

**Evolución del sistema reproductivo de *Oxalis alpina*
en la región de las Sky Islands**

Jessica Pérez Alquicira
Instituto de Ecología, UNAM

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS
POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. CÉSAR AUGUSTO PÉREZ TEJADA

México, D.F.

ABRIL 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a mi tutor principal, Dr. César Domínguez, por sus enseñanzas y por ser parte esencial de mi formación académica. Gracias por su confianza y por la libertad que me ha dado en todo momento.

Gracias, a los miembros de mi comité tutorial, Dr. Francisco Molina Freaner y Gerardo Pérez Ponce de León. Sus enseñanzas, apoyo y disponibilidad han sido cruciales en mi carrera.

Al Dr. Ken Oyama, agradezco que haya sido mi maestro de Ecología en la licenciatura.....

El Dr. Luis Eguiarte y el Dr. Daniel Piñero, a pesar de que no fueron parte de mi comité tutorial, siempre han sido parte de mi proyecto, sus acertados comentarios han sido cruciales en el mejoramiento de mi trabajo. Gracias por ser mis maestros en tantas materias!

A los miembros de mi jurado, muchas gracias por sus comentarios a mi tesis y por hacer visible lo que para mí era invisible. El trabajar en sus comentarios se convirtió en parte de mi entrenamiento como investigador.

Agradezco infinitamente al pueblo de México, al CONACYT y a la DGEP por darme una buena beca por más de 5 años. Gracias a las instituciones, CONACYT, PAPIIT y CONACYT-UC MEXUS por el apoyo económico para la realización de mi proyecto.

A mis papás.... uy..... les debo una más..... de un millón. Gracias por su infinito amor.

A mis amigos gracias porque siempre que volteo a verlos, ahí están caminando en paralelo conmigo.

A mi familia que tiene un tamaño efectivo grande.... gracias por su amor y apoyo.

A todos mis compañeros del laboratorio y a Rubick, gracias por su apoyo en cada momento, por sus consejos, por darme ánimo, por su entusiasmo y por su alegría.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

INTRODUCCION GENERAL

CAPÍTULO I: The role of historical factors and natural selection in the evolution of breeding Systems of *Oxalis alpina* in the Sonoran desert “Sky Islands”

CAPÍTULO II: Tiempo de divergencia y demografía histórica de *O. alpina* en la región de las Sky Islands (Noroeste de México y Suroeste de Estados Unidos)

CAPÍTULO III: La influencia de los eventos históricos en la estructura génica y evolución del sistema reproductivo de *O. alpina* en la región de las Sky Islands

DISCUSIÓN GENERAL

CONCLUSIONES GENERALES

RESUMEN

La evolución de los sistemas reproductivos en las plantas con flor ha sido un tema muy fecundo en el área de la biología evolutiva. En particular, entender los mecanismos del mantenimiento y disolución de los polimorfismos en los sistemas sexuales (más de un morfo sexual) han sido una de las preguntas más importantes en la biología reproductiva. La tristilia, uno de los sistemas sexuales más complejos en la naturaleza, se caracteriza por la presencia de tres morfos florales, cada uno se diferencia por la posición del estigma respecto al nivel de las anteras. Aunado a esta variación, existe un sistema de incompatibilidad que previene la autofecundación y la fecundación entre estigmas y anteras que se encuentran al mismo nivel. La tristilia ha llamado la atención de los investigadores debido a su gran potencial evolutivo. En la mayor parte de las especies en las que ocurre la tristilia, se han detectado múltiples modificaciones en este sistema. *Oxalis alpina*, es una especie tristílica cuya distribución más norteña ocurre en la región de las Sky Islands (noroeste de México y suroeste de Estados Unidos). En esta región *O. alpina* ocurre únicamente en las partes altas de las montañas. En cada rango montañoso hemos detectado diferentes variantes tristílicas que se caracterizan por la variación en la frecuencia de los morfos florales. Incluso hemos detectado poblaciones distílicas en donde el morfo intermedio se ha perdido. Asimismo el sistema de incompatibilidad, se ha modificado en distintos grados. Dada las múltiples variantes en el sistema reproductivo de *O. alpina*, en este trabajo analizamos la importancia de la selección natural y de los componentes históricos asociados a los cambios climáticos del Pleistoceno, en la disolución de la tristilia en *O. alpina*. Nuestros resultados basados en el modelaje de nicho ecológico, filogeografía y genética de poblaciones sugieren que la selección natural y a su vez los procesos históricos han influenciado la evolución del sistema reproductivo.

EVOLUCION DEL SISTEMA REPRODUCTIVO DE OXALIS ALPINA EN LA REGION DE LAS SKY ISLANDS

INTRODUCCION GENERAL

Al observar la naturaleza de manera cuidadosa no puede pasar por alto la gran variación en la que las plantas expresan su sexualidad. Dado que las flores son los órganos reproductivos de las angiospermas, la variación se expresa en formas, tamaños, colores y la disposición espacial de los órganos reproductivos femeninos y masculinos. Por ejemplo, aproximadamente el 90% de las angiospermas se reproducen a través de las dos vías sexuales, es decir son cosexuales. Existen especies que sólo producen flores hermafroditas (perfectas), otras que producen flores unisexuales y otras que producen una combinación de ambos tipos. El 10% de las especies restantes se reparte entre las especies dioicas (individuos masculinos e individuos femeninos) y otros tipos de polimorfismo sexual (ginodioicos, androdioicos y poligamodioicas) (Yampolski y Yampolski, 1922; Sakai y Weller, 1999). Esta enorme variación de los caracteres sexuales de las plantas ha atraído la atención de muchos biólogos evolutivos. Una de las principales aproximaciones a su estudio, han sido el evaluar desde una perspectiva ecológica el papel de los polinizadores en la diversidad de los sistemas sexuales (Castillo *et al.* 2002, Pérez Barrales *et al.* 2006; Sakai *et al.* 2006, Hodgins y Barrett 2008). Otro enfoque es el análisis genético y el papel de la endogamia y sus efectos negativos en dicha diversidad (Charlesworth y Charlesworth 1978). Sin embargo, pocos estudios han analizado el papel de la historia, como las transiciones climáticas del Pleistoceno, en la diversidad de los sistemas sexuales y como estos han influenciado la dinámica

evolutiva de las especies (Masta 2000; Cuevas *et al.* 2006). Entre los principales procesos históricos se encuentra la contracción y fragmentación del hábitat, la migración y la historia demográfica (Hewitt 2000, 2004).

En este contexto, uno de los sistemas sexuales más fascinantes y que representa uno de los paradigmas clásicos en el estudio de la evolución y la adaptación de las plantas, es la heterostilia (Barrett 1992). La heterostilia se caracteriza por presentar una variación en la posición relativa de los estigmas y las anteras. En las poblaciones pueden presentarse dos (distilia) o tres morfos florales (tristilia). Los sistemas distílicos presentan dos morfos florales, el morfo corto y el morfo largo, el primero se caracteriza por presentar el estigma por debajo del nivel de las anteras y en el morfo largo el estigma se encuentra por encima del nivel de las anteras. En los sistemas tristílicos existen tres morfos florales cada uno con dos niveles de anteras, el morfo corto presenta el estigma por debajo de los dos niveles de anteras, el morfo intermedio presenta el estigma entre los dos niveles de anteras y el morfo largo mantiene el estigma por encima de los dos niveles de anteras. Aunada a esta variación existe un sistema de incompatibilidad que previene la autofecundación y la fecundación entre estigmas y estambres que no se encuentren al mismo nivel (Fig. 1) (Barrett 1992).

La tristilia es uno de los sistemas más complejos de la naturaleza y su incidencia en la angiospermas es muy baja. Únicamente se ha detectado en seis familias. Existe evidencia experimental que indica que la tristilia se hereda bajo un sistema que incluye dos loci (S, M) cada uno con dos alelos, en donde el locus S es epistático sobre el M, es decir el primero domina la expresión del segundo gen (Fig. 1) (Weller 1976b; Lewis y Jones 1992). De acuerdo al modelo genético de la tristilia, se espera que la frecuencia de cada uno de los morfos florales sea la misma (Heuch

1979). La tristilia, además de ser uno de los sistemas más complejos, presenta una gran inestabilidad por su alta propensión para evolucionar hacia otros sistemas reproductivos (Weller 1992). Por ejemplo, en varias especies tristílicas existe una enorme variación en las frecuencias de los morfos florales hasta el grado de evolucionar hacia una condición distílica (dos morfos florales) u homostílica (un morfo floral). Se ha observado que la morfología floral y el sistema de incompatibilidad también pueden variar entre poblaciones de una misma especie (Barrett 1977a, b; Hodgins y Barrett 2007; Weller *et al.* 2007). Por tanto, entender los mecanismos por los cuales han variado estos sistemas requiere de un análisis que considere los procesos ecológicos e históricos.

En el presente trabajo estudiamos la influencia de los procesos históricos, en particular las oscilaciones climáticas ocurridas durante el Pleistoceno, en la evolución del sistema reproductivo de la especie heterostílica *Oxalis alpina* en las Sky Islands (Noroeste de México y Suroeste de Estados Unidos). Con este fin, integramos una aproximación filogeográfica, de genética de poblaciones y de modelaje de nicho ecológico. Asimismo, nuestros resultados son discutidos en función de la evidencia ecológica proveniente de estudios anteriores del sistema reproductivo de *O. alpina* (Weller *et al.* 2007; Sosenski *et al.* 2010).

En las siguientes secciones (1.1, 1.2 y 1.3) se describe el sistema reproductivo de *O. alpina*, el contexto histórico climático de la región de las Sky Islands, así como las evidencias sobre la relación entre las colonizaciones a nuevas regiones y la evolución de los sistemas reproductivos de las plantas.

1.1 El sistema reproductivo de *O. alpina* en la región de las Sky Islands

El sistema reproductivo de *O. alpina* en la región de las Sky Islands es muy variable. Se pueden encontrar poblaciones tristílicas isopléticas (los tres morfos florales se

encuentran en la misma frecuencia) ubicadas principalmente al sur de las Sky Islands y tristílicas anisopléticas (los tres morfos florales se encuentran en distinta frecuencia) concentradas en la región del norte (Fig. 1). En las poblaciones anisopléticas generalmente existe un exceso del morfo largo y una reducción del morfo intermedio, al grado de evolucionar hacia una condición distílica en donde el morfo intermedio está ausente (Fig. 1) (Weller *et al.* 2007). Asimismo, se ha detectado que el sistema de incompatibilidad presenta distintos grados de modificación (ver Tabla 1). Entre las principales modificaciones se encuentran la pérdida de incompatibilidad entre el morfo corto y largo. Estudios recientes muestran que esta condición ha promovido una desventaja reproductiva en el morfo intermedio, lo que resulta en una presión de selección en contra del alelo M (Weller *et al.* 2007). A su vez, se ha observado que en las poblaciones en donde se pierde la incompatibilidad entre el morfo corto y largo, el morfo intermedio puede producir semillas de autofertilización para compensar dicha desventaja reproductiva; sin embargo es posible que la depresión por endogamia limite el aumento en la frecuencia de este morfo. Se ha propuesto que esta situación ha promovido una desventaja reproductiva en el morfo intermedio. Debido a que la tristilia es un sistema morfológica y funcionalmente coordinado que promueve el entrecruzamiento entre los tres morfos florales, la reducción del morfo intermedio en *O. alpina* ha promovido una serie de reajustes en la morfología floral que se ajustan a la condición en donde únicamente dos morfos están presentes (Sosenski *et al.* 2010). Por ejemplo, se ha detectado que en las poblaciones distílicas la distancia entre las anteras medias del morfo largo y corto con el estigma complementario se ha reducido, por lo que ha aumentado la reciprocidad entre los órganos sexuales de ambos morfos durante la transición tristilia – distilia. De esta manera, las anteras

intermedias del morfo largo se encuentran a una altura similar al estigma del morfo corto, así como las anteras intermedias del morfo corto se localizan a una distancia similar al estigma del morfo largo (Sosenski *et al.* 2010).

1.2 El contexto histórico climático en la región de las Sky Islands (Noroeste de México y Suroeste de Estados Unidos)

La región de las Sky Islands se ubica al sureste de Arizona, suroeste de Nuevo México, noreste de Sonora y una pequeña porción del noroeste de Chihuahua. En esta región coexisten vegetaciones contrastantes como desiertos y bosques en latitudes similares pero permanecen aislados en gradientes altitudinales. Estas características, aunadas a que la topografía del lugar es altamente compleja y a que confluyen la Sierra Madre Occidental y las montañas Rocallosas, genera una zona de alta diversidad biológica. Asimismo esta región ha sido fuertemente impactada por las transiciones climáticas del Pleistoceno, las cuales han resultado en eventos vicariantes promoviendo el aislamiento y la divergencia entre las poblaciones, y por tanto favoreciendo la especiación (Masta 2000, 2002). Existe una gran cantidad de datos paleoclimáticos y paleontológicos que indican que durante el último máximo glacial (UMG, ocurrido hace aproximadamente 18,000 años) en esta región, noroeste de México y suroeste de Estados Unidos, los veranos eran más fríos y las lluvias de invierno eran más frecuentes (Metcalf 2006). En general la temperatura descendió entre 3 y 8 °C, dependiendo de la latitud (Van Devender 1990b). Asimismo, existe evidencia de la presencia de extensos lagos en esta región (Metcalf *et al.* 2000; Betancourt *et al.* 2001). Datos provenientes del registro de polen y de restos de vegetales preservados en las madrigueras del ratón *Neotoma* spp., muestran abundantes restos de pinos, como por ejemplo, *P. edulis*, *P. ponderosa* var. *arizona*, *P. leiophylla*, *P. strobiformis*, *P. engelmannii* y restos de diferentes especies

de *Juniperus*, entre ellas, *J. coahuilensis* y *J. scopulorum*. Estos datos indican una expansión de los bosques en los actuales desiertos de Sonora y Chihuahua durante el último máximo glacial (Van Devender 1990a, b; Metcalfe et al. 2000; Thompson y Anderson 2000; Holmgren et al. 2003). Sin embargo, a finales del Pleistoceno y principios del Holoceno (aproximadamente 10,000 años) conforme el clima comenzó a calentarse, la abundancia de *Pinus* y *Juniperus* disminuyó. Durante este periodo en los actuales desiertos se encontraron restos vegetales de *Chenopodiaceae*, *Poaceae* y *Asteraceae*, lo que implica un ambiente con menor precipitación y más cálido. Hace aproximadamente 4000 años la zona adquirió su forma actual y aparecieron las especies que caracterizan el desierto actual de Chihuahua y Sonora como *Dasyllirion wheeleri*, *Nicotiana obtusifolia*, *Parthenium incanum*, *Prosopis glandulosa*, entre otras (Van Devender 1990a, b; Metcalfe et al. 2000; Thompson y Anderson 2000; Holmgren et al. 2003). En resumen, los datos fósiles indican que existieron grandes extensiones de vegetación boscosa en los actuales desiertos de Sonora y Chihuahua durante el UMG, los cuales fueron reemplazados por los actuales desiertos durante la transición Pleistoceno – Holoceno.

Como resultado de este proceso los bosques experimentaron migraciones hacia latitudes mayores así como hacia los picos montañosos en donde las condiciones eran las óptimas para su desarrollo (Van Devender 1990a, b; Metcalfe et al. 2000; Thompson y Anderson 2000; Holmgren et al. 2003). En otras regiones del mundo, estos procesos históricos han resultado en intensos cuellos de botella y eventos fundador que han erosionado la variación genética (Petit et al. 1997, Hewitt 2000). En particular, se espera que en latitudes mayores las poblaciones hayan experimentado una mayor pérdida de la variación genética (Petit et al. 1997, Hewitt 2000,).

La distribución actual de los bosques en la cima de las montañas asemeja un archipiélago marino, en donde los picos montañosos serían las islas oceánicas y el desierto el océano que mantiene aisladas a las poblaciones. En estos sistemas, la restricción al flujo génico, las adaptaciones locales en cada isla y los procesos de deriva favorecen la divergencia de las especies (Barber 1999; DeChaine y Martin 2005; Holycross y Douglas 2007). Debido a que la fragmentación de las poblaciones es un evento que en tiempo evolutivo es muy reciente (10000 años), se ha observado una baja diferenciación genética en las poblaciones de reciente aislamiento (Masta 2000). Sin embargo, a nivel morfológico existe una enorme variación en caracteres, sobretodo en aquellos que son blanco de la selección natural y sexual, tal es el caso de las arañas *Habronattus pugillis* en donde los caracteres y conductas sexuales mostraron variación entre poblaciones (Masta y Maddison 2002), así como en el caso del sistema reproductivo de la especie *O. alpina* (Weller et al. 2007, Sosenski et al. 2010).

1.3 La migración y su influencia en la modificación del sistema reproductivo de las plantas

Diversos estudios han mostrado que los sistemas reproductivos de las plantas pueden modificarse durante eventos de colonización, debido a las condiciones climáticas y demográficas a las que se enfrentan (Brown y Marshall 1981). Entre los principales cambios que se han detectado en poblaciones de reciente colonización, destacan el rompimiento del sistema de incompatibilidad y la evolución de la autofecundación o de la asexualidad obligada (clonación). En el caso de la especie tristílica de hábito acuático, *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae), originaria de Brasil, se han detectado colonizaciones recientes de esta especie en las islas del Caribe y América Central. Se ha observado que en estas regiones las poblaciones

presentan altas tasas de autofecundación, lo cual se ha explicado como el resultado de la acción de la selección natural ante la ausencia de polinizadores (Barrett *et al.* 1989). Asimismo, existe evidencia genética que sugiere que la autofertilización ha evolucionado en varias ocasiones, lo cual apoya el argumento selectivo (Barrett *et al.* 2008). En otras especies tristílicas como *E. crassipes*, se ha encontrado un patrón similar al de *E. paniculata*, en donde la reproducción asexual y la autofecundación son frecuentes en las poblaciones de reciente colonización, mientras que en las poblaciones ancestrales su reproducción generalmente es por entrecruzamiento. En ambas especies a su vez, se ha detectado la pérdida de morfos florales. En el caso de *E. crassipes* se observó que el morfo intermedio está casi fijo, el morfo corto está ausente y el morfo largo se encuentra en bajas frecuencias (Barrett 1989). Por tanto, la evolución del sistema reproductivo de estas especies se ha asociado a los eventos históricos de colonización a nuevas regiones donde procesos estocásticos han provocado la pérdida de los morfos florales.

La autofertilización y reproducción clonal en zonas de reciente colonización se ha observado en otras especies. Entre ellas, *Elodea canadensis*, (Sculthorpe 1967), *Fallopia japonica* (Hollingsworth y Bailey 2000) y *Oxalis pes-caprae* (Ornduff 1987). Por tanto, la frecuente presencia de variación inter- e intra-específica en caracteres reproductivos, indica que muchas características relacionadas con la reproducción tienen una gran labilidad evolutiva, y por tanto tienen el potencial de responder ante los eventos estocásticos y selectivos durante la colonización de nuevas regiones. Como se mencionó anteriormente, uno de los patrones más generales y recurrentes es la evolución de la autocompatibilidad al expandir el rango de distribución. A su vez, en las especies que presentan algún tipo de polimorfismo sexual (i.e. dioicismo y

heterostilia), se ha observado la pérdida estocástica de los morfos sexuales (Husband y Barrett 1992; Eckert et al. 1996).

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es analizar la influencia de los factores históricos y de la selección natural en la evolución del sistema reproductivo de *O. alpina* en la región de las Sky Islands.

Nuestros objetivos particulares son los siguientes:

- 1) Analizar la estructura génica de *O. alpina* y conocer las relaciones genéticas entre las poblaciones distílicas y tristílicas con el fin de inferir el papel de la selección natural y la deriva génica en la evolución del sistema reproductivo de *O. alpina*.
- 2) Conocer la influencia de los procesos históricos como las fragmentaciones del habitat y migraciones ocurridas a consecuencia de las transiciones climáticas del Pleistoceno en la estructura génica y en los patrones de distribución del sistema reproductivo de *O. alpina*.
- 3) Estimar el tiempo de divergencia entre las poblaciones de *O. alpina* y asociar su divergencia con las transiciones climáticas del Pleistoceno.

HIPÓTESIS

- 1) Si la pérdida del morfo intermedio en las poblaciones distílicas ha ocurrido de manera independiente, se sugiere que la selección natural podría ser una fuerza evolutiva importante en la evolución de la distilia, ya que si únicamente fuera por azar, esperaríamos que cualquier otro morfo también estuviera ausente en las poblaciones.
- 2) Si *O. alpina* al igual que los bosques de coníferas experimentaron una expansión del rango de distribución al norte de las Sky Islands a finales del Pleistoceno,

entonces esperamos encontrar una menor variación genética en la región norte comparado con la zona sur.

3) De acuerdo a la evidencia experimental proveniente de diferentes especies de plantas, se ha propuesto que las poblaciones que han colonizado nuevas regiones, presentan mayores cambios en el sistema reproductivo. Por tanto, si *O. alpina* expandió su rango de distribución hacia el norte de las Sky Islands, esperamos encontrar que en las regiones de mayor latitud, el sistema reproductivo esté más modificado respecto a la tristilia típica. Por ejemplo que la frecuencia de los morfos florales no sea isoplética y que el sistema de incompatibilidad se haya modificado en distintos grados.

La tesis está estructurada en 3 capítulos. En el primero analizamos la estructura filogeográfica de *O. alpina*, así como las relaciones genéticas entre las poblaciones tristílicas y distílicas utilizando las secuencias de dos fragmentos de cloroplasto. Asimismo modelamos el nicho ecológico de *O. alpina* con el fin de predecir su distribución durante el UMG (último máximo glacial). El enfoque genético fue combinado con las inferencias del nicho ecológico con el fin de inferir la ruta evolutiva del sistema reproductivo. En el capítulo (2) estimamos el tiempo de divergencia de las poblaciones de *O. alpina*, utilizando la información del ADN de cloroplasto, y analizamos la historia demográfica de *O. alpina*. Finalmente en el capítulo (3) analizamos la estructura genética de *O. alpina* a través de los marcadores moleculares ISSR (inter simple sequence repeat) y comparamos estos resultados con los de cloroplasto. Obtuvimos un fenograma y reconstruimos la posible evolución del sistema reproductivo.

Referencias

- Barber PH. 1999. Phylogeography of the canyon treefrog, *Hyla arenicolor* (Cope) based on mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Ecology*. **8**: 547-562.
- Barrett SCH. 1977a. The breeding system of *Pontederia rotundifolia* L., a tristylous species. *New Phytologist*. **78**: 209-220.
- Barrett SCH. 1977b. Tristyly in *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms. (Water Hyacinth). *Biotropica*. **9**: 30-38.
- Barrett SCH. 1989. Waterweed invasions. *Scientific American*. **260**: 90-97.
- Barrett SCH. 1992. Evolution and function of Heterostyly. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Barrett S. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature*. **3**: 274-284
- Barrett SCH. 2003. Mating strategies in flowering plants: the outcrossing-selfing paradigm and beyond. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. **358**: 991-1004.
- Barrett SCH. 2008. Plant reproductive Systems and evolution during biological invasion. *Molecular Ecology*. **17**: 373-383.
- Barrett S, Colautti R, Echert C. 2008. Plant reproductive system and evolution during biological invasion. *Molecular Ecology*. **17**: 373-383.
- Betancourt JL, Rylander KA, Peñalba C, McVickar JL. 2001. Late Quaternary vegetation history of Rough Canyon, south-central New Mexico, USA. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. **165**: 71-95.
- Boyd A. 2004. Breeding system of *Macromeria viridiflora* (Boraginaceae) and geographic variation in pollinator assemblages. *American Journal of Botany*. **91**: 1809-1813.
- Brown AHD, Marshall DR. 1981. Evolutionary changes accompanying colonization in plants. En: Evolution Today: Proceedings of the Second International Congress of

Systematic and Evolutionary Biology (eds. Scudder GE, Reveal JL), pp. 351-363. Hunt Institute for Botanical Documentation, Carnegie-Mellon, Pittsburgh, Pennsylvania.

Castillo RA, Cordero C, Domínguez CA. 2002. Are reward polymorphisms subject to frequency- and density- dependent selection? Evidence from monoecious species pollinated by deceit. *Journal of Evolutionary biology*. **15**: 544-552.

Charlesworth B, Charlesworth D. 1978. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *American naturalist*. **112**: 975-997.

Cuevas E, Arias DM, Domínguez CA, Castillo RA, Molina-Freaner F. 2006. The genetic structure of the gynodioecious *Kallstroemia grandiflora* (Zygophyllaceae): the role of male sterility and colonization history. *Heredity*. **97**: 269-274.

DeChaine EG, Martin AP. 2005. Marked genetic divergence among Sky Island populations of *Sedum lanceolatum* (Crassulaceae) in the rocky mountains. *American Journal of Botany*. **92**: 477-486.

Downie DA. 2004. Phylogeography in a gallina insect, grape Phylloxera, *Daktulosphaira vitifoliae* (Phylloxeridae) in the fragmented habitat of the southwest USA. *Journal of Biogeography*. **31**: 1759-1768.

Eckert CG, Manicacci D, Barrett SCH. 1996. Genetic drift and founder effect in native versus introduced populations of an invading plant, *Lythrum salicaria* (Lythraceae). *Evolution*. **50**: 1512-1519.

Fenster CB, Barrett SCH. 1994. Inheritance of mating-system modifier genes in *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). *Heredity*. **72**: 433-445.

Ganders F. 1979. The biology of heterostyly. *New Zeland Journal of Botany*. **17**: 607-635.

- Graham C, Ron S, Santos J, Schneider C, Moritz C. 2004. Integrating phylogenetics and environmental Niche models to explore speciation mechanism in Dendrobatic frogs. *Evolution*. **58**: 1781-1793.
- Guggisberg A, Mansion G, Kelso S, Conti E. 2006. Evolution of biogeographic patterns, ploidy levels, and breeding Systems in a diploid-polyploid species complex of *Primula*. *New Phytologist*. **171**: 617-632.
- Heuch I. 1979. Equilibrium populations of heterostylous plants. *Theoretical Population Biology*. **15**: 43-57.
- Hewitt G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*. **405**: 909-913.
- Hewitt GM. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. **359**: 183–195.
- Hodgins KA, Barrett SCH. 2007. Population structure and genetic diversity in tristylous *Narcissus triandrus*: insights from microsatellite and chloroplast DNA variation. *Molecular Ecology*. **16**: 2317–2332.
- Hodgins K, Barrett SCH. 2008. Asymmetrical mating patterns and the evolution of biased morph ratios in a tristylous daffodil. *Genetics Research*. **90**: 3–15.
- Hollingsworth ML, Bailey JP. 2000. Evidence for massive clonal growth in the invasive weed (Japanese Knotweed). *Botanical Journal of the Linnean Society*. **133**: 463-472.
- Holmgren CA, Peñalba MC, Rylander KA, Betancourt JL. 2003. A 16,000 14C yr B.P. packrat midden series from the USA–Mexico Borderlands. *Quaternary Research*. **60**: 319–329.
- Holycross AT, Douglas ME. 2007. Geographic isolation, genetic divergence, and ecological non-exchangeability define ESUs in threatened sky-islands rattlesnake. *Biological conservation*. **134**: 142-154.

- Husband BC y Barrett SCH. 1992. Genetic drift and the maintenance of the style length polymorphism in tristylous populations of *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). *Heredity*. **69**: 440-449.
- Lewis D, Jones DA. 1992. The genetics of heterostyly. En: Evolution and function of heterostyly (Barrett SCH ed.), pp. 129–150. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Martinez-Meyer E, Peterson A, Hargrove WW. 2004. Ecological Niche as stable distributional constraints on mammal species, with implications for Pleistocene extinctions and climate change projections for. *Global Ecology and Biogeography*. **13**: 305-314. Biodiversity.
- Masta S. 2000. Phylogeography of the jumping spider *Habronattus pugillis* (Araneae: Salticidae): recent vicariance of sky island populations? *Evolution*. **54**: 1699-1711.
- Masta S, Maddison WP. 2002. Sexual selection driving diversification in jumping spiders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99**: 4442-4447.
- Metcalf SE, O'Hara SL, Caballero M, Davies SJ. 2000. Records of late Pleistocene–Holocene climatic change in Mexico – a review. *Quaternary Science Reviews*. **19**: 699–721.
- Metcalf SE. 2006. Late Quaternary environments of the northern deserts and central transvolcanic belt of Mexico. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **93**: 258–273.
- Pérez-Barrales R, Vargas P, Arroyo J. 2006. New evidences for the Darwinian hypothesis of heterostyly: breeding systems and pollinators in *Narcissus* sect. *Apodanthi*. *New Phytologist*. **171**: 553-567.
- Ornduff R. 1987. Reproductive systems and chromosome races of *Oxalis pes-caprae* L. and their bearing on the genesis of a noxious weed. *Annals of the Missouri Botanical*

Garden. **74**: 79–84.

Petit RJ, Pineau E, Demesure B, Bacilieri B, Ducouso A, Kremer A. 1997.

Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **94**: 9996–10001.

Pissard A, Ghislain M, Bertin P. 2006. Genetic diversity of the Andean tuber-bearing species, oca (*Oxalis tuberosa* Mol.), investigated by inter-simple sequence repeats. *Genome*. **49**: 8–16.

Sakai AK, Weller SG. 1999. Gender and sexual dimorphism in flowering plants: a review of terminology, biogeographic patterns, ecological correlates, and phylogenetic approaches (Geber MA, Dawson TE, Delph LF. eds), pp. 1–31. En *Sexual and gender dimorphism in flowering plants*. Springer-Verlag, Heidelberg.

Sakai AK, Weller SG, Wagner WL, Nepokroeff M, Culley TM. 2006. Adaptive radiation and evolution of breeding systems in *Schiedea* (Caryophyllaceae), an endemic Hawaiian genus. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **93**: 49–63.

Sosenski P, Fornoni J, Molina-Freaner FE, Weller SG, Dominguez CA. 2010. Changes in sexual organ reciprocity and phenotypic floral integration during the tristylous-distylous transitions in *Oxalis alpina*. *New Phytologist*. **185**: 829–840.

Sculthorpe CD. 1967. The biology of aquatic vascular plants, pp. 84–91. St. Martin's, New York.

Thompson RS, Anderson KH. 2000. Biomes of western North America at 18,000, 6000 and 0 14C yr BP reconstructed from pollen and packrat midden data. *Journal of Biogeography*. **27**: 555–584.

Van Devender TR. 1990a. Late Quaternary vegetation and climate of the Chihuahuan Desert, United States and Mexico. En: *Packrat Middens: the Last 40 000 years of*

- Biotic Changes (Betancourt JL, Van Devender TR y Martin PS eds), pp. 104–133. University of Arizona Press, Tucson, AZ.
- Van Devender, T.R. 1990b. Late Quaternary vegetation and climate of the Sonoran Desert, United States and Mexico. En: Packrat Middens: the Last 40 000 years of Biotic Changes (J.L. Betancourt, T.R. Van Devender & P.S. Martin, eds), pp. 134–165. University of Arizona Press, Tucson, AZ.
- Yampolsky C., Yampolsky H. 1922. Distribution of sex forms in the phanerogamic flora. *Bibliotheca Genetica*. **3**: 1-62
- Weller SG, Denton MF. 1976. Cytogeographic evidence for the evolution of distyly from tristily in the North American species of *Oxalis* section *Ionoxalis*. *American Journal of Botany*. **63**: 120-125.
- Weller SG. 1976b. The inheritance of tristily in *Oxalis* section *Ionoxalis*. *Heredity* **37**: 387–393.
- Weller SG. 1980. The incompatibility relationship of tristylous species of *Oxalis* section *Ionoxalis* in southern Mexico. *Canadian Journal of Botany*. **58**: 1908-1911.
- Weller SG. 1992. Evolutionary modifications of tristylous breeding system. En: Evolution and function of Heterostyly. Eds. Barrett SCH. Springer-Verlag, New York, USA.
- Weller SG, Dominguez CA, Molina-Freaner FE, Fornoni J, LeBuhn G. 2007. The evolution of distyly from tristily in populations of *Oxalis alpina* (Oxalidaceae) in the Sky Islands of the Sonoran desert. *American Journal of Botany*. **94**: 972–985.

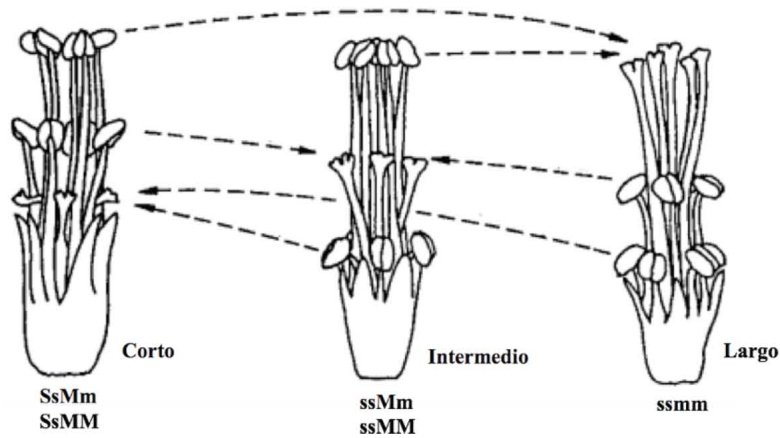


Figura 1. Esquema que muestra los tres morfos florales de las plantas tristílicas. De izquierda a derecha se muestra el morfo con estilo corto, medio y largo. Aunado al polimorfismo en el tamaño de los estilos y estambres, existe un sistema de incompatibilidad que previene la autofecundación y la fecundación entre estigmas y anteras que se encuentran a alturas distintas. Las líneas punteadas indican las cruzas compatibles. La genética de la tristilia se caracteriza por la interacción de dos genes que se encuentran en desequilibrio de ligamiento. La expresión del morfo de estilo corto depende de la presencia del alelo S, que es dominante sobre el s y tiene un efecto epistático sobre el gen M. cuando el locus S es homócigo recesivo y M está presente, se expresa el morfo intermedio. En el caso del morfo largo, los dos loci deben ser homócigos recesivos (Barrett 1992, 1993; Ganders 1979; Heuch 1979; Weller 1976a). De acuerdo a la determinación genética de la Distilia, la proporción esperada de cada morfo es la misma.

The role of historical factors and natural selection in the evolution of breeding systems of *Oxalis alpina* in the Sonoran desert 'Sky Islands'

J. PÉREZ-ALQUICIRA*, F. E. MOLINA-FREANER†, D. PIÑERO*, S. G. WELLER‡, E. MARTÍNEZ-MEYER§, J. ROZAS¶ & C. A. DOMÍNGUEZ*

*Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, México Distrito Federal, México

†Departamento de Ecología de la Biodiversidad, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Hermosillo, Sonora, México

‡Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of California, Irvine, CA, USA

§Departamento de Zoología, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México Distrito Federal, México

¶Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Keywords:

distyly;
 ecological niche modelling;
 genetic structure;
 historical factors;
 natural selection;
 phylogeography;
 Pleistocene;
 Sky Islands;
 tristily.

Abstract

Pleistocene climatic oscillations are known to influence the patterns of genetic diversity and the distribution of traits that are the target of selection. Here, we combine phylogeographical and ecological niche modelling (ENM) approaches to explore the influence of historical factors (Pleistocene climatic shifts) and natural selection on the evolution of distyly (two floral morphs) from tristily (three floral morphs) of *Oxalis alpina* in the Sky Islands of the Sonoran Desert. Molecular data and ENM indicate that historical factors have had a strong influence on the genetic structure and the geographical distribution of reproductive systems of *O. alpina*. Moreover, genetic results suggest the possibility that distylous populations do not represent a monophyletic group. We propose that the combined effects of natural selection and genetic drift have influenced the tristily–distyly transition.

Introduction

Plant reproductive systems exhibit a dramatic diversity that has attracted the attention of many naturalists and evolutionary biologists since Sprengel's times (Sprengel, 1793). This fascination has motivated many investigations into the selective forces responsible for the adaptation and the diversification of reproductive systems among flowering plants (Castillo *et al.*, 2002; Pérez-Barrales *et al.*, 2006; Sakai *et al.*, 2006; Hodgins & Barrett, 2008). Whereas these studies have emphasized the role of microevolutionary forces within populations, few have explored the influence of historical factors such as past migration, fragmentation and demographic history associated with events like climate oscillations. These events have produced shifts in the distributional range of plant species, and they are associated with founder events or

genetic bottlenecks that affect the evolutionary trajectory of populations (Hewitt, 2000, 2004) including the evolutionary dynamics of plant reproductive systems (Dorken & Barrett, 2004; Hodgins & Barrett, 2007). Species inhabiting regions that have been subject to strong climatic oscillations and that exhibit variation among populations in their reproductive system provide the opportunity to evaluate the relative importance of historical vs. microevolutionary processes for the evolution of plant reproduction (Eckert & Barrett, 1995; Dorken & Barrett, 2004; Hodgins & Barrett, 2007).

The Sky Islands from northwestern Mexico and southwestern USA are particularly interesting for studies of the effects of isolation and climatic fluctuation on evolutionary processes (Weller, 1979, 1986; Barber, 1999; Knowles, 2000; Masta, 2000; Downie, 2004; DeChaine & Martin, 2006; McCormack *et al.*, 2008; Moreno-Letelier & Piñero, 2009). These isolated mountain ranges have the northernmost extent of Madrean evergreen woodland, which becomes contiguous as it extends south into the Sierra Madre Occidental in northern Mexico (Brown & Lowe, 1980; Brown, 1982). Coniferous forest species in this region are restricted to

Correspondence: César A. Domínguez, Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-275, C.P. 04510, México Distrito Federal, México.
 Tel.: +52 55 5622 9039; fax: +52 55 5616 1976;
 e-mail: tejada@servidor.unam.mx

isolated mountaintop refugia surrounded by desert scrublands. The current distribution of coniferous forests in the Sky Islands is thought to be a consequence of the climate changes that characterized the end of the Pleistocene period (Van Devender, 1990a,b; Metcalfe *et al.*, 2000; Thompson & Anderson, 2000; Holmgren *et al.*, 2003). During the last glacial maximum (LGM), this region experienced an average decrease in temperature of 6 °C and an increased precipitation regime (Metcalfe, 2006). Analyses of macrofossils and pollen records from the present Sonoran and Chihuahuan deserts indicate that during the LGM, the landscape was characterized by extensive areas of woodland vegetation (including different species of *Pinus* and *Juniperus*) that reached lower latitudes and altitudes and maintained greater connectivity among populations through gene flow (Van Devender, 1990a,b; Metcalfe *et al.*, 2000; Thompson & Anderson, 2000; Holmgren *et al.*, 2003). The transition between the Pleistocene (11 000 years ago) and the Holocene epochs was characterized by climate changes that produced drier and warmer conditions and promoted a northward and upward range shift in cool-adapted species (Van Devender, 1990a,b; Metcalfe *et al.*, 2000). These processes, in turn, resulted in fragmentation and isolation of populations that were eventually restricted to the few mountaintops with the climate conditions necessary for the survival of these species.

Climatic oscillations and the range shifts they produced are expected to have left measurable traces in the genetic structure of populations. For instance, if latitudinal changes in range distribution produced repeated events of colonization and extinction from southern populations serving as refugia, southern populations should harbour higher levels of genetic variance, whereas northern ones should be genetically impoverished because of recent colonization (Petit *et al.*, 1997; Hewitt, 2000, 2004; Cuevas *et al.*, 2006). Additionally, altitudinal displacements may produce vicariant events restricting gene flow among disjunct populations, and thus allowing for different microevolutionary trajectories (Knowles, 2000; Masta, 2000).

Oxalis alpina (Rose) Knuth (section *Ionoxalis*, Oxalidaceae) is a heterostylous perennial herb inhabiting evergreen Madrean woodlands (Denton, 1973). Heterostyly is a reproductive system characterized by the presence of two (distyly) or three (tristyly) floral morphs differing in the relative length of their reproductive whorls. Tristyly, for example, has three floral morphs, the short-styled, mid-styled and long-styled morphs, which differ in the length of the styles as well as the positions of anther whorls. Each morph has two stamen whorls located at complementary positions within the flower, mid- and short stamens for the long-styled morph, long and short stamens for the mid-styled morph and mid- and long stamens for the short-styled morph (Fig. 1). This polymorphism is associated with an incompatibility system

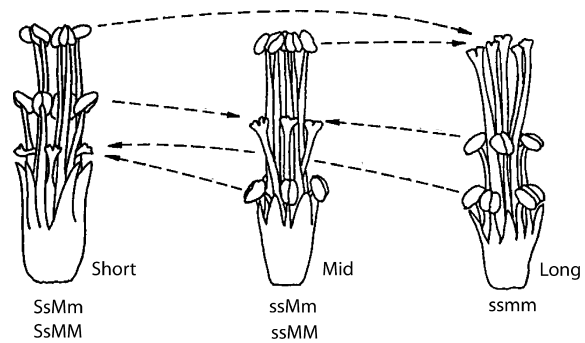


Fig. 1 Three floral morph of *Oxalis alpina* and their possible genotypes. The genetic system controlling tristyly, in those cases that have been investigated, consists of two linked loci, each with two alleles. The allele resulting in the short-styled morph is dominant (S), and when present, suppresses the expression of the allele governing expression of the mid-styled phenotype (M). The long-styled morph is homozygous and recessive at both the S and M loci. The dotted lines indicate the legitimate crosses, those leading to substantial seed production.

preventing seed production after crosses between stamens and styles located at different positions (illegitimate crosses, *sensu* Darwin, 1877). *Oxalis alpina* exhibits remarkable modifications among Sky Islands populations, indicating that its reproductive system is evolving from tristyly to distyly. Tristyly populations range from isopleth tristyly (equal frequency of the three morphs) to populations in which the mid-styled morph is very rare and the incompatibility system has been completely modified to resemble distyly populations (Weller *et al.*, 2007). Cytogeographical evidence indicates that tristyly species of section *Ionoxalis* in southern Mexico are highly diverse and typically diploid, whereas distyly species range further north and generally have higher chromosome numbers, a pattern suggesting that distyly is the derived condition in section *Ionoxalis* (Weller & Denton, 1976). A previous study in *O. alpina* indicated there is a negative relationship between the extent of incompatibility modification in the short- and long-styled morphs and the frequency of the mid-styled morph, suggesting that incompatibility modifications are responsible for the loss of the mid-styled morph in this species (Weller *et al.*, 2007). The derived nature of distyly in *O. alpina* is similar to the pattern found in section *Ionoxalis*. In addition to incompatibility modifications that result in the loss of the mid-styled morph, the evolution of distyly is characterized by morphological floral changes that follow a trend towards the establishment of a distyly phenotype (Sosenski *et al.*, 2010). Therefore, current evidence suggests that microevolutionary forces such as natural selection acting on the incompatibility system and flower morphology are responsible for the evolution of distyly in this species (Weller *et al.*, 2007; Sosenski *et al.*, 2010). However, because the Sky Islands have been subject to marked

climatic oscillations since the LGM, it is possible that genetic drift associated with historical colonizations has also played a role in the evolution of distyly.

The presence of populations representing different steps in the tristylous–distylous transition offers the opportunity to explore the relative importance of historical vs. selective processes in this evolutionary shift. Evidence of several independent evolutionary origins of distyly would support a selection-driven interpretation because the repeated evolution of distyly through the loss of the mid-styled morph is unlikely to be explained solely by genetic drift and founder events. If historical factors have also played a role on the evolution of *O. alpina* in the Sky Islands, we predict this influence should be expressed as a significant relationship between latitude and breeding system distribution and the magnitude of genetic variability. Southern populations should maintain the ancestral breeding system, whereas distyly, the derived breeding system, should be more common in recently colonized northern populations. Likewise, because southern populations acted as refugia during glacial maximums, these populations should harbour the highest levels of genetic variability.

In this article, we used a combination of phylogeographical and ecological niche modelling methods to analyse the role of historical factors and natural selection on the evolutionary transition from tristylous to distylous in *O. alpina* populations from the Madrean Sky Islands. We addressed the following questions: (i) Have climatic oscillations left a genetic signature among *O. alpina* populations? (ii) If so, is this effect also apparent in

breeding system distribution? (iii) Do genetic diversity and the genetic structure differ among tristylous and distylous populations? (iv) Does ecological niche modelling support the conclusions derived from genetic studies about the impact of historical factors on the genetic structure of *O. alpina*?

Materials and methods

Study species

Oxalis alpina is a herbaceous perennial plant found in temperate coniferous forest located at high elevations in the mountain ranges from southwestern United States to Guatemala (Denton, 1973). *Oxalis alpina* is mainly pollinated by solitary bees (*Heterosaurus bakeri* and *Heterosaurus neomexicanus*; Weller, 1981; C.A. Domínguez, personal observation); other flower visitors are dipterans (primarily Syrphidae), wasps and lepidoptera (Pieridae and Hesperidae; C.A. Domínguez, personal observation).

The chromosome number of *O. alpina* varies geographically, but in the Sky Islands region, those populations that have been sampled are uniformly tetraploid, suggesting they are monophyletic (Weller & Denton, 1976).

Sampling

From 2001 to 2004, bulbs were collected from fourteen tristylous and six distylous populations (Table 1) located at elevations above 1900 m in isolated mountain ranges

Table 1 Breeding system and chloroplast genetic variation for 20 populations of *Oxalis alpina* from the Sky Islands region.

Population	Geog. coord. (latitude; longitude)	RS	S : M : L (%)	IS	<i>n</i>	H	<i>h</i>	π
Santa Catalina	32.4279; 110.7552	D	57 : 0 : 50	C	10	1	0	0
Pinalaño	32.6459; 109.8508	D	53 : 0 : 47	?	15	1	0	0
Santa Rita	31.6772; 110.7452	D	53 : 0 : 47	?	11	3	0.34	0.0004
Pinery Chiricahua	31.9328; 109.2718	D	50 : 0 : 50	?	14	1	0	0
Sierra Ancha	33.8404; 110.9556	D	9 : 0 : 91	?	10	1	0	0
Pinal	33.2996; 110.8415	D	60 : 0 : 40	?	10	1	0	0
Miller Canyon Huachuca	31.4158; 110.2779	T	29 : 28 : 43	P	14	2	0.43	0.0008
Morse Canyon Chiricahua	31.8326; 109.3285	T	27 : 25 : 48	C	12	3	0.59	0.0009
San Luis	31.2184; 108.8283	T	46 : 21 : 34	N	11	4	0.60	0.0014
Los Ajos	30.9453; 109.9635	T	34 : 33 : 33	C	17	5	0.78	0.0021
La Púrica	30.5492; 109.7512	T	22 : 30 : 48	P	16	2	0.12	0.0004
San Jose	31.2572; 109.9901	T	22 : 24 : 53	P	13	2	0.38	0.0003
Animas	31.5671; 108.7774	T	27 : 29 : 44	C	11	2	0.53	0.0014
Mariquita	31.0537; 110.3834	T	34 : 36 : 30	N	18	1	0	0
Pinos Altos	32.9223; 108.2126	T	38 : 21 : 41	C	13	1	0	0
Galiuro	32.5170; 110.2639	T	?	?	15	1	0	0
White	33.6824; 109.4482	T	15 : 36 : 49	P	14	1	0	0
Buenos Aires	30.7285; 109.8343	T	33 : 33 : 34	P	10	1	0	0
Elenita	31.0461; 110.3827	T	39 : 32 : 29	P	11	2	0.43	0.0015
Azul	30.7412; 110.5732	T	33 : 34 : 33	N	5	1	0	0

RS, reproductive system; D, distylous and T tristylous; S : M : L indicate short : mid : long morph frequency; IS, incompatibility system; C, complete modification; P, partial modification; N, no modification; ?, information not available; *n*, sample size; H number of haplotypes; *h*, haplotype diversity; π , nucleotide diversity.

of Arizona, New Mexico, Sonora and Chihuahua. Bulbs were sampled at intervals of at least 1 m to minimize sampling the same genet. Bulbs were grown in a greenhouse at the Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México where foliar tissue (two leaves) was collected from 10 to 15 individuals from each population. Leaves were preserved in silica gel until DNA was extracted.

DNA extraction and sequencing

Total DNA was extracted using a modified version of the Doyle & Doyle (1987) procedure. These modifications involved grinding 100 mg of dry leaf tissue and adding 1.5 units of ribonuclease A (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and 2 units of proteinase k (Fermentas, Hanover, MO, USA). DNA was dissolved in 50 μ L of water (UltraPure™ water; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). An intergenic spacer from the chloroplast genome located between the *PsbA* [photosystem Q (B)] and *trnH* (histidine tRNA) genes was amplified by PCR (polymerase chain reaction) using the following pair of primers: *trnH* CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC (Tate & Simpson, 2003; Shaw *et al.*, 2005) and *psbA* GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C (Sang *et al.*, 1997; Shaw *et al.*, 2005). The NADH dehydrogenase subunit F (*ndhF*) gene was also amplified from chloroplast DNA using species-specific primers designed for this study (*NDH forward*: AAT GGT ACG TTA GGT TTG and *NDH reverse*: GGT AAT GCC TGC AGC TC). The PCRs were performed in 25 μ L final volume containing 20–60 ng of genomic DNA, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM dNTPs, 0.2 μ M of each primer, 1.5 units of Taq DNA polymerase, 2.5 μ L of 10 \times Buffer (Invitrogen). Amplification included 5 min at 80 °C; 30 cycles at 94 °C for 30 s, 55 °C for 30 s (*trnH-psbA*) or 60 °C (NADH) and 72 °C for 2 min; with a final extension for 5 min at 72 °C. PCR products were gel-purified with the QIAEX II Gel Extraction kit (Qiagen, Maryland, USA) following manufacturer's instructions. The sequencing reactions were performed by Macrogen DNA sequencing service (Seoul, Korea; <http://dna.macrogen.com>).

Data analysis

Sequences were aligned with BioEdit Sequence Alignment Editor (version 7.0.8; Hall, 1999) and later adjusted visually with MacClade (version 4.08; Maddison & Maddison, 2005). Before concatenating the two cpDNA regions (*trnH-psbA* intergenic fragment and *ndhF* gene), we first assessed the level of congruence between two fragments using the incongruence length difference test (ILD; Farris *et al.*, 1995) implemented in PAUP* (version 4.10b; Swofford, 2003) as the partition homogeneity test.

Genetic variability was estimated as haplotype diversity (h ; Nei, 1987) and nucleotide diversity (π ; Nei, 1987) using DnaSP (version 5; Librado & Rozas, 2009), whereas

total haplotype diversity (h_T) and the average diversity within population (h_S) were estimated following methods described by Pons & Petit (1996) using PERMUT (<http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/Software/PermutCpSSR/index.html>). To detect potential differences in the patterns of genetic variation in the northern and southern populations of the Sky Islands, we performed a regression analysis between latitude and the two estimators of variability (h , π). The normal distribution of residuals was tested by the Shapiro-Wilk W test. An ANOVA was carried out to test differences in the levels of genetic variability between distylous and tristylous populations using JMP (version 5.0; SAS Institute Inc., 2005); for this analysis, we included the genetic variation value for each population. We removed the effect of the latitude because there is an evident pattern in the distribution of reproductive systems, with distylous populations occurring mainly in the northern region of the Sky Islands.

To examine the partitioning of genetic variation within and between populations, as well as between distylous and tristylous populations, we performed a molecular analysis of variance (ANOVA) with 1000 permutations implemented in Arlequin (version 3.11; Excoffier *et al.*, 2005, University of Bern, Switzerland). We calculated other statistics of population differentiation including G_{ST} and N_{ST} because the comparison of both parameters provides useful information about phylogeographical structure (association between geography and gene genealogy; Pons & Petit, 1996). N_{ST} takes into account genetic similarities among haplotypes, and G_{ST} is based on the allele frequencies. A significantly higher value of N_{ST} indicates that more genetically similar haplotypes are also geographically closer, suggesting the presence of phylogeographical structure. The comparison of G_{ST} and N_{ST} was performed using PERMUT. We compared the calculated N_{ST} values with those obtained using 1000 random permutations of haplotype sequences to test whether $N_{ST} > G_{ST}$ (Burban *et al.*, 1999). The spatial analysis of molecular variance (SAMOVA) program (SAMOVA, version 1.0; Dupanloup *et al.*, 2002) was used to identify groups of populations based on genetic and geographical distances. The SAMOVA algorithm assigns populations to groups with the constraint that they must be geographically adjacent and genetically homogeneous. The main goal of this procedure is to create clusters with the highest among-group divergence and within-group relatedness. To find the maximum level of differentiation among groups (F_{CT}), we ran the program with $k = 2-10$ (where $k =$ number of groups) and 100 simulated annealing processes for each K group. Exact test of population differentiation based on a Markov Chain procedure were carried out among populations (Arlequin version 3.11; Excoffier *et al.*, 2005). To illustrate the genetic distance between populations, we generated a UPGMA phenogram using Nei's genetic distances Nei (1972) implemented in TFPGA (version 1.3;

Miller, 1997). Nodal support was estimated using bootstrap analysis with 1000 replicates. To assess the relationship between geographical and genetic distances (N_{ST}), we performed a Mantel test (Mantel, 1967) using the software *XLSTAT* (version 5.1; Addinsoft, Barcelona, Spain). The geographical distances between pairs of populations were calculated using *GeoDis* (version 2.6; Posada *et al.*, 2000). The relationship among haplotypes was determined using a statistical parsimony network (Templeton *et al.*, 1987, 1992) implemented in *TCS* (version 1.21; Clement *et al.*, 2000). We included three congeneric species as outgroups, *Oxalis latifolia* (Rose) Knuth, *Oxalis drummondii* (Gray) and *Oxalis magnifica* (Rose) Knuth; all section *Ionoxalis*, to root the network.

Ecological niche modelling

We used the desktop version 1.1.6 of the Genetic Algorithm for Rule-set Production (GARP) modelling system (Stockwell & Peters, 1999; <http://www.nhm.ku.edu/desktopgarp/index.html>) to identify the current climatic conditions under which the species maintains populations (i.e. its ecological niche). This method is based on the relationship between georeferenced occurrence data of the species and a set of 19 climatic parameters (drawn from the WorldClim database; Hijmans *et al.*, 2005), representing extreme, seasonal and mean conditions of temperature and precipitation in the area. The niche model was then projected onto the landscape to produce maps interpreted as the potential geographical distribution of the species (Soberón & Peterson, 2005).

To generate the niche-based distribution models, we used a set of 85 unique presence locations of *O. alpina* across the US and Mexico, from which 60 points were used for training the model and the remaining 25 for validating it using a chi-square analysis (Anderson *et al.*, 2003). GARP is a 'trial and error' system that uses a genetic algorithm to characterize the ecological niche of a species and produce a presence/absence map representing the areas where conditions are suitable for that species to establish (i.e. its potential distribution). A full description of the GARP algorithm can be found in Stockwell & Peters (1999).

To produce a potential distribution map for the LGM, the niche model was also projected onto a parallel geographical dataset representing the climatic conditions prevailing during the LGM according to the General Circulation Model of the Model for Interdisciplinary Research on Climate (MIROC, version 3.2; <http://www.ccsr.u-tokyo.ac.jp/~hasumi/MIROC/>), which was integrated and downscaled by R. Hijmans and made available at the WorldClim website (<http://www.worldclim.org/pastdown.htm>). Final grids for the present were at 0.01° pixel resolution (~1 km²) and 0.04° (~25 km²) for the LGM.

Given all the random processes involved in the construction of the niche model with GARP, two maps generated using the same datasets are usually somewhat different; thus, we produced 100 individual maps and selected a subset of the ten best models based on their performance according to omission and commission errors, following Anderson *et al.* (2003). The ten best models were summed together using GIS to obtain a final model with pixel values ranging from 0 to 10, where 0 represents the areas where all models predicted the species to be absent, 1 is a pixel in which one of 10 models predicted the species to be present, and so on, to 10, which represents those areas where all models predicted the presence of the species. This map was then converted to a presence-absence map, selecting as the threshold value those pixels in which all occurrences were correctly predicted, in this case corresponding to values 9 and 10. The same subset of best models was selected and processed identically for the LGM, resulting in one final map for the present and one for the Pleistocene. GARP has been used successfully to produce reliable distribution maps both in the present and in the past (Martínez-Meyer *et al.*, 2004; Martínez-Meyer & Peterson, 2006; Jakob *et al.*, 2009).

Results

Genetic variation

The two cpDNA regions yielded a total of 1104 base pairs (bp), consisting of 348 bp from *trnH-psbaA* spacer and 756 bp from *ndh F* gene. We detected seven nucleotide substitutions and only one indel (insertion-deletion) event. The two concatenated DNA fragments produced a total of eight haplotypes, with the haplotype number varying from one to five among populations. Nucleotide diversity (π) for the total sample was 0.0021; total haplotype diversity (h_T) was 0.79 and average diversity within population (h_S) was 0.21. The highest level of genetic variation was found in a tristylous population from Sierra Los Ajos, whereas 11 populations showed no genetic variation at all (Table 1). Both nucleotide diversity (average π for distylous populations = 0.00006, average π for tristylous populations = 0.00064; $t_{18} = -2.71$, $P = 0.015$) and haplotype diversity (average h for distylous populations = 0.057, average h for tristylous populations = 0.278; $t_{18} = -2.299$, $P = 0.034$) showed that tristylous populations maintain higher levels of genetic variation than distylous populations. Regression analyses showed a significant and negative relationship between latitude and both nucleotide and haplotype diversity (Fig. 2; $R^2 = 0.16$, $F_{1,18} = 4.75$, $P = 0.04$; $R^2 = 0.15$, $F_{1,18} = 4.48$, $P = 0.04$, respectively). We also found a significant negative association between latitude and mid-styled morph frequency ($R^2 = 0.28$, $F_{1,15} = 7.35$, $P = 0.02$). Further analysis indicated that distylous populations are located at higher latitudes than tristylous populations ($F_{1,18} = 6.47$, $P = 0.02$).

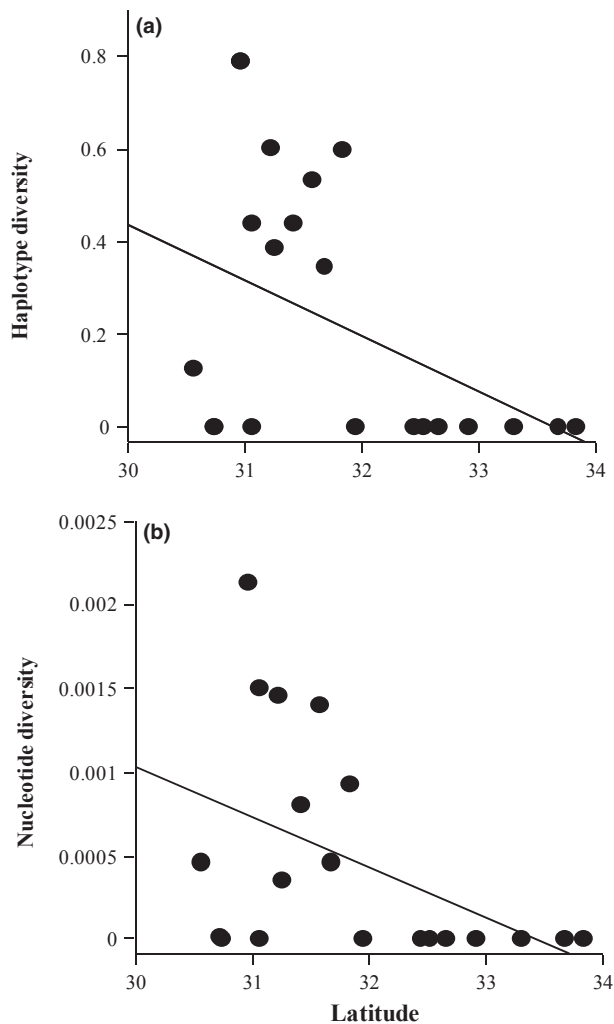


Fig. 2 Genetic diversity of *Oxalis alpina* populations from the Sky Islands region as a function of latitude (a) haplotype diversity (b) nucleotide diversity. The lines represent the adjustment to the linear regression model.

Because distylous populations are located at the northern range, and there is lower genetic variation at higher latitudes, we evaluated whether the differences in the levels of genetic variation between distylous and tristylous populations were an artefact owing to geographical location. Because residuals from these analyses between latitude and both π and h represent the amount of genetic variation not accounted for by latitude variation, we compared these values between reproductive systems. In both cases, we obtained nonsignificant results, suggesting that differences in latitude, but not between reproductive systems, account for the observed genetic differences between distylous and tristylous populations (π , $t = -1.15$, $P = 0.26$; h , $t = -1.01$, $P = 0.32$).

Genetic structure

AMOVA showed that almost 75% of the genetic variation was accounted for by differences among populations (Table 2). A hierarchical analysis further indicated that reproductive systems only explained 25% of the genetic variation, whereas more than half of the total genetic variation was accounted for by differences among populations within reproductive systems (Table 2). Results from two independent AMOVA's aimed to determine the extent of genetic structure within each reproductive system, indicated that distylous populations are more differentiated than tristylous populations (95.85% and 67.16% of among populations variation, respectively; see AMOVA from Table 2).

SAMOVA produced an optimum of five genetically distinct groups (Figs 3, 5): group A (Azul, Buenos Aires, Purica, Ajos and Animas), group B (Elenita, Mariquita and San Jose), group C (Chiricahua Morse, Santa Rita and Huachuca), group D (Galiuro, Pinos Altos, Pinaleño, Chiricahua Pinery, White, Santa Catalina and San Luis) and group E (Pinal and Sierra Ancha). Excepting Los Ajos (group A), populations within groups did not show significant genetic differentiation. Distylous populations were assigned to three different groups (groups C, D and E). Group E included only distylous populations, whereas groups C and D were composed of both distylous and tristylous populations. The UPGMA phenogram

Table 2 Analysis of molecular variance (AMOVA) among (a) 20 populations of *Oxalis alpina* in the Sky Islands region (b) reproductive system and populations within reproductive system (c) tristylous populations (d) distylous populations.

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
(a)				
Among populations	20	73.40	0.292	74.53*
Within populations	236	23.60	0.100	25.47*
Total	256	97.01	0.392	
(b)				
Among groups	1	45.80	0.349	24.48*
Among populations within groups	19	190.98	0.802	56.21*
Within populations	236	65.02	0.275	19.31*
Total	256	301.80	1.426	
(c)				
Among populations	14	48.70	0.269	67.16*
Within populations	172	22.69	0.131	32.84*
Total	186	71.40	0.401	
(d)				
Among populations	5	19.09	0.328	95.85*
Within populations	64	0.909	0.014	4.15*
Total	69	20	0.342	

*Indicates significant values ($P < 0.05$).

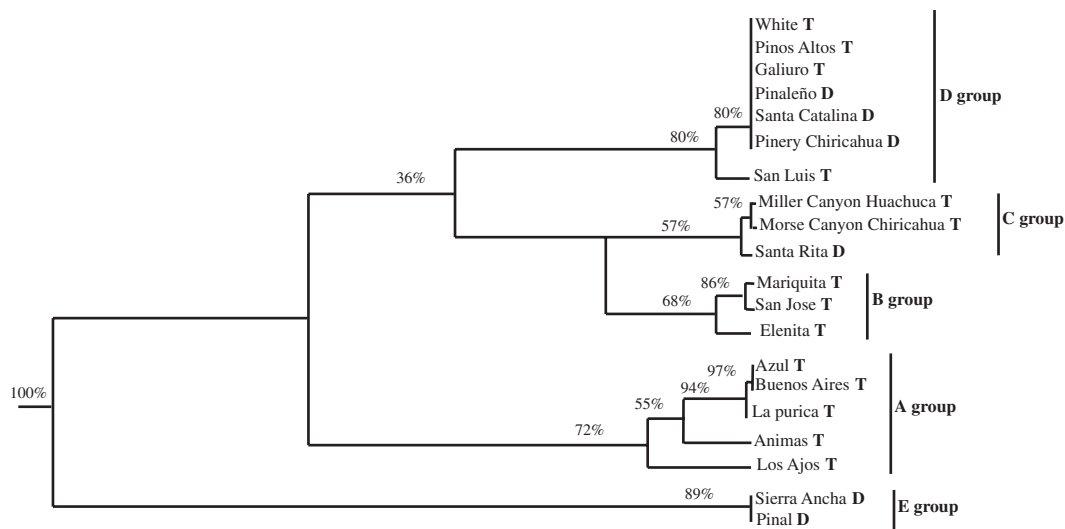


Fig. 3 UPGMA phenogram among 20 populations of *Oxalis alpina* from Sky Island region.

recovered the same five groups detected by SAMOVA, with bootstraps values ranging from 55% to 100%. The lower bootstrap value corresponded to group C (57%), whereas the highest value corresponded to the branch that separate group E from the other four groups (100%; Fig. 3). The UPGMA phenogram detected three additional groups, one associated with southern populations (group A from SAMOVA), a second one including the central and northern populations (groups B, C and D from SAMOVA), and one group with the northwestern populations (group E from SAMOVA).

The Mantel test revealed a significant association between genetic and geographical distance ($r = 0.42$, $P = 0.0001$), suggesting the occurrence of isolation by distance (Fig. 4). Although we found significant genetic structure among populations of *O. alpina* at the Sky Islands region, we did not detect a phylogeographical structure, because N_{ST} was not significantly higher than G_{ST} ($N_{ST} = 0.78$, $G_{ST} = 0.73$, $P = 0.07$).

Genealogy, frequency and geographical distribution of haplotypes

The different haplotypes in this network are all separated by one mutational step, except haplotypes H4 and H2, and haplotypes H1 and H6, (Fig. 5). The frequency of haplotypes showed a markedly skewed distribution with a clear dominance of H2 (48%). This haplotype occurred in 13 out of 20 sampled populations. The second most frequent haplotype was H1 (15%), which occurred in six populations from the Sky Islands. Both haplotypes are located in a central position within the network with two mutational steps separating them. H3, in contrast, was the less frequent haplotype (8%) and only occurred in three

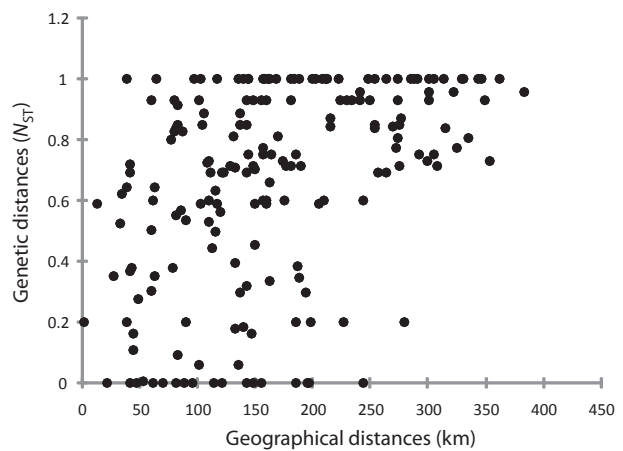


Fig. 4 Relationship between geographical and genetic distances (N_{ST}) for *Oxalis alpina* populations from Sky island region.

populations. The Los Ajos population had the only private haplotype (H8), that is, a haplotype occurring in only one population.

Seven out of eight haplotypes were found in tristylous populations, whereas four occurred in distylous populations (Fig. 5). The H1, H2 and H3 haplotypes were shared between distylous and tristylous populations. H4, the haplotype located at the tip of the network two mutational steps away from H2, was found only in the most northern distylous populations (Sierra Ancha and Pinal). According to the outgroup species, the ancestral haplotype is H2. Coalescent theory makes the same prediction, because ancestral haplotypes are expected in the central position of the network (Templeton *et al.*, 1995).

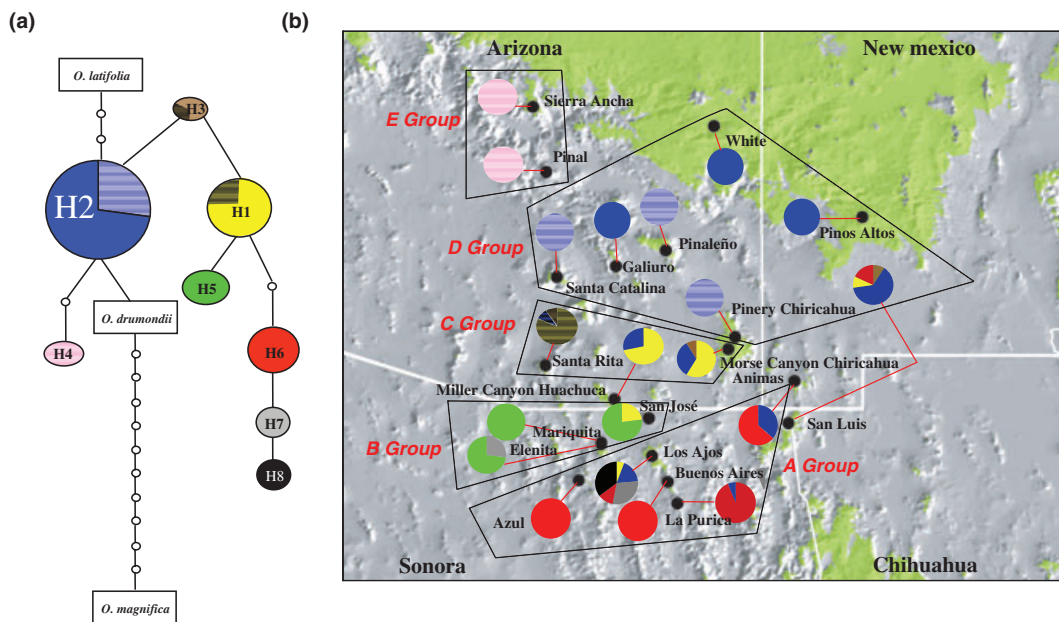


Fig. 5 (a) *Oxalis alpina* cpDNA haplotype network as inferred from maximum parsimony algorithm; three outgroup species were included to root the network. The size of circles corresponds to haplotype frequency and shading indicates the frequency of distylous populations haplotypes. White circles represent missing haplotypes (b) Geographical distribution and frequency of eight haplotypes of *O. alpina* from 20 populations in the Sky Island region and five groups of populations (delineated by polygons) detected by *sAMOVA* (spatial analysis of molecular variance). The shading pie graphics correspond to distylous populations.

Niche modelling and the putative Pleistocene distribution of *O. alpina*

The niche model for the present distribution of *O. alpina* was highly predictive. All ten best models showed low values of omission error for the extrinsic validation points (0–8%), significantly better than random expectation (χ^2 values > 150.0, $P = 0.0002$). In addition to the statistical performance, a visual inspection also indicates that models predicted regions of suitable habitat under current climate conditions that very precisely correspond with the known distribution of *O. alpina* in the Sky Islands, with no apparent major over prediction (Fig. 6a,b). A robust model for the present indicates that the critical variables determining the current distribution of the species are well characterized, a mandatory condition for projecting a model onto past climatic scenarios (Nogués-Bravo, 2009).

By projecting present-day models onto climate conditions for 18 000 years ago, *O. alpina* was predicted to have had two distinct distributional areas. One relatively small and fragmented area included the western part of central Arizona, ending just east the Sierra Ancha. A second, larger and more continuous distributional area included southeastern Arizona, southwestern New Mexico, northern Chihuahua and a small area in northern Sonora (Fig. 6c). The climate changes occurring since the Pleistocene appear to have produced dramatic shifts

in the distributional area of this species (Fig. 6c). The formerly large and continuous populations from south-eastern Arizona are now represented by a highly fragmented relictual distribution confined to high elevation mountains with almost no geographical overlap between the two time periods (Fig. 6c). Post-Pleistocene changes were also characterized by a northern distributional expansion involving the colonization of the White and Pinos Altos Mountains, whereas Sierra Ancha and Pinal may have been colonized by the northern refuge located at the western part of central Arizona (Fig. 6c). Finally, the process also included the colonization of high elevation peaks in Sonora, Chihuahua, southeastern Arizona, and southwestern New Mexico; probably from the large populations located in the southeastern and central portions of the Sky Islands distribution of *O. alpina* (Fig. 6c).

Discussion

Oxalis alpina harbours relatively high levels of genetic variation and has significant genetic structure among populations. In accordance with our expectations, there was a significant and negative relationship between latitude and both the frequency of the mid-styled morph and genetic diversity. These results support the hypothesis that range shifts produced by climatic oscillations influenced the genetic structure of *O. alpina*, but also the

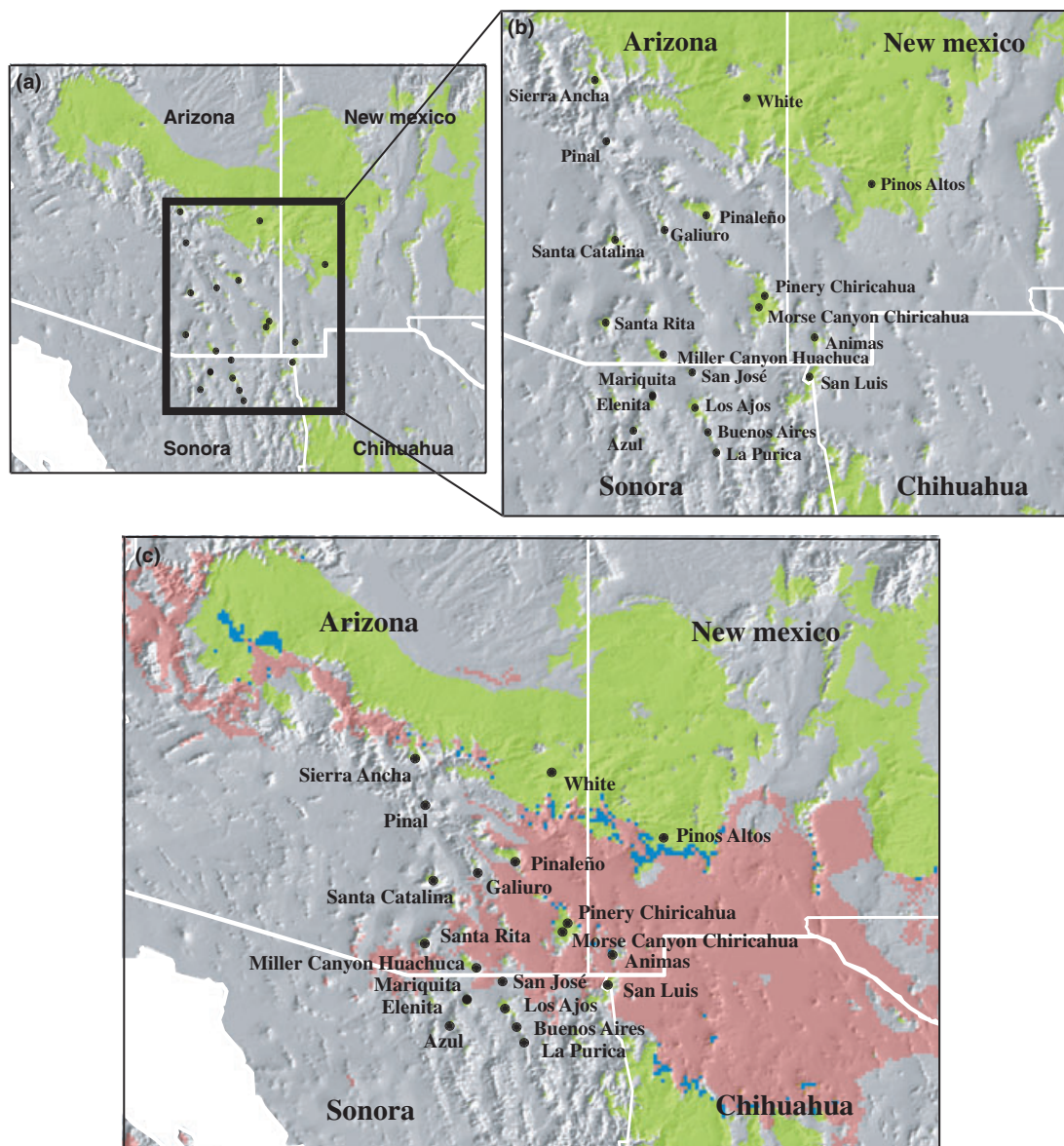


Fig. 6 Models for present and past distribution of *Oxalis alpina* from northwestern Mexico and southwestern USA. (a) Present distribution, (b) detail of the present distribution in the Sky Islands, (c) last glacial maximum (~18 000 year ago; pink) and present (green); blue areas correspond to shared distribution in both periods of time.

evolution of reproductive systems because distylous populations are mainly located at ranges where founder events were likely to have had a prominent role. Nonetheless, the likelihood of multiple evolutionary transitions to distyly in several populations of the Sky Islands and the reduction of the frequency of the mid-styled morph as a consequence of incompatibility changes between long- and short-styled morphs suggest that selective processes also influenced the evolution of distyly. Once natural selection has reduced the frequency of the mid-styled morph, this morph is especially

susceptible to loss during founder events and bottlenecks associated with climatic oscillations.

Oxalis alpina showed significantly higher levels of cpDNA diversity than the average value obtained by Petit *et al.* (2005) for 32 perennial herbs (cpDNA data; $h_T = 0.79$ and $h_T = 0.69$, respectively; 95% confidence interval for a sample of 32 species = 0.6–0.76). This difference was not because of variation in the number of populations sampled in each study because there was not a significant relationship between the number of populations sampled and h_T ($F_{1,27} = 1.43$, $P = 0.25$). Instead,

given that the estimation of h_T was much higher than the average h_S , the relatively high level of genetic variation found in *O. alpina* could be better explained as a consequence of a strong genetic structure, but also as a consequence of high effective population sizes at the southern range of the distribution. Haplotype diversity was also high in comparison with two other *Oxalis* species (Zietsman *et al.*, 2009), *Oxalis tomentosa* ($h_T = 0.352$) and *Oxalis oligophylla* ($h_T = 0.395$), and equivalent to that of *Oxalis purpurea* ($h_T = 0.771$). Nonetheless, because these estimations are based in small sample sizes (2, 1 and 1 population for *O. tomentosa* (L.f.), *O. oligophylla* (Salter) and *O. purpurea* (L.), respectively), we do not know whether the amount of genetic variation of *O. alpina* is really higher than that of other *Oxalis* species.

Both the geographical distribution of genetic variation and niche modelling analyses suggest that most of the contemporary distribution of this species is a consequence of relatively recent colonization from a large and continuous distribution in the southern and central part of the Sky Islands that harboured high levels of genetic variation. Accordingly, the latitudinal impoverishment of genetic variation could be a consequence of a series of founder events followed by range expansion, especially in the northernmost populations. Although this interpretation holds for most populations, both the Sierra Ancha and Pinal populations seem to have followed a different path and probably originated from the fragmented populations located in the northwestern part of central Arizona. These two populations are fixed for a single haplotype that is at the tip of the network and is not shared by any other population. Hence, the genetic uniqueness and northern position of these populations, along with evidence derived from niche modelling analyses suggesting the presence of isolated *O. alpina* populations at relatively high latitudes during the LGM (18 000 years ago), further suggest these populations resulted from an ancient divergence event.

In addition to latitudinal differences in genetic variation, we found significant genetic structure among *O. alpina* populations. Some of the factors that have contributed to this pattern of genetic variation are the low seed dispersion and the restricted microhabitat of *O. alpina*. Although the estimated G_{ST} (0.73) indicates the presence of a strong level of genetic differentiation, this value falls within the range reported for other perennial herbs (0.67; Petit *et al.*, 2005), a result indicating that the montane archipelago habitat does not increase genetic differentiation beyond what is expected for any other perennial herb. Absence of increased genetic divergence related to isolation on montane peaks could be a consequence of the short time elapsed since this archipelago was colonized. *SAMOVA* results further indicated the presence of five genetically homogeneous groups that were arranged in a latitudinal fashion and showed a clinal decrease in the magnitude of within-group genetic differentiation. Hence, the observed patterns of genetic

differentiation also support our interpretation of colonization from populations established at lower altitudes and latitudes during the LGM. This pattern has been observed in several species whose distribution was affected by latitudinal climatic oscillations (Broyles, 1998; Nason *et al.*, 2002; Hampe *et al.*, 2003; Cuevas *et al.*, 2006).

N_{ST} was not significantly higher than G_{ST} suggesting that there is no phylogeographical structure among *O. alpina* populations (more genetically similar haplotypes are not geographically closer). Nonetheless, the Mantel test revealed a significant pattern of isolation by distance and therefore a relationship between genetic and geographical distances. This apparent contradiction could be a consequence of the low mutation rate of cpDNA and shallow time of evolutionary divergence, which have not allowed enough time for new mutations to erase the signature of ancestral gene flow. Populations may share ancestral polymorphisms because of incomplete lineage sorting (Masta, 2000). The same pattern has been found for a galling insect, grape phylloxera (Downie, 2004), white pine (Moreno-Letelier & Piñero, 2009), tree frogs (Barber, 1999) and jumping spiders (Masta, 2000) inhabiting the Sonoran Sky Islands. Moreover, the tree frog and jumping spiders studies as well as our study of *O. alpina* all found high levels of genetic similarity among populations from Santa Rita and Huachuca mountains, and from those of the Santa Catalina, Galiuro and Pinaleno mountains. Hence, all these studies suggest that climatic oscillations in the Sky Islands may have imposed a similar pattern of range expansion and contraction on assemblages of species inhabiting coniferous forests. Finally, because incomplete lineage sorting is apparent in all the species studied so far, it is likely that population differentiation is an ongoing process at this region.

Although historical factors could have influenced the evolutionary breakdown of tristylous and the pattern of distribution of reproductive system of *O. alpina*, the available evidence suggests that distylous has probably evolved on several occasions in the Sky Islands. Genetic and ecological lines of evidence support this conclusion. First, the magnitude of genetic differentiation is 40% higher among distylous populations than tristylous populations, a result that is also supported by Weller (1978), where the crossability and fitness of the hybrids among distylous populations from the Sky Islands was lower than hybrids from tristylous populations. Because tristylous is ancestral to distylous (Weller *et al.*, 2007), a single origin of distylous is not consistent with the high level of genetic differentiation found among distylous populations in this study. Second, distylous populations were found in three out of the five genetically homogeneous groups produced by *SAMOVA*. The same five groups were recovered by the UPGMA phenogram. Tristylous occurred in two of the groups with distylous, and in these cases, no genetic differences were found between populations with

different reproductive systems, suggesting that distyly in both groups is very recently evolved. According to niche modelling, the distylous populations, Sierra Ancha and Pinal Mts. populations were isolated in a northwest refuge during last glacial maximum. In addition to this result, the occurrence of a haplotype two mutational steps (H4) from the ancestral haplotype (H2) suggests an ancient divergence of these populations. Third, phylogeography studies performed on jumping spiders (*Habronattus pugilis*, Griswold) and tree frogs (*Hyla arenicolor*, Cope) indicate that during the LGM, there was a barrier to gene flow between the Galiuro, Pinaleño and Santa Catalina Mountains and the Huachuca and Santa Rita Mountains (Barber, 1999; Masta, 2000). Given that we also found the same pattern of genetic differentiation between these mountain ranges, the presence of distyly in both groups suggests distyly has evolved independently in these two complexes of mountains. These different lines of evidence suggest distyly might have originated on three different occasions, although our results are preliminary and require further support with additional molecular markers.

An integrated approach from phylogeography and ecological niche modelling has provided a powerful tool to study the evolutionary history of *O. alpina* in the Sky Island region. We have found that historical factors (climatic oscillations) have had a major influence on the genetic structure with an impoverishment of genetic variation at northernmost ranges. Our results also indicate that the action of genetic drift alone on the evolution of distyly is less likely because under this hypothesis we would not expect consistent loss of the mid-styled morph in isolated populations. Theoretical models and empirical studies indicate that short-styled morph is more susceptible to loss under the action of genetic drift than the other morphs (Heuch, 1980; Eckert & Barrett, 1992; Husband & Barrett, 1992), which we have not observed in any populations of *O. alpina*. Therefore, the convergent evolution of distyly through the loss of mid-styled morph, the congruence in the floral morphology among distylous populations and the strong negative association between loss of incompatibility reactions and the reduction of mid-styled morph (Weller *et al.*, 2007; Sosenski *et al.*, 2010) suggest natural selection has played an important role in the evolution of this sexual system. In other distylous species of *Oxalis*, the mid-styled morph is always the floral morph that is lost, indicating that the selection model for *O. alpina* may be widespread in section *Ionoxalis*. However, because distyly in *O. alpina* is mainly distributed in areas where founder events have been stronger, it is possible that genetic drift has also played a role in loss of mid-styled morph. We propose that the combined effects of natural selection against the mid-styled morph and genetic drift resulting in further reductions in the frequency of the mid-styled morph have influenced the tristily – distyly transition.

Acknowledgments

We extend thanks to Rubén Pérez for technical assistance; Luis Eguiarte and Juan Fornoni for the helpful comments on the manuscript and Michael Hickerson for discussion of ideas. J.P.-A. acknowledges the academic support received from the Doctorado en Ciencias Biomédicas and The Instituto de Ecología of the Universidad Nacional Autónoma de México. She was supported by PhD fellowships from CONACYT and UNAM-DGEP, and by an international mobility scholarship from CONACYT and the Society of Systematic Biology. Our project was also supported by grants from UC-MEXUS, UNAM (DGAPA IN217803) and CONACYT (47858-Q).

References

- Anderson, R.P., Lew, D. & Peterson, A.T. 2003. Evaluating predictive models of species' distributions: criteria for selecting optimal models. *Ecol. Modell.* **162**: 211–232.
- Barber, P.H. 1999. Phylogeography of the canyon treefrog, *Hyla arenicolor* (Cope) based on mitochondrial DNA sequence data. *Mol. Ecol.* **8**: 547–562.
- Brown, D.E. 1982. *Desert Plants: Biotic Communities of the America Southwest – United States and Mexico*. University of Utah Press, Salt Lake City, UT.
- Brown, D.E. & Lowe, C.H. 1980. *Biotic Communities of the Southwest*. University of Arizona Press, Tucson, AZ.
- Broyles, S.B. 1998. Postglacial migration and the loss of allozyme variation in northern populations of *Asclepias exaltata* (Asclepiadaceae). *Am. J. Bot.* **85**: 1091–1097.
- Burban, C., Petit, R.J., Carcreff, E. & Jactel, H. 1999. Rangewide variation of the maritime pine bast scale *Matsucoccus feytaudi* Duc. (Homoptera: Matsucoccidae) in relation to the genetic structure of its host. *Mol. Ecol.* **8**: 1593–1602.
- Castillo, R.A., Cordero, C. & Domínguez, C.A. 2002. Are reward polymorphisms subject to frequency- and density-dependent selection? Evidence from a monoecious species pollinated by deceit. *J. Evol. Biol.* **15**: 544–552.
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* **9**: 1657–1660.
- Cuevas, E., Arias, D.M., Domínguez, C.A., Castillo, R.A. & Molina-Freaner, F. 2006. The genetic structure of the gynodioecious *Kallstroemia grandiflora* (Zygophyllaceae): the role of male sterility and colonization history. *Heredity* **97**: 269–274.
- Darwin, C. 1877. *The Different Forms of Flowers on Plants of the same Species*. Murray, London.
- DeChaine, E.G. & Martin, A.P. 2006. Using coalescent simulations to test the impact of Quaternary climate cycles on divergence in an alpine plant-insect associations. *Evolution* **60**: 1004–1013.
- Denton, M.F. 1973. A monograph of *Oxalis*, section *Ionoxalis* (Oxalidaceae) in North America. In: Publications of the Museum. Michigan State University Biological Series. Vol 4: 455–615.
- Dorcen, M.E. & Barrett, S.C.H. 2004. Chloroplast haplotype variation among monoecious and dioecious populations of *Sagittaria latifolia* (Alismataceae) in eastern North America. *Mol. Ecol.* **13**: 2699–2707.

- Downie, D.A. 2004. Phylogeography in a galling insect, grape phylloxera, *Daktulosphaira vitifoliae* (Phylloxeridae) in the fragmented habitat of the Southwest USA. *J. Biogeogr.* **31**: 1759–1768.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.J. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* **19**: 11–15.
- Dupanloup, I., Schneider, S. & Excoffier, L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol. Ecol.* **11**: 2571–2581.
- Eckert, C.G. & Barrett, S.C.H. 1992. Stochastic loss of style morphs from populations of tristylous *Lythrum salicaria* and *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Evolution* **46**: 1014–1029.
- Eckert, C.G. & Barrett, S.C.H. 1995. Style morph ratios in tristylous *Decodon verticillatus* (Lythraceae): selection vs. historical contingency. *Ecology* **76**: 1051–1066.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.11, an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* **1**: 47–50.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G. & Bult, C. 1995. Constructing a significance test for incongruence. *Syst. Biol.* **44**: 570–572.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**: 95–98.
- Hampe, A., Arroyo, J., Jordano, P. & Petit, J. 2003. Rangewide phylogeography of a bird-dispersed Eurasian shrub: contrasting Mediterranean and temperate glacial refugia. *Mol. Ecol.* **12**: 3415–3426.
- Heuch, I. 1980. Loss of incompatibility types in finite populations of the heterostylous plant *Lythrum salicaria*. *Hereditas.* **27**: 318–336.
- Hewitt, G.M. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**: 907–913.
- Hewitt, G.M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **359**: 183–195.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G. & Jarvis, A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. J. Climatol.* **25**: 1965–1978.
- Hodgins, K.A. & Barrett, S.C.H. 2007. Population structure and genetic diversity in tristylous *Narcissus triandrus*: insights from microsatellite and chloroplast DNA variation. *Mol. Ecol.* **16**: 2317–2332.
- Hodgins, K.A. & Barrett, S.C.H. 2008. Asymmetrical mating patterns and the evolution of biased morph ratios in a tristylous daffodil. *Genet. Res.* **90**: 3–15.
- Holmgren, C.A., Peñalba, M.C., Rylander, K.A. & Betancourt, J.L. 2003. A 16,000 ¹⁴C yr B.P. packrat midden series from the USA–Mexico Borderlands. *Quat. Res.* **60**: 319–329.
- Husband, B.C. & Barrett, S.C.H. 1992. Genetic drift and the maintenance of the style length polymorphism in tristylous populations of *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). *Heredity* **69**: 440–449.
- Jakob, S.S., Martínez-Meyer, E. & Blattner, F.R. 2009. Phylogeographic analyses and paleodistribution modeling indicate Pleistocene in situ survival of *Hordeum* species (Poaceae) in southern Patagonia without genetic or spatial restriction. *Mol. Biol. Evol.* **26**: 907–923.
- Knowles, L.L. 2000. Test of Pleistocene speciation in montane grasshoppers (genus *Melanoplus*) from the sky islands of western North America. *Evolution* **54**: 1337–1348.
- Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP version 5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451–1452.
- Maddison, W.P. & Maddison, D.R. 2005. *MacClade Version 4.08: Analysis of Phylogeny and Character Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Res.* **27**: 209–220.
- Martínez-Meyer, E. & Peterson, A.T. 2006. Conservatism of ecological niche characteristics in North American plant species over the Pleistocene-to-Recent transition. *J. Biogeogr.* **33**: 1779–1789.
- Martínez-Meyer, E., Townsend Peterson, A. & Hargrove, W.W. 2004. Ecological niches as stable distributional constraints on mammal species, with implications for Pleistocene extinctions and climate change projections for biodiversity. *Global Ecol. Biogeogr.* **13**: 305–314.
- Masta, S. 2000. Phylogeography of the jumping spider *Habronattus pugillis* (Araneae: Salticidae): recent vicariance of sky islands populations? *Evolution* **54**: 1699–1711.
- McCormack, J.E., Bowen, B.S. & Smith, T.B. 2008. Integrating paleoecology and genetics of bird populations in two sky island archipelagos. *BMC Biol.* **27**: 6–28.
- Metcalf, S.E. 2006. Late Quaternary environments of the northern deserts and central transvolcanic belt of Mexico. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **93**: 258–273.
- Metcalf, S.E., O'Hara, S.L., Caballero, M. & Davies, S.J. 2000. Records of late Pleistocene–Holocene climatic change in Mexico – a review. *Quat. Sci. Rev.* **19**: 699–721.
- Miller, M.P. 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: a windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Distributed by the author.
- Moreno-Letelier, A. & Piñero, D. 2009. Phylogeographic structure of *Pinus strobiformis* Engelm. across the Chihuahuan Desert filter-barrier. *J. Biogeogr.* **36**: 121–131.
- Nason, J.D., Hamrick, J.L. & Fleming, T.H. 2002. Historical vicariance and postglacial colonization effects on the evolution of genetic structure in *Lophocereus*, a Sonoran desert columnar cactus. *Evolution* **56**: 2214–2226.
- Nei, M. 1972. Genetic distances between populations. *Am. Nat.* **106**: 283–292.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nogués-Bravo, D. 2009. Predicting the past distribution of species climatic niches. *Global Ecol. Biogeogr.* **18**: 521–531.
- Pérez-Barral, R., Vargas, P. & Arroyo, J. 2006. New evidences for the Darwinian hypothesis of heterostyly: breeding systems and pollinators in *Narcissus* sect. *Apodanthi*. *New Phytol.* **171**: 553–567.
- Petit, R.J., Pineau, E., Demesure, B., Bacilieri, B., Ducousso, A. & Kremer, A. 1997. Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**: 9996–10001.
- Petit, R.J., Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Salvini, D. & Vendramin, G.G. 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Mol. Ecol.* **14**: 689–701.
- Pons, O. & Petit, R.J. 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics* **144**: 1237–1245.

- Posada, D., Crandall, K.A. & Templeton, A.R. 2000. GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Mol. Ecol.* **9**: 487–488.
- Sakai, A.K., Weller, S.G., Wagner, W.L., Nepokroeff, M. & Culley, T.M. 2006. Adaptive radiation and evolution of breeding systems in *Schiedea* (Caryophyllaceae), an endemic Hawaiian genus. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **93**: 49–63.
- Sang, T., Crawford, D.J. & Stuessy, T.F. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Am. J. Bot.* **84**: 1120–1136.
- SAS Institute Inc. 2005. *JMP version 5*. SAS: Cary, NC, USA.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Beck, J.T., Farmer, S.B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K.C., Winder, C.T., Schilling, E.E. & Small, R.L. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am. J. Bot.* **92**: 142–166.
- Soberón, J. & Peterson, A.T. 2005. Interpretation of models of fundamental ecological niches and species' distributional areas. *Biodivers. Inform.* **2**: 1–10.
- Sosenski, P., Fornoni, J., Molina-Freaner, F.E., Weller, S.G. & Dominguez, C.A. 2010. Changes in sexual organ reciprocity and phenotypic floral integration during the tristily-distily transitions in *Oxalis alpina*. *New Phytol.* **185**: 829–840.
- Sprengel, C.K. 1793. *Das entdeckte Geheimniss der Natur im Bau und in der Befruchtung der Blumen I*. Friedrich Vieweg, Berlin.
- Stockwell, D.R.B. & Peters, D. 1999. The GARP modelling system: problems and solutions to automated spatial prediction. *Int. J. Geogr. Inf. Sci.* **13**: 143–158.
- Swofford, D.L. 2003. *PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods. Version 4.0b10)*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Tate, J.A. & Simpson, B.B. 2003. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploidy species. *Syst. Bot.* **28**: 723–737.
- Templeton, A.R., Boerwinkle, E. & Sing, C.F. 1987. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics* **117**: 343–351.
- Templeton, A.R., Crandall, K.A. & Sing, C.F. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. III. Cladogram estimation. *Genetics* **132**: 619–633.
- Templeton, A.R., Routman, E. & Phillips, C.A. 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.
- Thompson, R.S. & Anderson, K.H. 2000. Biomes of western North America at 18,000, 6000 and 0 ¹⁴C yr BP reconstructed from pollen and packrat midden data. *J. Biogeogr.* **27**: 555–584.
- Van Devender, T.R. 1990a. Late Quaternary vegetation and climate of the Chihuahuan Desert, United States and Mexico. In: *Packrat Middens: the Last 40 000 years of Biotic Changes* (J.L. Betancourt, T.R. Van Devender & P.S. Martin, eds), pp. 104–133. University of Arizona Press, Tucson, AZ.
- Van Devender, T.R. 1990b. Late Quaternary vegetation and climate of the Sonoran Desert, United States and Mexico. In: *Packrat Middens: the Last 40 000 years of Biotic Changes* (J.L. Betancourt, T.R. Van Devender & P.S. Martin, eds), pp. 134–165. University of Arizona Press, Tucson, AZ.
- Weller, S.G. 1978. Dispersal patterns and the evolution of distily in *Oxalis alpina*. *Syst. Bot.* **3**: 115–126.
- Weller, S.G. 1979. Variation in heterostylous reproductive systems among populations of *Oxalis alpina* in southeastern Arizona. *Syst. Bot.* **4**: 57–71.
- Weller, S.G. 1981. Pollination biology of heteromorphic populations of *Oxalis alpina* in southeastern Arizona. *Bot. J. Linn. Soc.* **83**: 189–198.
- Weller, S.G. 1986. Factors influencing frequency of the mid-styled morph in tristylous populations of *Oxalis alpina*. *Evolution* **40**: 279–289.
- Weller, S.G. & Denton, M.F. 1976. Cytogeographic evidence for the evolution of distily from tristily in the North American species of *Oxalis* section *Ionoxalis*. *Am. J. Bot.* **63**: 120–125.
- Weller, S.G., Dominguez, C.A., Molina-Freaner, F.E., Fornoni, J. & LeBuhn, G. 2007. The evolution of distily from tristily in populations of *Oxalis alpina* (Oxalidaceae) in the Sky Islands of the Sonoran desert. *Am. J. Bot.* **94**: 972–985.
- Zietsman, J., Dreyer, L.L. & Jansen Van Vuuren, B. 2009. Genetic differentiation in *Oxalis* (Oxalidaceae): a tale of rarity and abundance in the Cape floristic region. *S. Afr. J. Bot.* **75**: 27–33.

Received 13 January 2010; revised 1 July 2010; accepted 7 July 2010

Capítulo 2

Tiempo de divergencia y demografía histórica

de *O. alpina* en la región de las Sky Islands (Noroeste de México y Suroeste de Estados Unidos)

Introducción

El Pleistoceno se caracteriza por ser un periodo de drásticas oscilaciones climáticas, con múltiples ciclos de glaciación seguidos por periodos interglaciares o de calentamiento global (Dansgaard *et al.* 1984; Paillard 1997). Estas oscilaciones climáticas han impactado fuertemente la demografía de los seres vivos, su distribución, los patrones de variación genética (Hewitt 2000, 2004) y los caracteres que son blanco de la selección natural (Hodgins y Barrett 2007). Uno de los resultados más comunes de las transiciones climáticas ha sido la fragmentación del hábitat y el consecuente aislamiento de las poblaciones. Estos eventos de vicarianza pueden tener un efecto en la tasa de diversificación de los linajes y por tanto en la diversificación biológica (Downie 2004; Knowles 2007). En particular, los refugios holocénicos caracterizados por ser remanentes de vegetación boscosa ubicados en los picos montañosos, representan laboratorios naturales en los que se pueden probar distintas hipótesis evolutivas. Estos sistemas asemejan un archipiélago marino en donde las “*islas montañosas*” están separadas unas de otras por “*mares*” de desierto. La estimación del tiempo de separación entre las islas brindaría información relevante acerca de la historia evolutiva de las especies (Masta 2000; Hickerson y Cunningham 2006; McCormack *et al.* 2008), así como del origen de caracteres adaptativos (Kim *et al.* 2008). La datación de la divergencia de las especies ha comenzado a tener gran relevancia en los estudios

filogeográficos y evolutivos, ya que ha permitido comparar los grandes momentos de la evolución de los organismos, así como los principales eventos ocurridos durante la historia de la tierra (Peterson *et al.* 2004; Sanderson *et al.* 2004).

El archipiélago Madreano, también conocido como Sky Islands, se ubica en el noroeste de México y suroeste de Estados Unidos. Esta región se caracteriza porque en las partes altas de las montañas se encuentran refugios de vegetación boscosa. Su configuración actual ha sido el resultado de eventos vicariantes que resultaron a consecuencia del calentamiento del planeta hace aproximadamente 10000 años (McCormack *et al.* 2008 Masta 2000; Downie 2004; Moreno-Letelier y Piñero 2009). Sin embargo, a nivel morfológico se han observado grandes diferencias entre poblaciones e incluso entre poblaciones geográficamente cercanas. Por ejemplo, en la araña *Habronattus pugillis* se ha observado una alta divergencia en caracteres que están bajo la acción de la selección sexual (Masta 2000). Asimismo, en otras especies como *Macromeria viridiflora* (Boraginaceae) se ha encontrado variación en caracteres florales (Boyd 2004); en la especie *Castilleja austromontana* (Scrophulariaceae), se ha reportado variación en diferentes atributos morfológicos (Slentz *et al.* 1999), y en la especie *Oxalis alpina*, se ha detectado una gran variación en el sistema reproductivo.

Existen numerosos registros paleoecológicos con los cuales se ha reconstruido la distribución de la vegetación durante el UMG (último máximo glacial), sin embargo las reconstrucciones de la distribución de la biota en los ciclos de glaciación e interglaciación anteriores al UMG han sido poco estudiados. Evidencia paleontológica indica que durante el UMG (último máximo glacial), hace aproximadamente 18000 años, los bosques de *Pinus* y *Juniperus* se encontraban ampliamente distribuidos en los actuales

desiertos de Sonora y Chihuahua. Sin embargo, estos bosques al igual que las especies de clima frío y templado, experimentaron grandes fragmentaciones a consecuencia del calentamiento global (Van Devender 1990 a, b; Metcalfe *et al.* 2000; Thompson y Anderson 2000; Holmgren *et al.* 2003). Por lo que estas especies se desplazaron, hacia el norte de su distribución y hacia los picos montañosos en donde las condiciones eran óptimas para su desarrollo (Masta 2000; Pérez-Alquicira *et al.* 2010). Dichos cambios en la distribución de las especies han impactado fuertemente la estructura génica y la demografía histórica de las especies que habitan la región de las Sky Islands (Pérez-Alquicira *et al.* 2010).

Debido a que cierta parte de la configuración actual del habitat de las Sky Islands ha sido principalmente moldeado en los últimos 18000 años, es común detectar polimorfismos ancestrales compartidos (Barber 1999; Masta 2000; Downie 2004; Moreno-Letelier y Piñero 2009; Pérez-Alquicira *et al.* 2010).

Oxalis alpina es una especie tristílica (Fig. 1) cuya distribución más norteña ocurre en la región de las Sky Islands. La tristilia es un sistema reproductivo caracterizado por la presencia de tres morfos florales. Cada uno se diferencia por la posición del estigma respecto a los niveles de anteras. Asociado a este polimorfismo, existe un sistema de incompatibilidad que impide la autofecundación y la fecundación entre estigmas y anteras que no se encuentran al mismo nivel. Por tanto, las únicas cruzas compatibles son aquellas que ocurren entre los estigmas y anteras que se encuentran al mismo nivel (Fig. 1). El control genético de la tristilia se basa en dos locus, S y M, el primero es epistático sobre el segundo. El morfo corto se expresa cuando está presente el alelo S dominante, el morfo intermedio segrega cuando está presente el alelo M dominante y el locus s es

homócigo recesivo. Mientras el morfo largo segrega cuando los dos loci son homócigos recesivos (Fig. 1) (Lewis y Jones 1992).

La tristilia es un sistema altamente complejo que está escasamente representado en la naturaleza. Únicamente se encuentra en seis familias de angiospermas, pontederiaceae, oxalidaceae, lythraceae, amaryllidaceae, linaceae, connaraceae (Barrett 1993; Thompson *et al.* 1996) y se ha observado que en la mayor parte de las especies la tristilia presenta modificaciones. Por ejemplo, en *O. alpina* existe una gran variación en la frecuencias de los morfos florales. Se pueden encontrar desde poblaciones tristílicas isopléticas (los tres morfos florales presentan la misma frecuencia), tristílicas anisopléticas (los tres morfos florales no presentan la misma frecuencia) y poblaciones distílicas en donde el morfo intermedio está ausente (Fig. 1). Debido a que la tristilia es un sistema altamente coordinado que optimiza la transferencia de polen legítimo, es decir entre anteras y estigmas que se encuentran al mismo nivel (Fig. 1), la pérdida del morfo intermedio ha favorecido una serie de reajustes en la estructura floral. Entre ellos cambios en los niveles de anteras, el tamaño de la flor (Sosenski *et al.* 2010) y de los granos de polen (Baena *et al.*, datos no publicados). Asimismo el sistema de incompatibilidad se ha modificado en distintos grados. Estudios anteriores sugieren que la modificación de las reacciones de incompatibilidad entre el morfo largo y corto han promovido una desventaja reproductiva en el morfo intermedio y por tanto para el alelo M (Weller *et al.* 2007).

En este estudio rastreamos la historia evolutiva de la transición tristilia-distilia a través de la historia de la fragmentación de las islas en el archipiélago terrestre de las Sky Islands. Asimismo analizamos el impacto de los cambios climáticos en

la historia demográfica de *O. alpina*. Esperamos detectar la influencia de los cambios climáticos ocurridos a finales del Pleistoceno, tanto en los patrones de divergencia de las poblaciones de *O. alpina*, como en la historia demográfica. En particular esperamos detectar tiempos de divergencia entre las poblaciones, similares al tiempo en el que han ocurrido los periodos interglaciares (ver figura 2), los cuales han resultado en eventos vicariantes que han aislado a las poblaciones.

Objetivos

1) Estimar el tiempo de divergencia entre las poblaciones de *O. alpina* en la región de las Sky Islands. 2) Analizar los cambios demográficos en las poblaciones. a través del estadístico *D* de Tajima (Tajima 1989) y Fu y Li's (Fu y Li 1993) 3) Estimar el tamaño efectivo de las poblaciones distílicas y tristílicas con el fin de inferir si la deriva génica pudo influenciar la evolución de la distilia.

Métodos y análisis de datos

Muestreo

Durante el periodo del 2001 al 2004 se colectaron bulbos de *O. alpina* de 14 poblaciones tristílicas y 6 poblaciones distílicas en los estados de Sonora, Chihuahua, Arizona y Nuevo México. Los bulbos fueron sembrados en macetas de plástico y se colocaron en el invernadero del Instituto de Ecología de la UNAM. A partir de mayo, los bulbos fueron regados cada tercer día hasta el mes de agosto. Una vez que las hojas brotaron, se colectaron entre dos a tres hojas por planta y se colocaron en bolsas de plástico que contenían silica gel. Posteriormente se llevó a cabo la extracción del ADN.

Extracción del ADN y amplificación de dos regiones de cloroplasto

Se llevó a cabo la extracción de 250 individuos pertenecientes a 20 poblaciones de *O. alpina* ubicadas en los estados de Sonora, Chihuahua, Arizona y Nuevo México. Se utilizó el método de extracción de Doyle y Doyle (1987), adicionando 1.5 unidades de ribonucleasa (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) y 2 unidades de proteinasa K (Fermentas, Hanouer, MO, USA). El ADN se disolvió en 50 µl de agua (Ultrapure water™; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y se cuantificó a través de un biofotómetro Eppendorf. Se llevó a cabo la amplificación de un segmento intergénico del ADN de cloroplasto ubicado entre el gen *psbA* (photosystem Q(B)) y *trnH* (gen histidina tRNA), utilizando los siguientes oligos: *trnH* CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT CC (Tate y Simpson, 2003; Shaw *et al.* 2005) y *psbA* GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C (Sang *et al.*, 1997; Shaw *et al.* 2005). Asimismo se amplificó el gen NADH deshidrogenasa subunidad F (*ndhF*), a través de oligos diseñados específicamente para *O. alpina*: (NDH forward) AAT GGT ACG TTA GGT TTG y (NDH reverse) GGT AAT GCC TGC AGC TC. La amplificación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo en una reacción de PCR (polymerase chain reaction) con un volumen final de 25 µl, que contenía 20-60 ng de DNA genómico, 2mM MgCl₂, 0.1 mM dNTPs, 0.2µM de cada primer, 1.5 unidades de Taq polimerasa, 2.5 µl de 10x Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). El protocolo de amplificación consistió en 5 min a 80 °C; 30 ciclos a 94 °C por 30 seg, 55°C por 30 seg y 55°C por 30 seg (*trnH-PsbA*) o 60 °C (NADH), y 72 °C por 2 min. Los productos de PCR fueron purificados a través de un gel de agarosa utilizando el kit de extracción QIAEX II Gel extraction (Qiagen, Maryland, USA). La secuenciación se llevó a cabo por la empresa MacroGene DNA sequencing service (Seoul, Korea; <http://dna.macrogen.com>).

Análisis de datos

1) Estimación del tiempo de divergencia

El tiempo de divergencia se calculó a través del programa IM (Isolation with migration; Hey y Nielsen 2004). El método del programa IM se basa en un modelo de coalescencia “aislamiento con migración”, asume que una población ancestral dio origen a dos poblaciones hijas. A través de las cadenas de Markov Monte Carlo, estima una serie de parámetros demográficos, entre ellos el tiempo de divergencia, el tamaño efectivo de las poblaciones así como el flujo génico. Las condiciones en las que se basaron los análisis fueron el modelo de sitios infinitos, 10 cadenas de Markov, con un tiempo de “burn in” time (tiempo de calentamiento) de 10,000,000 de pasos. Con estas condiciones el tamaño efectivo de la muestra (ESS) fue mucho mayor a 50. La estimación del tamaño efectivo de la muestra (ESS, effective sample size) es una estimación del número de puntos independientes que son muestreados para cada parámetro e indican que tan bien se están mezclando las cadenas de markov. Por tanto es un indicador de la confiabilidad de que nuestros resultados sean estimados correctamente. De acuerdo a la documentación del programa, se sugiere que la ESS sea mayor a 50. Realizamos pruebas utilizando diferentes valores de m (tasa de migración). Sin embargo la distribución posterior de nuestros parámetros mostraba una meseta en la máxima probabilidad, por lo que nunca obtuvimos un pico máximo. Este resultado indica que nuestros datos no tienen la información suficiente por lo que se redujo el número de parámetros a estimar. Finalmente únicamente estimamos el tiempo de divergencia.

Debido a que a que tenemos evidencias que sugieren que el flujo génico entre las poblaciones de *O. alpina* en la región de las Sky Islands es casi nula (Pérez-Alquicira *et al.*

2010) fijamos los parámetros m_1 y $m_2 = 0$ (estos parámetros se refieren a la tasa de migración de la población 1 a la 2 y de la población 2 a la 1, respectivamente), lo cual permitió reducir el número de variables a estimar. Esta recomendación fue sugerida por el autor del programa IM en un estudio realizado en las aves *Aphelocoma* que al igual que *O. alpina* habitan la región de las Sky Islands (McCormack *et al.* 2008).

El tiempo de divergencia en años fue calculado a partir $T = B/U$, donde B es el valor de máxima probabilidad del parámetro del tiempo de divergencia estimado por el programa IM, y U es la tasa de mutación, en este caso se utilizó la tasa de mutación reportada para regiones de cloroplasto de plantas con semilla 6×10^{-9} (Graur y Li 1999). Finalmente, el valor de T se multiplicó por el tiempo generacional de *O. alpina*. De acuerdo a observaciones personales estimamos que el tiempo generacional es de 5 años.

2) Análisis demográficos

Debido a que las transiciones climáticas pueden promover periodos de contracción y expansión de las poblaciones (Wakeley 2000; Fehlbeg y Ranker 2009), la existencia de cuellos de botella y crecimientos poblacionales en *O. alpina*, se analizaron a través del estadístico *D* de Tajima (Tajima 1989) y de Fu y Li's (Fu y Li 1993).

A pesar de que estos estadísticos fueron diseñados como pruebas de neutralidad, también son sensibles a los cambios demográficos. Tajima (1989) encontró a través de una serie de simulaciones que la comparación entre el número de sitios segregantes y el número promedio de diferencias nucleotídicas pueden indicar cambios en los tamaños poblacionales (Tajima 1989). Valores significativamente negativos indican un exceso de mutaciones en baja frecuencia, lo cual podría explicarse por eventos de crecimiento poblacional, mientras valores significativamente positivos indicarían un exceso de

mutaciones con frecuencia intermedia, que se interpretaría como contracciones poblacionales o cuellos de botella (Fu 1997). Los estadísticos antes mencionados se estimaron por población, así como también se realizó un análisis global, en donde se incluyeron todas las poblaciones con el fin de investigar si los cambios en los tamaños poblacionales pueden detectarse a nivel de la región de las Sky Islands.

2.1) Estimación del tamaño efectivo de las poblaciones distílicas y tristílicas

Debido a que no pudimos obtener una estimación del tamaño efectivo de las poblaciones a través del programa IM, se procedió a estimar este parámetro a través del índice de diversidad genética. Uno de los problemas asociados a este método es que no se pueden obtener intervalos de confianza para el parámetro estimado. Las poblaciones fueron agrupadas de acuerdo a su sistema reproductivo (distílico o tristílico), y en cada grupo se estimó el tamaño efectivo de la población con el fin de conocer el posible papel de la deriva génica en la evolución del sistema reproductivo. El tamaño efectivo se obtuvo a partir de la fórmula: $\theta = 2N_e\mu$ y despejando N_e . donde θ (medida de variación genética, Tajima 1996) se obtuvo a partir del programa DNAsp (version 5, Librado y Rozas 2009), y el valor de μ (tasa de mutación) fue de 6×10^{-9} el cual corresponde a la tasa de mutación del ADN de cloroplasto de plantas con semilla (Graur y Li 1999).

Resultados

Los tiempos de divergencia

Nuestros resultados del tiempo de divergencia estimados con métodos bayesianos, indicaron que la probabilidad posterior más alta del tiempo de divergencia entre pares de poblaciones varió de 4,313 a 279,285 años (Fig. 2). Por ejemplo, Santa Rita – Huachuca 4,313 años (4,313 – 297,403 años) (la divergencia en años que está entre

paréntesis corresponde al 90% del límite inferior y superior respectivamente del intervalo de más alta densidad posterior). Buenos Aires – La Púrica 7,548 años (7,548 – 1,517,210 años), San Luis – Ánimas 6,038 años (6,038 – 1,443,236 años), Mariquita – San José 7,548 años (7,548 – 2,845,712). Asimismo, detectamos tiempos de divergencia más antiguos tal es el caso de Los Ajos - Buenos Aires 173,611 años (4,528 – 1,064,311 años); Pinal - Santa Catalina 185,000 años (185,000 – 1,564,900 años), Pinery Chiricahua - Morse Canyon Chiricahua 279,285 años (22,644 – 3,811,896 años). Debido a que las poblaciones del norte de la distribución no presentaron variación genética, el tiempo de divergencia entre las poblaciones de esta región no pudo ser estimado. Un estudio previo sugiere que esta región ha sido colonizada recientemente, por lo que los eventos fundador han erosionado la variación genética. Dado que estos procesos de colonización han sido muy recientes, no ha pasado el tiempo suficiente para que se acumulen nuevas mutaciones.

Historia demográfica

Los estadísticos D de Tajima y F_u y L_i 's no fueron estadísticamente significativos al analizar en conjunto las 20 poblaciones (Tabla 1). Este resultado indica que a nivel global en la región de las Sky Islands no se detectan cambios en el tamaño poblacional a consecuencia de los cambios climáticos ocurridos a finales del Pleistoceno. Sin embargo, el estadístico F_u y L_i 's F^* mostró un valor positivo marginalmente significativo ($F^* = 1.553$; $0.10 > P > 0.05$; Tabla 1). En cuanto a la estimación de los parámetros demográficos a nivel de población, Los Ajos, presentó a su vez, valores positivos y marginalmente significativos (F_u y L_i 's $D^* = 1.264$; $0.10 > P > 0.05$; Tabla 1). Igualmente que la población Animas, en donde dos de los estadísticos analizados fueron marginalmente significativos

($D = 1.798$, $0.10 > P > 0.05$; $F^* = 1.553$; $0.10 > P < 0.05$; Tabla 1). A diferencia de las poblaciones anteriores, la población Púrica mostró valores significativamente negativos (Tabla 1). El resto de las poblaciones no mostraron ningún valor significativo (Tabla 1). Respecto al tamaño efectivo de las poblaciones distílicas y tristílicas, se obtuvieron valores de 356 y 637 individuos, respectivamente.

Discusión

Los valores de máxima probabilidad del tiempo de divergencia entre las poblaciones de Santa Rita – Huachuca, Buenos Aires – La Púrica, San Luis – Ánimas y Mariquita – San José, fueron de menos de 10000 años. Asimismo, detectamos tiempos de divergencia más antiguos que sugieren la presencia de eventos vicariantes anteriores. Tal es el caso de Los Ajos - Buenos Aires, Pinal - Santa Catalina, Pinery Chiricahua - Morse Canyon Chiricahua. El periodo interglacial anterior ocurrió hace aproximadamente 110,000 a 130,000 años mientras el antepenúltimo periodo interglacial ocurrió hace 200,000 a 380,000 años. Las poblaciones de Pinery Chiricahua y Morse Canyon Chiricahua, son las únicas que están en el rango del antepenúltimo periodo interglacial. El resto de las poblaciones no coincide con ninguno de los dos periodos interglaciares, sin embargo es posible que este resultado se deba al margen de error de nuestras estimaciones e incluso al error asociado a la datación de los periodos interglaciares.

De acuerdo a los resultados obtenidos por Masta (2000) el tiempo de divergencia entre poblaciones de arañas *Habronattus pugillis* que habitan las Sky Islands han ocurrido en un periodo de 30,000 a 2, 700,000 años. Ambos estudios evidencian que las Sky Islands han estado sujetas a varios procesos de fragmentación a lo largo de la historia. Es interesante que en *O. alpina*, el máximo tiempo de divergencia sea de 279,

000 años, pues podría sugerir que la historia de colonización de *O. alpina* a esta región es más reciente en comparación con otras especies como las arañas *Habronattus pugillis*. Por otro lado, en un estudio realizado en las aves *Aphelocoma ultramarina* (McCormack et al. 2008) se encontró que el tiempo de divergencia entre poblaciones que habitan las Sky Islands varía entre 1,100 a 20,000 años, lo que también coincide con los datos paleoecológicos que indican que la fragmentación de las poblaciones en la región de las Sky Islands ocurrió a finales del Pleistoceno (Van Devender 1990a, b; Metcalfe et al. 2000; Thompson y Anderson 2000; Holmgren et al. 2003).

El tiempo de divergencia y la evolución de la distilia

De acuerdo a nuestros resultados, el tiempo de divergencia entre la población Santa Rita y Huachuca es de 4,313 años. El modelaje de nicho ecológico proyectado al UMG indica un continuo de vegetación en menores altitudes, en zonas aledañas a estas montañas (Fig. 2), que posiblemente representa la población ancestral de la cual provienen Santa Rita y Huachuca. Un estudio realizado en las arañas *Habronattus pugillis* (Masta 2000), reporta que el tiempo de divergencia entre Santa Rita y Huachuca ocurrió hace 30,000 años, lo cual apoya nuestras inferencias de que las poblaciones de Huachuca y Santa Rita no estaban geográficamente aisladas durante la última glaciación del Pleistoceno que ocurrió hace 80,000-10,000 años.

Dado que Santa Rita es una población distílica y Huachuca tristílica, los resultados sugieren que la condición distílica evolucionó en estas poblaciones posterior a la última glaciación del Pleistoceno. En el caso de las poblaciones distílicas Sierra Ancha y Pinal ubicadas en el noroeste de las Sky Islands, no mostraron diferencias genéticas entre sí, lo que sugiere que su divergencia es muy reciente. Los modelos de nicho

ecológico, muestran un corredor de vegetación cerca de estas montañas en elevaciones menores, el cual se encontraba aislado de las poblaciones del centro y sur de las Sky Islands. Es posible que en esta región se encontraba el ancestro de las poblaciones Pinal y Sierra Ancha (Fig. 2), el cual probablemente también era distílico. El tiempo de divergencia de Pinal, respecto a las poblaciones distílicas aledañas como Santa Catalina es de 185,000 años. El hecho de que Santa Catalina, al igual que la población distílica Pinaleño, presentaron la misma constitución genética respecto a otras poblaciones tristílicas aledañas como Galiuro, White y Pinos Altos, se podría sugerir que estas poblaciones distílicas y tristílicas comparten un ancestro común muy reciente y posiblemente comenzaron a divergir después del UMG.

Por tanto, de acuerdo al tiempo de divergencia entre las poblaciones distílicas, se sugiere que este sistema reproductivo ha surgido de manera independiente en más de una ocasión. Los datos también sugieren que la evolución de la distilia en la población Santa Rita y en las poblaciones del norte de la Sky Islands que incluye a Santa Catalina y Pinaleño, han surgido recientemente, posiblemente en eventos postglaciares.

El tiempo de divergencia y la variación en el sistema reproductivo

Las poblaciones del sur de Sonora son tristílicas, sin embargo la frecuencia de los tres morfos florales difiere. Por un lado, la población Púrica se separó de la población Buenos Aires hace 7,548 años. El sistema reproductivo de ambas poblaciones es tristílico sin embargo Buenos Aires es isoplética mientras Púrica es anisoplética. Las poblaciones Ánimas y San Luis, también comparten una historia evolutiva muy reciente (6,038 años); a pesar de esto existen diferencias en la frecuencia de los morfos: la primera se encuentra en un equilibrio isoplético y la segunda presenta una reducción en

la frecuencia del morfo intermedio. A su vez, de acuerdo al índice que mide el grado de modificación del sistema de incompatibilidad (Weller *et al.* 2007), observamos que la población Animas presenta una mayor modificación respecto a la población San Luis (Animas = 0.701 y San Luis = 0.159). Estos resultados indican que a pesar del corto tiempo de divergencia, existen diferencias notables en las características del sistema reproductivo. En cambio, a nivel genético (marcadores de cloroplasto) no detectamos diferencias significativas entre ambas poblaciones, lo cual muestra las distintas tasas a las que evolucionan el ADN de cloroplasto y los caracteres que están bajo la acción de la selección natural. Por ejemplo, la frecuencia de los morfos florales es muy variable, el grado de modificación del sistema de incompatibilidad y la morfología floral.

Por otro lado, es sorprendente que las poblaciones de Mariquita y Elenita, que se encuentran a menos de 1 km de distancia, presenten tiempos de divergencia superiores a 143,417 años. Este resultado es consecuencia de que en la población Mariquita solo ocurre el haplotipo H3 y en Elenita el H3 y H7, los cuales difieren en 4 pasos mutacionales (Pérez-Alquicira *et al.* 2010). Sin embargo, es posible que estas poblaciones hayan comenzado a divergir después del UMG (hace 18,000 años), y que las diferencias en la constitución de los haplotipos sea el resultado de que H7 se perdió por deriva génica en la población Mariquita o bien ocurrió una fragmentación desigual de tal manera que la constitución de los haplotipos no fue la misma en ambas poblaciones. Por tanto, dada la corta separación geográfica que existen entre Elenita y Mariquita, es muy probable que ambas provengan de la misma población ancestral que habitaba el actual desierto de Sonora durante el UMG (Pérez-Alquicira *et al.* 2010). Lo mismo ocurre con la población Pinery Chiricahua y Morse Canyon Chiricahua, las cuales se encuentran a

12 km de distancia, y el tiempo estimado de divergencia entre ambas es de 279,285 años. Debido a que Morse es tristílica y presenta una mayor variación genética que Pinery, es posible que esta última haya sido el resultado de un evento fundador proveniente de Morse, sin embargo es necesario incluir mayor información genética para comprobar esta hipótesis.

Asimismo, las poblaciones del norte de las Sky Islands (Santa Catalina, Pinaleño, Pinery Chiricahua, Galiuro, White y Pinos Altos) no mostraron diferencias genéticas entre sí; sin embargo, observamos que la frecuencia de los morfos varía enormemente, así como las modificaciones en el sistema de incompatibilidad (Weller *et al.* 2007).

Intervalo de más alta densidad posterior del tiempo de divergencia

Nuestros valores de máxima probabilidad del tiempo de divergencia, se asocian a la última transición climática del Pleistoceno y posiblemente a eventos interglaciares anteriores. Sin embargo, los intervalos de más alta densidad posterior fueron extremadamente grandes. Dada la baja diversidad genética que obtuvimos con los marcadores de cloroplasto, no tenemos información suficiente en nuestros datos para estimar con mayor precisión el tiempo de divergencia.

*La demografía histórica de *O. alpina**

Los estadísticos D de Tajima y Fu y Li's, no fueron estadísticamente significativos al analizar en conjunto las 20 poblaciones (Tabla I). Sin embargo el estadístico Fu y Li's F^* mostró un valor positivo marginalmente significativo ($F^* = 1.53$; $0.10 > P > 0.05$; Tabla I). Posiblemente este resultado sería significativo si se incluyera un mayor número de sitios polimórficos. Debido a que la F^* presenta un valor positivo sugiere un evento de reducción poblacional en el pasado. Resultados similares, se encontraron en la población

Animas en donde dos de los estadísticos analizados fueron positivos y marginalmente significativos ($D = 1.798, 0.10 > P > 0.05$; $F^* = 1.553; 0.10 > P < 0.05$; Tabla I).

Por tanto, a pesar de que nuestros resultados no sean estadísticamente significativos, los valores positivos, marginalmente significativos, sugieren que las poblaciones han experimentado reducciones en el tamaño efectivo, lo cual es congruente con la historia de las oscilaciones climáticas, en donde las especies de clima frío experimentaron fuertes reducciones en el área de su distribución. Asimismo, nuestros datos sugieren que las poblaciones del norte de la distribución de las Sky Islands han experimentado fuertes cuellos de botella que han erosionado la variación genética (Tabla I; Pérez-Alquicira *et al.* 2010).

A diferencia de los resultados anteriores, la población Púrica mostró valores negativos, estadísticamente significativos (Tabla I) indicando la presencia de eventos de crecimiento poblacional. Sin embargo, este resultado es muy raro ya que de acuerdo a la evidencia paleoecológica de diferentes especies de *Pinus*, y al modelaje de nicho ecológico de *O. alpina*, se sugiere que las especies que habitan las Sky Islands han sido el resultado de fuertes contracciones poblacionales. Debido a que los valores negativos de Tajima y Fu y Li's, son el resultado de un exceso de mutaciones en baja frecuencia, y al analizar el contenido de haplotipos de la población Púrica, únicamente existe un haplotipo en bajas frecuencias, sugerimos que los valores negativos de los parámetros de neutralidad son el resultado de un artefacto dada la baja frecuencia de uno de los haplotipos (H2) presentes en la población Púrica. Debido a que este mismo haplotipo (H2) está presente en altas frecuencias en poblaciones cercanas a la población Púrica,

sugerimos que la migración histórica más que el crecimiento poblacional explicaría este resultado.

Estimación del tamaño efectivo en las poblaciones distílicas y tristílicas, y su relación con la evolución del sistema reproductivo

El tamaño efectivo estimado de las poblaciones distílicas fue de 356 individuos, mientras que de las poblaciones tristílicas fue de 637. El hecho de que el tamaño efectivo de las poblaciones distílicas es aproximadamente la mitad del tamaño efectivo de las poblaciones tristílicas, sugiere que las poblaciones distílicas han sido más susceptibles a los procesos de deriva génica. Por esta razón, no podemos descartar el papel de la deriva en la pérdida del morfo intermedio. Asimismo, en las especies tristílicas *Lythrum salicaria* (Eckert et al. 1996) y *Eichhornia paniculata* (Husband y Barrett 1992), aunque no realizaron estudios genéticos, el tamaño poblacional estuvo relacionado con la frecuencia de los morfos florales. Las poblaciones pequeñas, las cuales eran el resultado de recientes colonizaciones mostraban mayor irregularidad en las frecuencias de los morfos, mientras las poblaciones grandes generalmente presentaban los tres morfos florales en la misma proporción (Husband y Barrett 1992; Eckert et al. 1996). Este mismo patrón se observa en *O. alpina*. Sin embargo, a pesar de que existen razones para proponer que las colonizaciones y expansiones del rango hacia el norte de la distribución pudieron influenciar la pérdida del morfo intermedio, diversas líneas de evidencias, sugieren a su vez que la selección natural ha jugado un papel muy importante en la evolución de la distilia en *O. alpina* (Weller et al. 2007; Pérez-Alquicira et al. 2010; Sosenski et al. 2010).

Conclusiones

Nuestros datos indican que la historia de la fragmentación de *O. alpina* coincide con los datos paleoecológicos, en donde evidencia fósil de distintas especies vegetales de clima frío a templado muestran eventos de fragmentación del habitat a finales del Periodo del Pleistoceno (hace aproximadamente 10000 años). Asimismo, detectamos que a pesar de que las poblaciones comparten una historia evolutiva muy reciente de acuerdo a los marcadores de cloroplasto, el sistema reproductivo es muy variable, lo cual refleja las diferencias en las tasas evolutivas entre caracteres genéticos de cloroplasto y caracteres que están bajo la fuerte influencia de la selección natural. De acuerdo al tiempo de divergencia entre las poblaciones distílicas y tristílicas, sugerimos que la distilia se ha originado en distintos eventos evolutivos y en algunos casos su origen es muy reciente, posiblemente se remonta a eventos postglaciares.

Finalmente aunque nuestros datos fueron marginalmente significativos, se sugiere que las poblaciones pudieron haber experimentado reducciones en el tamaño efectivo de la población; posiblemente asociados a los eventos de fragmentación y migración de las poblaciones durante la transición Pleistoceno - Holoceno. Asimismo, es evidente la reducción de la variación genética en las poblaciones del norte de las Sky Islands, lo que sugiere la presencia de fuertes eventos fundador en esta región. Es por esta razón que las poblaciones distílicas, las cuales se localiza principalmente al norte, presentaron menores tamaños efectivos de la población. Este resultado apoya las conclusiones de estudios anteriores que sugiere que los factores históricos pudieron influenciar la evolución del sistema reproductivo distílico. Sin embargo, estudios previos han mostrado fuertes evidencias que indican que la selección natural, a su vez, ha

influenciado de manera importante la evolución del sistema reproductivo de *O. alpina* (Weller *et al.* 2007; Pérez-Alquicira *et al.* 2010; Sosenski *et al.* 2010).

Perspectivas

En futuros estudios se incluirán más marcadores moleculares. Actualmente, en la universidad de Kentucky se está trabajando en la amplificación de regiones microsatélites para las poblaciones de *O. alpina* de la región de las Sky Islands. También se están buscando secuencias hipervariables en el genoma nuclear. Por lo que se realizarán las estimaciones del tiempo de divergencia, unificando los datos de las secuencias de cloroplasto, nucleares y los microsatélites. En las estimaciones se considerará nuevos parámetros, por ejemplo un intervalo de mutación que sea representativo de las angiospermas, y no tanto una tasa de mutación específica.

Referencias

- Barber PH. 1999. Phylogeography of the canyon treefrog, *Hyla arenicolor* (Cope) based on mitochondrial DNA sequence data. *Molecular Ecology*. **8**: 547-562.
- Barrett SCH. 1993. The evolutionary biology of tristylia. En: Oxford surveys in evolutionary biology (Futuyma J. Antonovics J. eds.). Vol. 9: 283-326. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Boyd AE. 2004. Breeding system of *Macromeria viridiflora* (Boraginaceae) and geographic variation in pollinator assemblages. *American Journal of Botany*. **91**: 1809-1813.
- Brown, D.E. & Lowe, C.H. 1980. *Biotic communities of the Southwest*. University of Arizona Press, Tucson, AZ.
- Dansgaard W, Johnsen SJ, Clausen B, Dahl-Jensen D, Gundestrup N, Hammer CU, Oeschger H. 1984. North Atlantic climatic oscillations revealed by deep Greenland ice

cores. En: Climate Processes and Climate Sensitivity (Hansen JE, Takahashi T. eds.), pp. 288-298. Geophysical Monograph. **29**. American Geophysical Union, Washington D.C.

Downie DA. 2004. Phylogeography in a galling insect, grape phylloxera, *Daktulosphaira vitifoliae* (Phylloxeridae) in the fragmented habitat of the Southwest SA. *Journal of Biogeography*. **31**: 1759-1768.

Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. **19**: 11-15.

Eckert CG, Manicacci D, Barrett SCH. 1996. Genetic drift and founder effect in native versus introduced populations of an invading plant, *Lythrum salicaria* (Lythraceae). *Evolution*. **50**: 1512-1519.

Fehlberg SD, Ranker TA. 2009. Evolutionary history and phylogeography of *Encelia farinosa* (Asteraceae) from the Sonoran, Mojave, and Peninsular Deserts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **50**: 326-335.

Fu YX, Li WH. 1993. Statistical test of neutrality of mutations. *Genetics*. **133**: 693-709.

Fu Y-X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. **147**: 915-925.

Graur D, Li WH. 1999. Fundamentals of Molecular Evolution. Sinauer y Associates, Sunderland, Massachusetts.

Hewitt GM. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*. **405**: 909-913.

Hewitt GM. 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*. **10**: 537-549.

Hewitt GM. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. **359**: 183-195.

Hey J, Nielsen R. 2004. Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics*. **167**: 747-760.

Hickerson MJ, Cunningham WC. 2006. Nearshore fish (*Pholis gunnellus*) persists across the North Atlantic multiple glacial episodes. *Molecular Ecology*. **15**: 4095-4107.

Hodgins KA, Barrett SCH. 2007. Population structure and genetic diversity in tristylous *Narcissus triandrus*: insights from microsatellite and chloroplast DNA variation. *Molecular Ecology*. **16**: 2317–2332.

Holmgren CA, Peñalba MC, Rylander KA, Betancourt JL. 2003. A 16,000 14C yr B.P. packrat midden series from the USA–Mexico Borderlands. *Quaternary Research*. **60**: 319–329.

Husband BC, Barrett SCH. 1992. Genetic drift and the maintenance of the style length polymorphism in tristylous populations of *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). *Heredity*. **69**: 440-449.

Kim S-C, McGowen MR, Pesach L, Barber JC, Mort ME, Santos-Guerra A. 2008. Timing and tempo of early and successive adaptive radiations in Macaronesia. *Plos One*. **3**: e2139.

Knowles LL, Carstens BC, Keat ML. 2007. Coupling genetic and ecological-niche models to examine how past population distributions contribute to divergence. *Current Biology*. **17**: 940-946.

Lewis D, Jones DA. 1992. The genetics of heterostyly. In: Barrett SCH. (ed.) Evolution and function of heterostyly. Springer-Verlag, Berlin. 129-150pp.

- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. **25**: 1451-1452.
- Masta S. 2000. Phylogeography of the jumping spider *Habronattus pugillis* (Araneae: salticidae): recent vicariance of sky islands populations? *Evolution*. **54**: 1699-1711.
- McCormack JE, Bowen BS, Smith TB. 2008. Integrating paleoecology and genetics of bird populations in two sky island archipelagos. *BMC Biology*. **27**: 6-28.
- McCormack JE, Smith TB. 2008. Niche expansion leads to small-scale adaptive divergence along an elevation gradient in a medium-sized passerine bird. *Proceedings of the Royal Society B*. **275**: 2155-2164.
- McCormack JE, Huang H, Knowles LL. 2009. Sky islands. En: Encyclopedia of Islands. (Gillespie RG, Clague D. eds.), pp. 839-843. University of California Press: Berkeley, CA.
- Metcalf SE, O'Hara SL, Caballero M, Davies SJ. 2000. Records of late Pleistocene–Holocene climatic change in Mexico – a review. *Quaternary Science Reviews*. **19**: 699–721.
- Moreno-Letelier, A. & Piñero, D. 2009. Phylogeographic structure of *Pinus strobiformis* Engelm. across the Chihuahuan Desert filter-barrier. *Journal of Biogeography*. **36**: 121-131.
- Paillard D. 1997. The timing of Pleistocene glaciations from a simple multiple-state climate model. *Nature*, **391**: 378-381.
- Pérez-Alquicira J, Molina-Freaner FE, Piñero D, Weller S, Martínez-Meyer E, Rozas J, Domínguez CA. 2010. The role of historical factors and natural selection in the evolution of breeding systems of *Oxalis alpina* in the Sonoran desert “Sky islands”. *Journal of Evolutionary Biology*. **23**: 2163-2175.

Peterson KJ, Lyons JB, Nowak KS, Tacks MC, Wargo MJ, McPeck MA. 2004. Estimating metazoan divergence times with a molecular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **101**: 6536-6541.

Petit RJ, Aguinagalde I, De Beaulieu JL, Bittkau C, Brewer S, Cheddadi R, Ennos R, Fineschi S, Grivet D, Lascoux M, Mohanty A, Müller-Starck G, Demesure-Musch B, Palme A, Martín JP, Rendell S, Vendramin GG. 2003. Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science*. **300**: 1563–1565.

Sang T, Crawford DJ, Stuessy TF. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*. **84**: 1120–1136.

Sanderson MJ, Thorne JL, Wikström N, Bremer K. 2004. Molecular evidence on plant divergence times. *American Journal of Botany*. **91**: 1656-1665.

Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling EE, Small RL. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* **92**: 142–166.

Slentz S, Boyd AE, McDade LA. 1999. Morphological differentiation among madrean Sky Island populations of *Castilleja austromontana* (Scrophulariaceae). *Madroño*. **46**: 100-111.

Sosenski P, Fornoni J, Molina-Freaner FE, Weller SG, Dominguez CA. 2010. Changes in sexual organ reciprocity and phenotypic floral integration during the tristylous-distylous transitions in *Oxalis alpina*. *New Phytologist*. **185**: 829-840.

Tate JA, Simpson BB. 2003. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic Botany*. **28**: 723–737.

Tajima F. 1989. Statistical method to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. **123**: 585-595.

Tajima F. 1996. The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics*. **143**: 1457-1465.

Thompson JD, Paillier T, Strasberg D, Maniacacci D. 1996. Tristyly in the endangered Mascarene Island endemic *Hugonia serrata* (Linaceae). *American Journal of Botany* **83**: 1160–1167.

Thompson RS, Anderson KH. 2000. Biomes of western North America at 18,000, 6000 and 0 14C yr BP reconstructed from pollen and packrat midden data. *Journal of Biogeography* **27**: 555–584.

Thompson JDT, Paillier D, Strasberg, Maniacacci D. 1996. Tristyly in the endangered Mascarene Island endemic *Hugonia serrata* (Linaceae). *American Journal of Botany*. **83**: 1160-1167.

Van Devender TR. 1990a. Late Quaternary vegetation and climate of the Chihuahuan Desert, United States and Mexico. En: Packrat Middens: the Last 40 000 years of Biotic Changes (Betancourt JL, Van Devender TR y Martin PS eds), pp. 104–133. University of Arizona Press, Tucson, AZ.

Van Devender, T.R. 1990b. Late Quaternary vegetation and climate of the Sonoran Desert, United States and Mexico. En: Packrat Middens: the Last 40 000 years of Biotic Changes (J.L. Betancourt, T.R. Van Devender & P.S. Martin, eds), pp. 134–165. University of Arizona Press, Tucson, AZ.

Weller SG, Dominguez CA, Molina-Freaner FE, Fornoni J, LeBuhn G. 2007. The evolution of distyly from tristyly in populations of *Oxalis alpina* (Oxalidaceae) in the Sky

Tabla 1. Diversidad genética de *O. alpina* y pruebas de expansión y contracción de poblaciones a través de los estadísticos, *D* Tajima, Fu y Li's *D** y *F**

Población	Coordenadas Geográficas (latitud; longitud)	SR	N	H #	<i>h</i>	<i>D</i> Tajima	Fu li <i>D</i> *	Fu li <i>F</i> *
1. Santa Rita	31.6772; 110.7452	D	11	3	0.34	-0.77	-0.33	-0.49
2. Miller Canyon Huachuca	31.4158; 110.2779	T	14	2	0.43	1.07	0.93	1.10
3. Morse Canyon Chiricahua	31.8326; 109.3285	T	12	3	0.59	1.55	0.97	1.26
4. San Luis	31.2184; 108.8283	T	11	4	0.60	0.62	1.21	1.20
5. Los Ajos	30.9453; 109.9635	T	17	5	0.78	1.09	1.26†	1.39
6. La Púrica	30.5492; 109.7512	T	16	2	0.12	-1.83**	-2.40**	-2.58**
7. San Jose	31.2572; 109.9901	T	13	2	0.38	0.42	0.73	0.74
8. Animas	31.5671; 108.7774	T	11	2	0.53	1.79†	1.21	1.53†
9. Elenita	31.0461; 110.3827	T	11	2	0.43	1.01	1.21	1.31
10. Azul	30.7412; 110.5732	T	5	1	0			
11. Santa Catalina	32.4279; 110.7552	D	10	1	0			
12. Pinaleño	32.6459; 109.8508	D	15	1	0			
13. Crest Trial Chiricahua	31.9328; 109.2718	D	14	1	0			
14. Sierra Ancha	33.8404; 110.9556	D	10	1	0			
15. Pinal	33.2996; 110.8415	D	10	1	0			
16. Mariquita	31.0537; 110.3834	T	18	1	0			
17. Pinos Altos	32.9223; 108.2126	T	13	1	0			
18. Galiuro	32.5170; 110.2639	T	15	1	0			
19. White	33.6824; 109.4482	T	14	1	0			
20. Buenos Aires	30.7285; 109.8343	T	10	1	0			
Todas las poblaciones						1.36	1.25	1.55†

SR, sistema reproductivo, **N**, tamaño de muestra, ***h***, diversidad haplotídica, (**, indica valores estadísticamente significativos; †, indica valores marginalmente significativos 0.10>P>0.05).

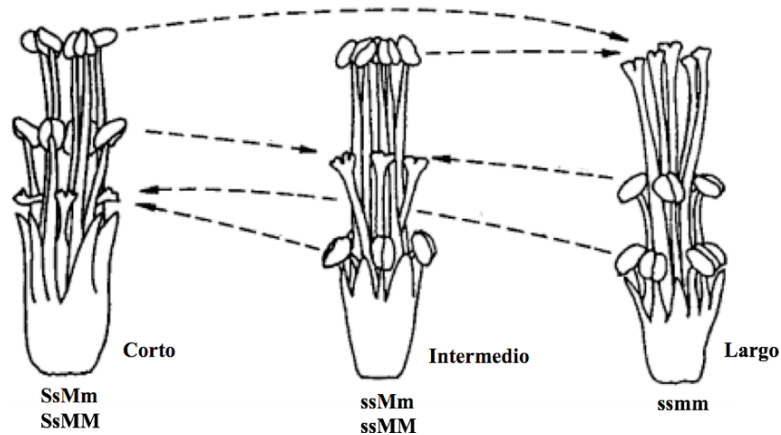


Figura 1. Esquema que muestra los tres morfos florales de las plantas tristílicas. De izquierda a derecha se muestra el morfo con estilo corto, medio y largo. Aunado al polimorfismo en el tamaño de los estilos y estambres, existe un sistema de incompatibilidad que previene la autofecundación y la fecundación entre estigmas y anteras que se encuentran a alturas distintas. Las líneas punteadas indican las cruces compatibles. La genética de la tristilia se caracteriza por la interacción de dos genes que se encuentran en desequilibrio de ligamiento. La expresión del morfo de estilo corto depende de la presencia del alelo S, que es dominante sobre el s y tiene un efecto epistático sobre el gen M. cuando el locus S es homócigo recesivo y M está presente, se expresa el morfo intermedio. En el caso del morfo largo, los dos loci deben ser homócigos recesivos (Barrett 1992, 1993; Ganders 1979; Heuch 1979; Weller 1976a). De acuerdo a la determinación genética de la Distilia, la proporción esperada de cada morfo es la misma.

Capítulo 3

La influencia de los eventos históricos en

*la estructura génica y evolución del sistema reproductivo de *O. alpina* en la región de las Sky Islands*

Introducción

Las angiospermas presentan una enorme diversidad de sistemas reproductivos que muy probablemente supera la variación encontrada en otros grupos de plantas como las gimnospermas, briofitas y pteridofitas (Barrett 2002). Se ha propuesto que la selección natural ha jugado un papel primordial en la evolución de esta diversidad debido a que los sistemas reproductivos tienen una influencia en el éxito reproductivo (Herrera *et al.* 2006; Rosas y Domínguez 2009; Sosenski *et al.* 2010). Por esta razón, la mayor parte de los estudios se han enfocado en analizar el papel ecológico de las interacciones entre las plantas y sus polinizadores (Barrett *et al.* 1996; Lobo *et al.* 2005; Rosas *et al.* 2005); así como desde una perspectiva genética la importancia de la endogamia en la evolución de los sistemas de apareamiento (Barrett y Harder 1996; Lande y Schemske 1985). Por otro lado, estudios recientes han propuesto que eventos históricos como cuellos de botella o eventos fundador asociados a la colonización a nuevas regiones, han sido importantes en la ruta evolutiva de los sistemas reproductivos (Eckert y Barrett 1995; Pannell y Dorken 2006). En particular, los sistemas sexuales polimórficos como la heterostilia, caracterizada por presentar dos (distilia) o tres (tristilia) morfos florales (Fig. 1) tienen una alta susceptibilidad de perder a uno o más de sus componentes durante eventos de colonización (Eckert y Barrett 1995; Pannell y Dorken 2006).

De acuerdo con lo anterior, el estudio de la evolución de los sistemas sexuales de las plantas requiere de un análisis que integre el contexto ecológico e histórico en el cual han evolucionado (Hodgins y Barrett 2007; Pérez-Alquicira et al. 2010). Entre los eventos históricos más importantes que han influenciado la distribución de los seres vivos, y por tanto su evolución, se encuentran los cambios climáticos ocurridos durante el Pleistoceno (Hewitt 2000, 2004). La región de las Sky Islands ubicada en los estados de Sonora y Chihuahua (México), Arizona y Nuevo México (USA), ha sido fuertemente impactada por las oscilaciones climáticas del Pleistoceno y constituye un escenario ideal para analizar la influencia de la historia en la evolución de las especies que habitan en esta región (Masta 2000; Downie 2004; McCormack et al. 2008).

Las Sky Islands se caracterizan por ser una serie de montañas aisladas unas de otras, inmersas en el desierto de Sonora, que alberga remanentes de vegetación boscosa en las partes más altas. De acuerdo a evidencias paleontológicas, durante el UMG (último máximo glacial) en el actual desierto de Sonora dominaban especies de clima frío a templado, entre ellas diferentes especies de pinos (*P. edulis*, *P. ponderosa* var. *arizona*, *P. leiophylla*, *P. strobiformis*, *P. engelmannii*) y juniperus (*J. coahuilensis* y *J. scopulorum*) (Van Devender 1990a, b; Metcalfe et al. 2000; Thompson y Anderson, 2000; Holmgren et al., 2003). Sin embargo, a finales del Pleistoceno (10000 años) la temperatura global del planeta se incrementó, por lo que la vegetación boscosa experimentó cambios drásticos en su distribución (Van Devender 1990a, b; Metcalfe et al. 2000; Thompson y Anderson 2000; Holmgren et al. 2003). Muchas especies experimentaron una expansión en su área de distribución hacia el norte y hacia la parte alta de las montañas. Estos fenómenos estuvieron frecuentemente acompañados de eventos fundador y cuellos de botella

(Pérez-Alquicira *et al.* 2010). La fragmentación y el consecuente aislamiento entre las poblaciones asemeja la dinámica evolutiva de un archipiélago marino, en donde la selección natural actuando en el contexto ecológico de cada isla, y la ausencia de flujo génico entre las islas favorece la evolución independiente de cada población promoviendo un sistema de alta diversidad biológica. En este contexto histórico y geográfico resulta muy relevante examinar la influencia de la historia en los procesos microevolutivos de las especies, así como analizar la dinámica evolutiva de los sistemas reproductivos polimórficos como la heterostilia.

Oxalis alpina (Rose) Knuth (sección *Ionoxalis*) es una especie tristílica que habita la región de las Sky Islands. La tristilia es un sistema reproductivo caracterizado por la presencia de tres morfos florales, que difieren por la posición de los estigmas con respecto a los niveles de anteras (Fig. 1). Aunado a este polimorfismo, existe un sistema de incompatibilidad que impide la autofecundación y la fecundación entre estigmas y anteras que no se encuentran a la misma altura. De tal manera que las únicas cruzas compatibles son aquellas que ocurren entre estigmas y anteras que se encuentran al mismo nivel (Fig. 1). Se ha propuesto que la tristilia se hereda bajo un sistema genético de dos locus (S y M), cada uno con dos alelos, en donde el locus S es epistático sobre el M (Weller 1976b; Lewis y Jones 1992; Fig. 1). De acuerdo al modelo genético de la tristilia, se espera que la frecuencia de cada uno de los morfos florales sea la misma (Heuch 1979).

Las poblaciones de *O. alpina* que habitan la región de las Sky Islands presentan diversas variantes a la tristilia. Por ejemplo, la frecuencia de los morfos es muy variable entre las poblaciones, siendo común la reducción del morfo intermedio, al grado de

encontrar poblaciones distílicas en donde el morfo intermedio está ausente (Weller et al. 2007). Un estudio reciente muestra que la pérdida del morfo intermedio ha promovido la evolución de reajustes en el tamaño de los verticilos florales (estilo, estambre y tamaño de la flor) que se ajustan a la condición en donde únicamente dos morfos están presentes (Sosenski et al. 2010). Por otro lado, el sistema de incompatibilidad típico de las especies tristílicas (Fig. 1) se han modificado (Weller et al. 2007). Por ejemplo, la incompatibilidad entre el morfo corto y largo se ha perdido en distintos grados, así como en algunas poblaciones el morfo intermedio es autocompatible (Weller et al. 2007).

La enorme variación en el sistema reproductivo que exhiben las poblaciones de *O. alpina* en la región de las Sky Islands, así como la presencia de la distilia en diferentes poblaciones, representa un sistema de estudio muy interesante para analizar la importancia de los eventos históricos y la selección natural en la disolución de la tristilia. Diversas líneas de evidencia sugieren que el papel de la selección natural ha sido muy importante en la evolución del sistema reproductivo de *O. alpina*. Por un lado existe una fuerte asociación entre la frecuencia del morfo intermedio y la pérdida del sistema de incompatibilidad entre el morfo corto y largo. Se ha propuesto que esta situación ha promovido una desventaja reproductiva en el morfo intermedio, lo que resulta en una presión de selección en contra del alelo M (Weller et al. 2007). A su vez, evidencia genética proveniente de marcadores moleculares de cloroplasto, sugiere que la distilia es una condición que se ha originado en distintas ocasiones, es decir, es el resultado de varios eventos de evolución que han convergido en el mismo sistema reproductivo. Esta evidencia apoyaría el argumento selectivo de evolución de la distilia, debido a que si

fuera únicamente azar, esperaríamos que en las poblaciones distílicas se perdiera también el morfo largo o el corto, sin embargo el morfo intermedio es el que siempre se pierde. Por otro lado, debido a que las poblaciones distílicas ocurren principalmente al norte de la distribución, es posible que procesos estocásticos asociados a los eventos fundador hayan influenciado la evolución de la distilia (Pérez-Alquicira *et al.* 2010). Por tanto, nuestro datos genéticos provenientes de secuencias del cloroplasto, sugieren que la acción combinada de la selección natural y los eventos estocásticos asociados a la historia como por ejemplo, cuellos de botella o eventos fundador podrían explicar la disolución de la tristilia en *O. alpina*.

Debido a que nuestras inferencias evolutivas acerca de la transición tristilia-distilia se han basado únicamente en marcadores citoplasmáticos, cuya herencia ocurre únicamente a través de la vía materna, en este trabajo analizamos marcadores moleculares nucleares ISSR (“inter simple sequence repeat”). Los marcadores nucleares, al heredarse a través de la vía materna (semillas) y paterna (polen), brindarán información complementaria sobre el papel de la selección natural y los factores históricos, como los cuellos de botellas y eventos fundador en la evolución del sistema reproductivo de *O. alpina*.

Como resultado de las diferentes vías por las que se heredan ambos tipos de genomas, cloroplasto y núcleo, esperamos encontrar que los patrones de estructuración genética sean menores a través de los marcadores nucleares que respecto a los de cloroplasto, ya que los genes nucleares se estarían moviendo a través del polen y las semillas, mientras que los de cloroplasto únicamente a través de las semillas. Debido a que tenemos evidencias genéticas (marcadores de cloroplasto) y ecológicas (modelaje

de nicho) que sugieren que la distilia ha evolucionado en distintas ocasiones, esperamos que este resultado sea apoyado por los marcadores nucleares. Los objetivos de este capítulo son: 1) analizar la influencia de los cambios climáticos en los patrones de variación genética y en la evolución del sistema reproductivo de *O. alpina*; 2) inferir las relaciones genéticas entre las poblaciones distílicas y tristílicas a través de marcadores moleculares nucleares ISSR 3) comparar los resultados que se obtengan de los objetivos uno y dos, con lo obtenido a partir de secuencias de ADN de cloroplasto.

Material y Métodos

Organismo de estudio

Oxalis alpina (Rose) Knuth (sección *Ionoxalis*, Oxalidaceae) es una especie herbácea y perenne que se distribuye desde el suroeste de Estados Unidos hasta Guatemala. La sección *Ionoxalis*, a la cual pertenece *O. alpina*, tiene su centro de diversidad en México (Weller y Denton 1976), lo que indica que las poblaciones que habitan las Sky Islands son el resultado de la migración de poblaciones del sur. Se ha propuesto que este grupo es monofilético debido a su condición tetraploide, que difiere de las poblaciones diploides del centro de México. La sección *Ionoxalis* incluye especies tristílicas y distílicas. Weller (1976) encontró que las poblaciones tristílicas suelen ser diploides con una distribución restringida, mientras que las especies poliploides son distílicas con un rango de distribución más amplio. De acuerdo a este resultado, se ha propuesto que la tristilia es el sistema reproductivo ancestral. En relación a la morfología floral, también es claro que las poblaciones distílicas de *O. alpina*, son derivadas de ancestros tristílicos. La evidencia es que los dos morfos florales (corto y largo) de las poblaciones distílicas presentan dos niveles de anteras. Esta característica solo está presente en las especies

tristílicas. En el caso de las especies distílicas que no provienen de ancestros tristílicos, el morfo corto y largo únicamente presentan un nivel de anteras.

La polinización se lleva a cabo principalmente por abejas solitarias del género *Heterosarus* (*H. bakeri* y *H. neomexicanus*) (Weller 1981). Otros polinizadores, cuyas visitas ocurren en menor frecuencia, incluyen a lepidópteros de las familias *Pieridae* y *Hesperiidae* (C.A. Domínguez, observación personal) e himenópteros del género *Melissodes*. Se ha observado que no hay diferencias significativas en el gremio de polinizadores entre las diferentes localidades de las Sky Islands. Los frutos son pequeñas cápsulas que al madurar explotan liberando las semillas, lo que sugiere que su dispersión es muy restringida.

Muestreo

Se colectaron bulbos de 18 poblaciones de *O. alpina* en la región de las Sky Islands. Se incluyeron 14 poblaciones tristílicas y 4 distílicas. Los bulbos fueron sembrados en macetas de plástico y se mantuvieron en el invernadero del Instituto de Ecología de la UNAM. Durante el periodo de mayo a agosto se mantuvieron en riego. Se colectaron 3 hojas por planta y se mantuvieron en sobres de papel que contenían silica gel.

Extracción de DNA y amplificación de ISSRs

La extracción del ADN se llevó a cabo a través del método de Doyle y Doyle (1987) y su cuantificación se realizó a través de un biofotómetro Eppendorf. Se probaron 20 oligos ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) procedentes de la serie 9 de la unidad de servicios de proteínas y ácidos nucleicos de la Universidad de Columbia Británica, Vancouver, B.C., Canadá. De acuerdo a su nitidez y alto polimorfismo, se eligieron cuatro oligos (809 = (AG)₈G; 810 = (GA)₈T; 840 = (GA)₈YT; 841 = (GA)₈YC). Las

reacciones de PCR consistieron en 30 ng de DNA, 1x Buffer (Tris-HCl 20mM pH8.4 y KCl 50mM), MgCl₂ 2mM, dNTPs 0.2μM, Taq I unidad, 1 μM de oligo (invitrogen), el volumen final se ajustó a 15 μl utilizando agua ultrapura (inyectable). Los ciclos de amplificación consistieron en 5 min a 94° C; 35 ciclos 30 seg 94° C, 45 seg 52° C, 2 min 72° C; y un ciclo de extensión 7 min 72° C. Los productos de PCR se visualizaron en geles de poliacrilamida al 6% (19:1 acrilamida:bis; urea 7 M, buffer TBE 1X [Tris-HCl 0.09 M, ácido bórico 0.09 M y EDTA 4mM]). La electroforesis se realizó en cámaras de secuencia dual (CBS Scientific Company) a 500 V y 18 mA durante 3 horas. Los geles fueron teñidos a través del protocolo de nitrato de plata (Bassam *et al.* 1991). Posteriormente fueron fotografiados con una cámara digital (Leica Digilux I). Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa Lab Works-4® (Image Acquisition and Analysis Software, UVP Laboratory Products, 1998), el cual asigna un peso molecular a cada banda de acuerdo con el marcador de referencia (100 pb DNA ladder, invitrogen). Finalmente se elaboró una matriz de datos en donde la presencia de las bandas se codificó con el número 1 y la ausencia como 0.

Análisis Estadísticos

Diversidad genética

Se calcularon los parámetros de diversidad genética más importantes. El porcentaje de loci polimórficos (PP) con el criterio del 95% (un locus es considerado polimórfico si la frecuencia del alelo es igual o menor a 0.95) y la heterocigosidad esperada (He; Hedrick 2000). Debido a que los marcadores ISSR son dominantes y por tanto no se puede distinguir entre genotipos heterocigos y homocigos dominantes, se asumió que las poblaciones se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg. Se utilizó la corrección

de Lynch y Milligan (1994) para reducir el sesgo en la estimación de las frecuencias alélicas con marcadores dominantes. Estos datos se obtuvieron con el programa TFPGA (versión 1.3; Miller 1997). Debido a que es fácil de violar el supuesto de Hardy-Weinberg (ver Culley y Wolf 2001), estimamos de manera complementaria el índice de Shannon como medida de diversidad genética (H'), el cual no asume que las poblaciones se encuentren bajo el equilibrio Hardy-Weinberg (Lewontin 1972; King y Schaal 1989; Bussell 1999; Domínguez *et al.* 2005). La estimación del índice se llevó a cabo a través del programa Popgene (version 1.32; Yeh *et al.*, 1997).

Se realizó un análisis de regresión lineal entre la variación genética y la latitud, con el fin de detectar si en el norte de la distribución existe huella genética de una posible expansión del área de distribución. Asimismo, se llevó a cabo un análisis de varianza para conocer si los niveles de variación genética difieren entre los sistemas reproductivos (distilia y tristilia). Debido a que a través de los marcadores de cloroplasto se encontró que no existen diferencias significativas entre la distilia y tristilia, una vez que se elimina el efecto de la latitud, procedimos a realizar estos mismos análisis. Para esto examinamos el efecto del sistema reproductivo sobre los residuales provenientes de un análisis de regresión lineal entre la latitud y la variación genética.

Estructura génica

La estructura génica de las poblaciones se calculó a través de un análisis molecular de varianza (AMOVA; Excoffier 1992) utilizando el programa Arlequin (versión 3.11; Excoffier *et al.* 2005). Se realizó un análisis jerárquico adicional, en donde se agrupó a las poblaciones de acuerdo al sistema reproductivo. Posteriormente, se calculó el grado de estructuración en cada grupo reproductivo con el fin de conocer el nivel de parentesco

entre las poblaciones. Las relaciones genéticas de las 18 poblaciones se infirieron a través de un fenograma Neighbour-Joining utilizando el programa sendbs (Takezaki, National Institute of Genetics, Japón; <http://www.kms.ac.jp/~genomelb/genomelab.eng.html>). El apoyo de las ramas se estimó con 1000 permutaciones de bootstrap. Se realizó una prueba de Mantel (Mantel, 1967) con el fin de conocer si existe relación entre las distancias genéticas y geográficas, utilizando el programa TFGA (versión 1.3; Miller 1997). La matriz de distancias geográficas se obtuvo con el programa GeoDis (versión 2.6, Posada *et al.*, 2000) y las distancias genéticas (F_{ST}) con el programa Popgene (version 1.32).

Se estimó el número de grupos (K) más probable que define la estructura genética de las poblaciones de *O. alpina* a través de la aproximación de agrupamiento Bayesiano, implementado en el programa Structure (version 2.2; Pritchard *et al.* 2000; Falush *et al.* 2003, 2007). Este método de agrupamiento se caracteriza porque no se especifica la población de la que procede cada individuo, sino que el algoritmo estima la probabilidad de pertenencia de un individuo a un grupo particular.

Los análisis se llevaron a cabo probando desde $k = 1$ hasta $k = 19$ con 30 repeticiones. Las condiciones del “burn-in” y “after burni-in” fueron de 90000 simulaciones. Los análisis se realizaron bajo el modelo “admixture” (se asume que los individuos tienen una ancestría mezclada) y el modelo de frecuencias correlacionadas (asume que las frecuencias en las distintas poblaciones son similares debido a migración o ancestría común). Estos modelos fueron elegidos debido a que información previa mostró que las poblaciones de *O. alpina* en las Sky Islands presentan una historia evolutiva muy reciente (6000 – 280000 años), por lo que la mayor parte de la variación

genética es aún compartida entre las poblaciones. El número de grupos más probable se estimó a través del método de Evanno *et al.* (2005).

Resultados

Variación genética

El tamaño de los fragmentos amplificados varió de 60 a 2070 (pb) pares de bases, sin embargo solo se consideraron las bandas de entre 60 y 650 pb debido a que eran más nítidas y por tanto, su identificación más confiable. Se detectaron un total de 80 bandas, de las cuales 26 corresponden al primer 810; 20 al 809, 29 al 841 y 5 bandas al primer 840. La diversidad genética total a nivel de especie medida a través del porcentaje de loci polimórficos fue de 98.75, el valor del índice de Shannon fue de 0.27, y la heterocigosidad esperada fue de 0.16 (tabla 1). Respecto al valor promedio de las 18 poblaciones con estos mismos parámetros fue de 48.35 el porcentaje de loci polimórficos, 0.23 el índice de Shannon y 0.15 la heterocigosidad esperada (tabla 1). Los menores niveles de diversidad genética ocurrieron en la población Santa Catalina Bear Wallow y en la población Mariquita a través de la heterocigosidad esperada ($H_e = 0.10$, $H_e = 0.13$ respectivamente), así como a través de los parámetros que no se basan en una estimación de las frecuencias alélicas (Santa Catalina Bear Wallow, $PP = 34.46$, $H' = 0.16$; Mariquita, $PP = 39.74$; $H' = 0.20$). Por otro lado, los mayores niveles de diversidad genética estimada a través del porcentaje de loci polimórficos se encontraron en la población Animas ($PP = 0.64$), la cual fue seguida por la población Los Ajos ($PP = 56.41$). Sin embargo, el índice de Shannon y la heterocigosidad esperada mostraron valores muy similares entre las dos poblaciones e incluso fueron mayores en la población de los Ajos (Animas, $H' = 0.23$; $H_e = 0.15$; Ajos, $H' = 0.26$; $H_e = 0.17$).

Se encontró una relación negativa, estadísticamente significativa, entre la latitud y el PP ($r = 0.20$, $F_{1,16} = 5.05$, $P = 0.04$; Fig. 2), sin embargo a pesar de que el índice de Shannon y la H_E siguen la misma tendencia, la relación fue marginalmente significativa ($r = 0.14$, $F_{1,16} = 3.78$, $P = 0.07$; $r = 0.17$, $F_{1,16} = 4.3$, $P = 0.05$, respectivamente; Fig. 2).

Las poblaciones tristílicas mostraron mayores niveles de diversidad genética que las poblaciones distílicas al analizar la heterocigosidad esperada ($F_{1,16} = 5.4$, $P = 0.03$), así como con los índices de diversidad que no se basan en la estimación de las frecuencias alélicas ($F_{1,16} = 7.8$, $P = 0.01$; $F_{1,16} = 5.9$, $P = 0.02$ PP e índice de Shannon respectivamente). Sin embargo, al considerar el efecto de la latitud, los resultados no fueron significativos con ninguno de los tres estimadores ($F_{1,16} = 2.54$, $P = 0.13$; $F_{1,16} = 2.06$, $P = 0.17$; $F_{1,16} = 1.67$, $P = 0.21$; PP, índice de Shannon y H_e respectivamente).

Estructura genética y relaciones entre las poblaciones

Un análisis molecular de varianza (AMOVA) mostró que el 13% de la variación genética es explicada por las diferencias entre las poblaciones ($P < 0.001$). Un análisis jerárquico adicional en donde se agrupó a las poblaciones de acuerdo al sistema reproductivo (distílicas y tristílicas), indicó que únicamente el 0.4% de la variación genética se encuentra distribuida entre los sistemas reproductivos, mientras que el 13% se explica por las diferencias entre poblaciones dentro de cada grupo (tabla 2). Finalmente se realizó un análisis para conocer la estructura genética en cada grupo reproductivo. Los resultados indicaron que el 14% de la variación es explicada por las diferencias entre poblaciones tristílicas, mientras que el 9% se debe a diferencias entre poblaciones distílicas.

El fenograma Neighbor-Joining mostró dos grupos principales (Fig. 3), uno de ellos incluye a las poblaciones tristílicas de Sonora y una población tristílica de Arizona (Chiricahua). En el segundo grupo se encuentran el resto de las poblaciones. En este último grupo se pueden observar a su vez dos subgrupos principales, uno de ellos incluye poblaciones que se ubican en la región más norte de las Sky Islands (Pinos Altos, White, Pinal, Galiuro, aunque también incluye a la población Buenos Aires, la cual se encuentra en el sur), mientras el segundo subgrupo comprende poblaciones localizadas en la parte central de las Sky Islands (San José, Mariquita, Elenita) y una población ubicada más al norte (Pinaleño). Las poblaciones distílicas Santa Catalina, Pinery Chiricahua y Nutall Ridge Pinaleño, se mantuvieron como grupos hermanos a estos dos subgrupos. En general las ramas del fenograma Neighbour-Joining fueron apoyadas por valores de bootstraps bajos, y variaron de 0 a 28 (Fig. 3). La prueba de Mantel no mostró una relación significativa entre la variación genética y geográfica ($r = 0.13$, $p = 0.083$), aunque está cerca del valor significativo.

Agrupamiento Bayesiano

De acuerdo al método de Evanno y Goudet (2005), el número de grupos más probable que refleja la estructura genética de *O. alpina* es de dos (Fig. 4). El 28.54% de los individuos fueron asignados al grupo 1, mientras 22.55% fueron asignados al grupo 2, el 48.90% restante de los individuos, no se pudo asignar a un grupo en particular ya que los intervalos de confianza de la asignación se sobreponían (Fig. 4). En general los individuos del grupo 1 tienden a distribuirse en latitudes menores, por ejemplo en las poblaciones de Sonora (Azul, Los Ajos, La Púrica, San José), Arizona (Pinery Chiricahua, Morse Canyon Chiricahua) y Nuevo México (Animas), mientras los individuos del grupo 2 se

encuentran principalmente en las poblaciones del norte, tales como Pinal, Santa Catalina, Galiuro, Pinaleño y White. Sin embargo, los individuos de tres poblaciones del sur (Mariquita, Elenita y Buenos Aires) fueron asignados a este grupo (Fig. 4).

Discusión

Variación genética en O. alpina: comparación entre el genoma de cloroplasto y el nuclear

A nivel de especie, *O. alpina* presentó mayores niveles de diversidad genética (98.75 PP) en comparación con 13 especies herbáceas y perennes que también fueron analizadas con marcadores moleculares ISSR (77.92 PP) (Culley *et al.* 2007; Esselman *et al.* 1999; Feyissa *et al.* 2007; Ge 2001; Houliston y Chapman 2004; Lei *et al.* 2006; Li y Xia *et al.* 2007; Qiu *et al.* 2006; Sica *et al.* 2005; Song *et al.* 2006; Ward *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2006; Zong *et al.* 2008). Sin embargo, al comparar el promedio de diversidad a nivel de población, los valores fueron muy similares entre *O. alpina* (47.6 PP) y las 13 especies mencionadas (46.10% PP). Un patrón similar se detectó al analizar el ADN de cloroplasto de *O. alpina* (Pérez-Alquicira *et al.* 2010). Ambos resultados sugieren que las diferencias genéticas entre las poblaciones y no tanto la variación dentro de las poblaciones, son la principal causa de los altos niveles de diversidad genética encontrados en *O. alpina*.

Encontramos una relación negativa entre los niveles de variación genética y la latitud. Este patrón es congruente con la información paleoecológica que sugiere que las especies adaptadas a climas templados a fríos migraron hacia mayores latitudes a finales del Pleistoceno a consecuencia del calentamiento del clima (Pérez-Alquicira *et al.* 2010). Este mismo resultado fue evidente a través de secuencias de ADN de cloroplasto, sin embargo la intensidad de los cuellos de botella y eventos fundador han sido más

intensos en este genoma debido a que el tamaño efectivo es más pequeño, por lo que la probabilidad de fijación y pérdida de los alelos al azar es mayor a consecuencia de la deriva génica (Hedrick 2005).

El sistema reproductivo no mostró una relación significativa con la variación genética una vez que se consideró el efecto de la latitud. Este mismo resultado se obtuvo al analizar el genoma de cloroplasto de *O. alpina*. En el caso de la especie heterostílida *Narcissus triandrus* tampoco se detectaron diferencias entre el sistema reproductivo trístilico y distílido al analizar el genoma nuclear (microsatélites) y de cloroplasto (secuencias no codificantes; Hodgins y Barrett 2007). Por tanto nuestros datos indican que los patrones de variación genética en *O. alpina* tienen un fuerte componente geográfico influenciado por las transiciones climáticas del Pleistoceno. Sin embargo, el sistema reproductivo al parecer no tiene un efecto en la variación genética de *O. alpina*.

La estructura génica de O. alpina: comparación entre el genoma nuclear y de cloroplasto.

Detectamos una baja estructuración genética, aunque significativa ($F_{ST} = 0.13$, $P < 0.001$). Este resultado contrasta con la marcada estructuración genética observada al analizar el ADN de cloroplasto ($F_{ST} = 0.75$, $P < 0.05$). Las posibles razones que explican estas diferencias son las siguientes: 1) debido a que el genoma de cloroplasto es haploide y se hereda únicamente por vía materna, tiene un tamaño efectivo menor que el genoma nuclear, el cual se hereda tanto por la vía materna y paterna, y tiene una ploidía mayor (Crochet 2000; Crochet *et al.* 2003). Por tanto, los procesos de deriva génica son más intensos en el genoma de cloroplasto. Debido a que uno de los resultados más importantes de la deriva génica es el incrementar la divergencia entre las poblaciones, se

espera que los niveles de estructuración sean más altos en los genomas citoplasmáticos (Wakeley 2000; Hedrick 2005; Knowles y Richards 2005; Knowles y Carstens 2007).

Con el fin de conocer si la mayor estructuración genética inferida a través de los marcadores de cloroplasto se debe al tamaño efectivo de la población, realizamos una estimación de la F_{ST} esperada para el genoma de cloroplasto considerando que no hay diferencias entre el tamaño efectivo de este genoma y el nuclear (Crochet 2000; Crochet *et al.* 2003). Los resultados indicaron que a pesar de eliminar el efecto del tamaño efectivo, la F_{ST} esperada fue de la mitad del valor observado (F_{ST} esperada = 0.374 y F_{ST} observada = 0.75). Este resultado sugiere que el tamaño efectivo no es el único factor que influye en las diferencias encontradas en los patrones de estructuración. Una segunda explicación complementaria a la anterior es la diferencia en las tasas de flujo génico entre el genoma de cloroplasto y el nuclear. Por un lado, la dispersión de semillas de *O. alpina* es muy restringida, ya que los frutos son cápsulas que explotan y liberan las semillas a distancias muy cortas de la planta madre. Por esta razón el flujo de genes del cloroplasto es muy pequeño. Mientras los genes nucleares además de dispersarse a través de las semillas, también lo hacen a través del polen. El polen se dispersa en mayor medida debido a que los principales polinizadores de *O. alpina* son abejas del género *Heterosaurus* (Weller 1981). Por tanto, las tasas de flujo génico a través de las semillas y del polen, sería otra de las razones que explicarían los patrones contrastantes en la estructuración génica detectada a través de marcadores nucleares y de cloroplasto. Este mismo patrón se ha encontrado en una gran cantidad de estudios, al comparar el genoma nuclear y los genomas citoplasmáticos (Tarayre *et al.* 1997; Crochet 2000; Crochet *et al.* 2003; Griffin y Barrett 2004).

Por otro lado, a diferencia de los marcadores de cloroplasto, la prueba de Mantel no resultó significativa con los genes nucleares, aunque está cerca de ser significativa ($r = 0.13$, $p = 0.083$), lo que indica que existe un patrón muy débil de aislamiento por distancia. Este resultado, aunado a la baja estructuración genética sugiere que las poblaciones mantienen una fuerte cohesión genética. A pesar de que en la actualidad se encuentran aisladas, el tiempo de divergencia no ha sido el suficiente para detectar patrones de aislamiento y estructuración. Estos mismos resultados son evidentes al analizar el árbol de distancias Neighbor Joining, en el cual los valores de bootstrap son muy bajos, lo que sugiere nuevamente la ausencia de patrones claros en el agrupamiento de las poblaciones.

A través del algoritmo del programa Structure detectamos que el número de grupos que refleja mejor los patrones de estructuración genética es de dos. Ambos grupos están representados por una fracción de individuos de todas las poblaciones, sin embargo se observa que la mayoría de los individuos del sur de las Sky Islands (Azul, Los Ajos, La Púrica, Animas, San José, Morse Canyon Chiricahua y Pinery Chiricahua, aunque también poblaciones del norte como Pinos altos) corresponden al grupo 1 y los individuos del norte de la distribución (Pinal, Santa Catalina, Galiuro, Pinaleño, White y algunas poblaciones del sur como Mariquita, Elenita y Buenos Aires) corresponden al grupo 2. El 48.9% de los individuos no se logró asignar a un grupo particular, esto sugiere que una gran proporción de individuos han sido el resultado de la reproducción entre organismos pertenecientes a los dos grupos. Este patrón se debe a que el tiempo de coalescencia de los genes nucleares es mayor que en relación a los genes de cloroplasto (Birky *et al.*, 1989; Palumbi *et al.* 2000), por lo que los polimorfismos

ancestrales compartidos se mantienen por más tiempo. Por esta razón, es posible detectar historias evolutivas más antiguas, a diferencia de los genes de cloroplasto, los cuales al tener tiempos de coalescencia más cortos, se borran más fácilmente las huellas de la historia antigua y se pueden detectar procesos evolutivos más recientes (Birky *et al.*; 1989; Palumbi *et al.* 2000).

Relaciones genéticas entre las poblaciones distílicas y tristílicas

El fenograma Neighbour-Joining generó dos grupos principales de poblaciones. Uno de ellos incluye poblaciones que se encuentran al centro y norte de las Sky Islands (Pinos Altos, Galiuro, White, Pinal, Bear Wallow Santa Catalina, Buenos Aires, San José, Mariquita, Soldier Greek Pinaleño, Elenita, Santa Catalina, Pinery Chiricahua y Nutall Ridge Pinaleño) y el segundo incluye localidades ubicadas principalmente al sur (Ajos, Púrica, Azul, Animas y Morse Canyon Chiricahua). Las poblaciones distílicas se agruparon en distintos clados, lo que sugiere que la distilia pudo tener varios orígenes. Este mismo tipo de resultado es apoyado por la información genética proveniente del cloroplasto, sin embargo existen diferencias en la topología del fenograma ya que los agrupamientos entre las poblaciones no fueron idénticos. Una de las principales razones que llevaría a la incongruencia entre las topologías sería las diferencias en los procesos microevolutivos que operan en el genoma de cloroplasto y el nuclear, por ejemplo las diferencias en los patrones de flujo génico y los diferentes tamaños efectivos.

El resultado del análisis jerárquico AMOVA, indicó que la diferenciación genética entre las poblaciones distílicas y tristílicas es muy pequeña (0.4%). Este resultado sugiere que las poblaciones distílicas han divergido muy recientemente de sus ancestros tristílicos. A su vez un análisis jerárquico adicional mostró que el 9% de la variación total

es explicado por las diferencias genéticas entre las poblaciones distílicas. Este resultado, en el que la diferenciación entre poblaciones distílicas es más grande en relación a la diferenciación genética entre poblaciones distílicas y tristílicas, sugiere que las poblaciones distílicas están más relacionadas con poblaciones tristílicas que con otras distílicas, tal como lo muestra el fenograma Neighbour-Joining. Este resultado sugiere que el origen de la distilia pudo haber ocurrido en distintas ocasiones.

Conclusiones

Las inferencias evolutivas sobre la disolución de la tristilia, a través de los marcadores moleculares de cloroplasto y de núcleo son similares. Se sugiere que el efecto combinado de la selección natural y la historia han moldeado la evolución del sistema reproductivo de *O. alpina*. Por un lado, la evolución convergente de la distilia apoyaría el modelo selectivo y por otro lado, la presencia de poblaciones distílicas al norte de la distribución, en donde los eventos fundador y los procesos estocásticos han sido más intensos, sugiere que el papel de los procesos histórico, han influenciado a su vez la ruta evolutiva del sistema reproductivo de *O. alpina*.

Referencias

Barrett SCH, Harder LD. 1996. Ecology and evolution of plant mating. *Trends in Ecology and Evolution*. **11**: 73-79.

Barrett SCH. 2002. The evolution of plant sexual Diversity. *Nature Reviews Genetics*. **3**: 274-284.

Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. **196**: 80-83.

- Birky C, William JR, Walsh B. 1988. Effects of linkage on rates of molecular evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA.* **85**: 6414-6418.
- Bussell JD. 1999. The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity among populations of *Isotoma petrae* (Lobeliaceae). *Molecular Ecology.* **8**: 775-789.
- Comes HP, Kadereit JW. 1998. The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in plant science.* **3**: 432-438.
- Crochet P-A. 2000. Genetic structure of avian populations allozymes revisited. *Molecular Ecology.* **9**: 1463-1469
- Crochet P-A, Chen JZ, Pons J-M, Lebreton J-D. 2003. Genetic differentiation at nuclear and mitochondrial loci among large White-headed gulls: sex-biased interspecific gene flow?. *Evolution.* **57**: 2865-2878.
- Cuevas E, Arias DM, Dominiguez CA, Castillo RA y Molina-Freaner F. 2006. The genetic structure of the gynodioecious *Kallstroemia grandiflora* (Zygophyllaceae): the role of male sterility and colonization history. *Heredity.* **97**: 269-274.
- Culley TM, Wolfe A. 2001. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aitom (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity.* **86**: 545-556.
- Culley TM, Sbita SJ, Wick A. 2007. Population genetic effects of urban habitat fragmentation in the perennial herb *Viola pubescens* (Violaceae) using ISSR markers. *Annals of Botany.* 3-10.

Domínguez CA, Abarca CA, Eguiarte LE, Molina Freaner F. 2005. Local genetic differentiation among populations of the mass-flowering tropical shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *New Phytologist*. **166**: 663-672.

Downie DA. 2004. Phylogeography in a galling insect, grape phylloxera, *Daktulosphaira vitifoliae* (Phylloxeridae) in the fragmented habitat of the Southwest SA. *Journal of Biogeography*. **31**: 1759-1768.

Eckert CG, Barrett SCH. 1995. Style morph ratios in tristylous *Decodon verticillatus* (Lythraceae): selection vs historical contingency. *Ecology*. **76**: 1051-1066.

Esselman EJ, Jianqiang L, Crawford DJ, Windus JL, Wolfe AD. 1999. Clonal Diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology*. **8**: 443-451.

Evanno SGR, Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*. **14**: 2611-2620.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of Molecular Variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. **131**: 479-491.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin version 3.11. An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*. **1**: 47-50.

Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*. **164**: 1567-1587.

- Falush D, Stephens M, Pritchard JK. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*.
- Feyissa T, Nybom H, Bartish IV, Welander M. 2007. Analysis of genetic diversity in the endangered tropical tree species *Hagenia abyssinica* using ISSR markers. *Genetic resources and crop evolution*. **54**: 947-958.
- Griffin SR, Barrett SCH. 2004. Post-glacial history of *Trillium grandiflorum* (Melanthiaceae) in eastern north America: inference from phylogeography. *American Journal of Botany*. **91**: 465-473.
- Herrera CM, Castellanos MC, Medrano M. 2006. Geographic context of floral evolution: towards an improved research programme in floral diversification. En: Ecology and evolution of flowers (Harder LD, Barrett SCH, eds.), pp. 278-294. Oxford, UK. Oxford University Press..
- Hedrick PW. 2005. Genetics of populations. 3a. edición. Jones and Bartlett eds. Arizona, USA.
- Heuch I. 1979. Equilibrium populations of heterostylous plants. *Theoretical Population Biology*. **15**: 43-57.
- Hewitt GM 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*. **58**: 247-276.
- Hewitt GM 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*. **405**: 907-913.
- Hewitt GM. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical transactions of the royal society B: Biological Sciences*. **359**: 183-195.
- Hodgins KA, Barrett SCH. 2007. Population structure and genetic diversity in tristylous *Narcissus triandrus*: insights from microsatellite and chloroplast DNA variation. *Molecular*

Ecology. **16**: 2317-2332.

Hodgins KA, Barrett SCH. 2008. Asymmetrical mating patterns and the evolution of biased morph ratios in a tristylous daffodil. *Genetics Research*. **90**: 3-15.

Holmgren CA, Peñalba MC, Rylander KA, Betancourt JL. 2003. A 16,000 ¹⁴C yr B.P. packrat midden series from the USA–Mexico Borderlands. *Quaternary Research*. **60**: 319-329.

Houliston GJ, Chapman HM. 2004. Reproductive strategy and population variability in the facultative apomictic *Hieracium pilosella* (Asteraceae). *American Journal of Botany*. **91**: 37-44.

King LM, Schaal B. 1989. Ribosomal-DNA variation and distribution in *Rudbeckia missourensis*. *Evolution*. **43**: 1117-1119.

Knowles LL, Richards CL. 2005. Importance of genetic drift during Pleistocene divergence as revealed by analyses of genomic variation. *Molecular Ecology*. **14**: 4023-4032.

Knowles LL, Carstens B. 2007. Estimating a geographically explicit model of population divergence. *Evolution*. **61**: 447-493.

Lande R, Schemske DW. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression I. Genetic models. *Evolution*. **39**: 24-40.

Lewis D, Jones DA. 1992. The genetics of heterostyly. En: Evolution and function of heterostyly (Barrett SCH ed.), pp. 129–150. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Lewontin R.C. 1972. The apportionment of human Diversity. *Evolutionary Biology*. **6**: 381-398.

- Lei Y, Gao H, Tsering T, Shi S, Zhong Y. 2006. Determination of genetic variation in *Rhodiola crenulata* from the Hengduan mountains region, China using inter-simple sequence repeats. *Genetics and molecular biology*. **29**: 339-344.
- Li A, Ge S. 2001. Genetic variation and clonal diversity of *Psammochloa villosa* (Poaceae) detected by ISSR markers. *Annals of Botany*. **87**: 585-590.
- Lobo JA, Quesada M, Stoner KE. 2005. Effects of pollination by bats on the mating system of *Ceiba pentandra* (Bombacaceae) populations in two tropical life zones in Costa Rica. *American Journal of Botany*. **92**: 370-376.
- Lynch M, Milligan BG. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*. **3**: 91-99.
- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and generalizad regresión approach. *Cancer Research*. **27**: 209-220.
- Masta S. 2000. Phylogeography of the jumping spider *Habronattus pugillis* (Araneae: salticidae): recent vicariance of sky islands populations? *Evolution*. **54**: 1699-1711.
- McCormack JE, Smith TB. 2008. Niche expansion leads to small-scale adaptive divergence along an elevation gradient in a medium-sized passerine bird. *Proceedings of the royal society B*. **275**: 2155-2164.
- Metcalfe SE, O'Hara SL, Caballero M. y Davies SJ. 2000. Records of late Pleistocene–Holocene climatic change in Mexico- a review. *Quaternary science reviews*. **19**: 699-721.
- Miller MP. 1997. Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.

- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. **89**: 583-590.
- Palumbi SR, Cipriano F, Hare MP. 2001. Predicting nuclear gene coalescence from mitochondrial data: the three-times rule. *Evolution*. **55**: 859-868.
- Pannell JR y Dorken ME. 2006. Colonization as a common denominator in plant metapopulations and range expansions: effects on genetic diversity and sexual systems. *Landscape Ecology*. 21: 837-848.
- Pérez-Alquicira J, Molina-Freaner FE, Piñero D, Weller S, Martínez-Meyer E, Rozas J, Domínguez CA. 2010. The role of historical factors and natural selection in the evolution of breeding systems of *Oxalis alpina* in the Sonoran desert “Sky islands”. *Journal of evolutionary Biology*. **23**: 2163-2175.
- Petit RJ, Pineau E, Demesure B, Bacilieri B, Ducouso A, Kremer A. 1997. Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **94**: 9996–10001.
- Petit RJ, Duminil J, Fineschi S, Hampe A, Salvini D, Vendramin GG. 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology*. **14**: 689-701.
- 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.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. 2000. Inference of population structure from multilocus genotype data. *Genetics*. **155**: 945-959.

- Qiu Y-X, Li J-H, Liu H-L, Chen Y-Y, Fu C-X. 2006. Population structure and genetic diversity of *Dysosma versipellis* (Berberidaceae), a rare endemic from China. *Biochemical systematics and ecology*. **34**: 745-752.
- Rosas F, Pérez-Alquicira J, Domínguez CA. 2005. Environmentally induced variation in fecundity compensation in the morph-biased male-sterile distylous shrub *Erythroxyllum havanense* (Erythroxyllaceae). *American Journal of Botany*. **92**: 116-122.
- Rosas F, Domínguez CA. 2009. Male sterility, fitness gain curves and the evolution of gender specialization from distyly in *Erythroxyllum havanense*. *Journal of Evolutionary Biology*. **22**: 50-59.
- Sica M, Gamba G, Montieri S, Gaudio L, Aceto S. 2005. ISSR markers show differentiation among Italian populations of *Asparagus acutifolius* L. *BMC genetics*. **6**:17
- Song Z, Guan Y, Rong J, Xu X, Lu B-R. 2006. Inter-simple sequence repeat (ISSR) variation in populations of the cutgrass *Leersia hexandra*. *Aquatic Botany*. **84**: 359-362.
- Sosenski P, Fornoni J, Molina-Freaner FE, Weller SG, Dominguez CA. 2010. Changes in sexual organ reciprocity and phenotypic floral integration during the tristylly-distylly transitions in *Oxalis alpina*. *New Phytologist*. **185**: 829-840.
- Tarayre M, Saumitou-Laprade P, Cuguen J, Couvet D y Thompson JD. 1997. The spatial genetic structure of cytoplasmic (cpDNA) and nuclear (allozyme) markers within and among populations of the gynodioecious *Thymus vulgaris* (Labiatae) in southern France. *American Journal of Botany*. **84**: 1675-1684.
- Thompson RS, Anderson KH. 2000. Biomes of western North America at 18,000, 6000 and 0¹⁴ C yr BP reconstructed from pollen and packrat midden data. *Journal of Biogeography*. **27**: 555-584.

Van Devender TR. 1990a. Late Quaternary vegetation and climate of the Chihuahuan Desert, United States and Mexico. In: Packrat middens: the last 40,000 years of biotic changes (Betancourt JL, Van Devender TR y Martin PS eds), pp. 104-133. University of Arizona Press, Tucson, AZ.

Van Devender TR. 1990b. Late Quaternary vegetation and climate of the Sonoran Desert, United States and Mexico. In: Packrat middens: the last 40,000 years of biotic changes (Betancourt JL, Van Devender TR y Martin PS eds), pp. 134-165. University of Arizona Press, Tucson, AZ.

Wakeley J. 2000. The effects of subdivision on the genetic divergence of populations and species. *Evolution*. **54**: 1092-1101.

Ward SM, Reid SD, Harrington J, Sutton J, Beck G. 2008. Genetic variation in invasive populations of yellow toadflax (*Linaria vulgaris*) in the western United States. *Weed sciences*. **56**: 394-399

Weller SG, Denton MF. 1976. Cytogeographic evidence for the evolution of distyly from tristily in the North American species of *Oxalis* section *lonoxalis*. *American Journal of Botany*. **63**: 120-125.

Weller SG. 1976b. The inheritance of tristily in *Oxalis* section *lonoxalis*. *Heredity*. **37**: 387-393.

Weller SG. 1981. Pollination biology of heteromorphic populations of *Oxalis alpina* in southeastern Arizona. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **4**: 57-71.

Weller SG, Dominguez CA, Molina-Freaner FE, Fornoni J, LeBuhn G. 2007. The evolution of distyly from tristily in populations of *Oxalis alpina* (Oxalidaceae) in the Sky Islands of the Sonoran desert. *American Journal of Botany*. **94**: 972-985.

- Xia T, Chen S, Chen S, Zhang D, ZHANG d, Gao Q, Ge X. 2007. ISSR analysis of genetic diversity of the Qinghai-Tibet plateau endemic *Rhodiola chrysanthemifolia* (Crassulaceae). *Biochemical systematics and ecology*. **35**: 209-214.
- Yeh FC, Yang R-C, Boyle TBJ, Ye Z-H y Mao JX. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.
- Zhang X-P, Li X-H, Qiu Y-X. 2006. Genetic diversity of the endangered species *Kirengeshoma palmata* (Saxifragaceae) in China. *Biochemical systematics and ecology*. **34**: 38-47.
- Zong M, Liu H-L, Qiu Y-X. 2008. Genetic diversity and geographic differentiation in the threatened species *Dysosma pleiantha* in China as revealed by ISSr analysis. *Biochemical genetics*. **46**: 180-196.

Tabla 1. Variabilidad genética de *O. alpina* detectada a través de marcadores moleculares ISSR en la región de las Sky Islands (**SR**, sistema reproductivo; **n**, tamaño de muestra; **PP**, Porcentaje de loci polimórficos, criterio del 95%; **He**, heterocigosidad esperada; **H'** índice de Shannon).

Población	SR	n	PP	He	H'
1. Mariquita	T	30	39.74	0.12	0.19
2. San José	T	27	52.56	0.17	0.27
3. Santa Catalina	D	27	42.30	0.13	0.21
4. White	T	33	39.74	0.13	0.21
5. Morse Canyon Chiricahua	T	32	44.87	0.16	0.25
6. Soldier Greek Pinaleño	T	15	41.02	0.12	0.18
7. Pinery Canyon Chiricahua	D	29	50.00	0.15	0.24
8. Nutall Ridge Pinaleño	D	26	39.74	0.13	0.21
9. Azul	T	26	52.56	0.17	0.26
10. Ajos	T	30	56.41	0.17	0.26
11. Purica	T	30	50.00	0.15	0.24
12. Pinos Altos	T	22	53.84	0.16	0.25
13. Pinal	D	30	43.58	0.13	0.20
14. Animas	T	30	64.10	0.20	0.31
15. Galiuro	T	20	52.56	0.14	0.23
16. Buenos Aires	T	28	53.84	0.15	0.23
17. Elenita	T	29	55.12	0.15	0.23
18. Santa Catalina Bear Wallow	T	20	38.46	0.10	0.16
Promedio		18	48.35	0.15	0.23
A nivel de especie		484	98.75	0.15	0.23

Tabla 2. Análisis molecular de varianza (AMOVA) entre a) 18 poblaciones de *O. alpina* en la región de las Sky Islands b) poblaciones tristílicas y distílicas c) poblaciones tristílicas d) poblaciones distílicas. *indica los valores significativos ($p < 0.05$) (g.l., grados de libertad)

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de la variación
a)				
Entre poblaciones	17	667.5	1.18	13.5
Dentro de poblaciones	466	3537.3	7.6	86.7
Total	483	4204.8	8.8	
b)				
Entre grupos	1	44.3	0.04	0.4
Entre poblaciones dentro de grupos	16	623.2	1.2	13.2
Dentro de poblaciones	466	3537.2	7.6	86.3
Total	483	4204.8	8.8	
c)				
Entre poblaciones	12	530.9	1.3	14.13
Dentro de poblaciones	354	2776.5	7.8	85.9
Total	366	3307.3	9.1	
d)				
Entre poblaciones	4	92.3	0.7	9.4
Dentro de poblaciones	112	760.8	6.8	90.6
Total	116	853.1	7.5	

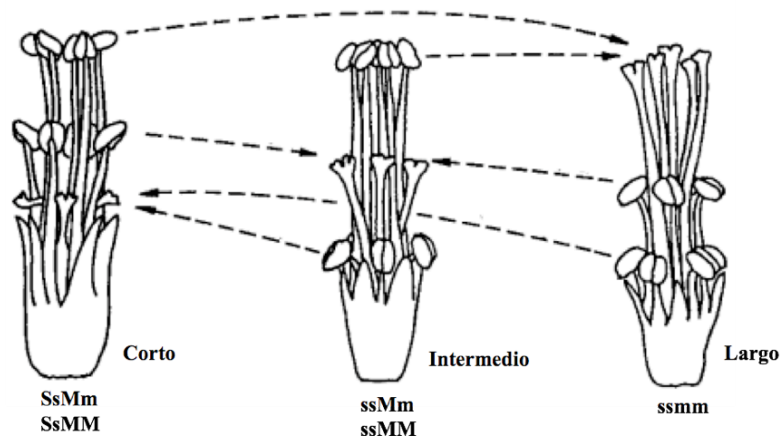


Figura 1. Esquema que muestra los tres morfos florales de las plantas tristílicas. De izquierda a derecha se muestra el morfo con estilo corto, medio y largo. Aunado al polimorfismo en el tamaño de los estilos y estambres, existe un sistema de incompatibilidad que previene la autofecundación y la fecundación entre estigmas y anteras que se encuentran a alturas distintas. Las líneas punteadas indican las cruces compatibles. La genética de la tristilia se caracteriza por la interacción de dos genes que se encuentran en desequilibrio de ligamiento. La expresión del morfo de estilo corto depende de la presencia del alelo S, que es dominante sobre el s y tiene un efecto epistático sobre el gen M. cuando el locus S es homócigo recesivo y M está presente, se expresa el morfo intermedio. En el caso del morfo largo, los dos loci deben ser homócigos recesivos (Barrett 1992, 1993; Ganders 1979; Heuch 1979; Weller 1976a). De acuerdo a la determinación genética de la Distilia, la proporción esperada de cada morfo es la misma.

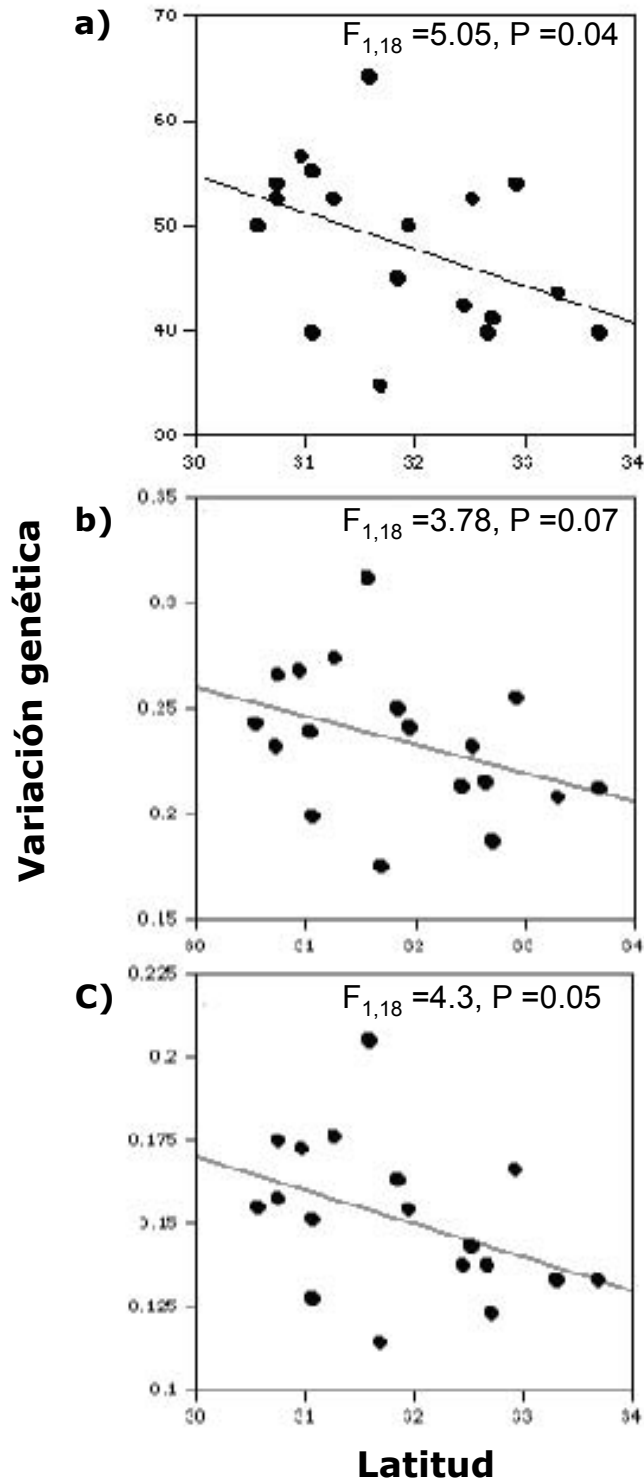


Figura 2. Diversidad genética de *O. alpina* de la región de las Sky Island, en función de la latitud a) Porcentaje de loci polimórficos b) Índice de Shannon c) Heterocigosidad esperada.

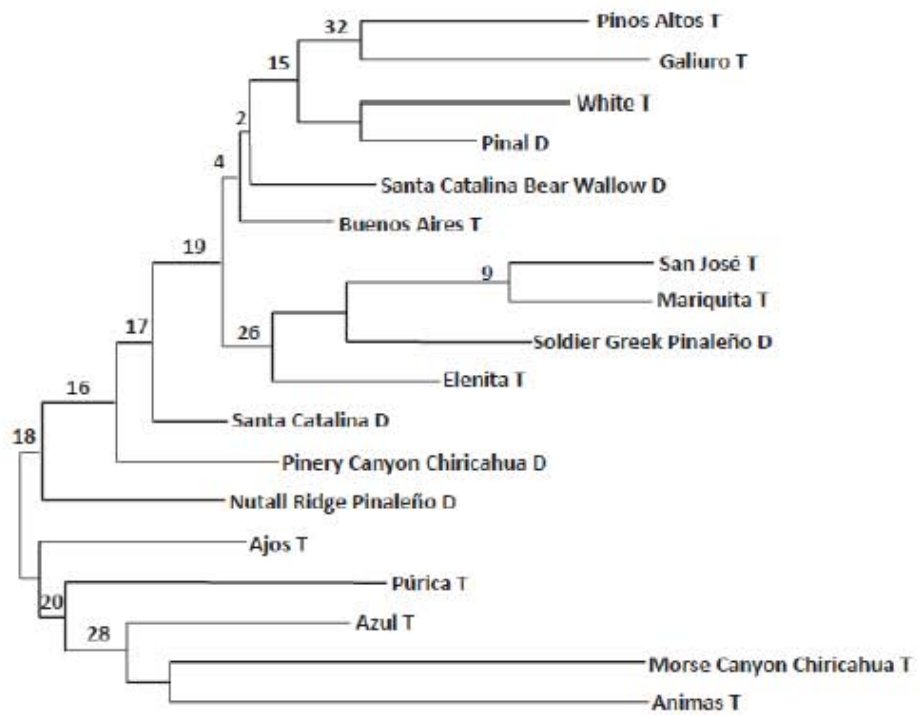


Figura 3. Fenograma Neighbour joining y valores de bootstrap de 18 poblaciones de *O. alpina* de la región de las Sky Island.

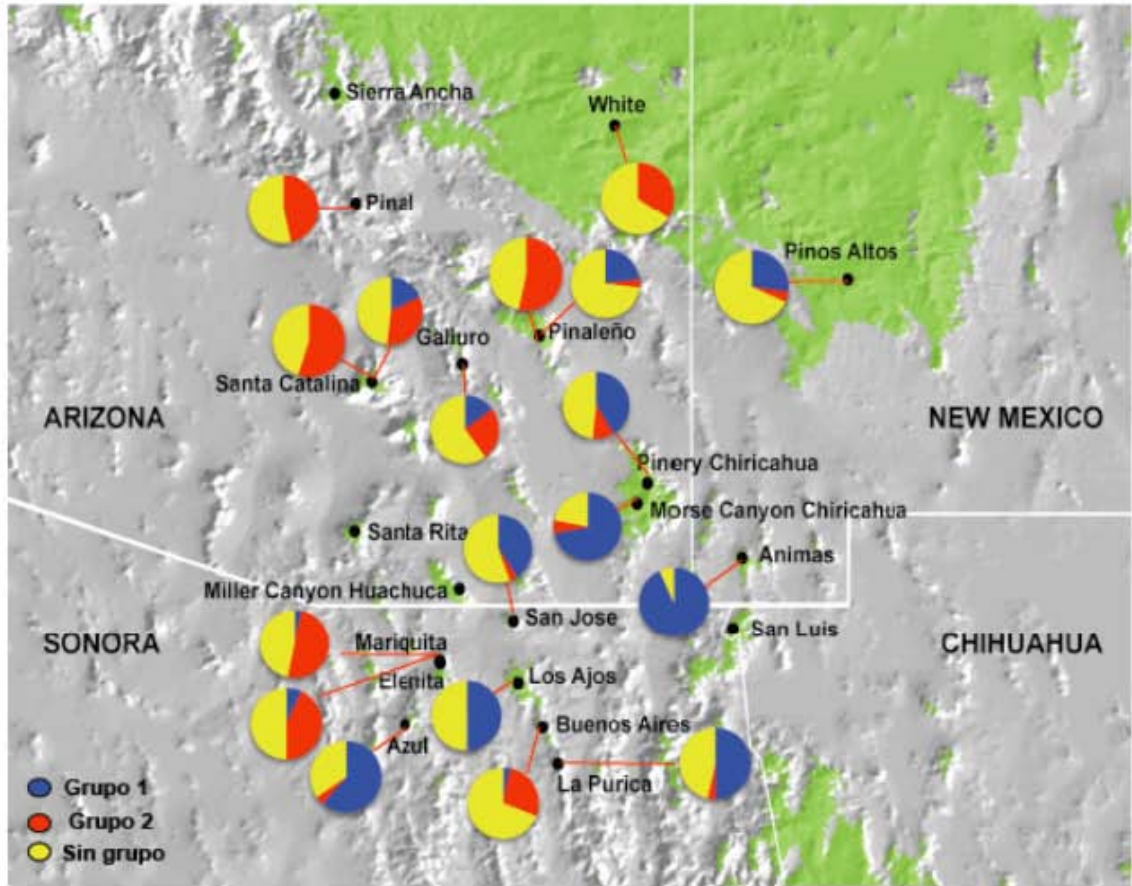


Figura 4. Mapa que muestra la distribución de los 2 grupos genéticos detectados con el algoritmo bayesiano (Pritchard *et al.* 2000). También se incluyeron las frecuencias de los individuos que no se asignaron a ningún grupo.

DISCUSIÓN GENERAL

Nuestros principales resultados muestran que la estructura génica de *O. alpina*, ha estado fuertemente influenciada por las transiciones climáticas ocurridas durante el Pleistoceno, en particular nuestros datos sugieren que durante los dos últimos periodos de glaciación-interglaciación.

Encontramos la huella genética de una posible expansión del rango de distribución hacia latitudes mayores. Asimismo detectamos que las modificaciones más fuertes en el sistema de incompatibilidad y en la reducción del morfo intermedio, se encuentran en el norte de la distribución. Estos datos sugieren que la historia no solo ha influenciado los patrones de distribución de la variación genética sino a su vez el sistema reproductivo de *O. alpina*.

Por otro lado, estudios recientes muestran una relación negativa entre la pérdida de la incompatibilidad entre el morfo largo y corto con la frecuencia del morfo intermedio. Este resultado indica que al aumentar la compatibilidad entre el morfo largo y corto, la reproducción entre ambos aumenta. Sin embargo produce una desventaja reproductiva en el morfo intermedio ya que mantiene cierta incompatibilidad con estos dos morfos (Weller *et al.* 2007). Esta evidencia aunado a que nuestros datos genéticos indican la posible evolución convergente de la distilia, apoyan la hipótesis de que la selección natural ha jugado un papel preponderante en la evolución del sistema reproductivo de *O. alpina*. En otras especies distílicas de *Oxalis* que pertenecen a la sección *Ionoxalis*, el morfo intermedio también está ausente, lo que sugiere que este modelo de selección podría ser muy general para la sección.

Comparación de los patrones de variación genética entre el genoma de cloroplasto y el nuclear

A través de marcadores moleculares de cloroplasto y nucleares, encontramos una relación negativa entre la latitud y los niveles de variación genética, lo que sugiere que las poblaciones del norte han sido el resultado de una reciente colonización. El modelaje de nicho apoya estos datos genéticos, sugiriendo que la distribución de *O. alpina* durante el UMG, se encontraba principalmente al sur de la distribución actual y a una menor altitud.

Es importante señalar que el coeficiente de correlación entre la latitud y la variación genética fue mayor al analizar los marcadores de cloroplasto que los nucleares. Este resultado puede explicarse porque el tamaño efectivo del genoma de cloroplasto es menor y por tanto los cuellos de botella tienen un mayor impacto en los niveles de variación genética (Hedrick 2005). Existen numerosos ejemplos (Petit *et al.* 2005) en los que se ha observado este mismo patrón, en donde los organelos citoplasmáticos (cloroplasto y mitocondria) al presentar menores tamaños efectivos respecto al núcleo, la deriva génica actúa más intensamente, lo que puede generar la pérdida y fijación de alelos al azar en tiempos muy cortos (Birky *et al.* 1989; Palumbi *et al.* 2000).

Por otro lado, a través de los marcadores de cloroplasto, se encontró una fuerte estructuración genética y un proceso de aislamiento por distancia (prueba de Mantel).

Sin embargo los resultados provenientes de los marcadores nucleares, mostraron resultados contrastantes a los del cloroplasto, ya que la estructuración genética fue menor y no se detectó un proceso de aislamiento por distancia. Estas diferencias entre los marcadores moleculares puede ser el resultado de que los tamaños efectivos del genoma nuclear y de cloroplasto son distintos. Por tanto, como se mencionó anteriormente, el genoma del cloroplasto al tener un tamaño efectivo menor, los eventos aleatorios de pérdida y fijación de los alelos en las distintas poblaciones ocurren

en un menor tiempo, lo que conduciría a una rápida divergencia de las poblaciones y por tanto a una mayor estructuración genética. Sin embargo nuestros resultados indicaron que a pesar de que el tamaño efectivo del genoma puede influenciar los niveles de estructuración genética, esta variable no es la única, ya que al considerar las diferencias en el tamaño efectivo, la F_{ST} teórica a través de los genes de cloroplasto, es la mitad del valor observado. Por esta razón, otras explicaciones complementarias deberían de ser consideradas. La explicación complementaria, sería que las tasas de flujo génico entre el genoma de cloroplasto y el nuclear son diferentes. Por un lado, en la mayoría de las angiospermas, los organelos citoplasmáticos (cloroplasto y mitocondria) se heredan a través de la vía materna, es decir, a través de las semillas, mientras los genes nucleares se heredan a través de la vía materna y paterna, esto es, a través de las semillas y del polen. Debido a que la polinización en *O. alpina*, se lleva a cabo a través de distintos insectos, en particular abejas, indicaría que el área en la que ocurre el movimiento del polen es mayor que respecto a las semillas, ya que existen evidencias que muestran que en *O. alpina* los frutos al madurar explotan y las semillas son liberadas a cortas distancias de la planta madre. Por tanto, estas diferencias en los patrones de flujo génico serían una buena explicación ante los distintos patrones encontrados en la estructura génica a través de los distintos marcadores moleculares.

Un aspecto interesante fue que las poblaciones distílicas mostraron menores niveles de variación genética con respecto a las poblaciones tristílicas con ambos marcadores moleculares. Sin embargo, análisis posteriores indicaron que la latitud es la principal causa de estas diferencias, lo que sugiere que los eventos históricos que promovieron la expansión del rango han sido más importante en determinar los niveles de variación

genética en las poblaciones distílicas y tristílicas que el mismo sistema reproductivo, distílico o tristílico.

Relaciones genéticas entre las poblaciones distílicas y tristílicas: comparación entre marcadores moleculares de cloroplasto y nucleares.

Los árboles de distancia reconstruidos a través del genoma nuclear y de cloroplasto, mostraron patrones de agrupamiento similares, en particular asociados a la ubicación geográfica de las poblaciones. Sin embargo los patrones geográficos más claros se detectaron a través de los marcadores de cloroplasto ya que los nucleares mostraron ciertas incongruencias con la geografía. Estos resultados podrían ser consecuencia de que el sorteo de linajes es más lento en los genes nucleares ya que el tamaño efectivo tamaño es mayor, y por tanto el flujo génico histórico podría enmascarar los patrones espaciales actuales (Birky *et al.*, 1989; Palumbi *et al.* 2000). Este proceso, a su vez se ve reflejado en los bajos valores bootstraps en las ramas del fenograma Neighbour Joining, indicando que las poblaciones comparten una similitud genética alta.

Con el fin de inferir si la distilia se originó en diferentes eventos evolutivos, analizamos la estructura génica de las poblaciones distílicas y tristílicas. Una alta diferenciación genética, sugeriría que las poblaciones distílicas podrían tener distintos ancestros tristílicos. Los datos del ADN de cloroplasto mostraron justo el patrón que se ha mencionado, una mayor estructuración genética entre las poblaciones distílicas que entre las poblaciones tristílicas, sugiriendo su origen no es monofilético. Sin embargo, los marcadores nucleares mostraron el patrón inverso, las tristílicas tuvieron una mayor diferenciación genética, sin embargo ambos valores de F_{ST} fueron muy similares. Es importante señalar que en el caso de los ISSR, no se incluyeron dos poblaciones distílicas y por tanto estos resultados no son completamente comparables.

Otra aproximación a la que recurrimos para inferir si la distilia es una condición que se ha originado en distintas ocasiones, fue comparar tres fenogramas construidos a través de marcadores moleculares de cloroplasto, ISSR y microsátélites (Tsyusko datos no publicados). Detectamos incongruencias en cada uno de los árboles con respecto a los linajes tristílicos ancestrales de los cuales provienen las poblaciones distílicas. Sin embargo, en los tres fenogramas, es evidente que la distilia proviene de más de un ancestro tristílico. Estos resultados apoyarían la hipótesis de convergencia evolutiva y por tanto sugiere que la influencia de la selección natural sería crucial en la evolución tristilia-distilia. Es indispensable incluir más datos genéticos con el fin de analizar cuales podrían ser los ancestros de las poblaciones distílicas.

La influencia de los factores históricos en la transición tristilia-distilia en O. alpina

Detectamos una relación negativa entre la latitud y la frecuencia del morfo intermedio, así como una relación positiva entre el grado de modificación del sistema de incompatibilidad y la latitud ($F_{1,16} = 12$, $P = 0.003$). Este resultado indica que las poblaciones con mayor modificación del sistema reproductivo, se localizan en latitudes mayores. Debido a que detectamos una reciente expansión del rango hacia el norte de la distribución, asociado a las transiciones climáticas de Pleistoceno, sugiere que la historia de las migraciones ha influenciado la modificación del sistema reproductivo de *O. alpina*. Existen numerosos ejemplos que muestran cambios en los sistemas de incompatibilidad durante los eventos de migración, tal es el caso de las especies tristílicas *Eichhornia paniculata* y *E. crassipes*, en donde las poblaciones fundadoras son principalmente autocompatibles y con alta tasa de clonalidad. Este resultado se ha explicado es consecuencia de las nuevas condiciones ecológicas, como por ejemplo la ausencia de polinizadores. Asimismo, en estas dos especies tristílicas se han detectado

sesgos en las frecuencias de los morfos florales e incluso la pérdida de uno de los morfos, lo cual se ha asociado a eventos fundador. Por tanto, nuestros resultados sugieren que los factores históricos podrían haber influenciado la transición tristilia-distilia.

CONCLUSIONES GENERALES

- ◆ Nuestros datos genéticos y del modelaje de nicho ecológico sugieren que las transiciones climáticas ocurridas a finales del Pleistoceno han influenciado fuertemente los patrones de estructuración genética de *Oxalis alpina* en la región de las Sky Islands. La reducción en la diversidad genética en las poblaciones al norte de las Sky Islands, sugiere la ocurrencia de expansiones del rango en esta región.
- ◆ Los patrones de estructuración genética a través de los marcadores de cloroplasto fue casi seis veces mayor que respecto a los marcadores nucleares. Este patrón se debe por un lado, a que el tamaño efectivo del genoma de cloroplasto es menor que el genoma nuclear. Y por otro lado, el flujo genético a través de las semillas es menor en comparación con el flujo de genes a través del polen.
- ◆ Se sugiere que la evolución del sistema reproductivo ha sido influenciada por la selección natural y por los procesos estocásticos asociados a los eventos históricos. Por un lado, los árboles de distancia reconstruidos a través de marcadores nucleares y de cloroplasto sugieren una posible evolución

convergente de la distilia en donde el morfo intermedio siempre está ausente, lo que sugiere que la selección natural ha jugado un papel muy importante.

Asimismo en el género *Oxalis* sección *lonoxalis* se ha observado que en la mayor parte de las especies distílicas el morfo intermedio también está ausente, lo que sugiere que el modelo selectivo que opera en *O. alpina* podría ser similar en el grupo *lonoxalis*. Finalmente, el fuerte componente latitudinal en la distribución de las poblaciones distílicas, sugiere que a su vez los factores históricos asociados a las transiciones climáticas influenciaron la evolución del sistema reproductivo de *O. alpina*.

- ◆ Las inferencias sobre las relaciones genéticas entre las poblaciones de *O. alpina* difirieron entre los marcadores de cloroplasto y los nucleares, este resultado posiblemente está asociado a las diferencias en los patrones de flujo génico a través de las semillas y del polen, así como a las diferencias en el tamaño efectivo de cada uno de los genomas.
- ◆ El tiempo de divergencia entre las poblaciones de *O. alpina*, varió de 4313 a 279,285 años. Los tiempos de divergencia más recientes coinciden con la última transición climática ocurrida a finales del Pleistoceno. Sin embargo es muy importante incluir mayor información genética para tener estimaciones más precisas.
- ◆ Se sugiere que la evolución de la distilia en algunas poblaciones es muy reciente, posiblemente su origen ocurrió durante el último periodo interglaciar.

REFERENCIAS

Birky C, William JR, Walsh B. 1988. Effects of linkage on rates of molecular evolution.

Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. **85**: 6414-6418.

Hedrick PW. 2005. Genetics of populations. 3a. edición. Jones and Bartlett eds. Arizona, USA.

Palumbi SR, Cipriano F, Hare MP. 2001. Predicting nuclear gene coalescence from mitochondrial data: the three-times rule. *Evolution.* **55**: 859-868.

Petit RJ, Duminil J, Fineschi S, Hampe A, Salvini D, Vendramin GG. 2005.

Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology.* **14**: 689-701.

Weller SG, Dominguez CA, Molina-Freaner FE, Fornoni J, LeBuhn G. 2007. The evolution of distyly from tristily in populations of *Oxalis alpina* (Oxalidaceae) in the Sky Islands of the Sonoran desert. *American Journal of Botany.* **94**: 972–985.