



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
BIOLOGÍA EVOLUTIVA**

**FILOGEOGRAFÍA COMPARADA DE ARTRÓPODOS DE ALTA  
MONTAÑA DE LA FAJA VOLCÁNICA TRANSMEXICANA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ADRIANA USCANGA CASTILLO**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. SUSANA AURORA MAGALLÓN PUEBLA  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM  
DR. JUAN PABLO JARAMILLO CORREA  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM**

**MÉXICO, D.F. JUNIO, 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
BIOLOGÍA EVOLUTIVA**

**FILOGEOGRAFÍA COMPARADA DE ARTRÓPODOS DE ALTA  
MONTAÑA DE LA FAJA VOLCÁNICA TRANSMEXICANA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**ADRIANA USCANGA CASTILLO**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. SUSANA AURORA MAGALLÓN PUEBLA  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM  
DR. JUAN PABLO JARAMILLO CORREA  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM**

**MÉXICO, D.F. JUNIO, 2016**

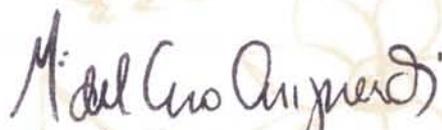
Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, en su sesión ordinaria del día 26 de octubre de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del Posgrado en Ciencias Biológicas, de la alumna **USCANGA CASTILLO ADRIANA** con número de cuenta **304502237** con la tesis titulada "**Filogeografía comparada de artrópodos de alta montaña en la Faja Volcánica Transmexicana**", bajo la dirección del **DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU**:

Presidente: DR. ATILANO CONTRERAS RAMOS  
Vocal: DR. ANTONIO GONZÁLEZ RODRÍGUEZ  
Secretario: DRA. SUSANA AURORA MAGALLÓN PUEBLA  
Suplente: DRA. ALICIA MASTRETTA YANES  
Suplente DR. EMERSON BRENT

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 22 de enero de 2016.



DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

Agradezco:

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

El apoyo económico brindado por el CONACyT mediante la beca que me fue otorgada (CVU 546231) y por el financiamiento del Proyecto de Ciencia Básica 178245. Asimismo, agradezco el apoyo económico brindado por el PAEP con el cual realicé mi estancia de investigación.

A mi tutor, Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau y a los miembros del Comité Tutor, Dra. Susana Aurora Magallón Puebla y Dr. Juan Pablo Jaramillo Correa.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por mi formación académica y humana, en especial al Posgrado en Ciencias Biológicas y al Instituto de Ecología.

Gracias a los integrantes del jurado, el Dr. Atilano Contreras, Dr. Antonio González, Dra. Susana Magallón, Dr. Brent Emerson y Dra. Alicia Mastretta Yanes, por sus atentos comentarios (a pesar de las prisas) y por sus correcciones al manuscrito. En especial agradezco a la Dra. Susana Magallón por enriquecer tanto el proyecto; y al Dr. Brent Emerson por recibirme en su laboratorio durante mi estancia de investigación y por enseñarme tanto con tan pocas palabras.

A mi comité tutorial, Dra. Susana Magallón y Dr. Juan Pablo Jaramillo, sus comentarios y sugerencias contribuyeron mucho a mejorar este proyecto.

A mis asesores, el Dr. Daniel Piñero Dalmau y la Dra. Alicia Mastretta Yanes, muchas gracias por su apoyo incondicional y por la confianza que me brindaron. Gracias por su paciencia y sus sutiles llamadas de atención, a su lado he aprendido mucho más que genética de poblaciones.

Agradezco a todos los que hicieron posible las salidas al campo. A los encargados administrativos de los Parques Nacionales en donde se realizó el muestreo, especialmente a los guardabosques y guías que nos acompañaron al Cerro Blanco y al Cerro de San Andrés. A las personas que me ayudaron a realizar las colectas: Diego, Daniel, Azael, Azalea, Fer, Atsiry, Lucía, Matthijs y Alicia; muchas gracias por aguantar las salidas y sobre todo las subidas. A todos los que prepararon el material para las trampas, Raúl, Cris, Fer, Marina, Diego, Ale y Fati; además de regalarme su tiempo, en el proceso también me regalaron mucha alegría.

Al Laboratorio de Microartrópodos de la Facultad de Ciencias por dejarme usar sus instalaciones y material, en particular quiero agradecer a Arturo por enseñarme con mucha paciencia a clasificar artrópodos. Gracias a Cris, Fer, Diego y Nancy, que me ayudaron (a marchas forzadas) a procesar todos los bichos; y agradezco a Fermín Ramírez por ayudarme con el catálogo fotográfico.

Al Laboratorio de Ecología y Evolución en islas del IPNA-CSIC, por su calurosa bienvenida y por generar un muy agradable ambiente de trabajo. Sobre todo quiero agradecer a Heri López por enseñarme a trabajar en el laboratorio, por pasarme todos sus trucos, por darme ánimos cuando me salía todo mal, y por presentarme el café con leche condensada que hacía que me salieran mejor las PCR.

A Alex Ponce y Alicia por ayudarme con el código de R. A Cris por hacer un mapa muy chulo y a Maus por sus correcciones tan precisas.

Además de agradecer a las personas que participaron activamente en la realización de este

proyecto, también quiero dar gracias a todos aquellos que me acompañaron en el camino:

Ante todo quiero agradecer a mis padres, Luis y Maritoña, por su amor y apoyo incondicional, por sus enseñanzas y por su confianza. Gracias por formar una familia tan bonita. A mis hermanas, Ale y Pao, eternas confidentes, gracias por su cercanía y por invitarme a reflexionar continuamente.

A mi familia extendida, Cris, Fer, Diego, Marina, Raúl, Fercita, Beto, Kin, Dalia, y Lucía, gracias por tantos años compartidos, no dejo de aprender de ustedes. A Fati y Ale, gracias por el bonito hogar que construimos en esos dos años, fue muy bonito adoptar a otras dos hermanas mayores. A Leo, por musicalizar el proceso, gracias por los cafés, las pláticas y por todo el cariño. Gracias al equipito naranja, mamá Chri, Guayito, Javi, Søren, Nico y Alice, hicieron de mi estancia una experiencia inolvidable.

A Ana Wegier, a Lev y a Mariana, porque me han enseñado mucho más de lo que se imaginan.

Muchas gracias al molote por cambiar mi vida. Especialmente agradezco a Maus, Emilios, Cris, Fer, Diego, Tania, Cexi, Luis, Benito, Checo, Lev y Mariana, por todo lo compartido en tan poco tiempo, y por demostrarme que hay otras formas, pero sobre todo por querer buscarlas. A Maus por echarme tantas porras en esta recta final y por todo lo que viene. Y gracias a Ringo por ser el lobazo más particular que he conocido, me da mucha alegría compartir casa con un can tan singular.

### **Supervisión durante estancia de trabajo en IPNA-CSIC**

Dr. Brent Emerson

Island Ecology and Evolution Research Group,

Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (IPNA-CSIC)

C/Astrofísico Francisco Sánchez,

La Laguna,

Tenerife (Islas Canarias, 38206),

España

# Índice

<b>1. Introducción</b>	1
1.1. <i>Estudio de los patrones de diversidad en montañas tropicales: los sistemas de islas en el cielo</i>	1
1.2. <i>La Faja Volcánica Transmexicana</i>	4
1.3. <i>Estructura de la diversidad en la FVTM: comparación de comunidades de artrópodos de alta montaña</i>	5
<b>2. Objetivos</b>	8
<b>3. Hipótesis</b>	9
<b>4. Métodos</b>	10
4.1. <i>Obtención de muestras y secuencias genéticas</i>	10
4.1.1. <i>Métodos de muestreo</i>	11
4.1.2. <i>Procesamiento de especímenes recolectados</i>	13
4.1.3. <i>Métodos moleculares</i>	14
4.2. <i>Catálogo de muestras</i>	16
4.3. <i>Delimitación de unidades taxonómicas operacionales (OTUs)</i>	16
4.4. <i>Diversidad genética y diversidad específica en siete montañas de la FVTM</i>	18
4.5. <i>Estructura genética dentro de las OTUs</i>	18
4.6. <i>Diferencia entre las comunidades de artrópodos de la FVTM que habitan distintos tipos de vegetación</i>	19
4.7. <i>Evaluación de una posible estructura Este-Oeste en la FVTM</i>	19
<b>5. Resultados</b>	23
5.1. <i>Procesamiento de muestras</i>	23
5.2. <i>Catálogo de muestras</i>	25
5.3. <i>Delimitación de unidades taxonómicas operacionales (OTUs)</i>	25
5.4. <i>Diversidad genética y diversidad específica en siete montañas de la FVTM</i>	32
5.5. <i>Estructura genética dentro de las OTUs</i>	35
5.6. <i>Diferencia entre las comunidades de artrópodos de la FVTM que habitan distintos tipos de vegetación</i>	40
5.7. <i>Estructura en la FVTM: ¿existe una división Este-Oeste?</i>	46
<b>6. Discusión</b>	52
6.1. <i>Utilidad de catálogos de OTUs para estudios de biodiversidad</i>	52
6.2. <i>Consideraciones metodológicas en la delimitación de OTUs con</i>	

<i>marcadores moleculares</i> .....	53
<b>6.3. Distribución de la diversidad genética y de OTUs en la FVTM</b> .....	54
6.3.1. Distribución altitudinal de la diversidad: diferencia entre las comunidades de artrópodos que habitan distintos tipos de vegetación .....	55
6.3.2. Distribución longitudinal de la diversidad .....	57
<b>6.4. ¿Existe una división Este-Oeste en la FVTM?</b> .....	59
<b>7. Conclusiones</b> .....	62
<b>8. Referencias</b> .....	64
<b>9. Anexos</b> .....	69
9.1. Anexo1. <i>Base de datos de individuos recolectados con información taxonómica</i> ..	69
9.2. Anexo 2. <i>Código de R</i> .....	75
9.2.1. Delimitación de OTUs con GMYC .....	75
9.2.2. Diversidad genética y diversidad específica .....	78
9.2.3. Diferenciación de individuos por el tipo de vegetación .....	80
9.2.4. ¿Existe una estructura E-O? .....	83

## Resumen

La Faja Volcánica Transmexicana (FVTM) es una unidad biogeográfica cuya biodiversidad ha sido moldeada por su historia geológica y climática en combinación con algunas características como su ubicación, longitud y orientación geográfica. Se ha documentado que la biodiversidad de la FVTM se distribuye de manera heterogénea, en particular la diversidad de las montañas del oriente es distinta de la diversidad con distribución occidental. Además, la FVTM presenta una dinámica característica de los sistemas de islas en el cielo. Los objetivos de este trabajo fueron conocer la diversidad de artrópodos de alta montaña presente en la FVTM, de los cuales no se tiene información taxonómica; analizar la distribución tanto altitudinal como longitudinal de dicha diversidad; y entender la relación que guardan las comunidades de distintas montañas. Se prestó especial atención a la estructura Este-Oeste, pues ha sido documentada en distintos estudios previos, sin embargo no ha sido examinada con un muestreo que la ponga a prueba específicamente. Para lograr estos objetivos se realizó una colecta de artrópodos general y masiva en dos tipos de vegetación (bosque de *Abies* y pastizal alpino) de siete montañas de la FVTM. Se seleccionaron los individuos pertenecientes a los órdenes taxonómicos Araneae (n=480) y Coleoptera (n=384), los cuales fueron separados en morfotipos. Posteriormente, de cada individuo se obtuvo la secuencia de la subunidad uno del gen mitocondrial citocromo oxidasa (*coxI*) con las que se delimitaron unidades taxonómicas operacionales (OTUs) utilizando los métodos CROP y GMYC. Una vez delimitadas las OTUs se obtuvo la diversidad tanto genética como de especies putativas a escala local (*i.e.* por montaña) y a escala regional (*i.e.* a lo largo de la FVTM). Se analizó la relación entre la diversidad de ambos tipos de vegetación estudiados y se probó la existencia de la hipotética estructura Este-Oeste presente en la FVTM. Los resultados obtenidos indican que la diversidad de cada montaña es particular, algunas OTUs están presentes sólo en una montaña, asimismo, cada montaña presenta alelos únicos. El Ajusco y el Iztaccíhuatl resultaron ser las montañas con mayor diversidad. A la vez, algunas OTUs se encuentran distribuidas en varias montañas, hecho que permitió analizar la distribución de la diversidad a lo largo de la FVTM. A pesar de la proximidad geográfica de algunas montañas, las comunidades de artrópodos que albergan se encuentran altamente diferenciadas entre sí (*e.g.* Ajusco y Nevado de Toluca). Además, las OTUs que habitan el bosque de *Abies* son distintas de las que habitan el pastizal alpino, es decir, las OTUs provienen del bosque o del pastizal pero no de ambos biomas. Estos patrones de distribución sugieren dos resultados principales: (1) que las comunidades alpinas colonizaron las cimas de las montañas a larga distancia y no mediante un cambio de nicho, y (2) que efectivamente existe una estructura en la FVTM que distingue las montañas orientales de las occidentales, probablemente resultado de la formación de la

FVTM. Coincidente con estudios previos, esta división fue ubicada entre el Nevado de Toluca y el Ajusco. Como conclusión, este proyecto muestra que la diversidad de la FVTM se distribuye en un patrón espacial complejo que puede ponerse a prueba mediante el análisis de la diversidad de artrópodos obtenidos con un muestreo masivo. La explicación de este patrón complejo incluye la distancia geográfica entre montañas en combinación con la historia climática y geológica de la región, particularmente las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno y el vulcanismo.

## Abstract

The Transmexican Volcanic Belt (TMVB) is a biogeographic region showing high levels of biodiversity which has been shaped by its geological and climatic history in combination with its length, location and geographic orientation. Biodiversity within TMVB is heterogeneously distributed; in particular its western mountains exhibit different lineages than the eastern ones. Besides, montane taxa from the TMVB display a dynamic proper of sky-island systems. The aims of this project were: to get acquainted by means of bulk sampling with the high-mountain arthropod's diversity, of which there is no taxonomic information available, present in TMVB; to analyze both the altitudinal and longitudinal distribution of this diversity and to understand the relations among the communities of different mountains. Special attention was given to the eastern-western structure along TMVB because despite having being previously documented, it had not yet been tested using a specific sampling design. To accomplish these purposes, arthropods were bulk-sampled and then sequenced for mitochondrial cytochrome oxidase 1 (*cox1*) in an individual basis. Specifically, samples were collected at two different altitudes representing different habitats (alpine grassland and *Abies* forest) from seven mountains of the TMVB. Coleoptera (n=384) and Araneae (n=480) specimens were classified in morphotypes and then in OTUs according to DNA sequences. OTU's delimitation was conducted using two algorithms: the GMYC method and CROP software. Genetic and OTUs diversity were calculated both within and among mountains. The relationship between the diversity of both types of vegetation was examined and the existence of the hypothetic east-west structure present in TMVB was confirmed. The obtained results indicate that the diversity of each mountain is specific, some OTUs are present only within one mountain and each mountain harbors private alleles. Of the seven mountains analyzed, Ajusco and Iztaccíhuatl exhibit the highest levels of diversity. Some OTUs with broader distributions are present in different mountains, reason that made the study of the longitudinal distribution of diversity possible. Despite of their linear proximity, the arthropod communities of some mountains are highly differentiated (*e.g.* Ajusco and Nevado de Toluca). Likewise, there are only few OTUs comprising individuals from both habitats, most OTUs coming either from *Abies* forests or alpine grasslands. Taken together, these distributional patterns of diversity suggest two main results: (1) alpine communities colonized high-mountain tops by long distance colonisation and not through niche shift; and (2) arthropod communities are in fact structured in two blocks, a probable outcome of the TMBV formation, representing eastern and western mountains. Coincident with previous studies, this division was traced between the Nevado de Toluca and the Ajusco. In conclusion, this study

provides evidence of the complex distributional patterns that characterize TMVB biodiversity, some which can be spatially tested using arthropod bulk samples and DNA barcode sequencing. The explanation of this complexity encompasses different factors such as geographic distance among mountains along with the region's climatic and geological history, particularly volcanism and Pleistocene climatic fluctuations.

## 1. Introducción

La Faja Volcánica Transmexicana (FVTM) es una región biogeográfica caracterizada por poseer una gran riqueza de especies –varias de las cuales son endémicas de la región– producto de su ubicación geográfica y su particular historia geológica y climática. Si bien ha sido ampliamente estudiada, existen zonas cuyas comunidades biológicas no han sido caracterizadas, tal es el caso de las comunidades alpinas que se distribuyen en las montañas más altas del país. Adicionalmente, existen muchas preguntas sobre cómo se genera y se mantiene la biodiversidad en este complejo sistema montañoso. Con el fin de estudiar la biodiversidad alpina de la FVTM se seleccionó un sistema de estudio que hasta ahora ha sido poco investigado, la comunidad de artrópodos de alta montaña.

Además de ser parte de la zona de transición mexicana, la FVTM es un sistema montañoso con distribución tropical, lo cual la diferencia de otros sistemas montañosos de latitudes más norteñas y le otorga características particulares. Dichas particularidades serán explicadas con mayor detalle en la primera sección de esta introducción. Posteriormente se hace un recuento de la importancia de la FVTM y su historia geológica. Finalmente, se plantea el problema que se pretende abordar en este trabajo.

### 1.1. *Estudio de los patrones de diversidad en montañas tropicales: los sistemas de islas en el cielo*

La biodiversidad es un concepto jerárquico que incluye varios niveles de organización biológica, por lo tanto para comprender los procesos que dirigen los patrones de su distribución se requiere de análisis en múltiples escalas, tanto temporales como espaciales –regionales y locales– (Graham y Fine, 2008; Baselga *et al.*, 2013). A escalas regionales los gradientes de diversidad están fuertemente influenciados tanto por factores evolutivos, como son la variación de la diversidad en el tiempo y la tasa de diversificación de linajes, como por factores ecológicos, como la distribución presente e histórica de hábitats (Ricklefs, 2002). A escalas locales, las interacciones bióticas y la evolución de caracteres son factores de gran importancia para la coexistencia de especies (Webb *et al.*, 2002; Graham y Fine, 2008). Adicionalmente, en la actualidad los cambios de distribución de especies a nivel global están influenciados fuertemente por la fragmentación del paisaje, el desplazamiento de zonas climáticas y las dinámicas poblacionales que surgen del disturbio (Baselga *et al.*, 2013). Entender la relación entre los distintos niveles de diversidad y las distintas escalas tanto espaciales como temporales, permitirá deducir patrones de diversidad a partir del análisis con

un solo nivel de organización (Taberlet *et al.*, 2012; Baselga *et al.*, 2013) e inferir cómo podría verse afectada la biodiversidad con los cambios globales en el presente. Actualmente, uno de los mayores retos en estudios de ecología evolutiva es elucidar cómo interactúan estos mecanismos a diferentes escalas con el fin entender la conexión entre los procesos locales y los procesos evolutivos regionales (Graham y Fine, 2008). Los gradientes altitudinales, como los otorgados por montañas, brindan la posibilidad de estudiar estos mecanismos en distintas escalas temporales y espaciales.

A diferencia de los gradientes latitudinales, los gradientes altitudinales suelen abarcar muchas zonas climáticas en una distancia corta, por lo tanto proveen de una gran variación climática en intervalos espaciales que abarcan la capacidad de dispersión de la mayoría de las especies (Graham *et al.*, 2014). Además, los gradientes montanos generalmente presentan una poza limitada de especies desde la cual surgen las especies que coexisten en una localidad, lo que representa un escenario más simple que la combinación de especies de distintas pozas en regiones muy amplias (como se presentaría en un gradiente latitudinal) (Graham *et al.*, 2014). Por estas características los gradientes altitudinales son uno de los experimentos naturales más poderosos para investigar la relación entre patrones de riqueza, variables ambientales, y procesos ecológicos y evolutivos (Rahbek, 1995; Körner, 2000; Körner, 2007; Graham y Fine, 2008). En este sentido, la selección de gradientes montanos enfocada en hipótesis o preguntas específicas puede ser de gran utilidad para ampliar nuestro conocimiento sobre los mecanismos que dirigen los patrones de diversidad (Körner, 2007).

Uno de los sistemas montanos más interesantes por sus características particulares son los sistemas de islas en el cielo (*sky-islands*). Las islas en el cielo son hábitats en sistemas montañosos a grandes altitudes que se encuentran geográficamente subdivididos y aislados. Los hábitats en altitudes menores presentan características ambientales distintas por lo que actúan como barreras para la dispersión de los organismos que habitan en zonas más altas, lo cual facilita la divergencia de las poblaciones aisladas. De este modo, las islas en el cielo son consideradas generadoras de diversidad y ofrecen un gran potencial para investigar la formación de especies (McCormack *et al.*, 2009).

Los sistemas de islas en el cielo se distinguen de los sistemas de islas oceánicas por su historia climática y la dinámica de dispersión de especies. Por lo tanto, los patrones ecológicos y evolutivos que los caracterizan no siempre son comparables. Por ejemplo, la colonización en las islas en el cielo puede ocurrir por el cambio de nicho de especies que habitan en zonas más bajas, por migraciones a distancias cortas, o por colonizaciones a larga distancia desde otras islas en el cielo. Por esta razón, la dinámica de las comunidades de las islas en el cielo difiere de la teoría

biogeográfica del equilibrio de islas propuesta por MacArthur y Wilson en 1967. En donde se postula que la diversidad de especies en una isla está dada por el balance entre la colonización y la extinción de especies que, a su vez, están en función de la distancia entre las islas y el área de las mismas (Rosenzweig, 1995; McCormack *et al.*, 2009). En cambio, en las islas en el cielo, la combinación del efecto del aislamiento con el efecto de los gradientes altitudinales promueve la divergencia tanto por deriva génica como por selección natural (dentro y entre montañas), por lo que estas dos fuerzas evolutivas son particularmente poderosas (McCormack *et al.*, 2009).

Las comunidades en complejos de islas en el cielo, especialmente en regiones tropicales, han experimentado varios cambios de distribución inducidos por la variación climática causada por los ciclos glaciales del Pleistoceno (McCormack *et al.*, 2009). Estos ciclos presentan una alternancia entre etapas más frías que el clima actual (en promedio 8 °C menos) conocidas como glaciales, y etapas en las que el clima es similar o un poco más cálido (2 a 3 °C mayor) que el presente, conocidas como interglaciales (Caballero *et al.*, 2010). Los ciclos glaciales ocurrieron con regularidad durante el Pleistoceno y se intensificaron en los últimos 700,000 años causando cambios drásticos en la distribución de especies. Durante los periodos glaciales, los hábitats de las islas en el cielo se desplazaron a menores altitudes, lo cual dio como resultado que poblaciones que se encontraban aisladas tuvieran una mayor probabilidad de estar en contacto. Cuando la temperatura aumentó durante los cortos periodos interglaciales se dio la recolonización de las cimas de las montañas por las especies que se habían desplazado a tierras bajas y las poblaciones de las islas en el cielo se volvieron a separar (Qian y Ricklefs, 2000; McCormack *et al.*, 2009; Stewart *et al.*, 2010; Mastretta-Yanes *et al.*, 2015). La tasa de diferenciación poblacional y especiación de un taxón en una dinámica de islas en el cielo estará en función de distintos factores, por ejemplo el tiempo desde que se estableció el taxón en el área, la escala geográfica que abarca el taxón, sus preferencias ambientales y su capacidad de dispersión (Mastretta-Yanes *et al.*, 2015).

El efecto que tuvieron los ciclos glaciales del Pleistoceno en la divergencia de especies es un tema polémico. Debido al tiempo relativamente corto entre ciclos glaciales existen discrepancias sobre si la divergencia fue promovida o inhibida. Aunque se espera que las presiones selectivas y la deriva génica promuevan la divergencia entre poblaciones, la diferenciación que se acumuló durante un ciclo glacial se pudo haber perdido por los cambios de distribución subsecuentes. Alternativamente, si en algún ciclo se dio suficiente aislamiento reproductivo, la especiación se pudo haber promovido por estos cambios frecuentes de distribución así como se hipotetiza en el modelo de diversificación de *species pump* (McCormack *et al.*, 2009).

## 1.2. La Faja Volcánica Transmexicana

La Faja Volcánica Transmexicana (FVTM) es el arco volcánico del Neógeno más largo de América del Norte, con casi 1000 km de longitud y 160,000 km<sup>2</sup>. Su distribución abarca todo el centro de México desde el sur del Golfo de California hasta el Golfo de México. Su formación empezó hace aproximadamente 19 Ma (millones de años) en la parte este (100° 30'O-97° 30'O), seguido por vulcanismo en la parte más oriental (al este de 97° 30'O) hace aproximadamente 16 Ma, y finalmente se formó la zona occidental (al oeste de 103° 00'O) y central (103° 00'O-100° 30'O) hace aproximadamente 11 Ma. La evolución geológica de la FVTM ha sido dividida en cuatro episodios principales: (1) Mioceno temprano y medio, (2) Mioceno tardío, (3) Mioceno tardío-Plioceno temprano, y (4) Plioceno tardío y Pleistoceno (Fig. 1; Ferrari *et al.*, 2012; Mastretta-Yanes *et al.*, 2015). El episodio final de la formación de la FVTM se caracterizó por la construcción de grandes estratovolcanes durante los últimos 1.5 Ma, algunos de los cuales siguen activos actualmente (Gómez-Tuena *et al.*, 2007; Ferrari *et al.*, 2012). Dicho vulcanismo de la última etapa de formación de la FVTM generó los mayores edificios volcánicos del país: el Pico de Orizaba, Popocatepetl, Iztaccíhuatl, Nevado de Toluca, Tancítaro, Nevado de Colima, entre otros. Esto ha generado varios gradientes altitudinales de más de 4,000 m en el centro de México (Caballero *et al.*, 2010).

Además de los cambios topográficos que han caracterizado a la FVTM durante los últimos 3 Ma, la distribución de hábitats en las regiones montañosas del país ha presentado cambios drásticos debido a las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno. Las especies de zonas montañosas en México parecen haber persistido en refugios de gran altitud durante los periodos interglaciales, mientras que en los periodos glaciales las poblaciones pudieron entrar en contacto en zonas de menor altitud. Esto puede considerarse como una dinámica de islas en el cielo, similar a la existente en otras regiones montañosas del mundo (Knowles, 2000; McCormack *et al.*, 2009).

La FVTM presenta una gran heterogeneidad ambiental, origen geológico complejo e intrincados patrones de distribución, lo que contribuye a la génesis y al mantenimiento de endemismos. Además constituye una provincia biogeográfica que ha sido asignada a la zona de transición mexicana (Morrone, 2005). Por estas características es reconocida como centro de diversificación, endemismo y transición biogeográfica (Rzedowski, 2006; Gámez *et al.*, 2012). Los tipos de vegetación que caracterizan a la FVTM son los bosques de encino y de coníferas, y los pastizales alpinos y subalpinos, que se distribuyen en zonas altas en un gradiente de 1,000 a más de 4,000 m. De acuerdo a Lozano-García (2005), con base en registros de polen del Iztaccíhuatl, el límite de la vegetación arbórea en la FVTM alcanzó su altitud actual hace 3,000 años. Por otro lado, las tierras bajas que separan estos hábitats de gran altitud presentan climas más templados con

desiertos, bosques secos y bosques lluviosos (Rzedowski, 1978; Calderón de Rzedowski y Rzedowski, 2005; Challenger y Soberón, 2008).

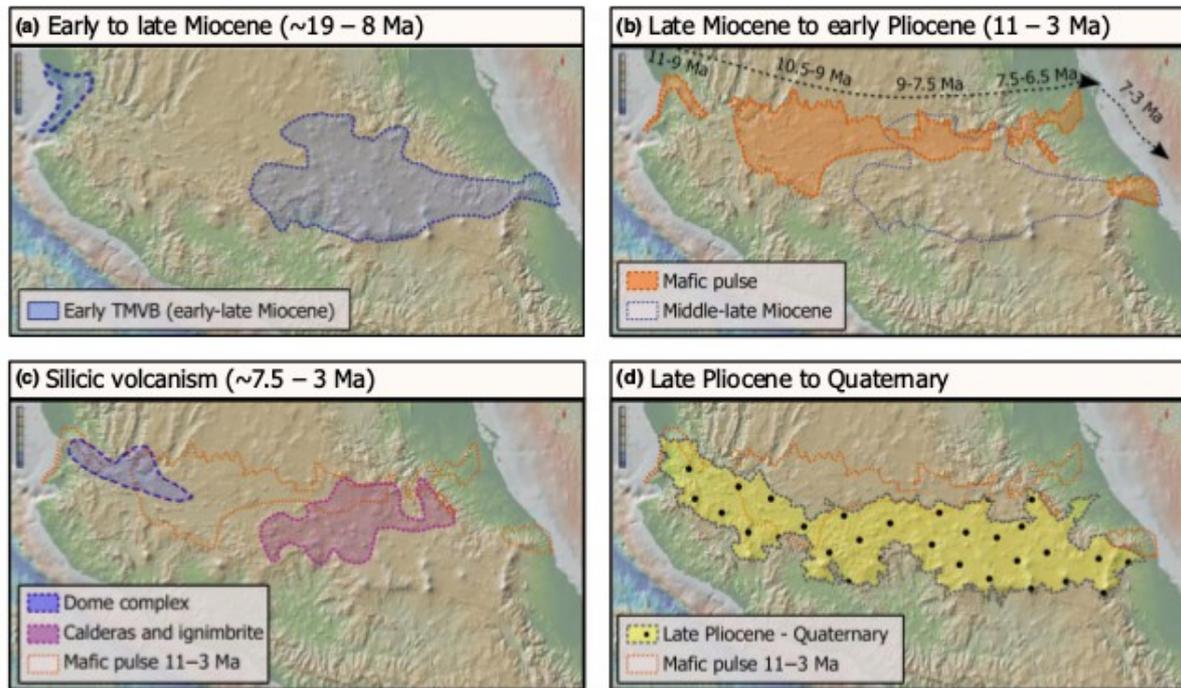


Figura 1. Momentos de formación de la FVTM, tomado de Mastretta-Yanes *et al.* (2015).

### 1.3. Estructura de la diversidad en la FVTM: comparación de comunidades de artrópodos de alta montaña

A pesar de los intentos por entender la complejidad de la historia evolutiva de la FVTM, aún existen muchas dudas sobre cómo surge y se mantiene la biodiversidad en la zona. Aunque su formación comenzó durante el Mioceno, muchos de los volcanes de la región tienen menos de 1.5 Ma de existencia. Esto quiere decir que los patrones de diversidad que temporalmente coinciden con el Pleistoceno podrían ser resultado no solamente de las fluctuaciones climáticas sino también del vulcanismo (Mastretta-Yanes *et al.*, 2015).

La historia particular de la FVTM dificulta la identificación y diferenciación de los efectos que el clima y la orogenia pudieron tener en los patrones de diversidad de especies, ya que ambos procesos pueden generar patrones de diversificación distintos (Bryson y Riddle, 2012; Ramírez-Barahona y Eguiarte, 2013; Mastretta-Yanes *et al.*, 2015). Por un lado, en una dinámica de islas en el cielo se esperaría que, debido a las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno, se diera una diferenciación de poblaciones durante periodos interglaciales seguida del contacto entre poblaciones durante los periodos glaciales. Por otro lado, el efecto del vulcanismo puede promover la

divergencia de especies ya sea por alopatría (entre montañas creadas por eventos volcánicos distintos) o por parapatría (por la colonización de hábitats nuevos a partir de hábitats de menores altitudes). Por lo tanto, algunas señales genéticas podrían coincidir con la existencia de una dinámica de islas en el cielo en una configuración de paisaje estable durante el último millón de años del Pleistoceno, sin embargo, otras señales genéticas más antiguas también podrían ser consecuencia de configuraciones de paisaje previas (Mioceno-Plioceno) (Mastretta-Yanes *et al.*, 2015).

Uno de los patrones de distribución de diversidad de especies que se ha encontrado en la FVTM y ha llamado la atención de biogeógrafos y ecólogos evolutivos, es una aparente separación longitudinal entre las especies distribuidas en el este y aquellas con distribución en el oeste. Por esto se ha cuestionado la unidad de la FVTM como provincia biogeográfica, e incluso se ha propuesto que se trata de dos unidades biogeográficas o de una unidad con dos distritos (Navarro-Sigüenza *et al.*, 2007; Escalante *et al.*, 2007; Corona *et al.*, 2009; Gámez *et al.*, 2012). Se ha sugerido que esta estructura podría estar relacionada a los episodios de formación de la FVTM (Mastretta-Yanes *et al.*, 2015). Asimismo, en estudios filogeográficos con especies distribuidas a lo largo de la FVTM se han encontrado linajes estructurados en grupos occidentales y orientales. Por ejemplo el caso de *Nolina parviflora* estudiado con dos marcadores de cloroplasto y uno nuclear (Ruíz-Sánchez y Specht, 2013); la estructura encontrada en marcadores de cloroplasto del complejo *Eryngium* y en marcadores genómicos de *Juniperus monticola* (Mastretta-Yanes, 2015); y en lagartos del género *Barisia* estudiados con genes mitocondriales (Bryson y Riddle, 2011).

Los datos moleculares juegan un papel trascendente en entender y distinguir distintos escenarios evolutivos, ya que permiten calcular tiempos de divergencia y reconstruir las posibles historias de diversificación en los paisajes de islas en el cielo (McCormack *et al.*, 2009). Con el fin de formular hipótesis filogeográficas específicas en la FVTM es necesario integrar los análisis moleculares con datos climáticos y geológicos que nos ayuden a entender la interacción de estos mecanismos en la distribución de la diversidad y los eventos de diversificación (Mastretta-Yanes *et al.*, 2015). En el presente trabajo se propone conocer la distribución de la diversidad en la FVTM con especial atención a la potencial estructura Este-Oeste existente, mediante el análisis molecular de decenas de artrópodos recolectados a dos altitudes distintas en siete montañas diferentes. El muestreo de campo fue dirigido al nivel de comunidades, es decir, se trata de un muestreo general que puede ser comparable entre sitios. En el análisis de comunidades puede ser difícil la identificación de especies, sin embargo, en este estudio se trabajó con unidades taxonómicas operacionales (OTUs). Este método permite realizar análisis comparativos sin necesidad de tener conocimiento taxonómico previo, lo que facilita la comparación de comunidades en sitios donde la

biodiversidad no ha sido completamente descrita, como es el caso de la comunidad de artrópodos de alta montaña en la FVTM. Este procedimiento es innovador porque (1) se pone a prueba una hipótesis geográfica específica *a priori*, y no se espera encontrar algún patrón geográfico (cualquiera) como resultado de los datos y (2) se usan análisis moleculares en muchas especies distintas codistribuidas en una misma región, que complementa tanto a los análisis biogeográficos, los cuales usan muchas especies distintas de las mismas zonas pero no usan análisis moleculares, como a los análisis filogeográficos, que se enfocan en una sola especie o acaso en un género con una distribución particular, lo que dificulta la comparación de patrones filogeográficos de distintas especies.

## 2. Objetivos

El objetivo general de este proyecto fue analizar el patrón de distribución de la diversidad en el sistema de islas en el cielo de la FVTM por medio del estudio de la diferenciación genética y específica de comunidades de artrópodos de alta montaña.

Para esto se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Delimitar unidades taxonómicas operacionales (OTUs) con el fin de comparar distintos patrones de diversidad en la misma zona geográfica.
- Comparar la diversidad genética con la diversidad específica en siete montañas de la FVTM.
- Analizar la distribución de la biodiversidad en la FVTM, tanto longitudinal como altitudinalmente.
- Analizar si la distribución de la diversidad de artrópodos en la FVTM se apega a la estructura Este-Oeste que se ha propuesto en otros estudios.

### 3. Hipótesis

La estructura y composición de la biodiversidad es moldeada por la historia geológica del paisaje. Por lo tanto, se esperaría que las comunidades de artrópodos de alta montaña que habitan en la FVTM presenten una estructura correspondiente a un sistema de islas en el cielo con cambios en la distribución de especies debido a las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno, en combinación con la actividad volcánica que caracterizó a la FVTM en los últimos 1.5 Ma. Esta dinámica se verá reflejada en la estructura de la biodiversidad independientemente de la distancia geográfica efectiva que separa a las montañas en la actualidad.

A partir de esta hipótesis, se esperaría que se cumplieran las siguientes predicciones:

- Se encontrarán similitudes entre los patrones de diversidad de distintas OTUs debido a que algunos han coexistido en el mismo paisaje geográfico. Esto no implica que todas las OTUs mostrarán el mismo patrón, sino que la historia geológica de un espacio podrá tener efectos similares en la diversidad y distribución de distintos linajes contemporáneos. En este sentido, los patrones de biodiversidad encontrados estarán más relacionados a la historia geológica y climática de la FVTM que a la distancia geográfica lineal entre montañas.
- Con base en otros estudios en donde se ha propuesto una diferencia en la composición taxonómica entre las montañas occidentales y orientales, se esperaría que las comunidades de artrópodos de la FVTM se encuentren estructuradas longitudinalmente en dos componentes: este y oeste, independientemente de la distancia geográfica efectiva que separa a las montañas en la actualidad.
- Las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno han permitido conectividad entre hábitats de alta montaña fragmentados en periodos interglaciales. Por lo tanto se esperaría un patrón distinto entre las comunidades de los dos tipos de vegetación estudiados, los cuales se distribuyen en altitudes distintas. Es decir, se esperaría una menor diferenciación en las especies distribuidas en bosque de *Abies* (que están a menor altitud), que aquellas distribuidas en el pastizal alpino (que se encuentran a mayor altitud), debido a la mayor conectividad que pudo haber existido en periodos glaciales entre las especies que habitan en los bosques.

## 4. Métodos

### 4.1. Obtención de muestras y secuencias genéticas

Durante marzo y abril de 2014 se realizaron salidas al campo con el fin de recolectar artrópodos que habitan en el bosque de *Abies* (~3,200 m s.n.m.) y en el pastizal alpino (~3,900 m s.n.m.) de siete montañas de la FVTM (Tabla 1 y Fig. 2).

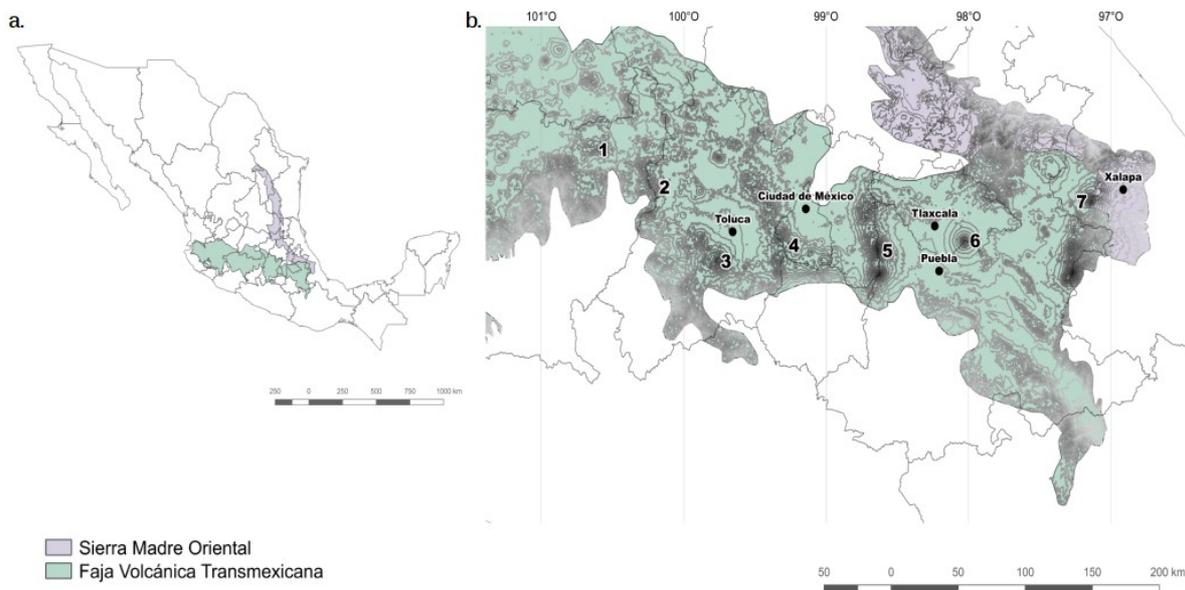


Figura 2. Montañas de la FVTM en donde se realizaron las colectas durante marzo y abril de 2014. a) Mapa de México con la región biogeográfica correspondiente a la FVTM en verde y la Sierra Madre Oriental en lila. b) acercamiento del mapa de la FVTM con curvas de nivel, se indican los nombres de las ciudades principales cercanas a las montañas estudiadas y los números indican las montañas en donde se realizó la colecta de la siguiente manera: (1) Cerro de San Andrés, (2) Cerro Blanco, (3) Nevado de Toluca, (4) Ajusco, (5) Iztaccíhuatl, (6) Malinche y (7) Cofre de Perote.

Tabla 1. Montañas en donde se realizaron las colectas de artrópodos. Se indica el nombre de las montañas, las coordenadas geográficas y la altitud a la cual se realizó la colecta.

Montaña	Coordenadas	Altitud m s.n.m.	
		Bosque de <i>Abies</i>	Pastizal alpino
Cerro de San Andrés	19° 47' 56.7" N 100° 35' 25.6" O	3,230	3,530
Cerro Blanco	19° 33' 49.0" N 100° 13' 32.4" O	3,264	3,612
Nevado de Toluca	19° 07' 17.8" N 99° 46' 26.9" O	3,364	4,071

Montaña	Coordenadas	Altitud m s.n.m.	
		Bosque de <i>Abies</i>	Pastizal alpino
Ajusco	19° 12' 58.5" N 99° 15' 20.1" O	3,300	3,728
Iztaccíhuatl	19° 08' 21.4" N 98° 38' 27.9" O	3,386	3,974
Malinche	19° 14' 18.7" N 98° 01' 45.1" O	3,490	3,996
Cofre de Perote	19° 31' 11.9" N 97° 09' 28.4" O	3,409	4,159

#### 4.1.1. Métodos de muestreo

Con la finalidad de hacer un muestreo generalizado y abarcar la mayor diversidad posible, se usaron cinco técnicas de colecta (Fig. 3):

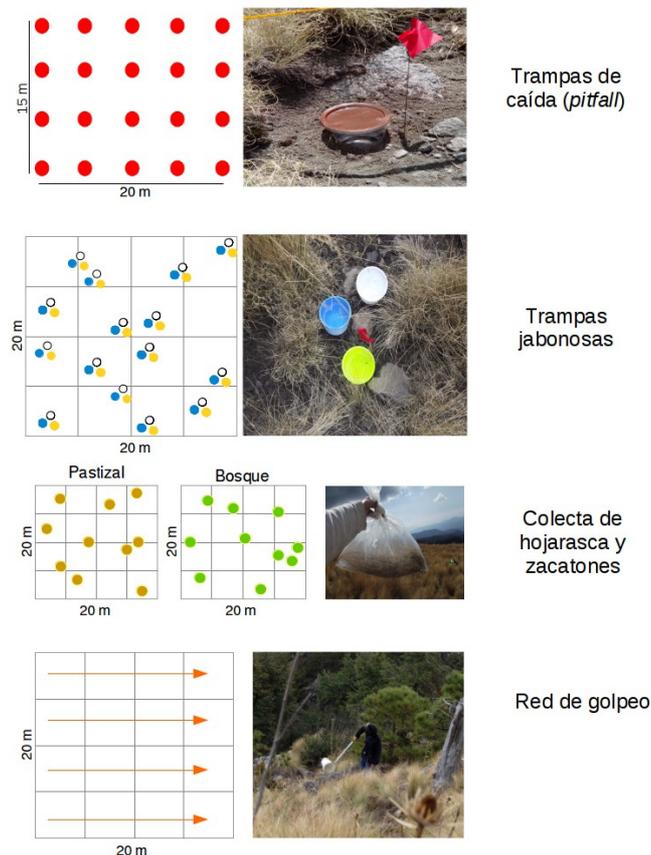


Figura 3. Diagramas y fotografías de los cinco métodos de colecta en campo.

**Trampas de caída o *pitfall*.** Se usan para coleccionar artrópodos que viven en la superficie del suelo. Consiste en un recipiente de plástico con fijador que se entierra en el suelo y se tapa, se deja un espacio entre el recipiente y la tapa para que los artrópodos que pasen por ahí caigan dentro del

recipiente.

En cada montaña se colocaron dos conjuntos de 20 trampas de caída, uno en el bosque de *Abies* y otro en el pastizal alpino. Para lograrlo, se trazó una parcela de 20 x 15 m en cada tipo de vegetación, se hicieron perforaciones en el suelo de aproximadamente 15 cm de profundidad cada cinco metros formando una cuadrícula y se colocó una trampa de caída cada cinco metros. Las trampas se construyeron con recipientes de plástico de un litro, a los cuales se le hicieron perforaciones en forma de ventanas de 2 x 3 cm a 8 cm de distancia de la base del recipiente. Los recipientes fueron enterrados hasta esa altura, para que las ventanas quedaran a ras de suelo. A cada recipiente se le agregaron 200 mL de alcohol (como conservador) al 70% con glicerina (para evitar la evaporación del alcohol), y luego se taparon. Previamente las tapas fueron pintadas con pintura café en aerosol para impedir que entrara demasiada luz y se calentara el recipiente, y para que la trampa se confundiera un poco con la vegetación.

Las trampas se quedaron en los sitios durante dos semanas. Los artrópodos que cayeron en las 20 trampas de cada parcela se colectaron en un mismo recipiente. De esta manera se obtuvieron 14 recipientes de artrópodos colectados por trampas *pitfall* a dos altitudes distintas en las siete montañas.

**Trampas jabonosas.** Son recipientes pequeños a los que se les agrega agua con jabón neutro. Se utilizan para capturar insectos voladores, que al acercarse al cuerpo de agua caen dentro del recipiente ya que el jabón rompe la tensión superficial del agua. Estas trampas suelen usarse en estudios de polinizadores, por lo tanto los recipientes se pintaron con colores fluorescentes que llaman la atención de los insectos.

En cada tipo de vegetación de cada montaña se trazó una parcela de 20 x 20 m. Dentro de las parcelas se colocaron aleatoriamente cinco trampas azules, cinco amarillas y cinco blancas, en 15 conjuntos de tres recipientes (uno de cada color). Las trampas se dejaron durante todo el día de trabajo (aproximadamente 6 horas) y los insectos que cayeron en una parcela fueron colectados en un mismo recipiente. Al final se obtuvieron 14 recipientes de insectos colectados con trampas jabonosas a dos altitudes en siete montañas.

**Recolección de hojarasca.** Con el fin de recolectar a los artrópodos que viven en el suelo, se trazó una parcela de 20 x 20 m en donde se recolectó aleatoriamente 1 m<sup>2</sup> de hojarasca, en diez ocasiones. En cada metro cuadrado recolectado se midió la profundidad de la hojarasca, después se tamizó para reducir el volumen de materia y para filtrar los artrópodos. Esta colecta se realizó sólo en el bosque de *Abies*.

Posteriormente las muestras fueron colocadas en embudos de Berlese, que son embudos metálicos y lisos a los que se les coloca un tamiz en la parte superior y un frasco con alcohol en la

parte final del embudo. La muestra se sostiene sobre el tamiz, y por fototropismo negativo, los artrópodos se mueven hacia el fondo del embudo y resbalan hacia el alcohol. Las 70 muestras colectadas (10 por montaña) se dejaron en los embudos de Berlese durante una semana.

**Recolección de zacatones.** En el pastizal de alta montaña la arthropofauna encuentra refugio y alimento dentro de los zacatones típicos de la vegetación. Para recolectarlos se trazó una parcela de 20 x 20 m y aleatoriamente se escogieron 10 zacatones. Los zacatones fueron embolsados para atrapar a todos los artrópodos que estuvieran presentes, se midió su altura y perímetro y se cortó desde la base con una segueta, de forma que quedaron dentro de las bolsas los zacatones y los artrópodos asociados. Este muestreo se llevó a cabo sólo en el pastizal alpino. Las 70 muestras fueron procesadas en embudos Berlese durante una semana.

**Red de golpeo.** Los artrópodos que vuelan o viven sobre ramas y arbustos fueron recolectados con una red de golpeo. En cada tipo de vegetación se trazó una parcela de 20 x 20 m, en donde se golpeó al aire y ramas durante una hora efectiva, cronometrada, y parando cada 5 minutos para colocar en frascos con alcohol los artrópodos colectados.

#### 4.1.2. *Procesamiento de especímenes recolectados*

Todas las colectas se conservaron en alcohol al 70%. Las muestras más abundantes y diversas fueron las colectadas por trampas de caída, por lo tanto se trabajó sólo con esta colección para el resto de los análisis. De las colectas de trampas *pitfall* se aislaron los individuos de los órdenes Coleoptera y Araneae. De cada orden se conformaron morfotipos con base en las características morfológicas de cada individuo, es decir, se conformaron grupos de individuos semejantes morfológicamente provenientes de distintas montañas. Para facilitar esta clasificación primero se separaron las muestras de cada montaña, se tomó una fotografía de cada tipo morfológico por montaña y luego se compararon las fotografías entre sí.

A cada individuo se le asignó una clave que incluye la información del sitio de colecta (montaña y tipo de vegetación), tipo de trampa en donde se encontró y número de morfotipo e individuo, de la siguiente manera: las primeras dos letras indican la montaña (An-Cerro de San Andrés, Bl-Cerro Blanco, To-Nevado de Toluca, Aj-Ajusco, Iz-Iztaccíhuatl, Ma-Malinche, Pe-Cofre de Perote), la tercer letra indica el tipo de vegetación (B-Bosque de *Abies*, Z-Pastizal alpino), la cuarta letra indica la trampa utilizada (P-*pitfall*), la quinta y sexta letra indican el orden (Co-Coleoptera y Ar-Araneae), finalmente se indica el número de morfotipo y separado con un guión, el número de individuo de ese morfotipo. Por ejemplo AjBPCo1-3 es un individuo que se

colectó en el Ajusco (Aj), en bosque de *Abies* con trampas *pitfall*, es del orden Coleoptera, y es el tercer individuo del morfotipo 1. Además se conformó un registro fotográfico, en donde se obtuvo la fotografía de al menos un individuo de cada morfotipo por montaña con aumento 10x (por ejemplo Fig. 4).

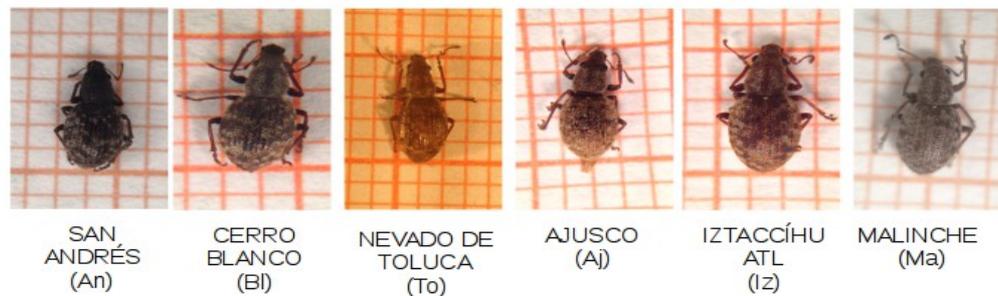


Figura 4. Fotografía 10x de un individuo por montaña del morfotipo 1 (Co1).

#### 4.1.3. Métodos moleculares

Se extrajo ADN de los coleópteros y arañas con un protocolo de extracción con resina Chelex (modificado de Casquet *et al.*, 2011), la cual se une a los componentes polares de las células después de la lisis, mientras que los componentes no polares se quedan en disolución.

Cada espécimen se trató por separado: de cada uno se removió tejido (una pata, dos patas, cuatro patas, medio cuerpo o cuerpo completo, de acuerdo con su tamaño) y se guardó en placas de PCR con alcohol etílico al 99%. Se llenaron 9 placas con 864 muestras. Para realizar la extracción se dejó secar el alcohol, a cada pocillo se le agregaron 10  $\mu$ L de Proteínasa K y 150  $\mu$ L de resina Chelex en disolución al 10% (20 gr de Chelex en 200 mL de agua destilada) y cada placa se dejó en la estufa por 12 horas a 55°C.

Se amplificó la subunidad 1 ó 2 del gen mitocondrial citocromo oxidasa (*cox1* y *cox2*, respectivamente) con un 1  $\mu$ L de dilución 1:10 de ADN, los *primers* utilizados para cada caso se enlistan en la Tabla 2.

Para la amplificación en coleópteros, se llevaron a cabo reacciones en cadena de polimerasa (PCR) en un termociclador G-Storm con un volumen de PCR de 25  $\mu$ L, conformado por 17.6  $\mu$ L de agua destilada, 2.5  $\mu$ L  $\text{NH}_4$  (10x), 1  $\mu$ L  $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 1  $\mu$ L de dNTP 10 mM, 0.5  $\mu$ L de BSA, 0.63  $\mu$ L de *primer* Jerry (10 $\mu$ M) y de *primer* SpatR (10  $\mu$ M), 0.1  $\mu$ L de Taq polimerasa y 1 $\mu$ L de ADN (dilución 1:10) (Gillett *et al.*, 2014). Las PCR se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones: inicio a 94°C durante 2 minutos, 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 53°C y 1 minuto a 70°C, y extensión final de 10 minutos a 72°C.

En los coleópteros en los que no se logró amplificar el gen *cox1* se amplificó el gen *cox2* con los *primers* TL2-J-3038 (TED) y TK-N 3782 (EVA) (Caterino y Sperling, 1999), con las siguientes concentraciones de reacción: 14.40  $\mu$ L de agua destilada, 2.5  $\mu$ L  $\text{NH}_4$  (10x), 2.5  $\mu$ L  $\text{MgCl}_2$  (50mM), 2  $\mu$ L de dNTP 10 mM, 0.5  $\mu$ L de BSA, 1  $\mu$ L de cada primer 10  $\mu$ M, 0.10  $\mu$ L de Taq polimerasa y 1 $\mu$ L de ADN en dilución 1:10. Las condiciones de PCR para amplificar con TED y EVA fueron: inicio caliente de 95°C durante tres minutos, 32 ciclos de un minuto a 95°C, un minuto a 48°C y un minuto a 72°C, extensión final de tres minutos a 72°C.

Para amplificar el gen *cox1* en arañas se utilizaron los *primers* del código de barras de la vida LCO1490 y HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994). Las PCR se llevaron a cabo con un volumen de 25 $\mu$ L, conformados por 15.4  $\mu$ L de agua destilada, 2.5  $\mu$ L  $\text{NH}_4$  (10x), 1.5  $\mu$ L  $\text{MgCl}_2$  (50mM), 2  $\mu$ L de dNTP 10 mM, 0.5  $\mu$ L de BSA, 1  $\mu$ L de cada *primer* 10 $\mu$ M, 0.1  $\mu$ L de Taq polimerasa y 1  $\mu$ L de ADN en dilución 1:10. Las condiciones de amplificación fueron dos minutos a 95°C, 40 ciclos de un minuto a 95°C, 45 segundos a 52°C y un minuto a 72°C, y una extensión final de cinco minutos a 72°C.

Para los individuos que no se pudieron amplificar bajo las condiciones descritas anteriormente, se hicieron modificaciones en las condiciones de PCR, disminuyendo la temperatura de hibridación del *primer*. La amplificación de los fragmentos de *cox1* y *cox2* fue comprobada con geles de agarosa 1%. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados con el servicio de MacroGen Europe. Únicamente se secuenció con el *primer* SPatR para *cox1* y TED para *cox2* en coleópteros, y con el *primer* LCO para *cox1* en arañas, ya que una sola reacción de secuenciación resultó suficiente para cubrir con alta calidad ~700 pb en coleópteros y ~500 pb en arañas.

Las secuencias fueron agrupadas en carpetas de acuerdo a los morfotipos clasificados anteriormente, se editaron a mano y se alinearon en el programa Geneious 5.6.7.

Tabla 2. *Primers* utilizados en la amplificación de los marcadores *cox 1* y *cox 2* en coleópteros y arañas.

Nombre	Marcador	Dirección	Secuencia	Longitud (kpb)
Jerry	<i>cox1</i> 3'	Fwd.	CAACATTTATTTTGATTTTTTGG	0.8
Stev_pat_R (SPatR)	<i>cox1</i> 3'	Rev.	GCACTAWTCTGCCATATTAGA	
TL2-J-3038 (TED)	<i>cox 2</i>	Fwd.	TAATATGGCAGATTAGTGCATTGGA	0.7
TK-N 3782 (EVA)	<i>cox 2</i>	Rev.	GAGACCATTACTTGCTTTCAGTCATCT	
HCO2198	<i>cox 1</i> 5'	Fwd.	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	0.5
LCO1490	<i>cox 1</i> 5'	Rev.	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	

## 4.2. Catálogo de muestras

La formación de un catálogo de la biodiversidad de artrópodos que alberga la Faja Volcánica Transmexicana puede ser útil para sentar las bases de trabajos posteriores. Por ejemplo para analizar la diversidad de artropofauna y la dinámica de comunidades de este sistema montañoso, para identificar posibles especies candidatas para análisis filogeográficos posteriores o para tener una biblioteca de referencia al realizar estudios con *metabarcoding*.

La base de datos BoldSystems ([www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org)) provee una opción para generar proyectos propios que pueden ser visualizados por todo aquel que ingrese a la página. De esta forma puede conformarse un catálogo digital asociado a toda la base de datos de *barcode*. Las búsquedas en BoldSystems pueden hacerse por proyecto, por código de identificación, por medio de la identificación de secuencias desconocidas, por taxonomía y por región geográfica. Los datos que pueden ser visualizados y descargados son las secuencias por individuo, con información de su procedencia, un identificador único que le es asignado y su fotografía.

Como parte de esta tesis, se conformó un catálogo del proyecto en BoldSystems llamado “Transmexican Volcanic Belt Arthropod Taxa” (TMVBAC), al que se han subido las secuencias y fotografías de los ejemplares estudiados.

## 4.3. Delimitación de unidades taxonómicas operacionales (OTUs)

Se compararon las secuencias consenso de los alineamientos de cada morfotipo con secuencias genéticas de las bases de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), del National Center for Biotechnology Information (NCBI), y BoldSystems (<http://www.boldsystems.org/>). Para esta búsqueda se escogió a los morfotipos con mayor cantidad de individuos y más representados en distintas montañas. A partir de la comparación se obtuvo información taxonómica que fue agregada en la base de datos de las muestras, de manera que se conjuntó en una sola base de datos la clave única correspondiente a cada muestra, el morfotipo al que pertenece, los datos de amplificación, de extracción y de secuenciación, y su información taxonómica hasta nivel familia (Anexo 1).

En total se identificaron tres familias de coleópteros (Hydraenidae, Carabidae y Curculionidae) y cuatro familias de arañas (Linyphiidae, Gnaphosidae, Anyphaenidae y Agelenidae). A partir de ese momento se reagruparon las secuencias por familia, aunque cada secuencia mantuvo su clave única y el registro del morfotipo que le fue asignado originalmente.

En cada familia se conformaron OTUs con el fin de generar grupos de secuencias que

podrían usarse como unidades en análisis posteriores. Las OTUs son grupos de secuencias que pueden unificarse con distintos métodos y sirven como especies putativas (Kekkonen y Hebert, 2014). Para esto se compararon los resultados de dos métodos, uno con base en similitud de secuencias, implementado con el programa CROP (*Clustering RNA for OTU prediction*, Hao *et al.*, 2011); y otro con base en la tasa de especiación y coalescencia implementado con el algoritmo *generalized mixed Yule coalescent* (GMYC) en el paquete *splits* (*SPecies Limits by Threshold Statistics*) del lenguaje de programación R (<http://r-forge.r-project.org/projects/splits/>; el Anexo 2 contiene el código de R que fue utilizado).

CROP es una herramienta de agrupamiento diseñada por Hao *et al.*, (2011) para estudios metagenómicos, cuyo objetivo original es agrupar secuencias de 16S rRNA en OTUs, pero que puede ser utilizado para agrupar fragmentos pequeños de cualquier tipo de secuencia, incluyendo *cox* en artrópodos (e.g. Yu *et al.*, 2012). CROP genera grupos de secuencias con un umbral suave utilizando un algoritmo de probabilidad bayesiana e implementado un modelo mixto Gaussiano.

El método GMYC, diseñado por Pons *et al.* (2006) y Fontaneto *et al.* (2007), se usa para delimitar grupos evolutivamente independientes. A diferencia de los métodos de agrupación que usan un umbral de diferenciación genética entre secuencias, el GMYC es una aproximación estadística que predice cambios en la tasa de ramificación entre linajes y asocia dichos cambios a la delimitación de especies. En este procedimiento se evalúa, mediante un árbol filogenético, el cambio en la tasa de ramificación de un gen en un conjunto de individuos, el cual es interpretado como una transición de relaciones interespecíficas (especiación) hacia relaciones intraespecíficas (coalescencia). Si ocurre un incremento en la tasa de ramificación filogenética que no pueda ser explicado por un proceso de coalescencia neutral, se apoya la presencia de especies independientes. Con base en el modelo de ramificación de Yule (un modelo estocástico que considera sólo nacimientos o especiación), el GMYC optimiza un umbral de edad que corresponde a la transición entre coalescencia y especiación. Posteriormente se compara la probabilidad del modelo nulo, en el cual todas las muestras pertenecen a una misma especie, con la probabilidad del modelo alternativo, en el que distintos grupos coalescentes están agrupados en un árbol de especies (Papadopoulou *et al.*, 2009; Fujisawa y Barraclough, 2013; Humphreys y Barraclough, 2014).

Para implementar el método GMYC se calcularon árboles filogenéticos de cuatro familias taxonómicas: Curculionidae (Orden Coleoptera), Carabidae (Orden Coleoptera), Linyphiidae (Orden Araneae) y Gnaphosidae (Orden Araneae). Se usó el programa BEAST v1.8.2. (Drummond *et al.*, 2012) con un modelo de especiación de nacimiento-muerte con muestreo incompleto, reloj relajado con tasas de sustitución obtenidas con una distribución previa (*prior*) uniforme de 0 a 100, a la raíz del árbol se le asignó una distribución previa uniforme de 0.9 a 1.1 unidades de tiempo y un

valor inicial de 1, de manera que se calcularan tiempos relativos y no absolutos. En los demás parámetros se dejó el valor predeterminado para las distribuciones previas. La búsqueda comenzó a partir de un árbol UPGMA, cada búsqueda implementó una cadena de 100,000,000 pasos. Los resultados fueron analizados en el programa Tracer v1.6. y el árbol de máxima credibilidad fue identificado con Treeanotator v1.8.2. Los árboles fueron importados a R para implementar la función *gmyc* con los parámetros predeterminados.

Los grupos resultantes del método GMYC y del programa CROP fueron comparados. En la mayoría de los casos coincidieron, sin embargo, en algunas ocasiones se formaron más grupos con el método GMYC que con CROP. En estos casos se optó por conformar menos grupos con más representantes en distintas montañas en vez de más OTUs con menos individuos. Esta decisión se sustentó en resultados de publicaciones que al comparar distintos métodos para delimitar OTUs encontraron que el GMYC tiende a sobreestimar la cantidad de unidades evolutivas (Kekkonen y Hebert, 2014), en la discusión de esta tesis se profundiza más sobre este tema.

#### 4.4. *Diversidad genética y diversidad específica en siete montañas de la FVTM*

La diversidad específica de un lugar se mide con índices que evalúan la riqueza y abundancia de especies de la comunidad (Whittaker, 1960). Para comparar la diversidad entre las siete montañas estudiadas se obtuvo el número de OTUs presentes en cada montaña y los índices de diversidad de Simpson y de Shannon-Weaver. También se obtuvo la diversidad beta, un índice que evalúa la heterogeneidad de especies, es decir, qué tanto cambia la diversidad específica en un gradiente ambiental (Whittaker, 1960). Los índices de diversidad fueron calculados con el paquete *vegan* en R (Oksanen *et al.*, 2013; el Anexo 2 contiene el código de R que fue utilizado).

Por otro lado se evaluó la diversidad genética existente en cada montaña. Para esto se obtuvo el número de haplotipos totales y haplotipos únicos de cada OTU y cada montaña. Las OTUs que se utilizaron fueron aquellas con un mínimo de dos representantes en al menos dos montañas. Los cálculos se realizaron con los paquetes *adegenet* y *pegas* en R (Jombart, 2008; Paradis, 2010; el Anexo 2 contiene el código de R que fue utilizado). La montaña Cerro de San Andrés no fue considerada en este cálculo porque no se encontraron OTUs en esta localidad con más de dos representantes en otras montañas.

#### 4.5. Estructura genética dentro de las OTUs

Se analizó la estructura genética de la comunidad de artrópodos de la FVTM con matrices de distancia genética y con el estadístico  $F_{ST}$ , con el fin de calcular la diferenciación genética entre individuos de las distintas localidades.

En el lenguaje de programación R con el paquete *adegenet* (Jombart, 2008) se calculó la distancia genética con dos medidas estadísticas, la distancia de Roger (euclidiana) y la de Nei (no euclidiana). El análisis se realizó en tres niveles: (1) entre las OTUs de coleópteros y de arañas, (2) entre las OTUs de cada familia taxonómica y (3) entre las poblaciones de cada OTU. Con las distancias de las matrices se construyeron *clusters* para visualizar mejor las relaciones entre los grupos. Con el mismo paquete se calculó la  $F_{ST}$  entre las poblaciones de cada OTU. Finalmente, con el paquete *pegas* (Paradis, 2010) se construyeron redes de haplotipos de cada OTU (el Anexo 2 contiene el código de R que fue utilizado).

#### 4.6. Diferencia entre las comunidades de artrópodos de la FVTM que habitan distintos tipos de vegetación

Para evaluar si existe una diferencia en la estructura y composición de las comunidades que habitan en los pastizales alpinos y aquellas que habitan en el bosque de *Abies*, se calculó la frecuencia de OTUs existentes en ambos tipos de vegetación. Posteriormente, con base en los árboles filogenéticos obtenidos por familia, se analizó la pertenencia de cada OTU a ambos tipos de vegetación.

#### 4.7. Evaluación de una posible estructura Este-Oeste en la FVTM

Para poner a prueba si existe una estructura Este-Oeste entre las montañas analizadas se usaron dos métodos: análisis de modelos nulos y análisis de varianza con permutaciones. Con los análisis de varianza se realizó un *cluster* y un análisis de coordenadas principales (PCoA).

El análisis de modelos nulos, diseñado por Gotelli y Graves en 1996, se basa en la comparación de los datos empíricos que describen a las comunidades ecológicas con datos de comunidades simuladas en la computadora. Las comunidades simuladas representan el escenario

que se esperaría observar en ausencia de un mecanismo ecológico particular, de manera que se genera un modelo nulo que posteriormente es comparado con el patrón que generan los datos empíricos. Las comunidades simuladas se construyen a partir de la aleatorización de los datos empíricos, en la cual se permite que ciertos elementos varíen estocásticamente mientras que otros se mantienen fijos; por ejemplo, se pueden aleatorizar comunidades cambiando sólo la información de los sitios o sólo la información de la especie. El procedimiento general consiste en modelar muchas comunidades aleatorias con los datos recolectados en campo, después se calcula y se compara estadísticamente el índice de interés (*e.g.* diversidad beta) en los datos empíricos con el índice obtenido en las comunidades simuladas (el modelo nulo).

Dado que el objetivo es evaluar la diferencia de comunidades entre montañas del Este (E) y montañas del Oeste (O) del área de estudio, la diversidad beta se calculó a partir de la comparación de dos grupos de montañas, las montañas occidentales (O: Cerro San Andrés, Cerro Blanco y Nevado de Toluca) y las montañas orientales (E: Ajusco, la Malinche, Iztaccíhuatl y Cofre de Perote). Esta categorización se basó en resultados de estudios previos que describen una diferenciación en la composición y estructura de linajes a lo largo de la FVTM cuya separación puede ubicarse alrededor de los 99° de longitud.

A partir de la matriz de presencia-ausencia de OTUs en las siete montañas, se realizaron 999 simulaciones de comunidades aleatorias y se calculó la diversidad beta en todas las comunidades (la empírica y las simuladas). Estos análisis se realizaron con la función *oecosimu* del paquete *vegan* en R (Oksanen *et al.*, 2013). En la función *oecosimu* se incluye el índice que se quiere obtener, en este caso se calculó diversidad beta con la función *nestedbetasor*, la cual encuentra disimilitudes entre sitios y descompone esta información en componentes de recambio (*turnover*) y anidamiento (*nestedness*) de acuerdo a Baselga (2010), quien propone que el recambio se da por un proceso de reemplazo o sustitución de especies mientras que el anidamiento se da por un proceso de pérdida de especies. De esta manera la información de la diversidad beta se descompone en tres resultados: recambio, anidamiento y la suma de las dos, que es la diversidad beta total (Baselga, 2010).

Para comparar este resultado con otros posibles escenarios de estructuración se simuló diferentes agrupamientos de montañas. Todos los grupos consistieron en un vector de cuatro montañas (“E”) y otro de tres (“O”), dando un total de 35 agrupamientos distintos (Tabla 3). De los 35 grupos analizados, el grupo 1 corresponde a la estructura Este-Oeste que se está poniendo a prueba. Se repitió el análisis de modelos nulos con cada uno de los grupos y se compararon los resultados.

La otra forma en la que se analizó la separación E-O fue con un análisis de varianza con permutaciones, en donde se comparó la varianza de diversidad beta entre un vector Este y un vector

Oeste. Se usaron los mismos 35 grupos de montañas (Tabla 3) para analizar las posibles combinaciones de estructuración E-O existentes. Estos análisis se realizaron con el paquete *vegan* con la función *betadiver* en R. Con el fin de visualizar los resultados se construyó un PcoA y un *cluster* con los índices de diversidad beta (el Anexo 2 contiene el código de R que fue utilizado).

Tabla 3. Grupos de montañas utilizados en los análisis de modelos nulos con el objetivo de probar distintos escenarios de estructura de la diversidad en las siete montañas estudiadas de la FVTM. Se usaron todas las combinaciones posibles que dividieran a las montañas en dos conjuntos de tres y cuatro montañas. Las iniciales indican el nombre de la montaña de la siguiente forma: Cerro de San Andrés (An), Cerro Blanco (Bl), Nevado de Toluca (To), Ajusco (Aj), Iztaccíhuatl (Iz), Malinche (Ma) y Cofre de Perote (Pe).

Grupo	O	E
1	An, Bl, To	Aj, Iz, Ma, Pe
2	An, Bl, Aj	To, Iz, Ma, Pe
3	An, Bl, Iz	To, Aj, Ma, Pe
4	An, Bl, Ma	To, Aj, Iz, Pe
5	An, Bl, Pe	To, Aj, Iz, Ma
6	An, To, Aj	Bl, Iz, Ma, Pe
7	An, To, Iz	Bl, Aj, Ma, Pe
8	An, To, Ma	Bl, Aj, Iz, Pe
9	An, To, Pe	Bl, Aj, Iz, Ma
10	An, Aj, Iz	Bl, To, Ma, Pe
11	An, Aj, Ma	Bl, To, Iz, Pe
12	An, Aj, Pe	Bl, To, Iz, Ma
13	An, Iz, Ma	Bl, To, Aj, Pe
14	An, Iz, Pe	Bl, To, Aj, Ma
15	An, Ma, Pe	Bl, To, Aj, Iz
16	Bl, To, Aj	An, Iz, Ma, Pe
17	Bl, To, Iz	An, Aj, Ma, Pe
18	Bl, To, Ma	An, Aj, Iz, Pe
19	Bl, To, Pe	An, Aj, Iz, Ma
20	Bl, Aj, Iz	An, To, Ma, Pe
21	Bl, Aj, Ma	An, To, Iz, Pe
22	Bl, Aj, Pe	An, To, Iz, Ma
23	Bl, Iz, Ma	An, To, Aj, Pe
24	Bl, Iz, Pe	An, To, Aj, Ma
25	Bl, Ma, Pe	An, To, Aj, Iz

---

Grupo	O	E
26	To, Aj, Iz	An, Bl, Ma, Pe
27	To, Aj, Ma	An, Bl, Iz, Pe
28	To, Aj, Pe	An, Bl, Iz, Ma
29	To, Iz, Ma	An, Bl, Aj, Pe
30	To, Iz, Pe	An, Bl, Aj, Ma
31	To, Ma, Pe	An, Bl, Aj, Iz
32	Aj, Iz, Ma	An, Bl, To, Pe
33	Aj, Iz, Pe	An, Bl, To, Ma
34	Aj, Ma, Pe	An, Bl, To, Iz
35	Iz, Ma, Pe	An, Bl, To, Aj

---

## 5. Resultados

### 5.1. Procesamiento de muestras

De los cinco tipos de muestreo que se realizaron se obtuvo una mayor cantidad y variedad en las trampas de caída (*pitfall*), por lo que se concentraron esfuerzos en procesar las muestras colectadas con este método. Se separaron los artrópodos en órdenes taxonómicos y se dio prioridad a los órdenes Coleoptera y Araneae. La decisión de continuar sólo con coleópteros y arañas se tomó porque se contaba con los métodos de laboratorio estandarizados para obtener secuencias de estos grupos de organismos, se encontraron ampliamente representados en el muestreo general y son grupos que albergan grandes niveles de diversidad. Los individuos fueron agrupados en 103 morfotipos de coleópteros y 95 morfotipos de arañas, de los cuales sólo 13 y 22 morfotipos de coleópteros y de arañas, respectivamente, tienen representantes en más de una montaña (Tabla 4).

Tabla 4. Número de individuos por morfotipo recolectados en cada montaña. Los morfotipos con el prefijo Co son coleópteros y los morfotipos con prefijo Ar son arañas. Los sitios de colecta fueron Cerro de San Andrés (An), Cerro Blanco (Bl), Nevado de Toluca (To), Ajusco (Aj), Iztaccíhuatl (Iz), Malinche (Ma) y Cofre de Perote (Pe).

Morfotipo	An	Bl	To	Aj	Iz	Ma	Pe
Co1	1	12	12	6	13	15	5
Co2			8	5	12		
Co3			1	5	11		
Co4				5	1	1	
Co5			3	5			
Co6				2			2
Co7			7	2		1	
Co8				1	4	2	
Co9	19	11	2		3		
Co10	1	12	14		12	12	12
Co11	1				12	3	13
Co12		7				4	
Co13		1			10		
Ar1				13			9
Ar2	6	1		2	23	5	13
Ar3	2			12	2	1	3
Ar4			2	8		2	
Ar5	1	6			5	2	5

Morfotipo	An	Bl	To	Aj	Iz	Ma	Pe
Ar6				6	12		
Ar7	3	2	1	9	12		
Ar8				6			
Ar9	10	1		6		1	3
Ar10		2		2			2
Ar11			5	2			
Ar12		2		1			
Ar13	23	24		6			2
Ar14	5		6	3			
Ar15		5		2			
Ar16	4		6	1	5	4	10
Ar17				1	8		8
Ar18			12				
Ar19			1				4
Ar20	2	2	1		3	2	1
Ar21	13	9	7		1		
Ar22		2	4		1	8	1

Debido a distintos obstáculos durante los procesos de extracción, amplificación y secuenciación, la cantidad de muestras fue mermando. La mayor reducción se dio en el proceso de amplificación, esto puede deberse a distintos factores, mismos que se solucionaron como se explica a continuación: (1) que el ADN esté degradado, ya sea por alguna manipulación en laboratorio o por las condiciones en las que fue colectado el organismo; (2) la cantidad de ADN en la muestra era demasiado alta, problema que puede solucionarse haciendo distintas diluciones del material genético; (3) el *primer* utilizado no es adecuado para amplificar *cox1* en esos organismos y/o las condiciones de amplificación no son las correctas, ya que probablemente ese morfotipo contiene mutaciones en el segmento en donde hibrida el *primer*, en este caso se puede solucionar con ciclos de mayor temperatura o de distinta temporalidad o se pueden usar otros *primers* para amplificar el mismo marcador; y (4) errores en la preparación del coctel para PCR, que puede solucionarse cambiando las alícuotas utilizadas en la mezcla. A pesar de intentar las distintas soluciones descritas anteriormente, varias de las muestras no se pudieron amplificar.

De los 384 coleópteros procesados (de los cuales 291 fueron asignados a un morfotipo) se logró amplificar el gen *cox1* o *cox2* de 247 especímenes (207 pertenecientes a algún morfotipo). En total se obtuvieron 185 secuencias de coleópteros de buena calidad (>60% HQ en Geneious). En cuanto al orden Aranaeae, se procesaron 480 especímenes de los cuales 408 fueron asignados a

algún morfotipo. Se logró amplificar el gen *cox1* de 365 especímenes (296 pertenecientes a algún morfotipo) de los cuales se obtuvieron 240 secuencias de buena calidad. En total se logró obtener secuencias de aproximadamente el 49% de las muestras colectadas. Las secuencias editadas se encuentran disponibles en la sección de Complementos del archivo digital de esta tesis, la cual puede ser consultada en la página de internet de catálogos de la Biblioteca Digital de la UNAM (<http://tesis.unam.mx/E>).

## 5.2. Catálogo de muestras

Se realizó un catálogo en BoldSystems con el fin de que la información recabada en este proyecto sea de libre acceso y esté en bases de datos internacionales. El catálogo sigue en construcción pero podrá ser consultado en [www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org) bajo el nombre *Transmexican Volcanic Belt Arthropod Taxa* con las iniciales TMBVAC.

## 5.3. Delimitación de unidades taxonómicas operacionales (OTUs)

A partir de la búsqueda en GenBank y BoldSystems se identificó la familia taxonómica de cada secuencia (Anexo 1). De cuatro morfotipos de coleópteros se identificaron tres familias taxonómicas: Hydranidae, Curculionidae y Carabidae. En el caso de las arañas, a partir de 12 morfotipos, se identificaron cuatro familias taxonómicas: Linyphiidae, Agelenidae, Gnaphosidae y Anyphaenidae.

Las secuencias fueron acomodadas en familias taxonómicas independientemente de los morfotipos a los que pertenecían. A partir de este agrupamiento se realizaron análisis para identificar unidades taxonómicas operacionales (OTUs). En el análisis se priorizó aquellas familias con mayor número de individuos y mayor representación en distintas montañas.

Al complementar la información de agrupamiento del programa CROP y del método GMYC se obtuvieron 45 OTUs, once de las cuales son coleópteros, denominadas OTU 1 a 11 (familias Carabidae y Curculionidae); y 34, denominadas OTU 12 a 45, son arañas (familias Linyphiidae y Gnaphosidae; Tabla 5). A continuación se muestra el resultado de ambos métodos en cada familia taxonómica.

Tabla 5. OTUs resultantes de la comparación de GMYC y CROP, se indica el número de individuos encontrados en cada montaña. Las abreviaturas de los nombres de las montañas son: Cerro de San Andrés (An), Cerro Blanco (Bl), Nevado de Toluca (To), Ajusco (Aj), Iztaccíhuatl (Iz), Malinche (Ma) y Cofre de Perote (Pe). Entre paréntesis se muestra el morfotipo al que pertenecían esos individuos. \* indica las OTUs con representantes en dos o más montañas.

OTU	An	Bl	To	Aj	Iz	Ma	Pe
1			5 (Co 7)				
2						4 (Co 1)	
3 *					10 (Co 11)	3 (Co 11)	1 (Co 11)
4					2 (Co 11)		
5							2 (Co 11)
6				1 (Co 7)			
7						1 (Co 7)	
8 *		4 (Co 1)	5 (Co 1)	1 (Co 1)		4 (Co 1)	
9						1 (Co 1)	
10 *		5 (Co 10)	14 (Co 10)				
11 *					6 (Co 10)	8 (Co 10)	8 (Co 10)
12				2 (Ar 7)			
13				11 (Ar 9, Ar 11, Ar 6, Ar 3)			
14 *				6 (Ar 1)	7 (Ar 6)		
15 *				8 (Ar 1, Ar 4, Ar 9, Ar 11)			10 (Ar 1, Ar 3, Ar 5)
16 *		1 (Ar 7)					1 (Ar 1)
17							7 (Ar 9, Ar 17)

<b>OTU</b>	<b>An</b>	<b>Bl</b>	<b>To</b>	<b>Aj</b>	<b>Iz</b>	<b>Ma</b>	<b>Pe</b>
18 *		1 (Ar 5)	9 (Ar 18)	2 (Ar 4)		2 (Ar 5)	
19 *						1 (Ar 4)	4 (Ar 5)
20 *		3 (Ar 5, Ar 12)	4 (Ar 4, Ar 18)	1 (Ar 12)	3 (Ar 7)		
21 *			2 (Ar 11)		1 (Ar 3)		
22				2 (Ar 3, Ar 10)			
23				2 (Ar 1)			
24				4 (Ar 3)			
25 *				4 (Ar 3, Ar 9)			2 (Ar 10)
26 *				5 (Ar 7)	3 (Ar 6)		
27 *	4 (Ar 9)	1 (Ar 9)					
28 *				1 (Ar 9)	5 (Ar 17)		
29				1 (Ar 1)			
30				1 (Ar 10)			
31				1 (Ar 3)			
32				1 (Ar 3)			
33				1 (Ar 4)			
34	1 (Ar 7)						
35		1 (Ar 12)					
36		1 (Ar 7)					
37							1 (Ar 17)
38			1 (Ar 7)				

OTU	An	Bl	To	Aj	Iz	Ma	Pe
39							3 (Ar 16)
40 *		2 (Ar 21)	3 (Ar 21)		2 (Ar 16)		
41	2 (Ar 16)						
42	3 (Ar 21)						
43			2 (Ar 21)				
44			2 (Ar 16)				
45	3 (Ar 21)						

**Curculionidae.** Las secuencias de *cox1* de la familia Curculionidae se separaron en siete OTUs por ambos métodos (Fig. 5).

Curculionidae (Coleoptera)

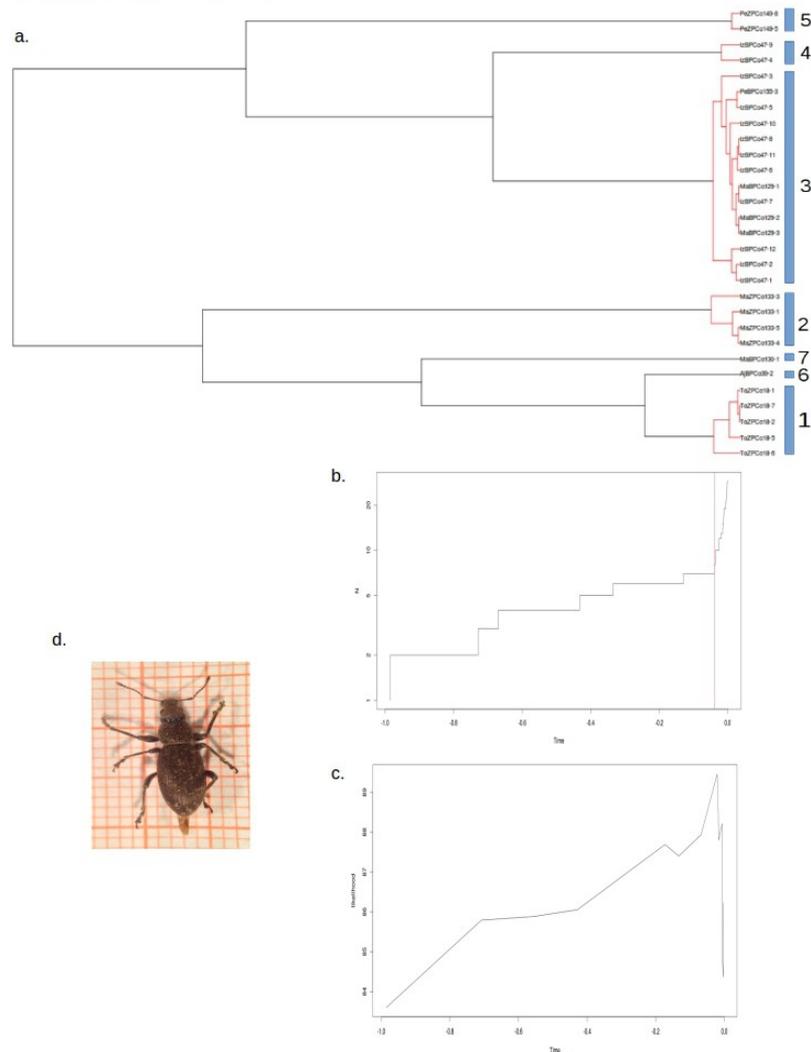


Figura 5. Resultados de la delimitación de OTUs en la familia Curculionidae obtenidos con los métodos CROP y GMYC. a) Árbol filogenético de la familia Curculionidae obtenido con el programa BEAST, en donde se muestran en rojo los grupos formados por el método GMYC y en azul los grupos que forma el programa CROP con un umbral del 97% de similitud. Los números a la derecha de los cuadros azules indican el número de OTU asignado al comparar ambos métodos. b) Gráfica de la tasa de ramificación del árbol filogenético que fue calculada con GMYC, la línea vertical roja muestra el umbral del cambio en la tasa de diversificación-coalescencia. c) Gráfica de la probabilidad de encontrar el umbral del cambio de la tasa de diversificación-coalescencia obtenido con GMYC a lo largo del tiempo. d) Fotografía de un individuo de la familia Curculionidae recolectado en la FVTM.

**Carabidae.** En estas 41 secuencias se agrupan cuatro unidades evolutivas con el método GMYC y dos unidades al usar un umbral de 3% de diferenciación genética. Se decidió agrupar las secuencias en dos OTUs (Fig.6).

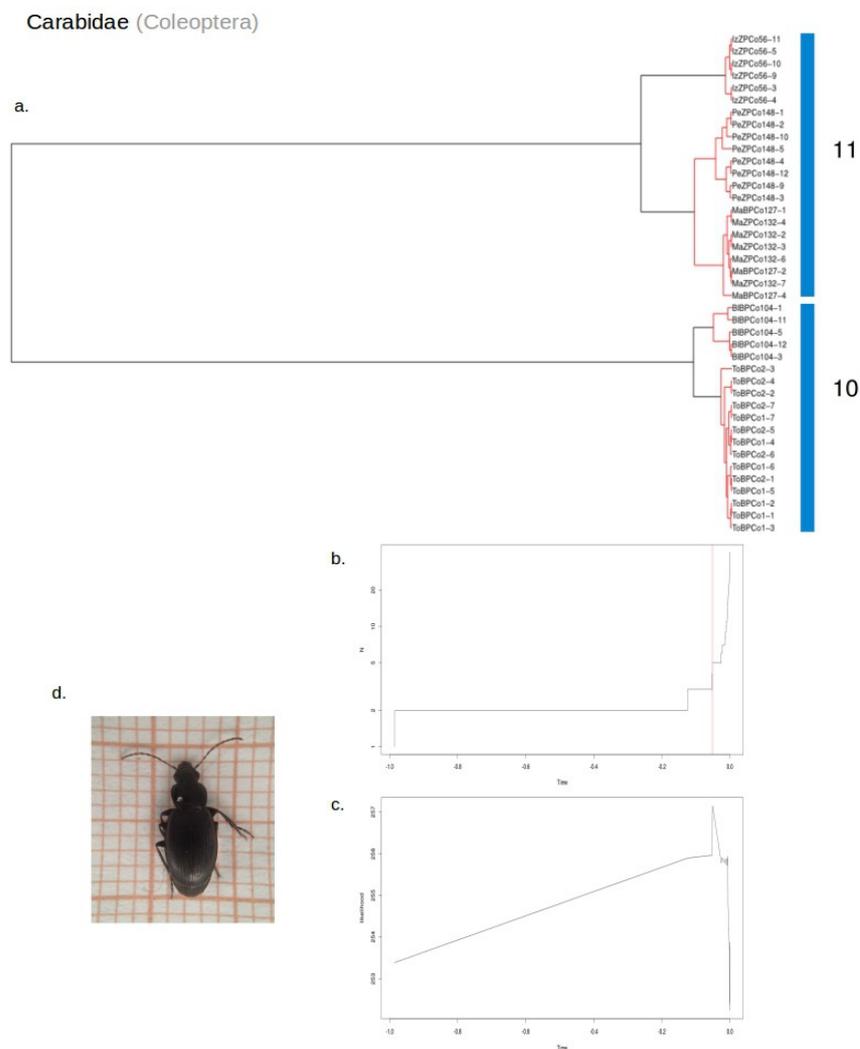


Figura 6. Resultados de la delimitación de OTUs en la familia Carabidae obtenidos con los métodos CROP y GMYC. a) Árbol filogenético de la familia Carabidae obtenido con el programa BEAST, en donde se

muestran en rojo los grupos formados por el método GMYC y en azul los grupos que forma el programa CROP con un umbral del 97% de similitud. Los números a la derecha de los cuadros azules indican el número de OTU asignado al comparar ambos métodos. b) Gráfica de la tasa de ramificación del árbol filogenético que fue calculada con GMYC, la línea vertical roja muestra el umbral del cambio en la tasa de diversificación-coalescencia. c) Gráfica de la probabilidad de encontrar el umbral del cambio de la tasa de diversificación-coalescencia obtenido con GMYC a lo largo del tiempo. d) Fotografía de un individuo de la familia Carabidae recolectado en la FVTM.

**Linyphiidae.** Un total de 129 secuencias pertenecientes a doce morfotipos distintos forman parte de la familia Linyphiidae. Con un umbral de similitud de 97% se agrupan en 27 unidades, mientras que por el método GMYC se forman 28 unidades (Fig.7).

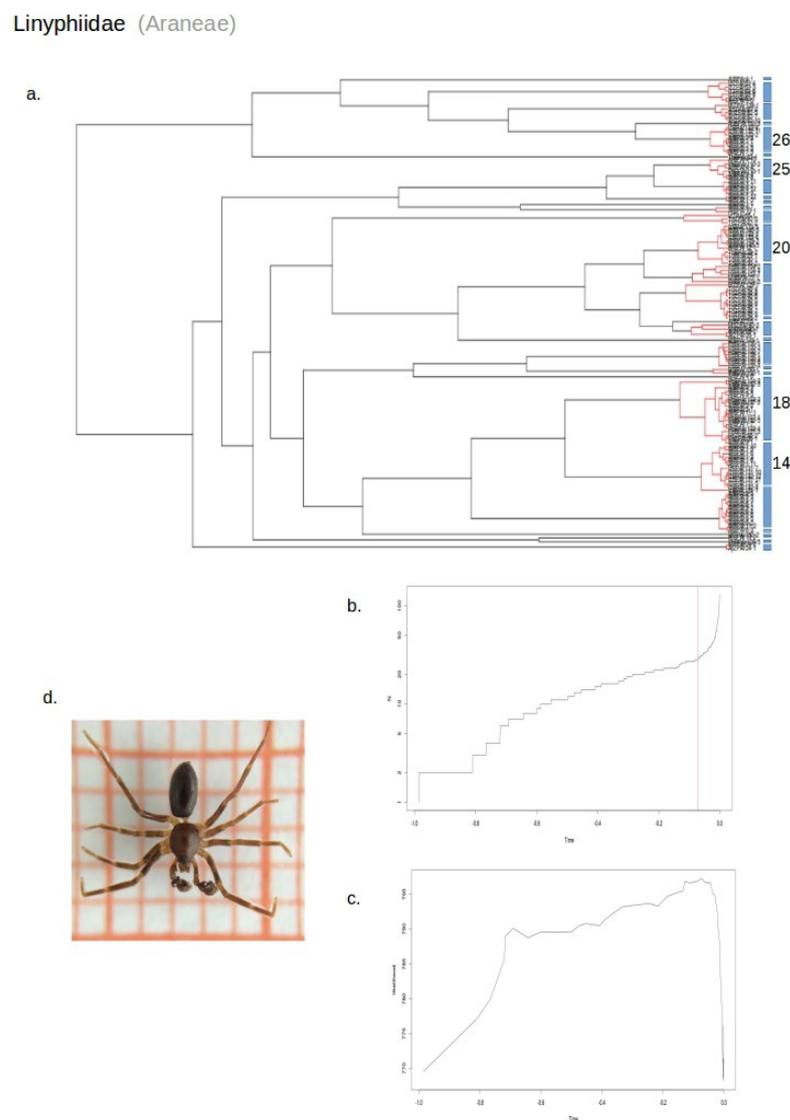


Figura 7. Resultados de la delimitación de OTUs en la familia Linyphiidae obtenidos con los métodos CROP y GMYC. a) Árbol filogenético de la familia Linyphiidae obtenido con el programa BEAST, en donde se

muestran en rojo los grupos formados por el método GMYC y en azul los grupos que forma el programa CROP con un umbral del 97% de similitud. Los números a la derecha de los cuadros azules indican el número de OTU asignado al comparar ambos métodos, solamente se muestran las OTUs con mayor cantidad de individuos. b) Gráfica de la tasa de ramificación del árbol filogenético que fue calculada con GMYC, la línea vertical roja muestra el umbral del cambio en la tasa de diversificación-coalescencia. c) Gráfica de la probabilidad de encontrar el umbral del cambio de la tasa de diversificación-coalescencia obtenido con GMYC a lo largo del tiempo. d) Fotografía de un individuo de la familia Linyphiidae recolectado en la FVTM.

**Gnaphosidae.** Se tienen 22 secuencias de la familia Gnaphosidae, las cuales fueron agrupadas en siete unidades con CROP y en ocho con el GMYC (Fig.8).

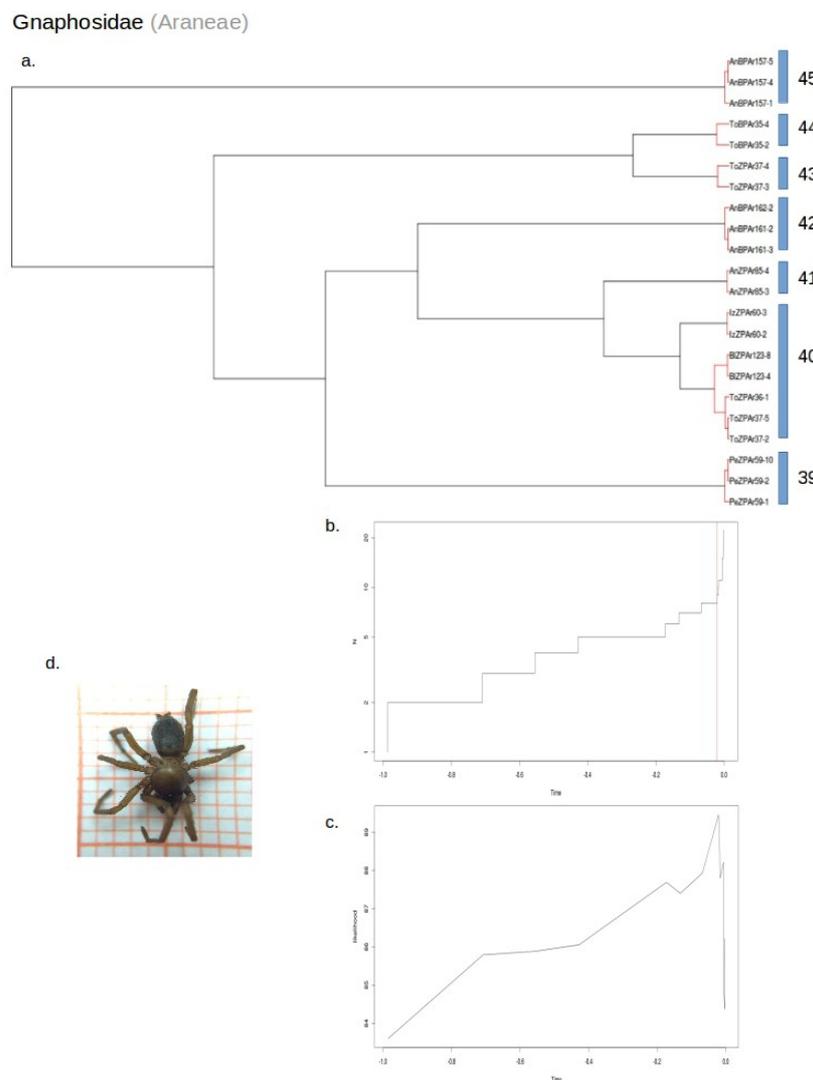


Figura 8. Resultados de la delimitación de OTUs en la familia Gnaphosidae obtenidos con los métodos CROP y GMYC. a) Árbol filogenético de la familia Gnaphosidae obtenido con el programa BEAST, en donde se muestran en rojo los grupos formados por el método GMYC y en azul los grupos que forma el

programa CROP con un umbral del 97% de similitud. Los números a la derecha de los cuadros azules indican el número de OTU asignado al comparar ambos métodos. b) Gráfica de la tasa de ramificación del árbol filogenético que fue calculada con GMYC, la línea vertical roja muestra el umbral del cambio en la tasa de diversificación-coalescencia. c) Gráfica de la probabilidad de encontrar el umbral del cambio de la tasa de diversificación-coalescencia obtenido con GMYC a lo largo del tiempo. d) Fotografía de un individuo de la familia Gnaphosidae recolectado en la FVTM.

#### 5.4. Diversidad genética y diversidad específica en siete montañas de la FVTM

Con el fin de comparar la diversidad que albergan las distintas montañas de la FVTM se calculó la diversidad de cada una (Tabla 6). La montaña que mostró mayor riqueza y mayor diversidad específica fue el Ajusco (Aj, 18 OTUs presentes,  $H=2.53$ ,  $D= 0.89$ ), y la montaña menos biodiversa resultó ser el Cerro de San Andrés (An, 6 OTUs,  $H=1.67$ ,  $D=0.79$  ).

Tabla 6. Riqueza e índices de diversidad de Shannon-Weaver ( $H'$ ) y diversidad de Simpson ( $D$ ) calculados con las OTUs presentes en cada montaña. Las abreviaturas de los nombres de las montaña son: Cerro de San Andrés (An), Cerro Blanco (Bl), Nevado de Toluca (To), Ajusco (Aj), Iztaccíhuatl (Iz), Malinche (Ma) y Cofre de Perote (Pe).

Índices	Montañas						
	An	Bl	To	Aj	Iz	Ma	Pe
Riqueza	6	9	10	18	9	8	10
$H'$	1.67	1.98	2.02	2.53	2.00	1.82	1.99
$D$	0.79	0.83	0.83	0.89	0.84	0.80	0.83

Al evaluar el índice Whittaker de diversidad beta entre las siete montañas resultó que las montañas con una composición de OTUs más similar son el Cerro Blanco (Bl) y el Nevado de Toluca (To). Mientras que el Cerro de San Andrés (An) es la montaña más distinta a las demás, sobre todo al compararla con el Ajusco (Aj), el Iztaccíhuatl (Iz) y el Cofre de Perote (Pe) (Tabla 7, Fig. 9). Tanto en el *cluster* como en el PCoA se puede observar que las montañas se agrupan en pares debido a la similitud en la composición de OTUs: el Nevado de Toluca y el Cerro Blanco forman un grupo, el Ajusco y el Iztaccíhuatl también se agrupan, y la Malinche y el Cofre de Perote forman otro grupo. En cambio el Cerro de San Andrés es distinto al resto de las montañas. También se puede observar que el primer eje en el PCoA separa a las montañas orientales (Aj, Iz, Ma, Pe) de las occidentales (To, Bl, An).

Tabla 7. Índice Whittaker de diversidad beta entre montañas. Los valores cercanos o igual a cero indican mayor similitud entre sitios. Los valores cercanos o igual a uno indican mayor o total diferencia entre sitios, respectivamente. Las abreviaturas de los nombres de las montañas son: Cerro de San Andrés (An), Cerro Blanco (Bl), Nevado de Toluca (To), Ajusco (Aj), Iztaccíhuatl (Iz), Malinche (Ma) y Cofre de Perote (Pe).

	An	Bl	To	Aj	Iz	Ma
Bl	0.7333					
To	0.8750	0.4736				
Aj	1.0000	0.8518	0.8571			
Iz	1.0000	0.7777	0.6842	0.7037		
Ma	0.8571	0.7647	0.7777	0.9230	0.7647	
Pe	1.000	0.8947	1.0000	0.8571	0.7894	0.6666

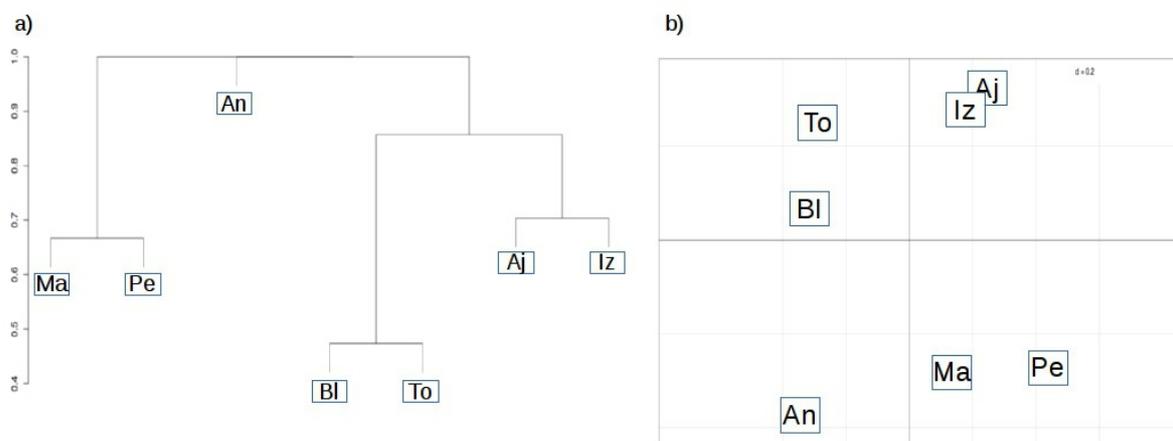


Figura 9. Relación entre siete montañas de la FVTM de acuerdo a la diversidad beta de OTUs, visualizada con a) un cluster y b) un PCoA. Las abreviaciones de cada montaña son: Cerro de San Andrés (An), Cerro Blanco (Bl), Nevado de Toluca (To), Ajusco (Aj), Iztaccíhuatl (Iz), Malinche (Ma) y Cofre de Perote (Pe).

En cuanto a la diversidad genética (Tabla 8), la montaña con mayor cantidad de haplotipos es el Ajusco. Aunque el Ajusco es también la montaña con más haplotipos únicos, el porcentaje de estos en relación al total de haplotipos es mayor en el Iztaccíhuatl. Es decir, proporcionalmente existe una mayor cantidad de haplotipos en el Iztaccíhuatl que existen sólo en esta montaña (85%). El Cofre de Perote y el Ajusco muestran también una diversidad genética alta en relación a las otras montañas, 80% y 83% de los haplotipos que presentan, respectivamente, son únicos (Tabla 8).

Tabla 8. Diversidad genética de siete montañas de la FVTM. De once OTUs se muestra el número de individuos de cada OTU (n) presentes en cada montaña, seguido por el número total de haplotipos encontrados por montaña y por el número de haplotipos únicos. La última columna muestra el número total

de haplotipos encontrados en cada OTU. Las dos filas al final de la tabla indican el número total de individuos (n), el número total de haplotipos y el número total de haplotipos únicos encontrados en cada montaña. Las abreviaturas del nombre de las montañas son: Cerro de San Andrés (An), Cerro Blanco (Bl), Nevado de Toluca (To), Ajusco (Aj), Iztaccíhuatl (Iz), Malinche (Ma) y Cofre de Perote (Pe).

OTU	Montañas						Total
	Bl	To	Aj	Iz	Ma	Pe	
3				<i>n=10</i>	<i>n=3</i>	<i>n=1</i>	<i>n=14</i>
				7	1	1	8
				6	0	1	7
8	<i>n=1</i>	<i>n=4</i>	<i>n=5</i>		<i>n=4</i>		<i>n=14</i>
	3	3	1		2		6
	1	1	1		1		4
10	<i>n=5</i>	<i>n=14</i>					<i>n=19</i>
	3	2					5
	3	2					5
11				<i>n=6</i>	<i>n=8</i>	<i>n=8</i>	<i>n=22</i>
				1	2	6	9
				1	2	6	9
14			<i>n=6</i>	<i>n=7</i>			<i>n=13</i>
			4	3			7
			4	3			7
15			<i>n=8</i>			<i>n=10</i>	<i>n=18</i>
			7			6	10
			4			3	7
18	<i>n=1</i>	<i>n=9</i>	<i>n=2</i>		<i>n=2</i>		<i>n=14</i>
	1	1	1		2		5
	1	1	1		2		5
20	<i>n=3</i>	<i>n=4</i>	<i>n=1</i>	<i>n=3</i>			<i>n=11</i>
	2	2	1	1			5
	1	2	1	0			4
25			<i>n=4</i>			<i>n=2</i>	<i>n=6</i>
			3			2	5
			3			2	5
26			<i>n=5</i>	<i>n=3</i>			<i>n=8</i>
			1	1			2
			1	1			2
40	<i>n=2</i>	<i>n=3</i>		<i>n=2</i>			<i>n=7</i>
	1	1		1			3
	1	1		1			3
No. de haplotipos por montaña	<i>n=12</i> 10	<i>n=34</i> 9	<i>n=31</i> 18	<i>n=31</i> 14	<i>n=17</i> 7	<i>n=21</i> 15	<i>n=146</i>
No. de haplotipos únicos por montaña	7	7	15	12	5	12	

### 5.5. Estructura genética dentro de las OTUs

Con el fin de evaluar la relación genética existente entre los coleópteros y las arañas de las montañas de la FVTM se calculó la distancia genética y la estructura ( $F_{ST}$ ) entre distintas poblaciones de cada OTU, así como la relación de los haplotipos de cada unidad. Si bien las tres medidas (ambas medidas de distancia genética y la  $F_{ST}$ ) se calculan de distinta forma, todas indican qué tan diferenciadas se encuentran las poblaciones de acuerdo a la variación genética que presentan, por lo tanto muestran tendencias similares. Algunas unidades pertenecen a poblaciones altamente diferenciadas, por ejemplo la OTU 11, mientras que otras pertenecen a unidades con muchos haplotipos compartidos, por ejemplo la OTU 15.

A continuación se muestran estos resultados para cada OTU evaluada:

#### OTU 3 Coleoptera (Curculionidae)

##### a) Distancia genética

Nei	Iz	Ma	Pe
Iz	0		
Ma	0.024	0	
Pe	0.187	0.200	0

Roger	Iz	Ma	Pe
Iz	0		
Ma	0.154	0	
Pe	0.281	0.181	0

##### b) Estructura poblacional

$F_{ST}$	Iz	Ma	Pe
Iz	0		
Ma	0.052	0	
Pe	0.102	1	0

##### c) Red de haplotipos

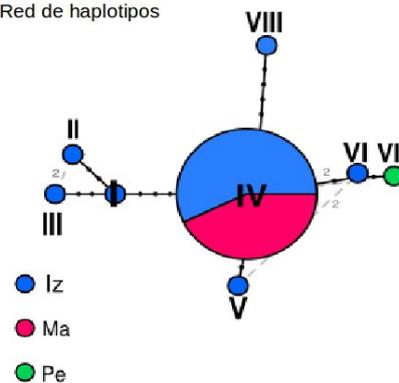


Figura 10. Estructura genética entre las tres poblaciones de la OTU 3. Las abreviaciones de los nombres de las montañas son: Iztaccíhuatl (Iz), Malinche (Ma) y Cofre de Perote (Pe). a) Distancia genética de Nei (izquierda) y euclidiana (Roger; derecha). b) Estructura genética evaluada con el parámetro  $F_{ST}$ . c) Red de haplotipos en donde el tamaño del círculo indica la frecuencia del haplotipo, cada paso es una mutación y los colores indican la población a la que pertenece cada haplotipo.

**OTU 8** Coleoptera (Curculionidae)

a) Distancia genética

Nei	Aj	To	Bl	Ma
Aj	0			
To	0.097	0		
Bl	0.157	0.055	0	
Ma	0.094	0.014	0.084	0

Roger	Aj	To	Bl	Ma
Aj	0			
To	0.108	0		
Bl	0.291	0.220	0	
Ma	0.104	0.045	0.250	0

b) Estructura poblacional

$F_{ST}$	Aj	To	Bl	Ma
Aj	0			
To	0.478	0		
Bl	0.147	0.150	0	
Ma	0.531	0.171	0.185	0

c) Red de haplotipos

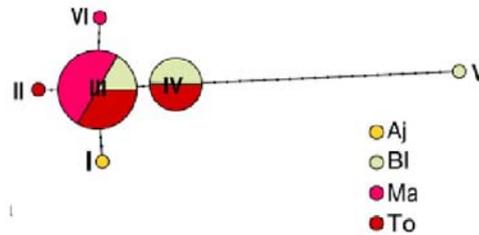


Figura 11. Estructura genética entre las cuatro poblaciones de la OTU 8. Las abreviaciones de los nombres de las montañas son: Ajusco (Aj), Cerro Blanco (Bl), Malinche (Ma) y Nevado de Toluca (To). a) Distancia genética de Nei (izquierda) y euclidiana (Roger; derecha). b) Estructura genética evaluada con el parámetro  $F_{ST}$ . c) Red de haplotipos en donde el tamaño del círculo indica la frecuencia del haplotipo, cada paso es una mutación y los colores indican la población a la que pertenece cada haplotipo.

**OTU 10** Coleoptera (Carabidae)

a) Distancia genética

Nei	Bl	To
Bl	0	
To	0.806	0

Roger	Bl	To
Bl	0	
To	0.608	0

b) Estructura poblacional

$F_{ST}$	Bl	To
Bl	0	
To	0.730	0

c) Red de haplotipos

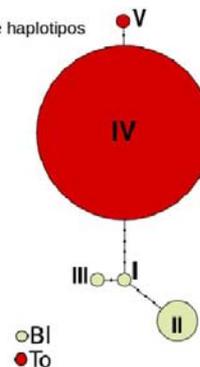


Figura 12. Estructura genética entre las dos poblaciones de la OTU 10. Las abreviaciones de los nombres de las montañas son: Cerro Blanco (Bl) y Nevado de Toluca (To). a) Distancia genética de Nei (izquierda) y euclidiana (Roger; derecha). b) Estructura genética evaluada con el parámetro  $F_{ST}$ . c) Red de haplotipos en donde el tamaño del círculo indica la frecuencia del haplotipo, cada paso es una mutación y los colores indican la población a la que pertenece cada haplotipo.

**OTU 11** Coleoptera (Carabidae)

a) Distancia genética

Nei	Iz	Ma	Pe
Iz	0		
Ma	1.131	0	
Pe	1.152	0.340	0

Roger	Iz	Ma	Pe
Iz	0		
Ma	0.679	0	
Pe	0.703	0.335	0

b) Estructura poblacional

$F_{ST}$	Iz	Ma	Pe
Iz	0		
Ma	0.976	0	
Pe	0.825	0.673	0

c) Red de haplotipos

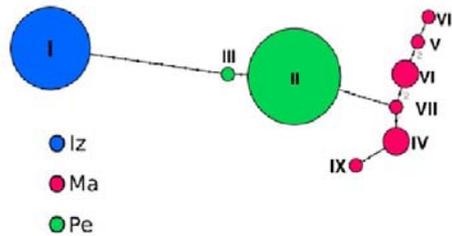


Figura 13. Estructura genética entre las tres poblaciones de la OTU 11. Las abreviaciones de los nombres de las montañas son: Iztaccíhuatl (Iz), Malinche (Ma) y Cofre de Perote (Pe). a) Distancia genética de Nei (izquierda) y euclidiana (Roger; derecha). b) Estructura genética evaluada con el parámetro  $F_{ST}$ . c) Red de haplotipos en donde el tamaño del círculo indica la frecuencia del haplotipo, cada paso es una mutación y los colores indican la población a la que pertenece cada haplotipo.

**OTU 14** Araneae (Linyphiidae)

a) Distancia genética

Nei	Iz	Aj
Iz	0	
Aj	0.340	0

Roger	Iz	Aj
Iz	0	
Aj	0.383	0

b) Estructura poblacional

$F_{ST}$	Iz	Aj
Iz	0	
Aj	0.481	0

c) Red de haplotipos

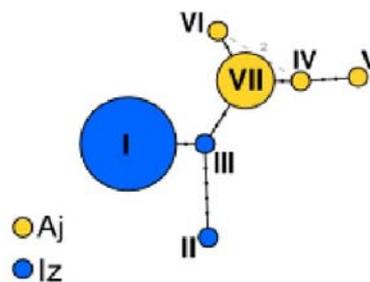


Figura 14. Estructura genética entre las dos poblaciones de la OTU 14. Las abreviaciones de los nombres de las montañas son: Ajusco (Aj) e Iztaccíhuatl (Iz). a) Distancia genética de Nei (izquierda) y euclidiana (Roger; derecha). b) Estructura genética evaluada con el parámetro  $F_{ST}$ . c) Red de haplotipos en donde el tamaño del círculo indica la frecuencia del haplotipo, cada paso es una mutación y los colores indican la población a la que pertenece cada haplotipo.

**OTU 15** Araneae (Linyphiidae)

a) Distancia genética

Nei	Aj	Pe
Aj	0	
Pe	0.052	0

Roger	Aj	Pe
Aj	0	
Pe	0.196	0

b) Estructura poblacional

$F_{ST}$	Aj	Pe
Aj	0	
Pe	0.088	0

c) Red de haplotipos

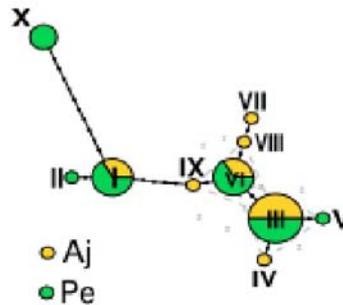


Figura 15. Estructura genética entre las dos poblaciones de la OTU 15. Las abreviaciones de los nombres de las montañas son: Ajusco (Aj) y Cofre de Perote (Pe). a) Distancia genética de Nei (izquierda) y euclidiana (Roger; derecha). b) Estructura genética evaluada con el parámetro  $F_{ST}$ . c) Red de haplotipos en donde el tamaño del círculo indica la frecuencia del haplotipo, cada paso es una mutación y los colores indican la población a la que pertenece cada haplotipo.

**OTU 18** Araneae (Linyphiidae)

a) Distancia genética

Nei	Aj	Bl	Ma	To
Aj	0			
Bl	0.546	0		
Ma	0.185	0.861	0	
To	0.641	0.379	1.010	0

Roger	Aj	Bl	Ma	To
Aj	0			
Bl	0.421	0		
Ma	0.246	0.614	0	
To	0.473	0.315	0.667	0

b) Estructura poblacional

$F_{ST}$	Aj	Bl	Ma	To
Aj	0			
Bl	1	0		
Ma	0.461	0.655	0	
To	1	1	0.837	0

c) Red de haplotipos

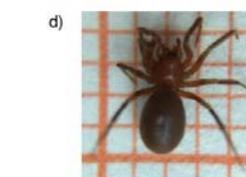
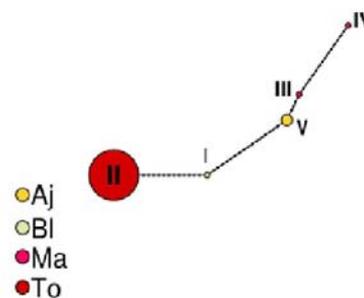


Figura 16. Estructura genética entre las cuatro poblaciones de la OTU 18. Las abreviaciones de los nombres de las montañas son: Ajusco (Aj), Cerro Blanco (Bl), Malinche (Ma) y Nevado de Toluca (To). a) Distancia genética de Nei (izquierda) y euclidiana (Roger; derecha). b) Estructura genética evaluada con el parámetro  $F_{ST}$ . c) Red de haplotipos en donde el tamaño del círculo indica la frecuencia del haplotipo, cada paso es una mutación y los colores indican la población a la que pertenece cada haplotipo.

**OTU 20** Araneae (Linyphiidae)

a) Distancia genética

Nei	Aj	Bl	Iz	To
Aj	0			
Bl	0.384	0		
Iz	0.318	0.041	0	
To	1.820	0.953	0.822	0

Roger	Aj	Bl	Iz	To
Aj	0			
Bl	0.333	0		
Iz	0.272	0.060	0	
To	0.840	0.628	0.568	0

b) Estructura poblacional

$F_{ST}$	Aj	Bl	Iz	To
Aj	0			
Bl	0.794	0		
Iz	1	0.500	0	
To	0.906	0.887	0.932	0

c) Red de haplotipos

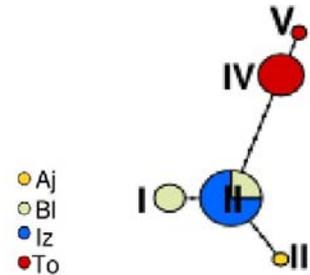


Figura 17. Estructura genética entre las cuatro poblaciones de la OTU 20. Las abreviaciones de los nombres de las montañas son: Ajusco (Aj), Cerro Blanco (Bl), Iztaccíhuatl (Iz) y Nevado de Toluca (To). a) Distancia genética de Nei (izquierda) y euclidiana (Roger; derecha). b) Estructura genética evaluada con el parámetro  $F_{ST}$ . c) Red de haplotipos en donde el tamaño del círculo indica la frecuencia del haplotipo, cada paso es una mutación y los colores indican la población a la que pertenece cada haplotipo.

**OTU 25** Araneae (Linyphiidae)

a) Distancia genética

Nei	Aj	Pe
Aj	0	
Pe	0.275	0

Roger	Aj	Pe
Aj	0	
Pe	0.321	0

b) Estructura poblacional

$F_{ST}$	Aj	Pe
Aj	0	
Pe	0.233	0

c) Red de haplotipos

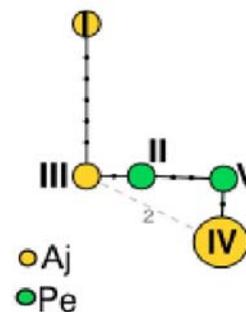


Figura 18. Estructura genética entre las dos poblaciones de la OTU 25. Las abreviaciones de los nombres de las montañas son: Ajusco (Aj) y Cofre de Perote. a) Distancia genética de Nei (izquierda) y euclidiana (Roger; derecha). b) Estructura genética evaluada con el parámetro  $F_{ST}$ . c) Red de haplotipos en donde el tamaño del círculo indica la frecuencia del haplotipo, cada paso es una mutación y los colores indican la población a la que pertenece cada haplotipo.

**OTU 40** Araneae (Gnaphosidae)

a) Distancia genética

Nei	Bl	Iz	To
Bl	0		
Iz	2.564	0	
To	0.262	1.871	0

Roger	Bl	Iz	To
Bl	0		
Iz	0.923	0	
To	0.230	0.846	0

b) Estructura poblacional

$F_{ST}$	Bl	Iz	To
Bl	0		
Iz	1	0	
To	1	1	0

c) Red de haplotipos

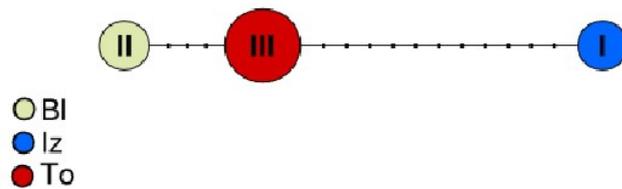


Figura 19. Estructura genética entre las tres poblaciones de la OTU 40. Las abreviaciones de los nombres de las montañas son: Cerro Blanco (Bl), Iztaccíhuatl (Iz) y Nevado de Toluca (To). a) Distancia genética de Nei (izquierda) y euclidiana (Roger; derecha). b) Estructura genética evaluada con el parámetro  $F_{ST}$ . c) Red de haplotipos en donde el tamaño del círculo indica la frecuencia del haplotipo, cada paso es una mutación y los colores indican la población a la que pertenece cada haplotipo.

5.6. *Diferencia entre las comunidades de artrópodos de la FVTM que habitan distintos tipos de vegetación*

Tanto los árboles filogenéticos como las gráficas de la cantidad de individuos que provienen de cada tipo de vegetación muestran que la mayoría de los individuos de cada OTU pertenecen a sólo un tipo de vegetación (Figs. 20-23).

## Curculionidae (Coleoptera)

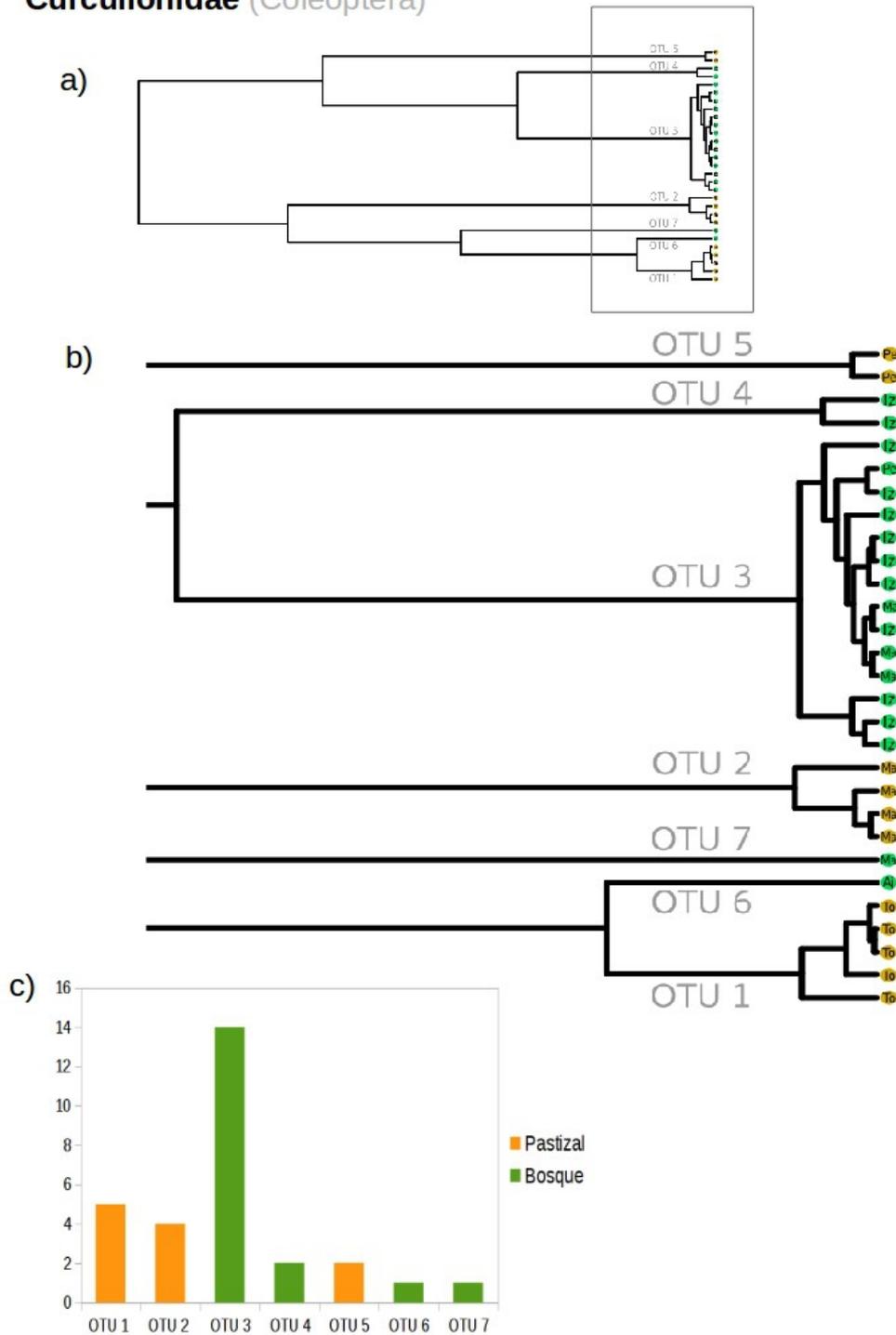


Figura 20. Tipo de vegetación del cual provienen los individuos de la familia Curculionidae. a) Árbol filogenético de las OTUs 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 (familia Curculionidae) en donde se indica con color verde los individuos del bosque y en amarillo los individuos del pastizal alpino. Las abreviaturas del nombre de las montañas son: Nevado de Toluca (To), Ajusco (Aj), Iztaccíhuatl (Iz), Malinche (Ma) y Cofre de Perote (Pe). b) Acercamiento del árbol filogenético de la familia Curculionidae. c) Gráfica del número de individuos de las OTUs 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, que provienen del bosque (en verde) y del pastizal alpino (en amarillo).

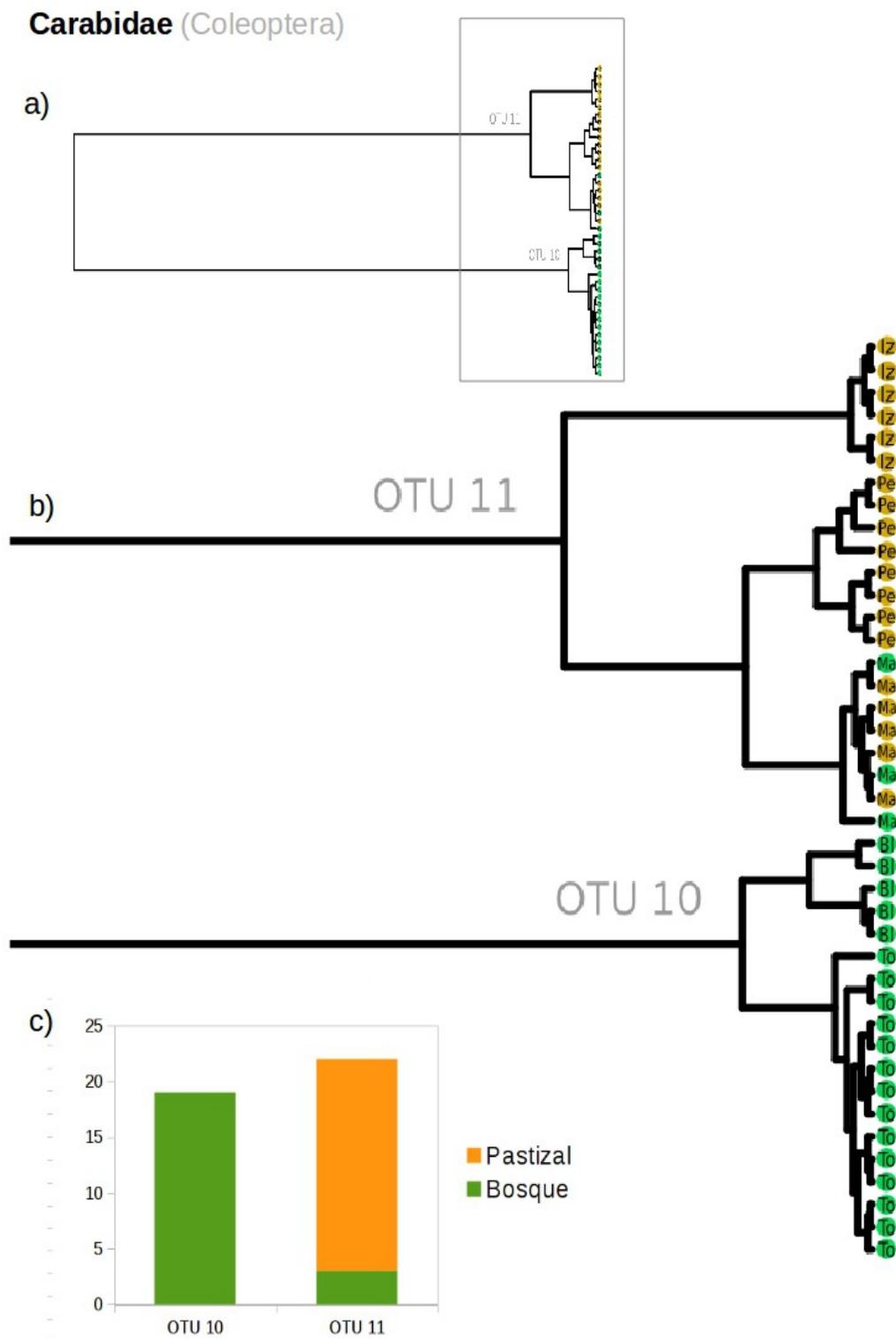
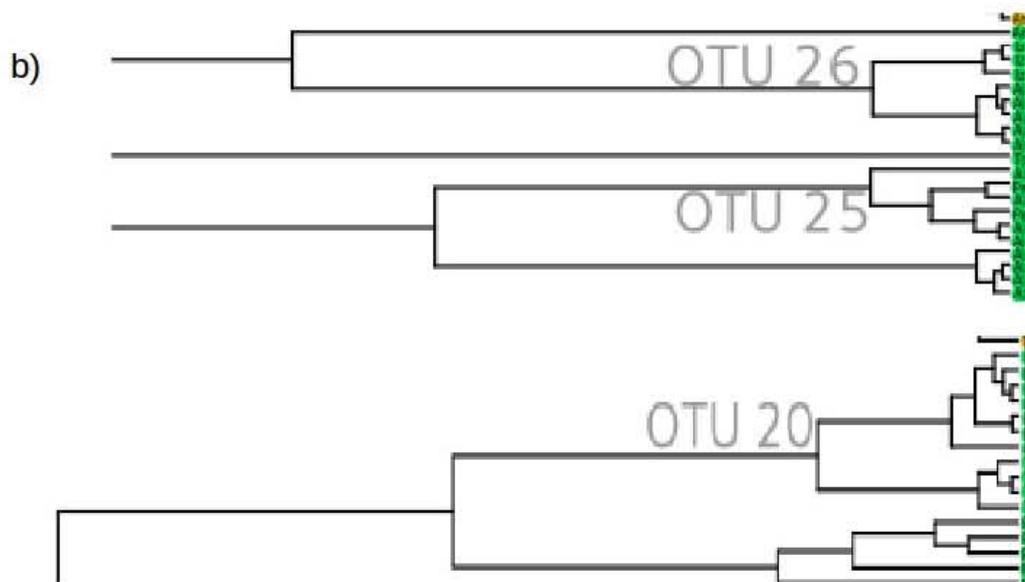
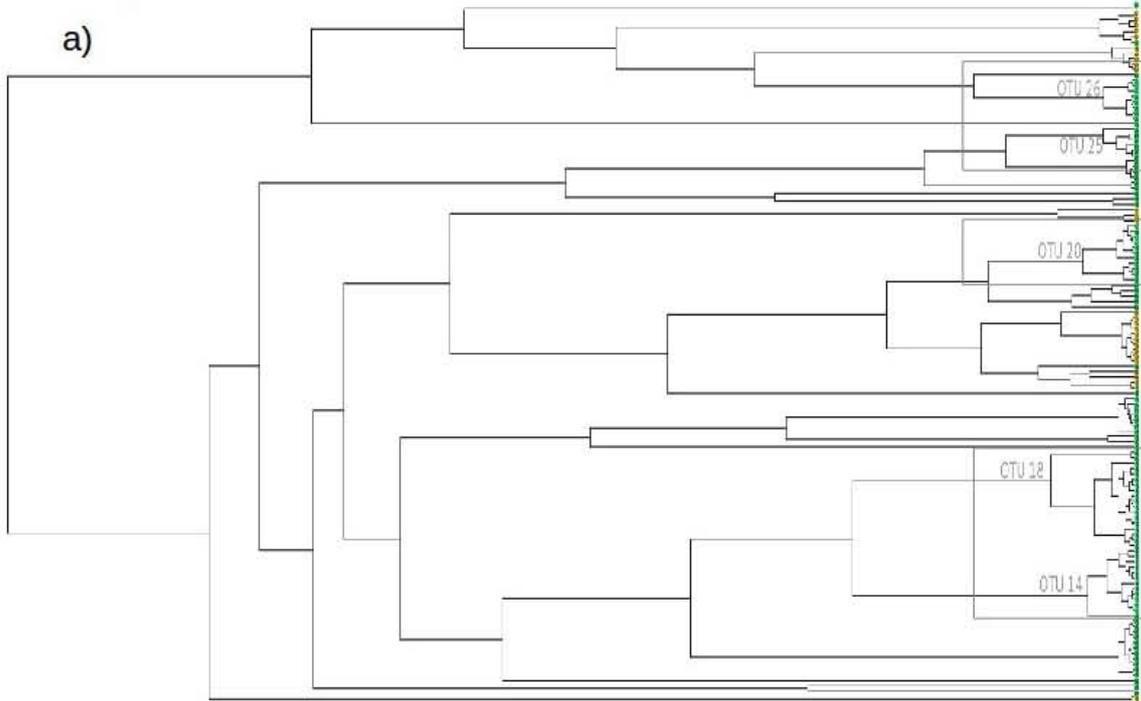


Figura 21. Tipo de vegetación del cual provienen los individuos de la familia Carabidae. a) Árbol filogenético de las OTUs 10 y 11 (familia Carabidae) en donde se indica con color verde los individuos del bosque y en amarillo los individuos del pastizal alpino. Las abreviaturas del nombre de las montañas son: Cerro Blanco (Bl), Nevado de Toluca (To), Iztaccíhuatl (Iz), Malinche (Ma) y Cofre de Perote (Pe). b) Acercamiento del árbol filogenético de la familia Carabidae. c) Gráfica del número de individuos de las OTUs 10 y 11 que provienen del bosque (en verde) y del pastizal alpino (en amarillo).

Linyphiidae (Aranae)



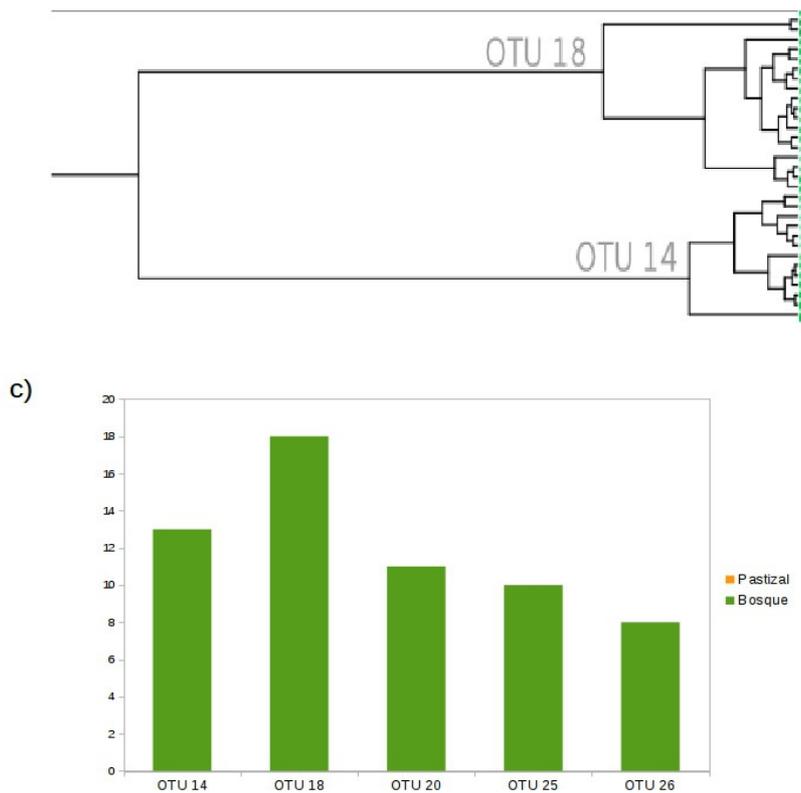


Figura 22. Tipo de vegetación del cual provienen los individuos de la familia Linyphiidae. a) Árbol filogenético de la familia Linyphiidae, en donde se indica con color verde los individuos del bosque y en amarillo los individuos del pastizal alpino. Las abreviaturas del nombre de las montañas son: Cerro de San Andrés (An), Cerro Blanco (Bl), Nevado de Toluca (To), Ajusco (Aj), Iztaccíhuatl (Iz), Malinche (Ma) y Cofre de Perote (Pe).b) Acercamientos del árbol filogenético de la familia Linyphiidae que muestran a las OTUs 14, 18, 20, 25 y 26. c) Gráfica del número de individuos de las OTUs 14, 18, 20, 25 y 26, que provienen del bosque (en verde) y del pastizal alpino (en amarillo).

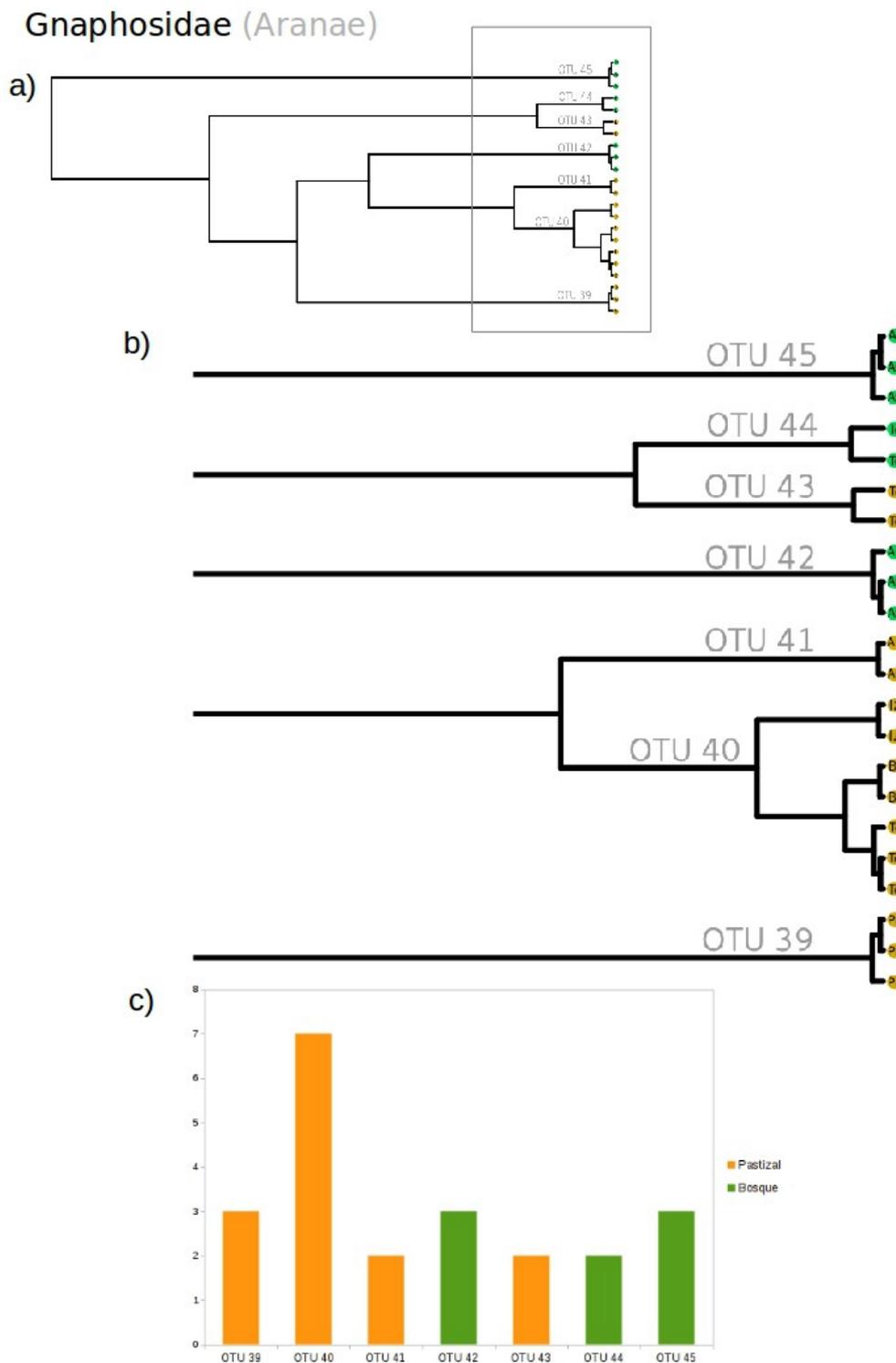


Figura 23. Tipo de vegetación del cual provienen los individuos de la familia Gnaphosidae. a) Árbol filogenético de las OTUs 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 (familia Gnaphosidae) en donde se indica con color verde los individuos del bosque y en amarillo los individuos del pastizal alpino. Las abreviaturas del nombre de las montañas son: Cerro de San Andrés (An), Cerro Blanco (Bl), Nevado de Toluca (To), Cofre de Perote (Pe). b) Acercamiento del árbol filogenético de la familia Gnaphosidae. c) Gráfica del número de individuos de las OTUs 39, 40, 41, 42, 43, 44 y 45, que provienen del bosque (en verde) y del pastizal alpino (en amarillo).

### 5.7. Estructura en la FVTM: ¿existe una división Este-Oeste?

La posible existencia de una estructura en dos componentes en la FVTM, un componente oriental y otro occidental, se analizó con un método de modelos nulos y con un análisis de varianza con permutaciones. La diversidad beta entre los dos grupos de montañas evaluados, el occidental representado por Cerro de San Andrés, Cerro Blanco y el Nevado de Toluca y el oriental conformado por el Ajusco, la Malinche, el Iztaccíhuatl y el Cofre de Perote, resultó ser mayor que lo esperado por azar ( $p=0.001$ ) (Figura 24), este resultado se obtuvo al comparar los datos empíricos con 999 comunidades simuladas. Al repetir este procedimiento con 35 agrupamientos distintos de montañas, se obtuvo que el grupo 1 (O=An,Bl,To y E=Aj,Iz,Ma,Pe), que representa la estructura que se está poniendo a prueba, es el que presenta una mayor diversidad beta (Tabla 11).

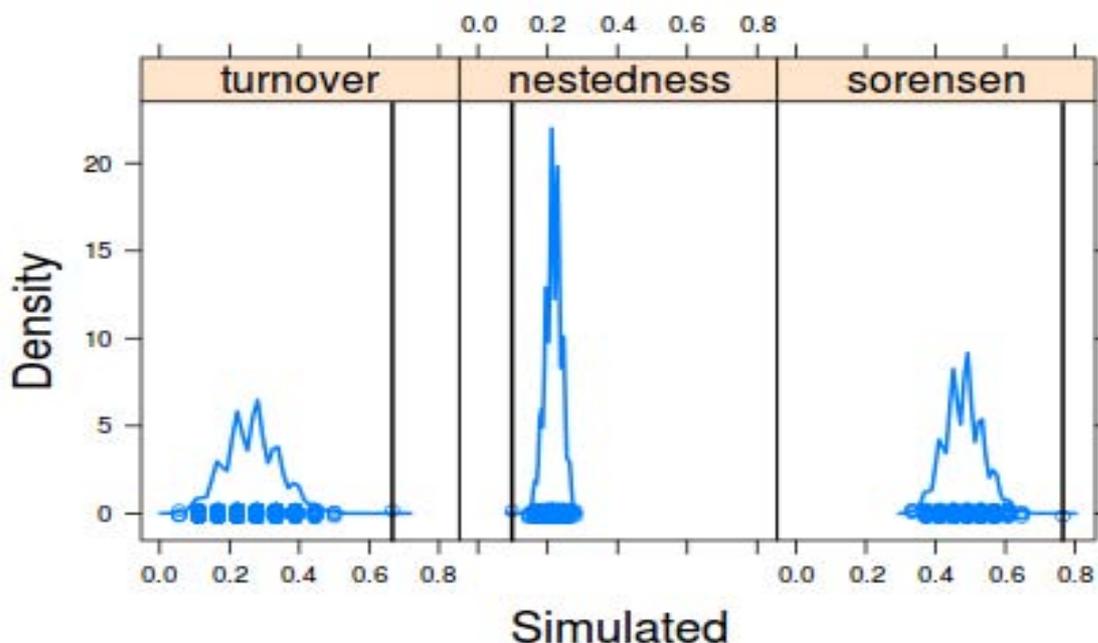


Figura 24. Diversidad beta entre los grupos de montañas oriental y occidental. Gráficas de densidad de los tres componentes de la diversidad beta (recambio, anidamiento y diversidad beta total) en donde se muestra la frecuencia de los valores de las comunidades simuladas en color azul y el valor de los datos empíricos en una línea vertical negra. Los valores empíricos obtenidos para cada componente fueron 0.66 de recambio (*turnover*, izquierda); 0.09 de anidamiento (*nestedness*, centro); y 0.76 de diversidad beta total (índice de disimilitud de Sorensen, derecha).

Tabla 11. Índice de diversidad beta calculada en 35 agrupamientos distintos de montañas. Se muestran los valores obtenidos para los tres componentes de la diversidad beta, recambio (*turnover*), anidamiento (*nestedness*) y diversidad beta total (índice de similitud de Sorensen). En negritas se muestra el valor más

alto. Las abreviaturas de los nombres de las montañas son: Cerro de San Andrés (An), Cerro Blanco (Bl), Nevado de Toluca (To), Ajusco (Aj), Iztaccíhuatl (Iz), Malinche (Ma) y Cofre de Perote (Pe).

Grupo		Recambio	Anidamiento	Diversidad beta total
Este	Oeste			
1		0.66	0.09	<b>0.76</b>
An, Bl, To	Aj, Iz, Ma, Pe			
2		0.59	0.01	0.60
An, Bl, Aj	To, Iz, Ma, Pe			
3		0.40	0.17	0.57
An, Bl, Iz	To, Aj, Ma, Pe			
4		0.52	0.14	0.66
An, Bl, Ma	To, Aj, Iz, Pe			
5		0.54	0.09	0.63
An, Bl, Pe	To, Aj, Iz, Ma			
6		0.53	0.04	0.57
An, To, Aj	Bl, Iz, Ma, Pe			
7		0.47	0.13	0.60
An, To, Iz	Bl, Aj, Ma, Pe			
8		0.52	0.11	0.63
An, To, Ma	Bl, Aj, Iz, Pe			
9		0.48	0.07	0.55
An, To, Pe	Bl, Aj, Iz, Ma			
10		0.61	0.02	0.63
An, Aj, Iz	Bl, To, Ma, Pe			
11		0.55	0.02	0.57
An, Aj, Ma	Bl, To, Iz, Pe			
12		0.54	0.06	0.60
An, Aj, Pe	Bl, To, Iz, Ma			
13		0.40	0.17	0.57
An, Iz, Ma	Bl, To, Aj, Pe			
14		0.39	0.13	0.52
An, Iz, Pe	Bl, To, Aj, Ma			
15		0.60	0.09	0.69
An, Ma, Pe	Bl, To, Aj, Iz			
16		0.55	0.02	0.57
Bl, To, Aj	An, Iz, Ma, Pe			
17		0.50	0.13	0.63
Bl, To, Iz	An, Aj, Ma, Pe			

Grupo		Recambio	Anidamiento	Diversidad beta total
Este	Oeste			
18		0.50	0.13	0.63
Bl, To, Ma	An, Aj, Iz, Pe			
19		0.52	0.08	0.60
Bl, To, Pe	An, Aj, Iz, Ma			
20		0.57	0.007	0.57
Bl, Aj, Iz	An, To, Ma, Pe			
21		0.48	0.01	0.50
Bl, Aj, Ma	An, To, Iz, Pe			
22		0.52	0.05	0.57
Bl, Aj, Pe	An, To, Iz, Ma			
23		0.30	0.22	0.52
Bl, Iz, Ma	An, To, Aj, Pe			
24		0.34	0.15	0.50
Bl, Iz, Pe	An, To, Aj, Ma			
25		0.52	0.11	0.63
Bl, Ma, Pe	An, To, Aj, Iz			
26		0.64	0.02	0.66
To, Aj, Iz	An, Bl, Iz, Pe			
27		0.48	0.04	0.52
To, Aj, Ma	An, Bl, Iz, Pe			
28		0.45	0.09	0.55
To, Aj, Pe	An, Bl, Iz, Ma			
29		0.45	0.15	0.60
To, Iz, Ma	An, Bl, Aj, Pe			
30		0.41	0.10	0.52
To, Iz, Pe	An, Bl, Aj, Ma			
31		0.52	0.08	0.60
To, Ma, Pe	An, Bl, Aj, Iz			
32		0.62	0.006	0.63
Aj, Iz, Ma	An, Bl, To, Pe			
33		0.66	0.03	0.69
Aj, Iz, Pe	An, Bl, To, Ma			
34		0.62	0.04	0.66
Aj, Ma, Pe	An, Bl, To, Iz			
35		0.50	0.10	0.60
Iz, Ma, Pe	An, Bl, To, Aj			

Al analizar la varianza de la diversidad beta entre un vector oriental y otro occidental se obtuvo que el único grupo que mostró una diferencia estadísticamente significativa entre la diversidad beta del E y del O es el grupo 1 ( $p < 0.05$ ), mismo que corresponde a la división Este-Oeste que se está poniendo a prueba. En el resto de los agrupamientos no es posible rechazar la hipótesis nula ya que la varianza de la diversidad beta se comporta como lo esperado por azar (Tabla 12).

Tabla 12. Valores de  $p$  obtenidos en el análisis de varianza de la diversidad beta calculado en 35 agrupamientos distintos de montañas. En negritas se muestra la única diferencia estadísticamente significativa, presente en el grupo 1. Las abreviaturas de las montañas son: Cerro de San Andrés (An), Cerro Blanco (Bl), Nevado de Toluca (To), Ajusco (Aj), Iztaccíhuatl (Iz), Malinche (Ma) y Cofre de Perote (Pe).

Grupo		$p$
Este	Oeste	
<b>1</b>		<b>0.043</b>
An, Bl, To	Aj, Iz, Ma, Pe	
<b>2</b>		0.353
An, Bl, Aj	To, Iz, Ma, Pe	
<b>3</b>		0.763
An, Bl, Iz	To, Aj, Ma, Pe	
<b>4</b>		0.259
An, Bl, Ma	To, Aj, Iz, Pe	
<b>5</b>		0.394
An, Bl, Pe	To, Aj, Iz, Ma	
<b>6</b>		0.467
An, To, Aj	Bl, Iz, Ma, Pe	
<b>7</b>		0.635
An, To, Iz	Bl, Aj, Ma, Pe	
<b>8</b>		0.394
An, To, Ma	Bl, Aj, Iz, Pe	
<b>9</b>		0.937
An, To, Pe	Bl, Aj, Iz, Ma	
<b>10</b>		0.558
An, Aj, Iz	Bl, To, Ma, Pe	
<b>11</b>		0.659
An, Aj, Ma	Bl, To, Iz, Pe	
<b>12</b>		0.284
An, Aj, Pe	Bl, To, Iz, Ma	

Grupo		<i>p</i>
Este	Oeste	
13		0.795
An, Iz, Ma	Bl, To, Aj, Pe	
14		0.742
An, Iz, Pe	Bl, To, Aj, Ma	
15		0.083
An, Ma, Pe	Bl, To, Aj, Iz	
16		0.281
Bl, To, Aj	An, Iz, Ma, Pe	
17		0.209
Bl, To, Iz	An, Aj, Ma, Pe	
18		0.309
Bl, To, Ma	An, Aj, Iz, Pe	
19		0.862
Bl, To, Pe	An, Aj, Iz, Ma	
20		0.528
Bl, Aj, Iz	An, To, Ma, Pe	
21		1
Bl, Aj, Ma	An, To, Iz, Pe	
22		0.674
Bl, Aj, Pe	An, To, Iz, Ma	
23		0.973
Bl, Iz, Ma	An, To, Aj, Pe	
24		0.876
Bl, Iz, Pe	An, To, Aj, Ma	
25		0.408
Bl, Ma, Pe	An, To, Aj, Iz	
26		0.172
To, Aj, Iz	An, Bl, Iz, Pe	
27		0.934
To, Aj, Ma	An, Bl, Iz, Pe	
28		0.819
To, Aj, Pe	An, Bl, Iz, Ma	
29		0.550
To, Iz, Ma	An, Bl, Aj, Pe	

Grupo		<i>p</i>
Este	Oeste	
30		0.732
To, Iz, Pe	An, Bl, Aj, Ma	
31		0.601
To, Ma, Pe	An, Bl, Aj, Iz	
32		0.442
Aj, Iz, Ma	An, Bl, To, Pe	
33		0.053
Aj, Iz, Pe	An, Bl, To, Ma	
34		0.150
Aj, Ma, Pe	An, Bl, To, Iz	
35		0.121
Iz, Ma, Pe	An, Bl, To, Aj	

## 6. Discusión

### 6.1. Utilidad de catálogos de OTUs para estudios de biodiversidad

La biodiversidad mexicana es vasta y aunque existen esfuerzos muy valiosos para describir los componentes florísticos y faunísticos de ciertas regiones (*e.g.* Llorente *et al.*, 1996; Llorente *et al.*, 2000; Llorente *et al.*, 2002; Llorente *et al.*, 2004, Luna *et al.*, 2007), aún existen muchos sitios sin listas ni descripción de sus especies, lo cual dificulta la realización de análisis de la biodiversidad (Morrone y Márquez, 2008). Este es el caso de la comunidad de artrópodos de alta montaña que se distribuye en la FVTM. Dicha limitante puede ser superada con la realización de muestreos generales, como el del presente estudio, en el que (1) se obtengan muestras suficientes para realizar un estudio comparativo entre comunidades de artrópodos de distintas montañas, aunque carezcan de información taxonómica previa; y (2) se genere una línea base de especies candidatas para estudios posteriores.

Debido a que el objetivo del proyecto fue comparar patrones generales de diversidad entre las comunidades, no se realizó un trabajo preciso de identificación de especies. Las claves de identificación pueden ser una gran herramienta para describir las especies de una región, sin embargo, suele ser complicada su utilización para estudios que buscan conocer mucha diversidad en poco tiempo. Primero, porque se necesita un alto nivel de conocimiento taxonómico para poderlas seguir; segundo, las claves generales de familias no suelen estar clasificadas por regiones y las claves por regiones son escasas; y tercero, una parte de la fauna de artrópodos encontrada podría no haber sido descrita aún o estar representada por estadios juveniles difíciles de identificar. La delimitación de OTUs con secuencias de ADN representa entonces una alternativa ante estas dificultades, ya que no es necesario tener una base de conocimiento taxonómico amplio para identificarlas; se pueden delimitar muchas unidades en un periodo de tiempo considerablemente corto (en comparación a las horas-humano que lleva identificar especies con claves); complementa la identificación de morfotipos o morfoespecies; y es un procedimiento que puede repetir cualquier persona con acceso a un laboratorio de biología molecular (Yu *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2013).

Esta aproximación metodológica no sustituye la tarea de describir especies morfológicamente ni de identificarlas a partir de claves taxonómicas, más bien se trata de métodos que deben complementarse. De hecho, complementar métodos morfológicos con métodos moleculares ha sido de gran utilidad tanto para demostrar la veracidad de los algoritmos de delimitación de unidades con secuencias de ADN (*e.g.* Talavera *et al.*, 2013; Humphreys *et al.*, 2014), como para identificar especies crípticas o especies que carecen de características

morfológicas distintivas, lo que provoca una identificación morfológica ineficiente (*e.g.* Fontaneto *et al.*, 2007; Papadopoulou *et al.*, 2008; Barraclough *et al.*, 2009; Emerson *et al.*, 2011). Además, en algunos grupos taxonómicos funciona mejor una de las dos aproximaciones. Por ejemplo, en este estudio resultó más sencillo clasificar por morfología a los coleópteros que a las arañas. En el caso de los coleópteros la mayor cantidad de veces coincidió la clasificación por morfotipos con la clasificación genética. En cambio, para las arañas la clasificación con morfotipos fue ineficiente a comparación de la clasificación con secuencias genéticas (Tabla 5). Esto puede deberse a cuestiones de morfología, por ejemplo en casos de dimorfismo sexual, por falta de características morfológicas muy distintivas o por incapacidad de identificar arañas en estadios juveniles; también existe la posibilidad de que las arañas presenten más diversidad genética que diversidad morfológica. La identificación de especies ineficiente o errónea plantea un problema ecológico adicional: la riqueza y diversidad en aquellos grupos cuya identificación morfológica es complicada han sido subestimadas. Esta problemática puede ser solucionada implementando métodos moleculares para la identificación de especies (Emerson *et al.*, 2011).

Como resultado, la presente tesis generó un catálogo de libre acceso de unidades taxonómicas operacionales que proporciona información genética, referencia geográfica y una fotografía de los organismos. Esto será parte fundamental de la formación de una línea de base para estudios posteriores, ya sea para (a) análisis de biodiversidad, pues representa información novedosa sobre la fauna que habita las cimas de las montañas mexicanas además de proporcionar una forma de cuantificar la riqueza en ausencia de información taxonómica en una zona megadiversa; (b) análisis evolutivos, ya que a partir de estas unidades se puede escoger alguna especie y realizar estudios filogeográficos o de genética de poblaciones; (c) para estudios taxonómicos y filogenéticos que profundicen la clasificación de los organismos colectados o (d) como biblioteca de referencia para monitoreos de artrópodos con *metabarcoding* (Ratnasingham y Hebert, 2007; Yu *et al.*, 2012; Ji *et al.*, 2013). Es importante mencionar que mientras mayor cantidad y mayor calidad de información se encuentre en las bases de datos internacionales, se realizarán mejores análisis de la biodiversidad. Esta razón es suficiente para que cualquier catálogo, listado o monografía sea de libre acceso.

Las aplicaciones anteriormente descritas dependen del proceso de delimitación de OTUs. Existen muchos métodos de delimitación de OTUs, cada uno con sus respectivas ventajas y desventajas, las cuales deben ser evaluadas de acuerdo con los objetivos específicos de cada proyecto como se discute a continuación.

## 6.2. Consideraciones metodológicas en la delimitación de OTUs con marcadores moleculares

La delimitación de OTUs con marcadores moleculares generalmente se lleva a cabo con métodos que usan umbrales de diferenciación en donde se evalúa qué porcentaje de distancia genética es aceptable entre individuos de una misma especie. Aunque es un método útil, la delimitación de unidades con umbrales de distancia genética estrictos ha causado cierta polémica porque la variación genética que presenta cada linaje depende de su historia evolutiva (Hickerson *et al.*, 2006; Fujisawa y Barraclough, 2013). Por lo tanto, el umbral varía dependiendo del grupo de organismos. Por ejemplo, para colémbolos se ha usado un umbral de diferenciación del 5% (Faria, 2015), mientras que para coleópteros suele usarse un umbral de diferenciación del 3% (Bower, 1994). Por ende, usar el mismo umbral para todos los organismos puede producir errores serios de delimitación. Esta polémica ha desatado el desarrollo de otras formas de delimitación de OTUs que mitiguen el problema, tal es el caso de los métodos que usan umbrales suaves sustentados con métodos estadísticos en vez del umbral estricto, como el utilizado por el programa CROP (Hao *et al.*, 2011); o métodos que consideran los procesos evolutivos de los linajes (diversificación y coalescencia) y no solamente distancias genéticas, como el método GMYC (Pons *et al.*, 2006; Fontaneto *et al.*, 2007).

En este trabajo se comparó la delimitación de OTUs por los métodos CROP y GMYC. En general se obtuvo la misma cantidad de unidades con ambos, sin embargo, en las familias Carabidae, Linyphiidae y Gnaphosidae, el programa GMYC delimitó un número mayor de OTUs que CROP. En estos casos se tomó la decisión de agrupar a los organismos en unidades más grandes e incluyentes, primero, porque cualquier diferencia entre ambos métodos se debe, probablemente, a que se trate de especies muy cercanas; además, de esta forma se obtenía más representatividad de OTUs en distintas montañas, lo que beneficiaba el análisis comparativo entre éstas; y finalmente, porque en estudios en donde comparan distintos métodos de delimitación de OTUs se ha reportado que el GMYC suele sobreestimar la cantidad de unidades (Kekkonen y Hebert 2014). Esta sobreestimación se debe a que el algoritmo GMYC busca unidades evolutivas, es decir, si dos grupos pertenecen a poblaciones estructuradas cuya coalescencia es antigua, entonces el GMYC las dividirá, aunque pueda tratarse de la misma especie (Talavera *et al.*, 2013; Carstens *et al.*, 2013). Este atributo no es necesariamente negativo, de hecho ha sido de gran utilidad en la identificación de especies crípticas, pero es importante considerarlo (Pons *et al.*, 2006).

En este trabajo, al igual que otros estudios que se han dedicado a comparar la eficiencia de los distintos métodos de delimitación de OTUs, se propone que la mejor opción para tener un

resultado más acertado es usar al menos dos métodos y complementar los resultados (Carstens *et al.*, 2013).

### 6.3. Distribución de la diversidad genética y de OTUs en la FVTM

La biodiversidad suele medirse en tres niveles de organización: genética, específica y ecosistémica. Sin embargo a la fecha pocos estudios se han enfocado en examinar la diversidad genética y específica al mismo tiempo (Vellend y Geber, 2005; Taberlet *et al.*, 2012). En el presente trabajo, una vez delimitadas las OTUs, fue posible realizar análisis de diversidad tanto a nivel de especies putativas como a nivel genético, con el fin de examinar cómo se distribuye la diversidad en los dos pisos altitudinales estudiados y a lo largo de la FVTM.

Los análisis de la distribución de la diversidad, como los realizados aquí, tienen importancia tanto a nivel local (*e.g.* en una sola montaña) como a nivel regional (*e.g.* en toda la FVTM). En la escala local pueden ser estudiados procesos evolutivos como la diversificación por el cambio de hábitat, evolución por selección natural en un gradiente altitudinal y la colonización a distancias cortas. La escala regional brinda información sobre procesos como la migración y colonización a larga distancia, procesos de especiación dirigidos por eventos geológicos, el efecto de la deriva génica debido al aislamiento, entre otros (Graham *et al.*, 2014; Graham y Fine, 2008).

#### 6.3.1. Distribución altitudinal de la diversidad

Uno de los primeros resultados relevantes a partir de la obtención de las 45 OTUs de coleópteros y arañas fue que la mayor parte de las OTUs se constituyen por individuos que provienen de sólo un tipo de vegetación (correspondientes a cada piso altitudinal estudiado). Pocas OTUs tienen individuos provenientes de los dos tipos de vegetación, y en aquellas que presentan muestras de ambos tipos de vegetación se encuentran en una distribución muy desproporcionada. Por ejemplo, en la OTU 11 (Familia Carabidae; Fig. 21) solamente tres de 22 individuos provienen del bosque de *Abies*, el resto fueron colectados en el pastizal alpino. Esta distribución de OTUs en distintos pisos altitudinales coincide con una dinámica de islas en el cielo, en la cual cada hábitat es aislado debido al gradiente altitudinal y las condiciones ambientales, lo que provoca diferenciación entre las poblaciones de una misma montaña (McCormack *et al.*, 2009).

Los datos de este proyecto no permiten calcular la edad de divergencia entre OTUs porque no se conoce la relación exacta entre éstas, es decir, no se puede asegurar que se trate de OTUs hermanas. Esto se debe, por un lado, a que no se realizó un muestreo completo de las familias taxonómicas con el fin de inferir su historia evolutiva, sino que se calculó la cercanía evolutiva entre los individuos de las poblaciones que se colectaron. Por otro lado, se usó solamente un gen para calcular los dendrogramas, por lo tanto sería incorrecto asumir que la historia de ese marcador representa la historia evolutiva de los individuos colectados; generalmente es recomendado usar varios marcadores moleculares para inferir una filogenia (Poe, 1998; Rosenberg y Nordborg, 2002; Edwards, 2009; Kuhner, 2009). Debido a que es imposible definir a las especies putativas, aquí descritas como OTUs hermanas, es difícil saber si la divergencia entre éstas fue promovida por una diferenciación de hábitat. Sin embargo, existen dos escenarios posibles que podrían explicar la diferenciación de OTUs en los dos tipos de vegetación: (1) la diferenciación ha sido producto de la colonización del hábitat alpino a partir de organismos de tierras bajas seguida por especiación parapátrida, es decir, especiación por cambio de nicho; (2) la diferenciación entre OTUs fue previa a la formación de las montañas o al arribo de las OTUs a éstas, de modo que cada OTU que colonizó las cimas de las montañas ya tenía una preferencia por un tipo de vegetación. En este escenario, la colonización se pudo haber dado a larga distancia (desde la cima de otra montaña) o debido a los cambios de distribución de los hábitats durante las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno, cuando poblaciones que actualmente se encuentran distantes presentaron una mayor cercanía. En el primer escenario, en donde la colonización de los pastizales pudo haber ocurrido a partir de individuos del bosque, esperaríamos encontrar una mezcla mayor en la representatividad de los tipos de vegetación en una misma OTU, lo que indicaría que una unidad puede abarcar los dos tipos de vegetación debido a que ha colonizado el pastizal desde el bosque; o se esperaría encontrar en una misma montaña OTUs cercanas provenientes de los distintos tipos de vegetación. La diferenciación entre estas OTUs tendría que ser muy reciente, posterior a 1.5 Ma, porque es la fecha de formación de los estratovolcanes estudiados. Ni los dendrogramas ni las gráficas de frecuencia apoyan este escenario (Figs. 20-23). Los resultados parecen ajustarse más al segundo escenario, en el cual pudo haber existido un proceso de colonización a larga distancia de organismos previamente adaptados a las condiciones alpinas. Esto se ve reflejado en los dendrogramas ya que las OTUs están conformadas por individuos que habitan en un tipo de vegetación solamente, pero fueron encontrados en distintas montañas. Esto quiere decir que el intervalo de distribución de las OTUs abarca distancias de varios cientos de kilómetros, sin embargo en una misma montaña (con distancias menores a cien kilómetros entre el pastizal alpino y el bosque de *Abies*) prácticamente no existen OTUs con individuos en ambos ambientes. De

acuerdo con Donoghue (2008) éste es un fenómeno común, cuando surge un nuevo ambiente es más sencillo que sea colonizado por especies que viven en ambientes parecidos aunque esto signifique migrar distancias largas, a que sea poblado por especies del mismo sitio que se adaptan al nuevo ambiente (Donoghue, 2008).

Otra de las predicciones que se puso a prueba respecto a la diferenciación de OTUs en función del tipo de vegetación es la supuesta conectividad entre hábitats que existió entre las montañas durante los periodos glaciales. De acuerdo con esta hipótesis, debería existir mayor conectividad entre poblaciones de unidades provenientes del bosque de *Abies* (que está distribuido a menor altitud) que aquellas que habitan el pastizal alpino. Esta predicción se debe a que la mayor parte de los pastizales alpinos permanecieron aislados, incluso cuando la línea de vegetación disminuyó hasta 1,000 m, mientras que entre los bosques de *Abies* pudo haber existido comunicación con mayor facilidad (Mastretta-Yanes *et al.*, 2015). Los resultados presentados aquí muestran que de las OTUs que tienen poblaciones en distintas montañas, la minoría (3/10) fueron colectadas en el pastizal alpino y la mayoría (7/10) en el bosque de *Abies*. Es decir, las OTUs de distribución amplia se presentan en menores altitudes, mientras que las OTUs de mayores altitudes tienden a estar restringidas a una montaña en particular. Además, las OTUs con distribución en el pastizal alpino presentan más haplotipos únicos que las OTUs provenientes del bosque de *Abies*. Aunque con un tamaño de muestra limitado, estos resultados representan una primera prueba de que las OTUs del bosque presentan mayor conectividad entre poblaciones de distintas montañas.

### 6.3.2. Distribución longitudinal de la diversidad

En las diez OTUs cuya diversidad genética fue analizada (cuatro de coleópteros y seis de arañas) se puede observar que, en general, existen pocos haplotipos compartidos entre distintas poblaciones de una misma OTU. Esto puede ser por el aislamiento entre montañas pero también por un efecto del muestreo, ya que es probable que no se hayan colectado todos los haplotipos de cada OTU. A pesar de esta limitante, al comparar las redes de haplotipos, las distancias genéticas y la estructura entre poblaciones, resulta interesante ver que algunas montañas nunca comparten haplotipos entre sí, y que las medidas de *Fst* son muy altas entre sus poblaciones, por ejemplo entre el Nevado de Toluca y el Ajusco, y entre el Nevado de Toluca y el Cofre de Perote (Fig. 10-19). En cambio, otras montañas parecen estar más conectadas con el resto, por ejemplo la Malinche. Esto brinda información sobre la relación actual e histórica entre las comunidades de distintas montañas, pues parece indicar que la conectividad entre éstas no ha sido homogénea en el tiempo y puede estar

moldeada por su historia geológica. Las redes de haplotipos son útiles para elucidar algunos posibles patrones de conectividad y dinámicas poblacionales entre montañas. Por ejemplo, una red de haplotipos con una estructura marcada y sin haplotipos compartidos entre montañas puede significar una divergencia antigua (*e.g.* las OTUs 10, 11, 14 y 40; Figs. 12, 13, 14 y 19, respectivamente); en cambio, una red de haplotipos en donde algunos haplotipos son más frecuentes y están presentes en distintas montañas, y otros haplotipos derivados son poco frecuentes y únicos de alguna población, puede ser señal de una dinámica de islas en el cielo con diferenciación poblacional post-glaciaciones (*e.g.* la OTU 8; Fig. 11) (McCormack *et al.*, 2008). Aunque un muestreo incompleto podría resultar en incapacidad para recuperar haplotipos post-glaciales y recuperar sólo los haplotipos que representen una dinámica más antigua (McCormack *et al.*, 2008), el número de mutaciones entre haplotipos de distintas OTUs es pequeño (a pesar de que exista estructura en varias de las OTUs) por lo que es altamente probable que la diferenciación sea pleistocénica, lo cual no quiere decir que necesariamente sean producto de las fluctuaciones climáticas.

Para contribuir con datos al debate sobre la relación entre la biodiversidad medida en los tres niveles de organización (es decir, si existe mayor diversidad genética en regiones donde también existe mayor diversidad específica; Taberlet, 2012; Baselga *et al.*, 2013; Papadopoulou *et al.*, 2014) se calculó la cantidad de haplotipos y la diversidad de OTUs presentes en cada montaña. Se encontró que el Ajusco presenta mayor diversidad que el resto de las montañas, tanto genética como de especies putativas (Tabla 8). Sin embargo, otras montañas como el Iztaccíhuatl y el Cofre de Perote, no sobresalieron por la diversidad de OTUs pero presentaron una alta diversidad genética, sobre todo al evaluar los haplotipos únicos. La cantidad de muestras analizadas en el presente trabajo no permite hacer una conclusión certera acerca de la relación entre la diversidad genética y la diversidad de OTUs en cada montaña de la FVTM, sobre todo porque no se obtuvo la cantidad de haplotipos de las 45 OTUs, sino que sólo se calculó la diversidad genética de las 10 OTUs con poblaciones presentes en al menos dos montañas. Sin embargo, es importante resaltar la relevancia de medir ambos niveles (genético y específico) para entender mejor la distribución de la diversidad, especialmente en los casos en los que se usan índices de diversidad para definir áreas prioritarias para conservar la biodiversidad.

Además de conocer la diversidad de cada montaña y la estructura entre las poblaciones, existen métodos que permiten analizar la variación de la composición de especies a lo largo de la FVTM, tal es el caso de la diversidad beta (Whittaker, 1956). La diversidad beta mide el intercambio espacial o recambio de las especies entre dos o más localidades o conjuntos de especies, y es el reflejo de dos fenómenos distintos: el recambio (*turnover*) y el anidamiento

(*nestedness*), es decir el reemplazamiento y la pérdida de especies, respectivamente (Koleff *et al.*, 2003; Baselga, 2010). De acuerdo con la diversidad beta evaluada entre las siete montañas estudiadas, se encontró que algunas montañas presentan una composición de especies más similar que otras. En particular, el Cerro Blanco y el Nevado de Toluca presentan una composición de especies muy similar entre sí, al igual que ocurre entre el Ajusco y el Iztaccíhuatl, y entre la Malinche y el Cofre de Perote (Tabla 7, Fig. 9). En cambio algunas montañas son muy distintas entre sí, por ejemplo el Cofre de Perote y el Nevado de Toluca, o el Cerro de San Andrés y el Ajusco. Al retomar estos resultados con los análisis de estructura genética en cada OTU se observan patrones similares: el Nevado de Toluca y el Cerro Blanco comparten más haplotipos y más OTUs entre sí que con el resto de las montañas; a su vez, el Ajusco, la Malinche y el Iztaccíhuatl tienen una composición más similar, tanto en haplotipos compartidos como en diversidad de OTUs. El que los patrones a nivel de OTUs y haplotipos coincidan de este modo sugiere que efectivamente existe una relación entre las montañas mencionadas, y que no es un efecto del muestreo realizado a nivel de OTUs.

La diferencia en la composición de especies entre dos o más comunidades es el resultado de la disimilitud en el número de especies endémicas, de la especiación y extinción *in situ* y de la edad de las especies (Emerson y Kolm, 2005). En este sentido, las montañas agrupadas por la diversidad beta (Fig. 9) coinciden en alguna o varias de estas características. Distintos análisis sugieren que uno de los factores que tiene mayor influencia en los patrones de variación de la diversidad beta es la heterogeneidad ambiental, seguida por factores ambientales actuales (Currie *et al.*, 2004). Sin embargo, de acuerdo con Baselga y colaboradores (2012), los factores históricos pueden ser aún más importantes para la estructura de los patrones de diversidad de lo que antes se pensaba. En este sentido, añadir un enfoque evolutivo al análisis del recambio espacial de especies brinda una perspectiva histórica que implica analizar qué tan separados han estado los linajes a lo largo del tiempo. Para realizar este tipo de análisis se puede calcular la diversidad beta filogenética, un concepto que une la biogeografía histórica, la filogeografía y el análisis filogenético de una comunidad (Emerson *et al.*, 2011). Tanto la diversidad beta como la diversidad beta filogenética pueden ser muy útiles para comprender el ensamblaje de las comunidades y para probar hipótesis sobre la distribución de la diversidad presente y pasada (Emerson *et al.*, 2011); de ahí que una perspectiva para análisis futuros en la FVTM podría ser evaluar la diversidad beta filogenética entre las comunidades de las distintas montañas. En particular, en este estudio el análisis de diversidad beta resultó ser útil para probar la división hipotética entre las montañas orientales y occidentales de la FVTM.

#### 6.4. ¿Existe una división Este-Oeste en la FVTM?

Uno de los resultados más importantes de este proyecto es que la distribución de la diversidad a lo largo de la FVTM no coincide con la estructura que se esperaría si la distribución dependiera solamente de la distancia geográfica efectiva entre las montañas. Por ejemplo, de acuerdo a Mastretta-Yanes (2015) la distancia efectiva entre el Cofre de Perote y la Malinche es casi del doble que la existente entre el Nevado de Toluca y el Ajusco, sin embargo, la comunidad de arañas y coleópteros es más similar entre las primeras dos montañas que entre las segundas. Asimismo, la distancia efectiva entre el Ajusco y el Iztaccíhuatl es mayor que la distancia entre el primero y el Nevado de Toluca, pero el Ajusco y el Iztaccíhuatl se parecen más y comparten más haplotipos. Este resultado se cumple independientemente del método con el que se calcule la diversidad. Es decir, la similitud entre la comunidad de artrópodos de distintas montañas no depende de la distancia geográfica solamente. Por lo tanto, la distribución de la diversidad en la FVTM no cumple con un patrón de aislamiento por distancia en el cual se predice que las montañas más cercanas geográficamente son las más parecidas en cuanto a composición y diversidad de especies. Estos resultados sugieren que el patrón de distribución de la diversidad en la FVTM debe ser explicado con un proceso distinto a la dispersión de especies. Con base en esta afirmación se exploró la pregunta de si existe una división longitudinal que estructure la diversidad de la FVTM en un componente oriental y otro occidental. Este patrón podría ser resultado de distintos procesos históricos, más que de la estructura espacial actual de la cadena montañosa, y ha sido reportado en algunos estudios (*e.g.* Corona *et al.*, 2009; Bryson y Riddle 2011; Gámez *et al.*, 2012; Mastretta-Yanes *et al.*, 2015) pero hasta ahora no había sido confirmado por análisis filogeográficos comparativos que exploraran explícitamente el patrón espacial. Una razón importante es que los sistemas de estudio que reportan dicho patrón difieren en tipo de muestras y sitios de muestreo, por lo que no había sido posible realizar un análisis comparativo (Mastretta-Yanes *et al.*, 2015).

De acuerdo a los análisis con modelos nulos que fueron simulados con las 45 OTUs, la FVTM presenta una mayor diferenciación en la diversidad beta entre el grupo occidental, conformado por el Nevado de Toluca, el Cerro Blanco y el Cerro de San Andrés, y el grupo oriental conformado por el Ajusco, la Malinche, el Iztaccíhuatl y el Cofre de Perote. La diversidad beta fue calculada en otras 34 combinaciones posibles de agrupación entre montañas (Tabla 3), sin embargo todas esas combinaciones mostraron una menor diversidad beta (Tabla 11). Este resultado fue cotejado con un análisis de varianza con permutaciones, en el cual, de los 35 grupos evaluados, solamente el grupo uno (que representa la secuencia lineal de las montañas de la FVTM y la estructura que se está poniendo a prueba) mostró una diferencia estadísticamente significativa en

cuanto a composición de especies, es decir, un patrón que difiere del patrón esperado por azar (Tabla 12). Estos resultados comprueban que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la composición de la comunidad de arañas y coleópteros de las montañas orientales y de las occidentales.

Además, los análisis revelan que la división Este-Oeste se establece entre el Nevado de Toluca y el Ajusco. Este resultado es congruente con la estructura genética encontrada en las 10 OTUs analizadas previamente, en donde las poblaciones de aquellas OTUs que presentan individuos en el Ajusco y el Nevado de Toluca están muy diferenciadas genéticamente y no comparten haplotipos entre sí. Sin embargo, tanto la distancia geográfica lineal como la distancia geográfica efectiva (que considera la topografía y los escenarios de conectividad durante las glaciaciones), muestran que la separación entre estas dos montañas no es grande, y de hecho es menor a la que existe entre otras montañas que presentan mayor similitud, por ejemplo entre la Malinche y el Cofre de Perote. Es importante mencionar que, exceptuando a los grupos uno y 35, el resto de los agrupamientos de montañas irrumpen los posibles patrones de similitud en función de la distancia geográfica, pues agrupan montañas que se encuentran geográficamente alejadas. Aunque el grupo 35 arroja un valor de diversidad beta menor al grupo uno ( $\beta = 0.60$ , ver Tabla 11), en los análisis de varianza resultó ser el segundo valor más cercano a una  $p$  estadísticamente significativa ( $p = 0.12$ , ver Tabla 12). Este resultado sugiere que, si bien la composición de la comunidad de artrópodos en la FVTM es causada por distintos factores, el papel de la distancia geográfica en la distribución de la diversidad no puede ser ignorado.

A partir de estos resultados se puede concluir que la distribución de la diversidad en la FVTM no está dada solamente por la distancia geográfica que existe entre las montañas, incluso considerando la distancia efectiva (*i.e.* la distribución de estos ecosistemas durante los periodos glaciales). Sin embargo no es sencillo dilucidar los factores que moldearon dicho patrón, pues la FVTM es un sistema montañoso complejo cuya biodiversidad ha estado sujeta a una dinámica de islas en el cielo en combinación con un intenso vulcanismo (Mastretta-Yanes *et al.*, 2015). Es importante notar que las etapas de formación de la FVTM se traslaparon parcialmente en una misma área geográfica, por lo que la topografía generada por los primeros momentos de formación podría ser muy distinta al paisaje actual. Otra consideración importante es la probabilidad de que la distribución de especies haya cambiado desde los primeros estadios de formación. Aunque la dinámica de islas en el cielo puede llevar a una diferenciación entre las poblaciones de las cimas de las montañas, es poco probable que la división Este-Oeste se deba solamente al aislamiento durante los periodos interglaciales. Esto sólo podría ocurrir si (1) en periodos glaciales no hubo conectividad alguna entre los hábitats montanos del Ajusco y el Nevado de Toluca por la existencia

de escenarios topográficos distintos al actual, y/o (2) si la diferenciación entre los componentes oriental y occidental aconteció previamente de las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno, de manera que la conectividad que pudo existir entre el Ajusco y el Nevado de Toluca durante los periodos glaciales no fue suficiente para homogeneizar la composición de la biodiversidad. En este sentido, es altamente probable que la estructura en la composición de la biodiversidad de la FVTM sea resultado de los estadios geológicos de su formación. Esto es congruente con Päckert y colaboradores (2012), quienes sostienen que los patrones de riqueza de especies pueden estar dados por la historia geográfica de una región y por las fluctuaciones de las condiciones ambientales durante la formación de los sistemas montañosos, más que las condiciones ambientales del pasado próximo (Graham *et al.*, 2014). En otras palabras, podría considerarse que la FVTM posee una inercia en su composición de especies que se mantiene durante tiempos geológicos y determina los patrones actuales de biodiversidad.

## 7. Conclusiones

La FVTM es un sistema de islas en el cielo con una historia geológica compleja. En consecuencia, la biodiversidad se distribuye en patrones poco predecibles y difíciles de comprender. El presente trabajo es una contribución para entender la distribución de la biodiversidad en este sistema montañoso. A partir de la delimitación de OTUs y el análisis de índices de diversidad (tanto genética como específica) se presentaron métodos para probar hipótesis en un marco geográfico específico.

Como parte de la complejidad de los patrones de diversidad de la FVTM, se ha reportado un patrón estructural que la divide longitudinalmente en dos zonas: oriental y occidental. De acuerdo a los resultados de este proyecto la biodiversidad en la parte central de la FVTM sí se encuentra dividida en dos componentes al oeste y este del Nevado de Toluca y el Ajusco, respectivamente. Probablemente esta división es resultado de la formación del sistema montañoso, que coincide temporalmente con las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno. Ambos procesos pueden verse reflejados en los patrones de distribución de la biodiversidad. Por ejemplo, la mayor conectividad de las poblaciones del bosque en comparación a las poblaciones del pastizal alpino son evidencia de la dinámica de islas en el cielo influenciada por las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno. La distancia genética entre las poblaciones del este y las del oeste probablemente es resultado del origen geológico de la FVTM en sí. Por otro lado, la diferenciación de OTUs debido al tipo de vegetación debe ser resultado de la simultaneidad de ambos procesos. De manera interesante, parece ser que la colonización del pastizal alpino no se dio por especiación parapátrida desde los bosques sino por colonización a larga distancia, tal vez facilitada por los cambios de distribución de los biomas en los periodos glaciales. Una conclusión importante de estos resultados es que la biodiversidad de la FVTM es producto de distintos factores históricos y su complejidad no puede ser reducida al efecto de la dispersión de las especies en función de la distancia geográfica.

En este trabajo se presentó una aproximación al estudio de la diversidad en distintos niveles y escalas, en sitios cuya biodiversidad no ha sido explorada y con grupos sin descripción taxonómica. Esta aproximación permitió, por un lado, generar una línea base y un catálogo de datos (OTU, secuencia, referencia geográfica y fotografía del individuo) con el cual será posible realizar trabajos posteriores. Por otro lado, permitió analizar la estructura y composición de la comunidad de sitios sin explorar y que se encuentran continuamente sujetos a presiones de disturbio. En este sentido, los estudios comparativos como éste brindan información relevante sobre el proceso de formación y distribución de la diversidad, un tema fundamental tanto para comprender la historia de

los ecosistemas como para predecir los posibles escenarios futuros a los que estarán sujetos. Este último punto es importante porque de comprender mejor los mecanismos por los cuales se origina y se mantiene la biodiversidad, se lograrán generar mejores estrategias de manejo y conservación de especies. A partir de los resultados que en este trabajo se presentan se puede concluir que en los análisis de diversidad es importante considerar tanto las escalas regionales como las locales, así como los distintos niveles de organización sin relegar la diversidad genética de las estrategias de conservación. Respecto a la FVTM se puede concluir que las montañas que la conforman presentan una diversidad —tanto genética como específica— particular. Seis de las siete montañas analizadas en este estudio se encuentran bajo algún sistema de área natural protegida, ya sea como parque nacional o como reserva de la biósfera. Debido a la complejidad y heterogeneidad de la FVTM, es importante que el monitoreo y el manejo de especies sean locales, es decir, específicos a cada montaña; al mismo tiempo que las estrategias de conservación consideren la relación histórica y actual entre las distintas montañas y se lleven a cabo con una visión regional e integral.

## 8. Referencias

- Barraclough, T.G., M. Hughes, N. Ashford-Hodges, T. Fujisawa, 2009. Inferring evolutionarily significant units of bacterial diversity from broad environmental surveys of single-locus data, *Biology letters*, 5: 425-428.
- Baselga A., T. Fujisawa, A. Crampton-Platt, J. Bergsten, Peter G. Foster, M.T. Monaghan, A.P. Vogler, 2013. Whole-community DNA barcoding reveals a spatio-temporal continuum of biodiversity at species and genetic levels, *Nature communications*, 4: 1892.
- Baselga, A., C. Gómez-Rodríguez, J.M. Lobo, 2012. Historical Legacies in World Amphibian Diversity Revealed by the Turnover and Nestedness Components of Beta Diversity, *PLoS ONE*, 7(2): e32341.
- Baselga, A., 2010. Partitioning the turnover and nestedness components of beta diversity, *Global Ecology and Biogeography*, 19: 134–143.
- Brower A.V.Z. 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial-DNA evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:6491–6495.
- Bryson, R.W., B.R. Riddle, 2011. Tracing the origins of widespread highland species: a case of Neogene diversification across the Mexican sierras in an endemic lizard. *Biological Journal of the Linnean Society*, 105, 382–394.
- Caballero, M., C. Lozano-García , L. Vázquez-Selem, B. Ortega , 2010. Evidencias de cambio climático y ambiental en registros glaciales y en cuencas lacustres del centro de México durante el último máximo glacial. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 62 (3):359-377.
- Calderón de Rzedowski, G., J. Rzedowski, 2005. *Flora Fanerogámica del Valle de México*, Instituto de Ecología A.C. y CONABIO, Pátzcuaro, Michoacán, México.
- Casquet, J., C. Thebaud, R.G. Gillespie, 2012. Chelex without boiling, a rapid and easy technique to obtain stable amplifiable DNA from small amounts of ethanol-stored spiders, *Molecular Ecology Resources*, 12:136-141.
- Carstens B.C., T.A. Pelletier, N.M. Reid, J.D. Satler, 2013. How to fail at species delimitation. *Molecular ecology*, 22 (17): 4369–4383.
- Caterino M.S., F.A.H. Sperling, 1999. Papilio Phylogeny Based on Mitochondrial Cytochrome Oxidase I and II Genes, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 11 (1): 122-137.
- Challenger, A., J. Soberón J, 2008. Los ecosistemas terrestres en: *Capital natural de México* (J. Soberón G. Halffter y J. Llorente-Bousquets eds.), pp. 87–108. CONABIO, México.
- Currie D.J., G.G. Mittelbach, H.V. Cornell, R. Field, J-F. Guegan, B.A. Hawkins, D.M. Kaufman, J.T. Kerr, T. Oberdorff, E. O'Brien, J.R.G. Turner, 2004. Predictions and tests of climate-based hypotheses of broad-scale variation in taxonomic richness. *Ecology Letters*, 7: 1121–1134.
- Corona, AM., V.H. Toledo, J.J. Morrone, 2009. Track analysis of the Mexican species of Buprestidae (Coleoptera): testing the complex nature of the Mexican Transition Zone, *J. Biogeogr.*, 36: 1730-1738.
- Donoghue, M.J., 2008. A phylogenetic perspective on the distribution of plant diversity. *PNAS*, 105: 11549-11555.

- Duarte, L.D.S., R.S. Bergamin, V. Marcilio-Silva, G.D.D.S. Seger, M.C.M. Marques, 2014. Phylobetadiversity among Forest Types in the Brazilian Atlantic Forest Complex, *PLoS ONE*, 9 (8): e105043.
- Drummond, A.J., M.A. Suchard, D. Xie, A. Rambaut A, 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 *Molecular Biology And Evolution*, 29: 1969-1973.
- Edwards, S.V., 2009. Is a new and general theory of Molecular Systematics emerging?, *Evolution*, 63 (1): 1-19.
- Escalante, T., G. Rodríguez, N. Gámez, L. León-Paniagua, O. Barrera, V. Sánchez-Cordero, 2007. Biogeografía y conservación de los mamíferos en: *Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana* (Luna, I., J.J. Morrone y D. Espinosa eds.). UNAM, México D.F.
- Emerson, B.C., F. Cicconardi, P.P. Fanciulli, P.J.A. Shaw, 2011. Phylogeny, phylogeography, phylobetadiversity and the molecular analysis of biological communities, *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 366:2391-2402.
- Emerson, B.C., N. Kolm, 2005. Species diversity can drive speciation, *Nature*, 434: 1015–1017.
- Faria, M.A.C., 2015. Colonisation and diversification in invertebrates: looking within species on islands to connect pattern and process. Tesis doctoral. School of Biological Science University of East Anglia, UK.
- Ferrari L., T. Orozco-Esquivel, V. Manea, M. Manea, 2012. The dynamic history of the Trans-Mexican Volcanic Belt and the Mexico subduction zone, *Tectonophysics*, 522-523:122-149.
- Folmer, O., M. Black, W. Hoeh, R. Lutz, R. Vrijenhoek, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3:294-299.
- Fontaneto D., E.A. Herniou, C. Boschetti, M. Caprioli, G. Melone, C. Ricci C., T.G. Barraclough, 2007. Independently evolving species in asexual bdelloid rotifers, *PLoS Biol.*, 5:914–921.
- Fujisawa, T., T.G. Barraclough, 2013. Delimiting Species Using Single-Locus Data and the Generalized Mixed Yule Coalescent Approach: A Revised Method and Evaluation on Simulated Data Sets, *Syst. Biol.*, 62(5): 707–724.
- Gámez, N., T. Escalante, G. Rodríguez, M. Linaje, J.J. Morrone, 2012. Caracterización biogeográfica de la Faja Volcánica Transmexicana y análisis de los patrones de distribución de su mastofauna, *Rev. Mex. Biodiv.*, 83(1).
- Gillet, C.P.D.T., A. Crampton-Platt, M.J.T.N. Timmermans, B. Jordal, B.C. Emerson, A.P. Vogler, 2014. Bulk de novo mitogenome assembly from pooled total DNA elucidates the phylogeny of weevils (Coleoptera: Curculionoidea), *Mol Biol Evol*.
- Gómez-Tuena, A., M.T. Orozco-Esquivel, L. Ferrari, 2007. Igneous petrogenesis of the Trans-Mexican Volcanic Belt, en: *Geology of México: celebrating the centenary of the Geological Society of México* (S.A. Alaniz-Álvarez y Á.F. Nieto-Samaniego eds.), Geological Society of America Special Papers, 422, 129–181.
- Gotelli, Graves. 1996. Null models in ecology.
- Graham, C.H., A.C. Carnaval, C.D. Cadena, K.R. Zamudio, T.E. Roberts, J.L. Parra, C.M. McCain, R.C.K. Bowie, C. Moritz, S.B. Baines, C.J. Schneider, J. VanDerWal, C. Rahbek, K.H. Kozak, N.J. Sanders, 2014. The origin and maintenance of montane diversity: integrating evolutionary and ecological processes, *Ecography* 37: 001–009.

- Graham, C.H., P.V.A. Fine, 2008. Phylogenetic beta diversity: linking ecological and evolutionary processes across space in time, *Ecology Letters*, 11: 1265-1277.
- Hao, X., R. Jiang, T. Chen, 2011. Clustering 16S rRNA for OTU prediction: a method of unsupervised Bayesian clustering, *Bioinformatics*, 27: 611–618.
- Hickerson M.J., C.P. Meyer, C. Moritz, 2006. DNA barcoding will often fail to discover new animal species over broad parameter space, *Syst Biol*, 55(5):729–739.
- Humphreys A.M., T.G. Barraclough, 2014. The evolutionary reality of higher taxa in mammals, *Proc. R. Soc. B*, 281: 20132750.
- Ji, Y., L. Ashton, S.M. Pedley, D.P. Edwards, Y. Tang, A. Nakamura, R. Kitching, P.M. Dolman, P. Woodcock, F.A. Edwards, T.H. Larsen, W.W. Hsu, S. Benedick, K.C. Hamer, D.S. Wilcove, C. Bruce, X. Wang, T. Levi, M. Lott, B.C. Emerson, D.W. Yu, 2013. Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding, *Ecology Letters*, 2-13.
- Jin, Q., H. Han, X. Hu, X. Li, C. Zhu, S.Y.W. Ho, R.D. Ward, Z. Zhang, 2013. Quantifying Species Diversity with a DNA Barcoding-Based Method: Tibetan Moth Species (Noctuidae) on the Qinghai-Tibetan Plateau, *Plos One*, 8 (5): e64428.
- Kekkonen, M., P.D.N. Hebert, 2014. DNA barcode-based delineation of putative species: efficient start for taxonomic workflows, *Molecular Ecology Resources*, 14:706-715.
- Kembel, S.W., P.D. Cowan, M.R. Helmus, W.K. Cornwell, H. Morlon, D.D. Ackerly, S.P. Blomberg, C.O. Webb, 2010. Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology, *Bioinformatics*, 26:1463-1464.
- Koleff, P., K. J. Gaston, J. J. Lennon, 2003. Measuring beta diversity for presence–absence data. *Journal of Animal Ecology*, 72:367–382.
- Körner, C., 2007. The use of ‘ altitude ’ in ecological research, *Trends Ecol. Evol.*, 22: 569 – 574.
- Körner, C. 2000. Why are there global gradients in species richness? Mountains might hold the answer., *Trends Ecol. Evol.*, 15: 513 – 514.
- Kuhner, M.K., 2009. Coalescent genealogy samplers: windows into population history, *Trends in Ecology and Evolution*, 24 (2): 86-93.
- Llorente Bousquets, J., A.N. García Aldrete, E. González Soriano (eds.), 1996. *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: Hacia una síntesis de su conocimiento*. Instituto de Biología, UNAM, México, D.F.
- Llorente Bousquets, J., E. González, N. Papavero (eds.), 2000. *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: Hacia una síntesis de su conocimiento, Vol. II*. Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F.
- Llorente Bousquets, J., J.J. Morrone (eds.), 2002. *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: Hacia una síntesis de su conocimiento, Vol. III*. Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F.
- Llorente Bousquets, J., J.J. Morrone, O. Yáñez-Ordóñez, I. Vargas Fernández (eds.), 2004. *Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México: Hacia una síntesis de su conocimiento, Vol IV*. Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F.
- Luna, I., J.J. Morrone, D. Espinosa (eds.), 2007. *Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana*, UNAM, México, D.F.
- Mastretta-Yanes, A., A. Moreno-Letelier, D. Piñero, T.H. Jorgensen, B.C. Emerson, 2015. Biodiversity in the Mexican highlands and the interaction of geology, geography and climate

- within the Trans-Mexican Volcanic Belt, *Journal of Biogeography*, 42 (9): 1586-1600.
- Mastretta-Yanes A. 2015. Landscape genomics of tropical high altitude plant species. Tesis doctoral. School of Biological Science University of East Anglia, UK.
- McCormack J.E., H. Huang, L.L. Knowles, 2009. Sky islands, en: *Encyclopedia of Islands* (Gillespie, RG and D Clague, eds.), pp. 839-843. University of California Press: Berkeley, CA.
- Morrone, J.J., J. Márquez, 2008. Biodiversity of Mexican terrestrial arthropods (Arachnida and Hexapoda): a biogeographical puzzle. *Acta Zool. Mex*, 24 (1):15-41.
- Navarro-Sigüenza, A.G., A. Lira-Noriega, A.T. Peterson, A. Oliveras de Ita, A. Gordillo-Martínez, 2007. Diversidad, endemismo y conservación de las aves, en: *Biodiversidad de la Faja Volcánica Transmexicana* (Luna, I., J.J. Morrone y D. Espinosa eds.). UNAM: México D.F.
- Jombart, T., I. Ahmed, 2011. adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics*.
- Oksanen, J., F.G. Blanchet, R. Kindt, P. Legendre, P.R. Minchin, R.B. O'Hara, G.L. Simpson, P. Solymos, M. Henry, H. Stevens, H. Wagner, 2013. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-10. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Papadopoulou A., I. Anastasiou, B. Keskin, A. Vogler, 2009. Comparative phylogeography of tenebrionid beetles in the Aegean archipelago: the effect of dispersal ability and habitat preference, *Mol. Ecol.*, 18:2503–2517.
- Papadopoulou A., J. Bergsten, T. Fujisawa, M.T. Monaghan, T.G. Barraclough, A. P. Vogler, 2008. Speciation and DNA Barcodes: Testing the Effects of Dispersal on the Formation of Discrete Sequence Clusters, *Philosophical Transactions: Biological Science*, 363 (1506): 2987-2996.
- Paradis, E., 2010. pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach, *Bioinformatics*, 26: 419-420.
- Poe, S., 1998. Sensitivity of Phylogeny Estimation to Taxonomic Sampling, *Systematic Biology*, 47 (1): 18-31.
- Pons J., T.G. Barraclough, J. Gomez-Zurita, A. Cardoso, D.P. Duran, S. Hazell, S. Kamoun, W.D. Sumlin, A.P. Vogler, 2006. Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects, *Syst. Biol.*, 55:595–609.
- Qian, H., R.E. Ricklefs, 2000. Large-scale processes and the Asian bias in species diversity of temperate plants, *Nature*, 407 (6801): 180-182.
- Rahbek, C., 1995. The elevational gradient of species richness – a uniform pattern, *Ecography*, 18: 200-205.
- Ramírez-Barahona, S., L.E. Eguiarte, 2013. The role of glacial cycles in promoting genetic diversity in the Neotropics: the case of cloud forests during the Last Glacial Maximum. *Ecology and Evolution*, 3: 725–738.
- Ricklefs, R.E., 2006. Evolutionary diversification and the origin of the diversity–environment relationship, *Ecology*, 87.
- Rosenberg, N.A., M. Nordborg, 2002. Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms, *Nature Reviews. Genetics*, 3 (5): 380-390.
- Rosenzweig, M.L., 1995. *Species diversity in space and time*. Cambridge University Press. pp. 460.
- Ruiz-Sanchez, E., C.D. Specht, 2013. Influence of the geological history of the Trans-Mexican

Volcanic Belt on the diversification of *Nolina parviflora* (Asparagaceae: Nolinoideae), *J. Biogeogr.*, 40: 1336-1347.

Rzedowski, J., 1978. *Vegetación de México*, Limusa, México.

Stewart, J.R., A.M. Lister, I. Barnes, L. Dalén, 2010. Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time, *Proceedings of the Royal Society B*, 277(1682): 661-667.

Taberlet, *et al.* 2012. Genetic diversity in widespread species is not congruent with species richness in alpine plant communities, *Ecology Letters*, 15:1439-1448.

Talavera, G., D. Vlad, V. Roger, 2013. Factors affecting species delimitations with the GMYC model: insights from a butterfly survey, *Methods in Ecology and Evolution*.

Vellend, M., M.A. Geber, 2005. Connections between species diversity and genetic diversity, *Ecol. Lett.*, 8: 767–781.

Webb, C.O., D.D. Ackerly, M.A. McPeck, M.J. Donoghue, 2002. Phylogenies and community ecology, *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 33: 475–505.

Whittaker, R. H., 1960. Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California, *Ecological Monographs*, 30:279-338.

Whittaker, R. H., 1956. Vegetation of the Great Smoky Mountains, *Ecological Monographs*, 26:1-80

Yu, D.W., Y.Q. Ji, B.C. Emerson, X.Y. Wang, C.X. Ye, C.Y. Yang, Z. Ding, 2012. Biodiversity Soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring, *Methods Ecol. Evol.*, 3: 613–623.

## 9. Anexos

Los anexos también están disponibles en la sección de Complementos en el documento digital de esta tesis, el cual puede ser consultado en la página de internet del catálogo de la biblioteca digital de la UNAM (<http://tesis.unam.mx/F>).

Las secuencias que fueron utilizadas se encuentran solamente en el archivo digital de la tesis, están disponibles en la carpeta llamada secuencias en la misma sección de Complementos.

### 9.1 Anexo 1. Base de datos de individuos recolectados con información taxonómica

<i>ID</i>	<i>Montaña</i>	<i>Tipo de vegetación</i>		<i>Trampa</i>	<i>Orden</i>	<i>Morfotipo</i>	<i>Familia *</i>	<i>OTU</i>
AjBPCo22-4	Ajusco	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co1	Curculionidae	8
BIBPCo105-4	Cerro Blanco	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co1	Curculionidae	8
BIBPCo105-7	Cerro Blanco	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co1	Curculionidae	8
BIBPCo105-9	Cerro Blanco	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co1	Curculionidae	8
BIBPCo105-12	Cerro Blanco	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co1	Curculionidae	8
MaBPCo126-2	Malinche	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co1	Curculionidae	8
MaBPCo126-4	Malinche	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co1	Curculionidae	8
MaBPCo126-7	Malinche	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co1	Curculionidae	8
MaBPCo126-8	Malinche	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co1	Curculionidae	8
ToBPCo3-5	Nevado de Toluca	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co1	Curculionidae	8
ToBPCo3-9	Nevado de Toluca	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co1	Curculionidae	8
ToBPCo3-10	Nevado de Toluca	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co1	Curculionidae	8
ToBPCo3-11	Nevado de Toluca	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co1	Curculionidae	8
ToBPCo3-12	Nevado de Toluca	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co1	Curculionidae	8
PeBPCo154-1	Cofre de Perote	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co1	Hydraenidae	
PeBPCo154-3	Cofre de Perote	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co1	Hydraenidae	
PeBPCo154-4	Cofre de Perote	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co1	Hydraenidae	
PeBPCo154-5	Cofre de Perote	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co1	Hydraenidae	
MaZPCo133-1	Malinche	Pastizal		Pitfall	Coleoptera	Co1	Curculionidae	2
MaZPCo133-3	Malinche	Pastizal		Pitfall	Coleoptera	Co1	Curculionidae	2
MaZPCo133-4	Malinche	Pastizal		Pitfall	Coleoptera	Co1	Curculionidae	2
MaZPCo133-5	Malinche	Pastizal		Pitfall	Coleoptera	Co1	Curculionidae	2
BIBPCo104-1	Cerro Blanco	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co1	Carabidae	10
BIBPCo104-3	Cerro Blanco	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	10
BIBPCo104-5	Cerro Blanco	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	10
BIBPCo104-11	Cerro Blanco	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	10
BIBPCo104-12	Cerro Blanco	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	10
ToBPCo1-1	Nevado de Toluca	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	10
ToBPCo1-2	Nevado de Toluca	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	10
ToBPCo1-3	Nevado de Toluca	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	10
ToBPCo1-4	Nevado de Toluca	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	10
ToBPCo1-5	Nevado de Toluca	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	10
ToBPCo1-6	Nevado de Toluca	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	10
ToBPCo1-7	Nevado de Toluca	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	10
ToBPCo2-1	Nevado de Toluca	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	10
ToBPCo2-2	Nevado de Toluca	Bosque		Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	10

<b>ID</b>	<b>Montaña</b>	<b>Tipo de vegetación</b>	<b>Trampa</b>	<b>Orden</b>	<b>Morfortipo</b>	<b>Familia *</b>	<b>OTU</b>
ToBPCo2-3	Nevado de Toluca	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	10
ToBPCo2-4	Nevado de Toluca	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	10
ToBPCo2-5	Nevado de Toluca	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	10
ToBPCo2-6	Nevado de Toluca	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	10
ToBPCo2-7	Nevado de Toluca	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	10
IzZPCo56-3	Iztaccíhuatl	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	11
IzZPCo56-4	Iztaccíhuatl	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	11
IzZPCo56-5	Iztaccíhuatl	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	11
IzZPCo56-9	Iztaccíhuatl	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	11
IzZPCo56-10	Iztaccíhuatl	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	11
IzZPCo56-11	Iztaccíhuatl	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	11
IzZPCo56-12	Iztaccíhuatl	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	11
MaBPCo127-1	Malinche	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	11
MaBPCo127-2	Malinche	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	11
MaBPCo127-4	Malinche	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	11
MaZPCo132-2	Malinche	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	11
MaZPCo132-3	Malinche	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	11
MaZPCo132-4	Malinche	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	11
MaZPCo132-6	Malinche	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	11
MaZPCo132-7	Malinche	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	11
PeZPCo148-1	Cofre de Perote	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	11
PeZPCo148-2	Cofre de Perote	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	11
PeZPCo148-3	Cofre de Perote	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	11
PeZPCo148-4	Cofre de Perote	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	11
PeZPCo148-5	Cofre de Perote	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	11
PeZPCo148-9	Cofre de Perote	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	11
PeZPCo148-10	Cofre de Perote	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	11
PeZPCo148-12	Cofre de Perote	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co10	Carabidae	11
IzBPCo47-1	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co11	Curculionidae	3
IzBPCo47-2	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co11	Curculionidae	3
IzBPCo47-3	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co11	Curculionidae	3
IzBPCo47-5	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co11	Curculionidae	3
IzBPCo47-6	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co11	Curculionidae	3
IzBPCo47-7	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co11	Curculionidae	3
IzBPCo47-8	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co11	Curculionidae	3
IzBPCo47-10	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co11	Curculionidae	3
IzBPCo47-11	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co11	Curculionidae	3
IzBPCo47-12	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co11	Curculionidae	3
MaBPCo129-1	Malinche	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co11	Curculionidae	3
MaBPCo129-2	Malinche	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co11	Curculionidae	3
MaBPCo129-3	Malinche	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co11	Curculionidae	3
PeBPCo155-3	Cofre de Perote	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co11	Curculionidae	3
IzBPCo47-4	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co11	Curculionidae	4
IzBPCo47-9	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co11	Curculionidae	4
PeZPCo149-5	Cofre de Perote	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co11	Curculionidae	5
PeZPCo149-8	Cofre de Perote	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co11	Curculionidae	5
AjBPCo39-1	Ajusco	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co7	Curculionidae	6
AjBPCo39-2	Ajusco	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co7	Curculionidae	6
MaBPCo130-1	Malinche	Bosque	Pitfall	Coleoptera	Co7	Curculionidae	7
ToZPCo18-1	Nevado de Toluca	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co7	Curculionidae	1
ToZPCo18-2	Nevado de Toluca	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co7	Curculionidae	1
ToZPCo18-5	Nevado de Toluca	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co7	Curculionidae	1
ToZPCo18-6	Nevado de Toluca	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co7	Curculionidae	1

<b>ID</b>	<b>Montaña</b>	<b>Tipo de vegetación</b>	<b>Trampa</b>	<b>Orden</b>	<b>Morfortipo</b>	<b>Familia *</b>	<b>OTU</b>
ToZPCo18-7	Nevado de Toluca	Pastizal	Pitfall	Coleoptera	Co7	Curculionidae	1
AjZPAr24-1	Ajusco	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar7	Linyphiidae	12
AjZPAr24-2	Ajusco	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar7	Linyphiidae	12
AjBPAr6-3	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar6	Linyphiidae	13
AjBPAr11-2	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar11	Linyphiidae	13
AjBPAr6-2	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar6	Linyphiidae	13
AjBPAr4-5	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar3	Linyphiidae	13
AjBPAr6-6	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar6	Linyphiidae	13
AjBPAr6-4	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar6	Linyphiidae	13
AjBPAr9-2	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar9	Linyphiidae	13
AjBPAr6-1	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar6	Linyphiidae	13
AjBPAr4-3	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar3	Linyphiidae	13
AjBPAr9-3	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar9	Linyphiidae	13
AjBPAr6-5	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar6	Linyphiidae	13
IzBPAr131-1	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar6	Linyphiidae	14
IzBPAr132-4	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar7	Linyphiidae	14
IzBPAr131-5	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar6	Linyphiidae	14
IzBPAr131-11	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar6	Linyphiidae	14
IzBPAr132-12	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar7	Linyphiidae	14
IzBPAr131-10	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar6	Linyphiidae	14
IzBPAr131-7	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar6	Linyphiidae	14
AjBPAr1-11	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar1	Linyphiidae	14
AjBPAr1-8	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar1	Linyphiidae	14
AjBPAr1-3	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar1	Linyphiidae	14
AjBPAr1-6	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar1	Linyphiidae	14
AjBPAr1-9	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar1	Linyphiidae	14
AjBPAr1-10	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar1	Linyphiidae	14
AjBPAr9-1	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar9	Linyphiidae	15
PeZPAr56-1	Cofre de Perote	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar1	Linyphiidae	15
PeZPAr56-2	Cofre de Perote	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar1	Linyphiidae	15
PeBPAr107-3	Cofre de Perote	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar3	Linyphiidae	15
PeBPAr102-4	Cofre de Perote	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar1	Linyphiidae	15
AjBPAr1-7	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar1	Linyphiidae	15
PeBPAr102-5	Cofre de Perote	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar1	Linyphiidae	15
PeBPAr107-1	Cofre de Perote	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar3	Linyphiidae	15
AjBPAr11-1	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar11	Linyphiidae	15
AjBPAr5-1	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar4	Linyphiidae	15
AjBPAr5-2	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar4	Linyphiidae	15
PeBPAr107-2	Cofre de Perote	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar3	Linyphiidae	15
PeBPAr102-2	Cofre de Perote	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar1	Linyphiidae	15
AjBPAr9-5	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar9	Linyphiidae	15
AjBPAr5-4	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar4	Linyphiidae	15
AjBPAr5-3	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar4	Linyphiidae	15
PeBPAr102-3	Cofre de Perote	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar1	Linyphiidae	15
PeBPAr104-3	Cofre de Perote	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar5	Linyphiidae	15
PeBPAr102-1	Cofre de Perote	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar1	Linyphiidae	16
BIBPAr150-1	Cerro Blanco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar7	Linyphiidae	16
PeBPAr100-4	Cofre de Perote	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar17	Linyphiidae	17
PeBPAr100-8	Cofre de Perote	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar17	Linyphiidae	17
PeBPAr100-3	Cofre de Perote	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar17	Linyphiidae	17
PeBPAr108-1	Cofre de Perote	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar9	Linyphiidae	17
PeBPAr100-7	Cofre de Perote	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar17	Linyphiidae	17
PeBPAr100-2	Cofre de Perote	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar17	Linyphiidae	17

<b>ID</b>	<b>Montaña</b>	<b>Tipo de vegetación Trampa</b>		<b>Orden</b>	<b>Morfortipo</b>	<b>Familia *</b>	<b>OTU</b>
PeBPAr100-1	Cofre de Perote	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar17	Linyphiidae	17
AjZPAr26-1	Ajusco	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar4	Linyphiidae	18
AjZPAr26-2	Ajusco	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar4	Linyphiidae	18
MaZPAr80-1	Malinche	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar5	Linyphiidae	18
MaZPAr80-2	Malinche	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar5	Linyphiidae	18
ToZPAr46-2	Nevado de Toluca	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar18	Linyphiidae	18
ToZPAr46-3	Nevado de Toluca	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar18	Linyphiidae	18
ToZPAr46-7	Nevado de Toluca	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar18	Linyphiidae	18
ToZPAr46-1	Nevado de Toluca	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar18	Linyphiidae	18
ToZPAr46-9	Nevado de Toluca	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar18	Linyphiidae	18
ToZPAr46-5	Nevado de Toluca	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar18	Linyphiidae	18
ToZPAr46-6	Nevado de Toluca	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar18	Linyphiidae	18
ToZPAr46-8	Nevado de Toluca	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar18	Linyphiidae	18
ToZPAr46-4	Nevado de Toluca	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar18	Linyphiidae	18
BIZPAr129-1	Cerro Blanco	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar5	Linyphiidae	18
PeBPAr104-5	Cofre de Perote	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar5	Linyphiidae	19
MaBPAr71-1	Malinche	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar4	Linyphiidae	19
PeBPAr104-1	Cofre de Perote	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar5	Linyphiidae	19
PeBPAr104-4	Cofre de Perote	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar5	Linyphiidae	19
PeBPAr104-2	Cofre de Perote	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar5	Linyphiidae	19
ToBPAr30-2	Nevado de Toluca	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar18	Linyphiidae	20
ToBPAr30-1	Nevado de Toluca	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar18	Linyphiidae	20
ToBPAr29-1	Nevado de Toluca	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar4	Linyphiidae	20
ToBPAr29-2	Nevado de Toluca	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar4	Linyphiidae	20
AjBPAr12-1	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar12	Linyphiidae	20
BIBPAr146-5	Cerro Blanco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar5	Linyphiidae	20
BIBPAr149-2	Cerro Blanco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar12	Linyphiidae	20
IzBPAr133-4	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar5	Linyphiidae	20
IzBPAr133-3	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar5	Linyphiidae	20
BIBPAr146-3	Cerro Blanco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar5	Linyphiidae	20
IzBPAr133-5	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar5	Linyphiidae	20
ToZPAr47-2	Nevado de Toluca	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar11	Linyphiidae	21
ToZPAr47-5	Nevado de Toluca	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar11	Linyphiidae	21
IzZPAr65-1	Iztaccíhuatl	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar3	Linyphiidae	21
AjBPAr10-1	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar10	Linyphiidae	22
AjBPAr4-7	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar3	Linyphiidae	22
AjBPAr1-5	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar1	Linyphiidae	23
AjBPAr1-12	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar1	Linyphiidae	23
AjBPAr4-9	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar3	Linyphiidae	24
AjBPAr4-12	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar3	Linyphiidae	24
AjBPAr4-2	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar3	Linyphiidae	24
AjBPAr4-11	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar3	Linyphiidae	24
AjBPAr4-8	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar3	Linyphiidae	25
AjBPAr9-4	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar9	Linyphiidae	25
PeBPAr110-1	Cofre de Perote	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar10	Linyphiidae	25
AjBPAr4-4	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar3	Linyphiidae	25
PeBPAr110-2	Cofre de Perote	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar10	Linyphiidae	25
AjBPAr4-10	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar3	Linyphiidae	25
AjBPAr7-5	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar7	Linyphiidae	26
AjBPAr7-3	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar7	Linyphiidae	26
AjBPAr7-4	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar7	Linyphiidae	26
AjBPAr7-7	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar7	Linyphiidae	26
AjBPAr7-2	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar7	Linyphiidae	26

<i>ID</i>	<i>Montaña</i>	<b>Tipo de vegetación</b>	<b>Trampa</b>	<b>Orden</b>	<b>Morfotipo</b>	<b>Familia *</b>	<b>OTU</b>
IzBPAr132-2	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar7	Linyphiidae	26
IzBPAr132-11	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar7	Linyphiidae	26
IzBPAr132-8	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar7	Linyphiidae	26
AnZPAr87-10	Cerro de San Andrés	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar9	Linyphiidae	27
AnZPAr87-7	Cerro de San Andrés	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar9	Linyphiidae	27
AnZPAr87-5	Cerro de San Andrés	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar9	Linyphiidae	27
AnZPAr87-3	Cerro de San Andrés	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar9	Linyphiidae	27
BlZPAr128-1	Cerro Blanco	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar9	Linyphiidae	27
AjBPAr9-6	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar9	Linyphiidae	28
IzZPAr63-1	Iztaccíhuatl	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar17	Linyphiidae	28
IzZPAr63-8	Iztaccíhuatl	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar17	Linyphiidae	28
IzZPAr63-6	Iztaccíhuatl	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar17	Linyphiidae	28
IzZPAr63-3	Iztaccíhuatl	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar17	Linyphiidae	28
IzZPAr63-4	Iztaccíhuatl	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar17	Linyphiidae	28
AjBPAr1-1	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar1	Linyphiidae	29
AjBPAr10-2	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar10	Linyphiidae	30
AjBPAr4-1	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar3	Linyphiidae	31
AjBPAr4-6	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar3	Linyphiidae	32
AjBPAr5-6	Ajusco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar4	Linyphiidae	33
AnBPAr160-3	Cerro de San Andrés	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar7	Linyphiidae	34
BlBPAr149-1	Cerro Blanco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar12	Linyphiidae	35
BlBPAr150-2	Cerro Blanco	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar7	Linyphiidae	36
PeBPAr100-5	Cofre de Perote	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar17	Linyphiidae	37
ToBPAr32-1	Nevado de Toluca	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar7	Linyphiidae	38
PeZPAr59-1	Cofre de Perote	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar16	Gnaphosidae	39
PeZPAr59-2	Cofre de Perote	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar16	Gnaphosidae	39
PeZPAr59-10	Cofre de Perote	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar16	Gnaphosidae	39
ToZPAr37-2	Nevado de Toluca	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar21	Gnaphosidae	40
ToZPAr37-5	Nevado de Toluca	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar21	Gnaphosidae	40
ToZPAr36-1	Nevado de Toluca	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar21	Gnaphosidae	40
BlZPAr123-4	Cerro Blanco	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar21	Gnaphosidae	40
BlZPAr123-8	Cerro Blanco	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar21	Gnaphosidae	40
IzZPAr60-2	Iztaccíhuatl	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar16	Gnaphosidae	40
IzZPAr60-3	Iztaccíhuatl	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar16	Gnaphosidae	40
AnZPAr85-3	Cerro de San Andrés	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar16	Gnaphosidae	41
AnZPAr85-4	Cerro de San Andrés	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar16	Gnaphosidae	41
AnBPAr161-3	Cerro de San Andrés	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar21	Gnaphosidae	42
AnBPAr161-2	Cerro de San Andrés	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar21	Gnaphosidae	42
AnBPAr162-2	Cerro de San Andrés	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar21	Gnaphosidae	42
ToZPAr37-3	Nevado de Toluca	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar21	Gnaphosidae	43
ToZPAr37-4	Nevado de Toluca	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar21	Gnaphosidae	43
ToBPAr35-2	Nevado de Toluca	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar16	Gnaphosidae	44
ToBPAr35-4	Nevado de Toluca	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar16	Gnaphosidae	44

<i>ID</i>	<i>Montaña</i>	<i>Tipo de vegetación</i>	<i>Trampa</i>	<i>Orden</i>	<i>Morfortipo</i>	<i>Familia *</i>	<i>OTU</i>
AnBPAr157-1	Cerro de San Andrés	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar21	Gnaphosidae	45
AnBPAr157-4	Cerro de San Andrés	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar21	Gnaphosidae	45
AnBPAr157-5	Cerro de San Andrés	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar21	Gnaphosidae	45
AnBPAr156-5	Cerro de San Andrés	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar13	Agelenidae	
AnBPAr159-2	Cerro de San Andrés	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar13	Agelenidae	
AnBPAr156-4	Cerro de San Andrés	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar13	Agelenidae	
AnBPAr156-10	Cerro de San Andrés	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar13	Agelenidae	
AnBPAr156-12	Cerro de San Andrés	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar13	Agelenidae	
AnBPAr156-7	Cerro de San Andrés	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar13	Agelenidae	
BIZPAr122-4	Cerro Blanco	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar13	Agelenidae	
BIZPAr122-7	Cerro Blanco	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar13	Agelenidae	
BIZPAr122-5	Cerro Blanco	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar13	Agelenidae	
BIZPAr122-12	Cerro Blanco	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar13	Agelenidae	
BIZPAr122-9	Cerro Blanco	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar13	Agelenidae	
MaZPAr83-1	Malinche	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar2	Anyphaenidae	
AnBPAr158-1	Cerro de San Andrés	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar2	Anyphaenidae	
AnBPAr158-5	Cerro de San Andrés	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar2	Anyphaenidae	
IzZPAr61-3	Iztaccíhuatl	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar2	Anyphaenidae	
IzZPAr61-4	Iztaccíhuatl	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar2	Anyphaenidae	
IzZPAr61-6	Iztaccíhuatl	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar2	Anyphaenidae	
IzZPAr61-7	Iztaccíhuatl	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar2	Anyphaenidae	
IzZPAr61-9	Iztaccíhuatl	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar2	Anyphaenidae	
IzZPAr61-10	Iztaccíhuatl	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar2	Anyphaenidae	
IzBPAr130-3	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar2	Anyphaenidae	
IzBPAr130-8	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar2	Anyphaenidae	
IzBPAr130-9	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar2	Anyphaenidae	
IzBPAr130-10	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar2	Anyphaenidae	
IzBPAr130-11	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar2	Anyphaenidae	
IzBPAr130-12	Iztaccíhuatl	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar2	Anyphaenidae	
PeBPAr101-1	Cofre de Perote	Bosque	Pitfall	Araneae	Ar2	Anyphaenidae	
PeZPAr58-5	Cofre de Perote	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar2	Anyphaenidae	
PeZPAr58-6	Cofre de Perote	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar2	Anyphaenidae	
PeZPAr58-8	Cofre de Perote	Pastizal	Pitfall	Araneae	Ar2	Anyphaenidae	

\*Las familias taxonómicas se obtuvieron a partir de la comparación de las secuencias del gen mitocondrial *cox1* de los especímenes colectados con secuencias de las bases de datos de NCBI y BoldSystems

## 9.2. Anexo 2. Código de R

### 9.2.1. Delimitación de OTUs con GMYC

```
#Determinación de OTUs con gmyc
setwd("~/BEAST/BEASTv1.8.2/bin") #casi todos los árboles están guardados
en esta carpeta
## 1. Se cargan las librerías necesarias
library(splits)
library(ape)
library(MASS)
library(paran)
## 2. Se carga el árbol ultramétrico (usé BEAST para calcularlos). Se
tiene que nombrar al árbol como objeto nuevo.
CurcuTtree<-read.nexus("CurculionidaeTtree")
## 3. Se implementa gmyc con el nuevo árbol. Primero el árbol, luego el
método, intervalo de escala de los parámetros y si quieres ver en la
consola el avance (T o F).
CurcuTgmyc<-gmyc(CurcuTtree, method="single", interval=c(0,10),quiet=F)
## 4. Resultados:
CurcuTgmyc
summary(CurcuTgmyc)
#Para cambiar la fuente de los nombres de las ramas se modifica la
función (plotCluster3)
plotCluster3 <- function(tr, lthresh, show.tip.label = TRUE,
                        show.node.label = FALSE, cex = 0.5) {
  numnod <- tr$Nnode
  numtip <- length(tr$tip.label)
  cdat <- array(1, 2 * numnod)
  ndat <- array("", numnod)
  bt <- -branching.times(tr)
  nest.nodes <- function(tr, x, p = 0) {
    numtip <- length(tr$tip.label)
    nods <- array(NA, 0)
    desc <- as.integer(tr$edge[, 2][tr$edge[, 1] == x])
    if (desc[1] > numtip) {
```

```

    nods <- c(nods, desc[1], nest.nodes(tr, desc[1]))
  }
  if (desc[2] > numtip) {
    nods <- c(nods, desc[2], nest.nodes(tr, desc[2]))
  }
  if (length(nods) > 0) {
    return(nods)
  }
  else {
    return(NULL)
  }
}
threshold.group <- function(mrcas) {
  parent <- tr$edge[, 1]
  child <- tr$edge[, 2]
  thresh.group <- list()
  thresh.time <- c()
  mrcas <- mrcas + numtip
  k <- 1
  while (TRUE) {
    times <- bt[mrcas - numtip]
    thresh1.time <- min(times)
    thresh1.node <- mrcas[which.min(times)]
    mrcas <- mrcas[-which.min(times)]
    if (length(mrcas) == 0) {
      thresh.time <- c(thresh.time, thresh1.time)
      thresh.group[[k]] <- thresh1.node
      break
    }
  }
  member <- thresh1.node
  del <- c()
  for (i in 1:length(mrcas)) {
    par.nod <- parent[child == mrcas[i]]
    t.par <- bt[par.nod - numtip]
    if (t.par < thresh1.time) {
      member <- c(member, mrcas[i])
      del <- c(del, i)
    }
  }
}

```

```

    }
  }
  thresh.time <- c(thresh.time, thresh1.time)
  thresh.group[[k]] <- member
  k <- k + 1
  if (length(del) != 0) {
    mrcas <- mrcas[-del]
  }
  if (length(mrcas) == 0) {
    break
  }
}
return(thresh.group)
}
group <- threshold.group(lthresh)
colors <- rainbow(length(group))
k <- 1
for (g in group) {
  n.col.type <- rep(0, numnod)
  for (j in 1:length(g)) {
    n.col.type[g[j] - numtip] <- 2
    n.col.type[nest.nodes(tr, g[j]) - numtip] <- 1
  }
  cdat[match(tr$edge[, 1], which((n.col.type == 1) |
                                (n.col.type == 2)) + numtip) > 0]
<- colors[k]
  k <- k + 1
}
plot(tr, edge.color = cdat, use.edge.length = 1, show.node.label =
show.node.label,
      show.tip.label = show.tip.label, no.margin = FALSE,
      cex = cex, font=1)
}
#Graficarlo con la nueva función
x<-CurcuTgmyc
plotCluster3(x$tree, x$MRCA[[which.max(x$likelihood)]])
###Se repite con cada familia taxonómica

```

### 9.2.2. Diversidad genética y diversidad específica

```
##Para calcular distancias genéticas entre poblaciones
#primero cargas las librerías ape, adegenet, ade4
library(ape)
library(ade4)
library(adegenet)
library(diveRsity)
#lees el archivo de las secuencias
OTU40<-read.dna("OTU40.fasta",format="fasta")
OTU40gen<-DNABin2genind(OTU40) #conviertes el objeto DNABin a un objeto
genind
OTU40gen
OTU40gen@ind.names
#Para agregar los datos de la población:
# get pop data (first two chars of seq name)
head(labels(OTU40))
pops<-substr(labels(OTU40), 1,2)
pops<-as.factor(pops)
head(pops)
OTU40gen@pop<-pops
OTU40gen@pop.names<-c("Bl","Iz","To") #Esto lo escribes a mano
OTU40gen
#Conviertes el objeto genind en genpop
OTU40pop<-genind2genpop(OTU40gen)
#Se calcula la distancia genética entre poblaciones con la función de
adegenet dist.pop
distOTU40<-dist.genpop(OTU40pop, method=4,diag=T,upper=F)
distOTU40
###Se repite el procedimiento con todas las OTUs

# Para calcular Fst
library(adegenet)
library(ape)
library(pegas)
#Se leen las secuencias
OTU15<-read.dna("OTU15.fasta", format="fasta")
```

```

OTU15
class(OTU15)
OTU15gen<-DNABin2genind(OTU15) # adegenet format
OTU15loci<-genind2loci(OTU15gen) # pegas format
#Se obtienen los datos de las poblaciones (first two chars of seq name)
head(labels(OTU15))
pops<-substr(labels(OTU15), 1,2)
pops<-as.factor(pops)
head(pops)
#Se estima Fst
fstOTU15<-pairwise.fst(OTU15gen, pop=pops, res.type="matrix")
fstOTU15
###Se repite el prodecimiento con todas las OTUs

# Para calcular una red de haplotipos
library(adegenet)
library(pegas)
setwd("~/Geneious") #En donde estén guardados los archivos fasta
otu14<-read.dna("OTU14.fasta", format="fasta")
otu14
class(otu14)
haplosotu14<-haplotype(otu14)
haplosotu14
# Se obtienen los datos de las poblaciones (first two chars of seq name)
head(labels(otu14))
pops<-substr(labels(otu14), 1,2)
pops<-as.factor(pops)
head(pops)
#Se calculan las frecuencias de los haplotipos
hfotu14<-haploFreq(otu14, fac=pops)
hfotu14
#Se construye la red de haplotipos
hnotu14<-haploNet(haplosotu14) #hn es de haplotype network
hnotu14
#Tamaño-frecuencia y colores-poblaciones
plot(hnotu14, size=attr(hnotu14,"freq"), pie=hfotu14, legend=c(-10,0))
###Se repite con todas las OTUs

```

```

#Para calcular índice de diversidad beta
library(vegan)
library(ade4)
#Se lee el archivo de cantidad de individuos de cada OTU presente en cada
montaña
OTUs <- read.csv("~/Documentos/Proyectodetesis/Resultados/OTUs.csv")
View(OTUs)
OTUs<-OTUs[1:45,2:8] #Quitamos la columna de OTU porque es repetitiva
View(OTUs)
OTUs<-as.matrix(OTUs) #La convertimos en matriz
OTUs<-t(OTUs) #Trasponemos la matriz para que las especies sean las
columnas (variables) y los sitios los renglones.
#Se calcula una matrix de presencia-ausencia
OTUs.PA<-OTUs>0 #cada celda es transformada en T o F dependiendo si el
valor es mayor que 0 o no
mode(OTUs.PA)<-"integer" #coloca T=1 y F=0
head(OTUs)
head(OTUs.PA)
OTUsdist<-betadiver(OTUs.PA,method=1) #matriz de distancia. Para ver
todos los índices escribir betadiver(HELP=T). Índices 10 y 11 son de
similitud, los demás son distancia.
#para graficar un cluster
cluster<-hclust(OTUsdist)
plot(cluster)
#para verlo en gráfica (PCoA)
PCoA<-dudi.pco(sqrt(OTUsdist),scannf=F)
summary(PCoA)
scatter(PCoA, xax=1, yax=2, posieig="none")

```

### 9.2.3. Diferenciación de individuos por el tipo de vegetación

```

#Se usan los mismos árboles que se obtuvieron en el gmyc
x<-CurcuTgmyc
# Obtener nombres de poblaciones y el tipo de vegetación de colecta (B o
Z)
nomtips<-substr((x$str)$tip.label, 1,2)

```

```

nomtips #Población
samtips<-substr((x$tr)$tip.label, 3,3)
samtips #Tipo de vegetación
#Definir color por tipo de vegetación (samtips)
samtips<-as.factor(samtips)
levels(samtips)<-c("green", "blue")
samtips
# Se modifica la función para graficar de splits (se agrega un 2 para que
no se confunda R)
plotCluster2 <- function(tr, lthresh, show.tip.label = FALSE, # tip
labels to FALSE
                        show.node.label = FALSE, cex = 0.5) {
  numnod <- tr$Nnode
  numtip <- length(tr$tip.label)
  cdat <- array(1, 2 * numnod)
  ndat <- array("", numnod)
  bt <- -branching.times(tr)
  nest.nodes <- function(tr, x, p = 0) {
    numtip <- length(tr$tip.label)
    nods <- array(NA, 0)
    desc <- as.integer(tr$edge[, 2][tr$edge[, 1] == x])
    if (desc[1] > numtip) {
      nods <- c(nods, desc[1], nest.nodes(tr, desc[1]))
    }
    if (desc[2] > numtip) {
      nods <- c(nods, desc[2], nest.nodes(tr, desc[2]))
    }
    if (length(nods) > 0) {
      return(nods)
    }
    else {
      return(NULL)
    }
  }
  threshold.group <- function(mrcas) {
    parent <- tr$edge[, 1]
    child <- tr$edge[, 2]

```

```

thresh.group <- list()
thresh.time <- c()
mrcas <- mrcas + numtip
k <- 1
while (TRUE) {
  times <- bt[mrcas - numtip]
  thresh1.time <- min(times)
  thresh1.node <- mrcas[which.min(times)]
  mrcas <- mrcas[-which.min(times)]
  if (length(mrcas) == 0) {
    thresh.time <- c(thresh.time, thresh1.time)
    thresh.group[[k]] <- thresh1.node
    break
  }
  member <- thresh1.node
  del <- c()
  for (i in 1:length(mrcas)) {
    par.nod <- parent[child == mrcas[i]]
    t.par <- bt[par.nod - numtip]
    if (t.par < thresh1.time) {
      member <- c(member, mrcas[i])
      del <- c(del, i)
    }
  }
  thresh.time <- c(thresh.time, thresh1.time)
  thresh.group[[k]] <- member
  k <- k + 1
  if (length(del) != 0) {
    mrcas <- mrcas[-del]
  }
  if (length(mrcas) == 0) {
    break
  }
}
return(thresh.group)
}
group <- threshold.group(lthresh)

```

```

colors <- rainbow(length(group))
k <- 1
for (g in group) {
  n.col.type <- rep(0, numnod)
  for (j in 1:length(g)) {
    n.col.type[g[j] - numtip] <- 2
    n.col.type[nest.nodes(tr, g[j]) - numtip] <- 1
  }
  cdat[match(tr$edge[, 1], which((n.col.type == 1) |
                                (n.col.type == 2)) + numtip) > 0] <-
colors[k]
  k <- k + 1
}
plot(tr, edge.color = cdat, use.edge.length = 1, show.node.label =
show.node.label,
      show.tip.label = show.tip.label, no.margin = FALSE,
      cex = cex)
}
# Graficar con color de acuerdo al tipo de vegetación
plotCluster2(x$tree, x$MRCA[[which.max(x$likelihood)]])
tiplabels(text=nomtips, frame="none", adj=0, cex=0.5,
           col=as.vector(samtips))

```

#### 9.2.4. ¿Existe una estructura E-O?

##### **#Modelos nullos**

#Se comparan los datos empíricos con datos simulados con la función oecosimu. Se usa la base de datos de presencia-ausencia construida para calcular la diversidad beta.

```
library(vegan)
```

#Se hace un grupo del E y otro del W y aleatorizo las spp entre ambos lados:

#Lo haré con las 34 agrupaciones posibles.

```
#Grupo1: E=An,B1,To W=Aj,Iz,Ma,Pe
```

```
E1<-OTUs.PA[1:3,] #Hago el vector E
```

```
E1<-colSums(E) #Sumo las especies de las tres montañas para que se junten
```

```

en un solo complejo "Este"
W1<-OTUs.PA[4:7,] #Vector W
W1<-colSums(W)
EW1<-matrix(data=(c(E1,W1)),nrow=2,ncol=45,byrow=T,dimnames=list(c("E1","
W1"))) #Construyo la matriz E-W
EW1
sim1st<-oecosimu(EW1,nestedbetasor,method="r0",nsimul=999) #aleatorizando
sólo sitios
dplot1st<-densityplot(sim1st, par.strip.text=list(cex=1.3), lwd=2,
obs.line("red"),par.settings=list(par.xlab.text=list(cex=1.5),
par.ylab.text=list(cex=1.5))) #Letra grande y líneas verticales gruesas
dplot1st
###Se repite el mismo procedimiento con los otros 34 agrupamientos de
montañas (ver Tabla 3)

```

#### **#Análisis de varianza con permutaciones**

```

#Se usa la misma matriz de presencia-ausencia de OTUs
#Grupo1: W=An,B1,To E=Aj,Iz,Ma,Pe
OTUsdist<-betadiver(OTUs.PA,method=1) #matriz de distancia. Para ver
todos los índices escribir betadiver(HELP=T). Índices 10 y 11 son de
similitud, los demás son distancia.
vec1<-c(rep("W",3),rep("E",4)) #Hacer un vector con Este - Oeste
AV1<-adonis(OTUsdist~as.factor(vec1),permutation=999) #Se hace un
análisis de varianza con permutaciones
AV1
###Se repite con los otros 34 agrupamientos de montañas (ver Tabla 3)

```