



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

TESIS

FILOGEOGRAFÍA DE CHIRANTHODENDRON PENTADACTYLON (MALVACEAE)

PRESENTA

Biól. Diana Gabriela Hernández Langford

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS EN EL
ÁREA DE ECOLOGÍA Y BIODIVERSIDAD

TUTORA

Dra. María Elena Siqueiros Delgado

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Joaquín Sosa Ramírez

Dr. Eduardo Ruiz Sánchez

Aguascalientes, Ags., 14 de septiembre del 2020

M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ

DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

P R E S E N T E

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designados de la estudiante **DIANA GABRIELA HERNÁNDEZ LANGFORD** con ID 63723 quien realizó la tesis titulada: **FILOGEOGRAFÍA DE CHIRANTHODENDRON PENTADACTYLON (MALVACEAE)**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

“Se Lumen Proferre”

Aguascalientes, Ags., a 14 de septiembre de 2020.



Dra. María Elena Siqueiros Delgado

Tutora de tesis



Dr. Joaquín Sosa Ramírez

Asesor de tesis



Dr. Eduardo Ruiz Sánchez

Asesor de tesis



DICTAMEN DE LIBERACION ACADEMICA PARA INICIAR LOS TRAMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aa: _____

NOMBRE: DIANA HERNÁNDEZ LANGFORD ID 63723

PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS LGAC (del posgrado): ECOLOGÍA Y BIODIVERSIDAD

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo práctico

TITULO: FILOGEOGRAFÍA DE CHIRANTHODENDRON PENTADACTYLON (MALVACEAE)

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

Preservación de la flora nativa de los bosques mesófilo de montaña y de pino

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
SI Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
NA Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI Coincide con el título y objetivo registrado
SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
SI Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- SI Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
SI El estudiante es el primer autor
SI El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
SI En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
SI Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
SI La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

Sí SI
No

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

DR. GILBERTO ALEJANDRO OJAMBALACOSTA

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DRA. ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DRA. HAYDÉE MARTÍNEZ RUVALCABA

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. JORGE MARTÍN ALFEREZ CHÁVEZ

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Nuclear phylogeography of the temperate tree species *Chiranthodendron pentadactylon* (Malvaceae): Quaternary relicts in Mesoamerican cloud forests

Diana Gabriela Hernández-Langford^{1*}, María Elena Siqueiros-Delgado¹ and Eduardo Ruíz-Sánchez²

Abstract

Background: The Mexican hand tree or Canac (*Chiranthodendron pentadactylon*) is a temperate tree species of cloud and pine-oak forests of southern Mexico and Guatemala. Its characteristic hand-shaped flower is used in folk medicine and has constituted the iconic symbol of the *Sociedad Botánica de México* since 1940. Here, the evolutionary history of this species was estimated through phylogeographic analyses of nuclear DNA sequences obtained through restriction site associated DNA sequencing and ecological niche modeling. Total genomic DNA was extracted from leaf samples obtained from a representative number (5 to 10 per sampling site) of individuals distributed along the species geographic range. In Mexico, population is comprised by spatially isolated individuals which may follow the trends of cloud forest fragmentation. By contrast, in Guatemala *Chiranthodendron* may constitute a canopy dominant species near the Acatenango volcano. The distributional range of this species encompasses geographic provinces separated by the Isthmus of Tehuantepec.

The objectives of the study were to: (i) estimate its genetic structure to define whether the observed range disjunction exerted by the Isthmus of Tehuantepec translates into separate populations, (ii) link population divergence timing and demographic trends to historical climate change, and (iii) test hypotheses related to Pleistocene refugia.

Results: Patterns of genetic diversity indicated high levels of genetic differentiation between populations separated by the Isthmus. The western and eastern population diverged approximately 0.873 Million years ago (Ma). Demographic analyses supported a simultaneous split from an ancestral population and rapid expansion from a small stock approximately 0.2 Ma corresponding to a glacial period. The populations have remained stable since the LIG (130 Kilo years ago (Ka)). Species distribution modelling (SDM) predicted a decrease in potential distribution in the Last Interglacial (LIG) and an increase during the Last Glacial Maximum (LGM) (22 Ka), Mid-Holocene (6 Ka) and present times.

(Continued on next page)

* Correspondence: digahela.87@gmail.com

¹Departamento de Biología, Herbario UAA, Centro de Ciencias Básicas, Edificio 132, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av, Universidad No. 940, Ciudad Universitaria, 20131 Aguascalientes, Aguascalientes, México
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo brindado a través de la beca número 358420, y a la Universidad Autónoma de Aguascalientes incluyendo al doctorado en ciencias biológicas por proporcionar las facilidades mediante las cuales se logró desarrollar este proyecto.

Al *California Botanic Garden* y a la Universidad de California en Riverside por su apoyo en la obtención de los datos genómicos usados en el proyecto.

Al doctor Eduardo Ruíz Sánchez por aceptar ser parte de mi comité tutorial, por su paciencia y guía.

Al doctor Joaquín Sosa Ramírez por formar parte de mi comité tutorial, por su paciencia y por proporcionar valiosas recomendaciones para la realización de este proyecto.

A la doctora María Elena Siqueiros Delgado por abrirme las puertas y darme la oportunidad de desarrollar este proyecto bajo su tutoría.

Muchas gracias al ingeniero Mario Esteban Véliz Pérez y a Luis Velázquez (Universidad de San Carlos de Guatemala) por su apoyo en las colectas de Guatemala. A Ernesto López, Prócoro Almazán Rodríguez, Andrés Ernesto Ortiz Rodríguez (Universidad Nacional Autónoma de México), Gabriel González Adame (Universidad de la Sierra Juárez) y a Pablo Carrillo Reyes (Universidad de Guadalajara) por su apoyo en las colectas efectuadas en México.

A la doctora Loraine Washburn (*California Botanic Garden*), Matthew Colling y Clay Clark (*University of California, Riverside, Genomics Core*) por apoyo invaluable en el procesamiento de las muestras para la obtención de los datos genómicos usados en este proyecto.

Al doctor Pablo César Hernández Romero por su valioso apoyo y enseñanza en la ejecución de modelado de nicho ecológico.

A Higinio, Memo, José Carlos, Rebeca y Luz por su amistad, paciencia y apoyo.

Al doctor Jaime Antonio Escoto Moreno por su apoyo, paciencia y enseñanzas.

A mi familia por su incondicional apoyo, por estar ahí para levantarme cuando más lo necesitaba.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	5
ABSTRACT.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
1. Filogeografía.....	8
2. <i>Chiranthodendron pentadactylon</i> (Larreat ex Sessé).....	11
2.1 <i>Importancia económica y cultural</i>	18
2.2 <i>Distribución</i>	19
Capítulo 1. ANTECEDENTES.....	22
1.1 Origen de la subfamilia Bombacoideae	22
1.2 Filogeografía de especies de árboles	27
1.2.1 <i>Filogeografía de especies de árboles de América</i>	28
1.3 Bosques mesófilos de montaña en Mesoamérica	35
1.3.1 <i>Definición de bosque mesófilo de montaña</i>	35
1.3.2 <i>Patrones fitogeográficos</i>	36
1.3.3 <i>Patrones biogeográficos de los bosques mesófilos de montaña en México</i>	36
1.3.4 <i>Estudios filogeográficos en especies de bosque mesófilo de montaña</i>	37
1.3.5 <i>Refugios pleistocénicos</i>	43
1.4 JUSTIFICACIÓN	46
1.5 HIPÓTESIS.....	48
1.6 OBJETIVOS.....	48
1.6.1 <i>Objetivo general</i>	48
1.6.2 <i>Objetivos particulares</i>	48
Capítulo 2. METODOLOGÍA	49
2.1 Trabajo de campo.	49
2.2 Trabajo de laboratorio.	51
2.2.1 <i>Extracción de ADN genómico.</i>	51
2.2.2 <i>Pesado de material vegetal y homogeneización del tejido.</i>	51
2.2.3 <i>Remoción de proteínas y lípidos.</i>	51
2.2.4 <i>Precipitación del ADN y remoción de polisacáridos.</i>	52
2.2.5 <i>Evaluación de la integridad del ADN y cuantificación.</i>	52
2.2.6 <i>Preparación de biblioteca genómica y secuenciación.</i>	52

2.2.7 Digestión del ADN genómico con la enzima de restricción Sbf1-HF.....	53
2.2.8 Ligamiento de adaptador P1.....	53
2.2.9 Multiplexación (Multiplexing) y fragmentación del ADN.....	53
2.2.10 Reparación de extremos.....	54
2.2.11 Adición de extremo 3'-dA.....	54
2.2.12 Ligamiento de adaptador P2.....	54
2.2.13 Enriquecimiento por PCR y secuenciación.....	54
2.3 Análisis bioinformático.....	55
2.3.1 Ensamblaje y alineamiento de las secuencias.....	55
2.3.2. Diversidad genética y pruebas de neutralidad.....	56
2.3.3. Estructura genética.....	57
2.3.4. Reconstrucción filogenética.....	59
2.3.5 Estimación de tiempos de divergencia.....	59
2.3.6 Demografía histórica.....	61
2.3.7 Historia evolutiva.....	62
2.3.8 Modelado de nicho ecológico.....	64
Capítulo 3. RESULTADOS.....	65
3.1 Diversidad genética y pruebas de neutralidad.....	65
3.2 Estructura genética.....	66
3.3 Reconstrucción filogenética.....	67
3.4 Tiempos de divergencia.....	68
3.4 Historia evolutiva.....	70
3.5 Demografía histórica.....	72
3.6 Distribución potencial predicha mediante modelado de nicho ecológico.....	73
Capítulo 4. DISCUSIÓN.....	74
4.1 Efecto vicariante del istmo de Tehuantepec en la formación de patrones de diversidad genética.....	74
4.2 Relaciones del tiempo de divergencia poblacional y demografía histórica con cambio climático histórico.....	76
CONCLUSIONES.....	82
REFERENCIAS.....	85
PORTADA DE ANEXOS.....	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información de muestreo. Localidades muestreadas, información geográfica (latitud y longitud), número de ejemplares muestreados (n) y características del sitio incluyendo altitud y tipo de vegetación. En adición, se muestra el nombre del colector y fecha de colecta. 50

Tabla 2. Valores de diversidad nucleotídica y de pruebas de neutralidad. 66

Tabla 3. Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) global basada en secuencias nucleares de SNPs ligados. 67

Tabla 4. Probabilidad posterior de escenarios simulados (Regresión logística Bayesiana). 72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol de la manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) cerca del volcán Tacaná en Chiapas. Fuente: Eduardo Ruiz Sánchez (2017). 13

Figura 2. Árbol de la manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) cerca del volcán Acatenango en Guatemala. Fuente: Archivo personal (2018). 14

Figura 3. Flor de *C. pentadactylon*. Vista lateral. Fuente: Mario Véliz (s/f). 15

Figura 4. Flor de *C. pentadactylon*. Vista ventral. Fuente: Mario Véliz (s/f). 16

Figura 5. Cápsula dehiscente (fruto) de *C. pentadactylon*. Fuente: Eduardo Ruiz Sánchez (2017). 17

Figura 6. Semillas estrofioladas de *C. pentadactylon*. Fuente: Archivo personal (2018). 17

Figura 7. Mapa de la distribución geográfica de *C. pentadactylon*. Se muestra la delimitación de las provincias fisiográficas señalando aquellas dentro de las cuales ocurre. Los pentágonos rojos indican sitios de ocurrencia. 22

Figura 8. Paleocorología de Bombacacidites. Tomado de Krutzsch (1989). 24

Figura 9. Distribución geográfica de las localidades muestreadas para *C. pentadactylon* en México y Guatemala. 49

Figura 10. Gráfico de barras obtenido mediante el programa STRUCTURE plot en donde se representan los coeficientes de membresía individuales asignados a cada número K de grupos (K = 2) definidos como poblaciones. 67

Figura 11. Red filogenética (Neighbor-Net) construida mediante el programa SplitsTree en base a secuencias nucleares de SNPs ligados. 68

Figura 12. Cronograma de las poblaciones de *C. pentadactylon* basado en árbol consenso calculado usando 36 loci polimórficos nucleares y un modelo coalescente de multiespecies con tamaño constante. Los intervalos de máxima densidad posterior conteniendo 95% de la probabilidad posterior (HPD) se muestran cómo barras moradas. 69

Figura 13. Cronograma de las poblaciones de *C. pentadactylon* basado en árbol consenso calculado usando el conjunto de SNPs ligados y un modelo coalescente de multiespecies con tamaño constante. 69

Figura 14. Escenarios demográficos de *C. pentadactylon* simulados mediante el programa DIYABC basados en secuencias nucleares de SNPs ligados. 71

Figura 15. Skyline Plots Bayesianos estimados de secuencias nucleares de SNPs ligados para cada población. El eje-y corresponde al producto entre el tamaño efectivo poblacional y el tiempo

generacional, y el eje-x al tiempo transcurrido en millones de años. Líneas sólidas representan el promedio estimado y áreas sombreadas corresponden a intervalos de confianza del 95%. 72

Figura 16. Distribuciones presente e histórica predichas a través de modelado de nicho ecológico implementado por el método de máxima entropía. La probabilidad de ocurrencia basada en idoneidad climática (Idoneidad Climática MDE) se muestra de alta (100) en rojo a baja (0) en verde. 73

Figura 17. Comparación de las distribuciones de *C. pentadactylon* (rojo) y especies del género *Fremontodendron* (amarillo). 81



RESUMEN

Chiranthodendron pentadactylon (Malvaceae) es una especie de árbol de hoja perenne distribuida en bosque mesófilo de montaña y bosque de pino/encino del sur de México y Guatemala. Posee flores que asemejan una mano, rasgo que le ha atribuido importancia religiosa por los pueblos precolombinos. La flor ha sido el símbolo icónico de la Sociedad Botánica de México desde 1940 y es usada en la medicina tradicional mexicana. El bosque mesófilo de montaña es susceptible al cambio climático por requerir de precipitación continua y se desarrolla en franjas montañosas estrechas de distribución restringida. En consecuencia, son necesarios estudios que incrementen el valor estratégico de conservación mediante la determinación de su estado genético y de los factores que influyen en su distribución. El objetivo del presente estudio consistió en inferir el patrón filogeográfico de *C. pentadactylon* mediante la estimación de la diversidad genética y estructura genética, y de la inferencia de los procesos históricos y demográficos que moldearon su estructura genética y filogeográfica, en base a marcadores nucleares RAD-seq. Los resultados indican baja diversidad genética derivada de una expansión a partir de poblaciones de tamaño efectivo poblacional pequeño o de reproducción endogámica inducida por la fragmentación del rango de distribución. Se estimaron altos niveles de diferenciación genética entre poblaciones oeste y este del istmo de Tehuantepec. Esta separación data del primer interglacial de longitud de 100 Ka (800 Ka) a partir de una población ancestral de distribución más amplia y septentrional. Formas ancestrales pudieron haber migrado hacia el sur durante el Pleistoceno (1.6 Ma) con el incremento de precipitación pluvial. La estimación de cambios poblacionales indica expansión rápida en el ciclo glacial de 0.2 Ma y subsecuente mantenimiento. Se infiere reducción de nicho durante el LIG (130 Ka), aumento durante el LGM (22 Ka), Mid-HLC (6 Ka) y tiempo presente. Los resultados soportan el modelo de bosque húmedo.

Palabras clave: Bosque mesófilo de montaña, México, Guatemala, cambio climático, patrón filogeográfico, istmo de Tehuantepec, estructura genética, Pleistoceno, modelo de bosque húmedo

ABSTRACT

Chiranthodendron pentadactylon is an evergreen temperate tree species of cloud and pine-oak forests of Mexico and Guatemala. Religious importance has been attributed by the pre-Columbian peoples to its characteristic hand-shaped flower which has also constituted the iconic symbol of the Sociedad Botánica de México since 1940. The flowers are used in folk medicine. Cloud forests susceptible to climate change since they require a continuous precipitation input and develop in narrow mountainous strips of restricted distribution. Consequently, studies that increase the strategic value of conservation through the determination of the genetic status of populations and the factors that influence their distribution are needed. The objective of the present study was to infer the phylogeographic pattern of *Chiranthodendron* by estimating measures of genetic diversity and genetic structure, and by inferring the historical and demographic processes that shaped its genetic and phylogeographic structure based on RAD-seq derived nuclear markers. Results show low genetic diversity derived from the expansion of populations with small effective population size or high rates of inbreeding induced by range fragmentation. High levels of genetic differentiation were estimated between the populations located west and east of the isthmus of Tehuantepec. Populations diverged during the first interglacial with a time period length of 100 Ka (800 ka) from an ancestral population with a broader and northernmost distribution. Potential predecessors migrated south during the Pleistocene epoch (1.6 Ma) with the increase of precipitation input. Population changes estimation indicate a rapid expansion during the glacial period that dates back to 0.2 Ma followed by effective population size maintenance. Niche reduction during the LIG (130 Ka) and expansion during the LGM (22 Ka), Mid-HLC (6 Ka) and present time are predicted. The results support the moist forest model.

Key words: Cloud forest, México, Guatemala, climate change, phylogeographic pattern, isthmus of Tehuantepec, genetic structure, Pleistocene, moist forest model

INTRODUCCIÓN

El presente trabajo se realizó dentro del marco del programa del doctorado en Ciencias Biológicas en el área de Ecología y Biodiversidad con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Consiste en el análisis filogeográfico de la especie de árbol *Chiranthodendron pentadactylon* comúnmente conocida como el árbol de las manitas la cual se distribuye en bosque mesófilo de montaña del sur de México y Guatemala. El trabajo se llevó a cabo de manera sistematizada iniciando con la obtención de muestras seguida de la generación de datos genómicos a través de la técnica de secuenciación asociada a sitios de restricción (RAD-Seq) y el subsecuente análisis bioinformático. La presentación del trabajo inicia con un apartado introductorio en el que se describe el campo de estudio de la filogeografía, así como características que definen a la especie de estudio. El siguiente apartado constituye el capítulo 1 y consiste de antecedentes o estudios previos sobre la distribución y origen de la categoría taxonómica de subfamilia dentro de la cual se clasifica *C. pentadactylon*. En adición, se incluyen conclusiones derivadas de estudios filogeográficos de especies de árboles distribuidas en diferentes latitudes del continente americano y de especies de plantas distribuidas en Mesoamérica específicamente en bosque mesófilo de montaña. Enfoques complementarios de la filogeografía como son fitogeografía, biogeografía y genética de poblaciones son asimismo incluidos para proporcionar un marco conceptual que sirva de guía en la derivación de inferencias filogeográficas. En este capítulo también se incluyen la justificación, la hipótesis y los objetivos del presente estudio. El capítulo 2 comprende una descripción detallada de la metodología empleada seguido de los resultados y discusión en los capítulos 3 y 4 respectivamente. El trabajo finaliza con el apartado de conclusiones obtenidas de los resultados observados.

1. Filogeografía

La filogeografía es un campo de estudio que se encarga de determinar los principios y procesos causales de la distribución geográfica de linajes genealógicos infraespecíficos. La inferencia e interpretación de estos procesos se realiza mediante herramientas conceptuales de la genética de poblaciones, la sistemática filogenética y la biogeografía (Avice, 2000). La genética de poblaciones se enfoca en los patrones de diversidad genética dentro y entre poblaciones siendo esta descriptora de la configuración contemporánea del estado genético de una población. La estructura genética de una población subdividida debe describirse en función de la distribución geográfica de las frecuencias de los genes y genotipos que definen la estructura genética. Fuerzas evolutivas como mutación, duplicación de genes, selección natural, deriva génica (Nei, 1975) y demografía histórica (Rosenberg y Nordborg, 2002) promueven cambios en la estructura genética (Nei, 1975). La filogeografía interpreta el modo y extensión de las huellas evolutivas que los procesos demográficos e históricos de las poblaciones pudieron haber dejado en la distribución geográfica contemporánea de los rasgos genéticos. Estos procesos ejercen un impacto inexorable sobre las genealogías de genes afectando la dinámica de los procesos de ramificación y coalescencia. Los procesos de coalescencia aseguran las conexiones filogenéticas entre los genotipos dentro de las especies a través de las rutas verticales de descendencia. El tratamiento matemático y estadístico de estos procesos los proporciona la teoría de la coalescencia (Avice, 2000) la cual cuantifica la relación entre el tamaño poblacional y el nivel de relación entre los linajes de la población a través de patrones de ancestría común y estructura poblacional (Kuhner, 2008). La sistemática filogenética se enfoca en la cuantificación del nivel de relación evolutiva entre grupos de organismos bajo un contexto histórico (Nei y Kumar, 2000) mientras que la biogeografía se enfoca en la descripción de la distribución histórica y contemporánea de grupos de organismos de alto nivel taxonómico a través de la interpretación del potencial impacto ejercido por variables históricas como el cambio climático, procesos geológicos y evolutivos (Llorente y Morrone, 2001). Como subdisciplina de la biogeografía, la filogeografía determina el papel histórico

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

que las presiones ecológicas tuvieron en la configuración de las distribuciones espaciales de los rasgos genéticos de los organismos (Avice, 2000).

La distribución de algunas especies puede reflejar respuestas selectivas a gradientes ambientales. Sin embargo, la selección natural no constituye la única fuerza evolutiva capaz de generar patrones geográficos en atributos genéticos. En poblaciones históricamente separadas con prolongada limitación o ausencia de flujo génico entre ellas, tanto genes selectivamente neutrales como no neutrales se encuentran inexorablemente sujetos a divergencia evolutiva. Poblaciones con distintos niveles de separación geográfica reflejan patrones filogenéticos diferenciales en función del tiempo o período de separación de la población ancestral. Estos son: 1) Monofilia recíproca, en la cual todos los linajes dentro de una población se encuentran ligados genealógicamente entre sí; 2) Polifilia, en la cual algunos, pero no todos los linajes están ligados genealógicamente; y 3) Parafilia, en la cual todos los linajes de una población se encuentran anidados en una población hija más grande (Avice, 2000).

Los rasgos genéticos mediante los cuales se realiza la evaluación filogeográfica deben presentar valor filogenético, extensa variación intraespecífica y ausencia de recombinación genética intermolecular. En particular, el estudio filogeográfico en plantas tradicionalmente se ha basado en el ADN de cloroplasto por presentar variación y herencia uniparental (Avice, 2000). No obstante, la herencia uniparental del ADN de cloroplasto refleja en la mayoría de las plantas únicamente el movimiento de semillas (Morris et al., 2008) y por lo tanto no representa la historia poblacional completa en particular cuando el sesgo sexual afecta el comportamiento de dispersión y capacidad de adaptación (Hare, 2001).

La herencia uniparental de los marcadores citoplasmáticos implica teóricamente una diferenciación genealógica o monofilia recíproca en un tiempo menor que los marcadores nucleares. Sin embargo, este tiempo reciente de coalescencia impide la detección de procesos históricos previos a la separación de las poblaciones (Hare, 2001). Más aún, la inexactitud de las tasas de sustitución estimadas a partir de un único locus y la variación en la topología de árbol pueden derivar en tiempos de especiación/divergencia imprecisos (Lu et al., 2019).

El ADN nuclear es biparentalmente heredado y refleja tanto el movimiento de polen como de semillas (Morris et al., 2008). En teoría, el tamaño poblacional para genealogías nucleares es cuatro veces mayor que para genealogías mitocondriales o de cloroplasto. No obstante, esto puede cambiar dependiendo del sistema de apareamiento y los correspondientes parámetros demográficos (Avice, 2000).

Un mayor tamaño poblacional, implica tiempos de coalescencia mayores lo cual permite la resolución de interrogantes relacionadas con poblaciones antiguas (Hare, 2001). Los marcadores nucleares poseen además tasas de sustitución silenciosas por lo menos cinco veces mayores que las tasas de sustitución de mitocondria y el doble de las de cloroplasto (Wolfe, Li y Sharp, 1987). La recombinación intragénica, sin embargo, constituye una dificultad biológica que debe ser considerada durante el aislamiento y procesamiento del ADN nuclear para el análisis de genealogías de genes infraespecíficas. La recombinación reciente tergiversa las historias filogenéticas de los eventos mutacionales. Se ha sugerido por lo tanto el uso de loci nucleares independientes y de manera particular de múltiples de estos loci con la finalidad de obtener conclusiones filogeográficas robustas mediante el muestreo y representación de varias de las potenciales rutas hereditarias dentro de la genealogía poblacional (Avice, 2000).

La secuenciación de nueva generación (NGS por sus siglas en inglés) representa una tecnología que facilita la obtención de datos de secuencias de múltiples loci de manera rápida y económica (McCormack et al., 2012).

Existen múltiples métodos para la obtención de datos genómicos que hacen uso de las plataformas de NGS siendo su selección dependiente del enfoque de estudio. En particular, la secuenciación asociada a enzimas de restricción (RAD-Seq por sus siglas en inglés) constituye un método de reducción del genoma nuclear que consiste en la digestión del ADN mediante enzimas de restricción. La conservación de los sitios de restricción se da a niveles categóricos superficiales como son género y especie, siendo este un método apropiado en estudios a nivel poblacional (Yu et al., 2018).

Este método muestrea un conjunto de marcadores genéticos (Davey y Blaxter, 2011) no ligados (Yu et al., 2018) adyacentes a sitios de restricción distribuidos aleatoriamente a

lo largo del genoma (Davey y Blaxter, 2011; Yu et al., 2018). Puede ser aplicado a poblaciones silvestres y especies de estudio no tradicionales de las cuales no se tiene disponible un genoma de referencia. Lo anterior es posible mediante el ensamblaje *de novo* de las secuencias, el cual consiste en la agrupación y comparación de lecturas idénticas que son filtradas para minimizar el número de desajustes entre ellas. El análisis de las secuencias alineadas permite la determinación de alelos, genotipado y posterior registro de polimorfismos (Davey y Blaxter, 2011; Etter et al., 2011).

El uso de marcadores nucleares obtenidos mediante la técnica de RAD-seq para la ejecución de estudios filogeográficos, ha derivado en la detección de estructura genética (e.g. Závěská et al., 2019; Lu et al., 2019; Park y Donoghue, 2019) previamente no detectada a través de marcadores de cloroplasto (e.g. Cao et al., 2018).

En adición, se han estimado tiempos de divergencia mayores a los estimados mediante marcadores de cloroplasto obteniéndose una mayor concordancia con eventos biogeográficos (e.g. Lu et al., 2019). Se han logrado estimar historias demográficas detalladas (e.g. Sakaguchi et al., 2017; Borrell et al., 2018) y el efecto de cambios climáticos históricos sobre la historia demográfica (e.g. Ren et al., 2016; Zhou et al., 2018).

2. *Chiranthodendron pentadactylon* (Larreat ex Sessé)

Chiranthodendron pentadactylon Larreat ex Sessé (Malvaceae) es una especie de árbol (Figuras 1 y 2) de hoja perenne que se caracteriza por poseer flores en las cuales la porción del androceo que alberga los estambres asemeja los dedos de una mano siendo consecuentemente conocido bajo varios nombres vernáculos que hacen alusión a esta característica. Estos incluyen *árbol de las manitas*, *árbol de la manita*, *camxóchitl*, *canaco*, *canaque*, *huiahuonahua*, *lechillo*, *li-ma-ne-shmu*, *macpalxochicuáhuítl*, *macpalxóchitl*, *mano de dragón*, *mano de león*, *mapasúchil*, *teyacua*, *teyeque* (González-Espinosa et al., 2011), *tayuyo*, *Canac*, *mano de mico* y *Majagua* (Standley y Steyermark, 1949).

Puede llegar a medir 30 metros de altura (Vivero et al., 2006). Las hojas son simples, cordadas y con 5 o 7 lóbulos. Las flores (Fig. 3 y 4) presentan disposición opuesta a las hojas, un diámetro superior a 2 cm y producen grandes cantidades de néctar. Los sépalos (5) son

rojizo oscuros, parcialmente fusionados, aquillados y con forma de saco en la base. Carece de pétalos. El tubo estaminal se encuentra unilateralmente dividido. Las anteras (5) son sésiles en tubo, largas, ditecales y con tejido conectivo prolongado. El ovario posee 5 lóculos con numerosos óvulos. El estilo es ahúsado (Bayer y Kubitzki, 2003). Las frutas son cápsulas (Fig. 5) dehiscentes (Toledo, 1975) y contienen muchas semillas negras estrofioladas (Fig. 6) con endospermo presente y cotiledones planos (Bayer y Kubitzki, 2003). El mínimo tiempo de desarrollo generativo es de más de 3 años (Chimera, 2016). Resiste a las bajas temperaturas (hasta 5°C) y a las condiciones secas (Osuna-Fernández et al., 1997). Las flores dicógamas pueden ser polinizadas mediante polinización cruzada o geitonogamia (Toledo, 1975). La polinización está mediada por aves (Toledo, 1975) y murciélagos (Fleming, Geiselman y Kress, 2009). El período de floración comienza en noviembre y termina en abril con mayor abundancia en febrero, mientras que el período de fructificación empieza en abril y finaliza en mayo (Osuna-Fernández et al., 1997). La dispersión de las semillas es potencialmente mediada por aves (Toledo, 1975).

Se clasifica en el reino Plantae, división Tracheophyta (plantas vasculares), subdivisión Spermatophytina (plantas con semillas, angiospermas), clase Magnoliopsida, orden Malvales, familia Malvaceae, subfamilia Bombacoideae y tribu Fremontodendreae. Sinonimias: *Cheirostemon apetalus* Cerv, *Cheirostemon platanoides* Bonpl y *Chiranthodendron platanoides* (Bonpl.) Baill.



Figura 1. Árbol de la manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) cerca del volcán Tacaná en Chiapas.
Fuente: Eduardo Ruiz Sánchez (2017).



Figura 2. Árbol de la manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) cerca del volcán Acatenango en Guatemala. Fuente: Archivo personal (2018).



Figura 3. Flor de *C. pentadactylon*. Vista lateral. Fuente: Mario Véliz (s/f).



Figura 4. Flor de *C. pentadactylon*. Vista ventral. Fuente: Mario Véliz (s/f).



Figura 5. Cápsula dehiscente (fruto) de *C. pentadactylon*. Fuente: Eduardo Ruiz Sánchez (2017).



Figura 6. Semillas estrofioladas de *C. pentadactylon*. Fuente: Archivo personal (2018).

2.1 Importancia económica y cultural

El uso de la flor de *C. pentadactylon* en la medicina tradicional mexicana se registra en el Códice de la Cruz-Badiano de 1552 (Osuna-Fernández et al., 1997). Durante la edad de los aztecas se usaba en el tratamiento de úlceras crónicas, dolor e inflamación de los ojos (Velázquez et al., 2009).

En la actualidad se tienen reportadas propiedades antiinflamatorias, anticolinérgicas, antisépticas y espasmolíticas de la flor (Velázquez et al., 2009) y es por lo tanto usada en el tratamiento de afecciones del corazón (Bye y Linares, 1983; Osuna-Fernández et al., 1997), presión alta (Osuna-Fernández et al., 1997), epilepsia y trastornos gastrointestinales como diarrea y disentería (Velázquez et al., 2009). Las flores se recolectan en Carrizal de Bravo, Guerrero (Osuna-Fernández et al., 1997) y comercializan en el Mercado de Sonora durante los meses de invierno (Bye y Linares, 1983) siendo su disponibilidad inversamente proporcional a su demanda (Hersch-Martínez, 1997). Además, la corteza es usada como cuerda y las hojas como envoltorios de comida (González-Espinosa et al., 2011).

Por otra parte, los pueblos precolombinos le adjudicaron importancia religiosa (González-Espinosa et al., 2011) siendo usado posiblemente como fuente de aceite (Peterson y Peterson, 1992).

En el lienzo de Quauhquechollan se hace alusión a este árbol para representar posiblemente las tierras altas de Sololá en Guatemala (Universidad Francisco Marroquín [UFM], 2009). Este lienzo es un mapa pictográfico elaborado alrededor del año 1530 por los cholultecas, habitantes de lo que hoy se conoce como el municipio de San Martín Huaquechula en el estado de Puebla, México. El mapa relata una historia de alianza entre el ejército español y el ejército quauhquechol para conquistar lo que hoy se conoce como Guatemala (Ortíz, 2012). El Popol Vuh (libro sagrado o biblia de los mayas) lo describe como el árbol de la vida. Sus semillas eran molidas junto con el cacao para hacer chocolate y las flores eran usadas para dar aroma (Universidad Francisco Marroquín [UFM], 2009).

Además, un dibujo de la flor ha sido el icónico símbolo de la Sociedad Botánica de México desde principios de la década de 1940 (González-Espinosa et al., 2011, p. 49).

2.2 Distribución

Chiranthodendron pentadactylon se distribuye en bosque mesófilo tropical de montaña y bosque de pino-encino del sur de México y Guatemala en las provincias de la Sierra Madre del Sur y el Macizo Central de Chiapas (Figura 7). En México se encuentra en los estados de Guerrero, Oaxaca y Chiapas a una altura de 1,830-2,740 msnm (González-Espinosa et al., 2011). En Guatemala se distribuye en los departamentos de El Progreso, Zacapa, Sacatepéquez, Chimaltenango, Sololá, Totonicapán, Quetzaltenango, Quiché, Huehuetenango y San Marcos (Véliz, 1989; Vivero et al., 2006) a una altura de 2,000-3000 msnm (Vivero et al., 2006).

La Sierra Madre del Sur es una provincia fisiográfica de topografía muy accidentada y altitudes que oscilan entre los 1,000 a los 2,700 msnm (Rzedowski, 1978 en Campos-Villanueva y Villaseñor, 1995). En la zona hay una gran cantidad de barrancas y cañadas con riachuelos en su mayoría permanentes, que originan microhábitats particulares (Campos-Villanueva y Villaseñor, 1995). El sistema montañoso de la Sierra Madre del Sur corre en dirección noroeste-sureste paralela a la costa del océano Pacífico, desde Jalisco hasta el istmo de Tehuantepec. Presenta afinidades bióticas con las adicionales provincias de la Zona de Transición Mexicana y las provincias neotropicales de las Tierras Altas del Pacífico y la Cuenca del Balsas. En la vegetación predominan bosques de coníferas, bosques de pino-encino, bosques mesófilos de montaña, matorrales xerófitos con cactus y selva baja caducifolia en las zonas de contacto con las provincias de las Tierras Bajas del Pacífico y de la Cuenca del Balsas. La provincia de la Sierra Madre del Sur se encuentra amenazada por la construcción de carreteras, el desarrollo turístico, el sobrepastoreo, la caza excesiva y presiones por urbanización (Morrone, 2019).

En la Sierra Madre del Sur de Guerrero y Oaxaca, principalmente en las vertientes con influencia directa del mar, existen numerosos manchones de bosque mesófilo de montaña. Sin embargo, se tienen pocos datos acerca de su estructura y composición. En particular, en la Sierra Madre del Sur en Oaxaca, las partes altas y húmedas de la Mixteca Alta al sur de los distritos de Tlaxiaco y Juxtlahuaca ocurre un reducido bosque mesófilo de montaña en donde se puede encontrar *C. pentadactylon* (García-Mendoza, Tenorio y Reyes, 1994).

La porción central del Municipio de San Jerónimo Coatlán en el Distrito de Miahuatlán, presenta medias anuales de precipitación que oscilan entre 700 y 1,500 mm con una temperatura media anual de 18 a 22°C. En esta también ocurre un bosque mesófilo de montaña en donde se puede encontrar *C. pentadactylon*, el cual se localiza en zonas muy restringidas que se desarrollan en cañadas y laderas protegidas con límites altitudinales que se sitúan entre los 1,000 y 2,400 msnm. En ocasiones se puede mezclar con el bosque de pino-encino. En la región predominan las actividad agrícola-ganadera y la actividad maderera. La actividad maderera pone en riesgo los recursos naturales pues gran parte de la explotación forestal se realiza de manera irracional (Campos-Villanueva y Villaseñor, 1995).

Por otra parte, en la región del Cerro Teotepec en Guerrero, se han colectado numerosas especies entre ellas *C. pentadactylon*, a 2,700 msnm que sugieren que se trata de bosques exuberantes (Rzedowski, 1994). En Guerrero, el bosque mesófilo de montaña se distribuye en la vertiente del Pacífico y la depresión del Balsas. La fisiografía del área se encuentra comprendida por cerros con laderas de pendiente pronunciada y barrancas profundas. La precipitación pluvial anual oscila entre los 1100 y 1500 mm y la temperatura media anual varía entre 17°C y 21°C. En la región de Carrizal de Bravo, la agricultura, la cría de ganado lechero, la recolección de la flor de la manita (*C. pentadactylon*) y el aprovechamiento forestal son las actividades humanas que se desarrollan en el área y que tienen impacto importante sobre el bosque. En esta zona, *C. pentadactylon* representa la especie más importante debido a su elevado valor de área basal y baja densidad relativa (Catalán, López-Mata y Terrazas, 2003).

La Sierra Madre de Chiapas alberga un tipo similar de bosque mesófilo de montaña el cual ocupa importantes extensiones. En altitudes cercanas a los 2,500 msnm, *C. pentadactylon* puede ser muy frecuente, sobre todo en las laderas del Volcán Tacaná (Rzedowski, 1994, p. 324). Por otra parte, en el Macizo Central de Chiapas, en la estación biológica localizada en el Cerro Huitepec a 4.5 km al oeste de San Cristóbal de las Casas, *C. pentadactylon* se puede encontrar formando parte del bosque de encino y bosque mesófilo de montaña pero con distribución local muy limitada y en donde su población se está

reduciendo notablemente debido a la perturbación de naturaleza antrópica como son la agricultura, el pastoreo de ovinos y el establecimiento de nuevos centros de población (Ramírez-Marcial, Ochoa-Gaona y González-Espinosa, 1998).

La Sierra Madre de Chiapas es una prolongación septentrional del Núcleo Centroamericano extendiéndose hasta Guatemala, Honduras, El Salvador y Nicaragua. Corre a lo largo del litoral pacífico de Chiapas y penetra hasta el istmo de Tehuantepec. Alcanza su mayor altitud en Tacaná (4,026 msnm), en la frontera con Guatemala (Morrone, 2019, p.4). La Sierra Madre de Chiapas junto con el Macizo Central de Chiapas forma parte de las Tierras Altas de Chiapas. Entre ambos sistemas montañosos se sitúa la Cuenca o Depresión Central de Chiapas, que es el amplio valle del río Grijalva. Las Tierras Altas de Chiapas presentan afinidad con las adicionales provincias de la Zona de Transición Mexicana, las provincias Veracruzana y de las Tierras Bajas del Pacífico (Morrone, 2019).

La provincia de las Tierras Altas de Chiapas se encuentra amenazada por la conversión de hábitats para la producción de café, la recolección de leña, la conversión de hábitats naturales para la agricultura, el desmonte para la creación de pastizales, el sobrepastoreo y los fuegos antropogénicos (Dinerstein et al., 1995 en Morrone, 2019, p. 50).

En el volcán de Agua (Standley y Steyermark, 1949) y en el volcán de Acatenango en Guatemala (Véliz, 1989), *C. pentadactylon* forma franjas densas de bosque que se extienden hasta los 3,000 msnm. En el volcán de Agua, sin embargo, gran parte del bosque de *C. pentadactylon* ha sido talado para limpiar la tierra para el cultivo de guisantes (Standley y Steyermark, 1949).

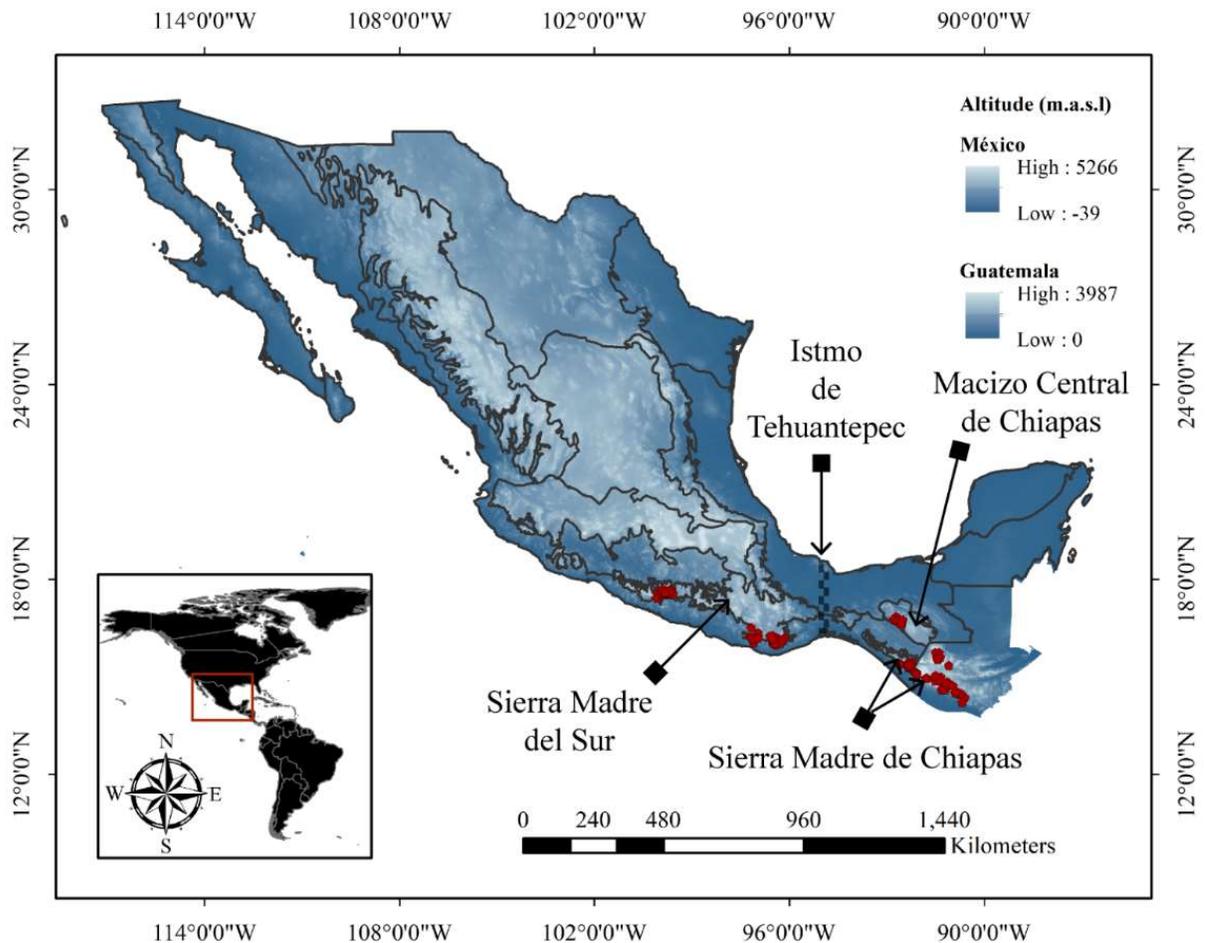


Figura 7. Mapa de la distribución geográfica de *C. pentadactylon*. Se muestra la delimitación de las provincias fisiográficas señalando aquellas dentro de las cuales ocurre. Los pentágonos rojos indican sitios de ocurrencia.

Capítulo 1. ANTECEDENTES

1.1 Origen de la subfamilia Bombacoideae

De acuerdo con Krutzsch (1989), *Bombacacidites* representa el polen más común de los tipos ancestrales de miembros de la subfamilia Bombacoideae (previamente Bombacaceae) y el elemento más antiguo ocurre en la flora del Thetis a partir de la cual emigra hacia los trópicos ecuatorianos.

Los hallazgos sobre su paleodistribución permitieron la reconstrucción de 4 o 5 etapas paleocorológicas. La más antigua data del Campaniense (83.6-72.1 Ma) Inferior y Maastrichtiense (72.1-66.0 Ma) de Nueva Jersey (Fig. 8a). En la segunda fase durante el

Paleoceno (66.0-56.0 Ma) e inicios del Terciario (56.0-33.9 Ma) se da una rápida expansión hacia lo que actualmente es California, Nuevo México, Texas y Europa. Simultáneamente las formas de *Bombacacidites* migran de América del Norte hacia América del Sur vía América Central a través de una cadena de islas volcánicas y de ahí a África Central (Fig. 8b).

En la tercera fase, la expansión hacia el sur continúa a partir de América del Sur hacia Australia a través de la Antártica iniciando en el Eoceno inferior (Fig. 8c), y a Nueva Zelanda durante el Oligoceno (33.9-23.03 Ma) y Mioceno (23.03-5.33 Ma). En la tercera fase durante el Eoceno, *Bombacacidites* se encontraba distribuida en el cinturón de Thetis en América del Norte y Europa. Este género estaba representado por una variedad de especies en Europa, pero subsecuentemente desaparece de la región con el inicio de climas más fríos después del Eoceno Medio.

Se ha demostrado que se encontraba en las montañas de Moroco en el Eoceno. También ocurre en Cuba durante el Eoceno Medio y después en Puerto Rico durante el Oligoceno. En adición, se tiene evidencia de su ocurrencia durante el Eoceno en Venezuela, Colombia, Guyana, el Delta del Amazonas y Brasil. En el oeste de África tropical ocurre frecuentemente hacia el inicio del Plioceno (Fig. 8d).

Durante el Paleógeno en África probablemente se dio una expansión gradual hacia el este pues se tiene evidencia de varios tipos de polen en el Oligoceno/Mioceno en Etiopía y en el Plioceno/Pleistoceno en Burundi posiblemente llegando a Madagascar durante el Terciario de esta manera.

Durante esta cuarta fase, *Bombacacidites* se distancia del cinturón de Thetis en dirección este y sureste alcanzando el norte de La India en el Mioceno inferior, y se expande rápidamente en el sureste de Asia formando un nuevo centro evolutivo que aún existe en la actualidad. Desaparece completamente de América del Norte y de casi toda Europa en particular de la región central de Europa. Se mantiene únicamente en Portugal a partir del cual se extiende a España durante la transición del Oligoceno/Mioceno y al noroeste del Mediterráneo durante el Plioceno Temprano.

Su desaparición en las regiones del norte se debe a la disminución considerable de la temperatura y al cambio simultáneo en dirección sur de las paleolatitudes durante el

Oligoceno. Los linajes del sureste de Asia y el oeste del Pacífico no migran a través de África. En su lugar se distancian de la flora del norte de Tethys en dirección sureste durante los últimos 20 a 30 Ma.

El secundario centro de desarrollo en América del sur experimenta expansión secundaria durante el Plioceno hacia América Central y el Caribe durante el Plioceno. También, el secundario centro de desarrollo en el sureste de Asia experimenta expansión hacia Nueva Guinea, las Nuevas Hébridas y el norte de Australia durante el Plioceno y Pleistoceno cruzando la línea de Wallace. Una expansión secundaria se da en dirección noroeste hacia India (Fig. 8e) (Kruttsch, 1989).

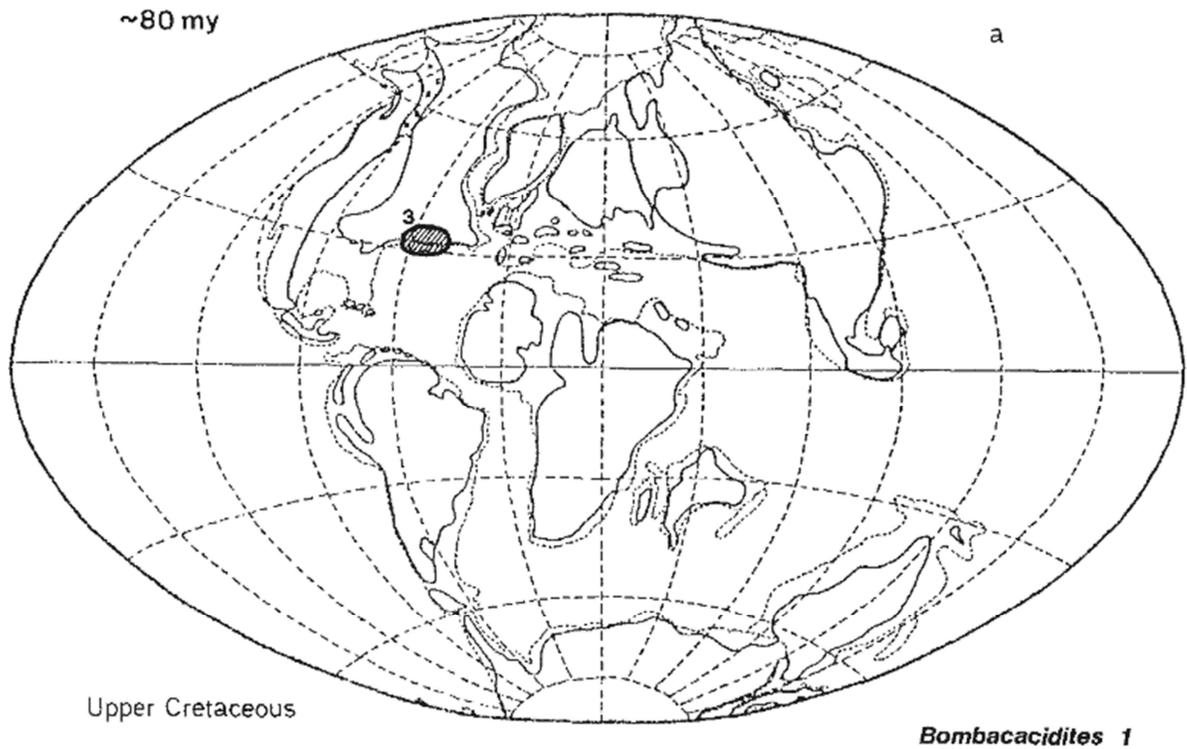


Figura 8. Paleocorología de *Bombacacidites*. Tomado de Kruttsch (1989).

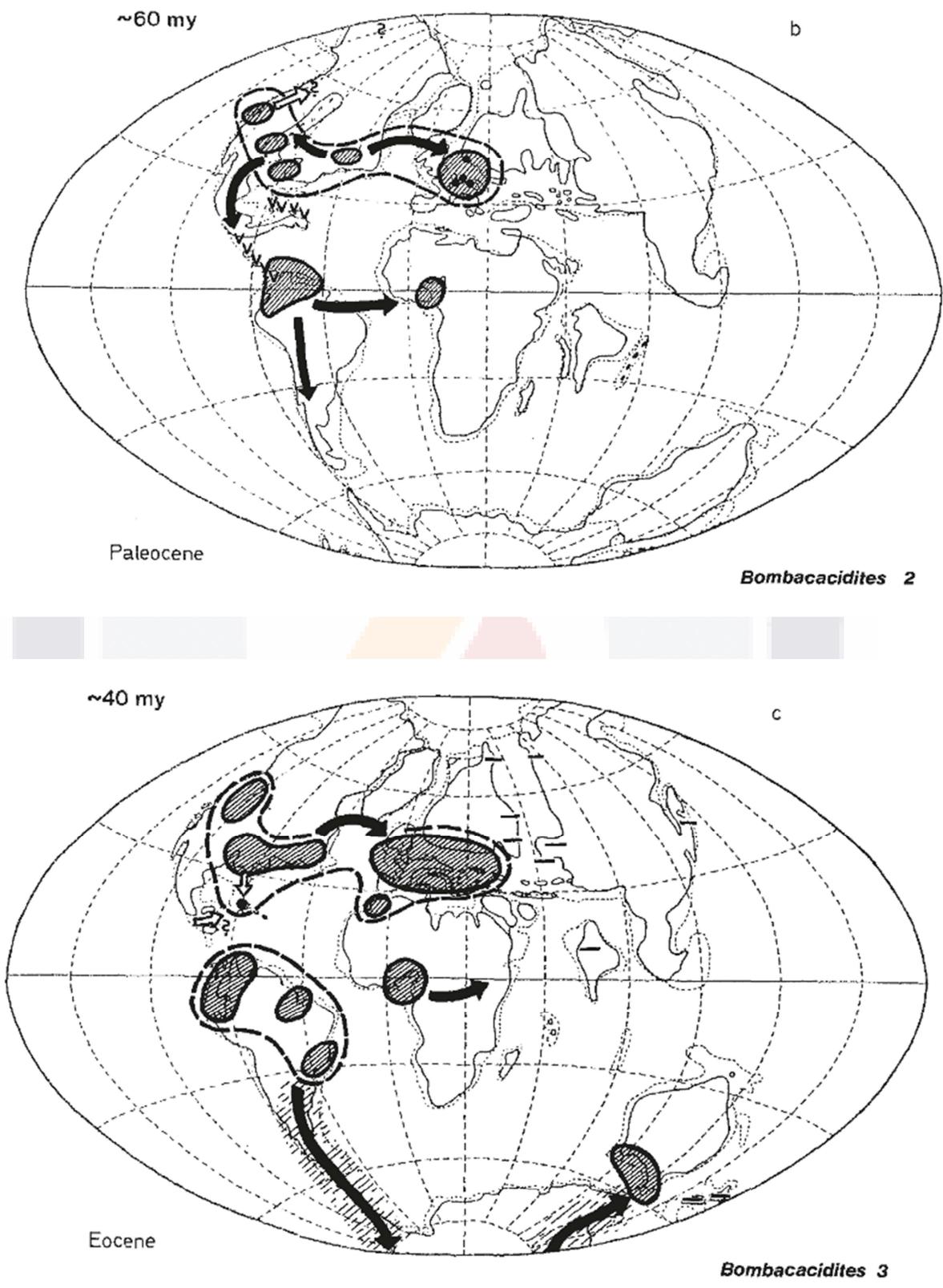


Figura 8 (continuación). Paleocorología de *Bombacacidites*. Tomado de Krutzsch (1989).

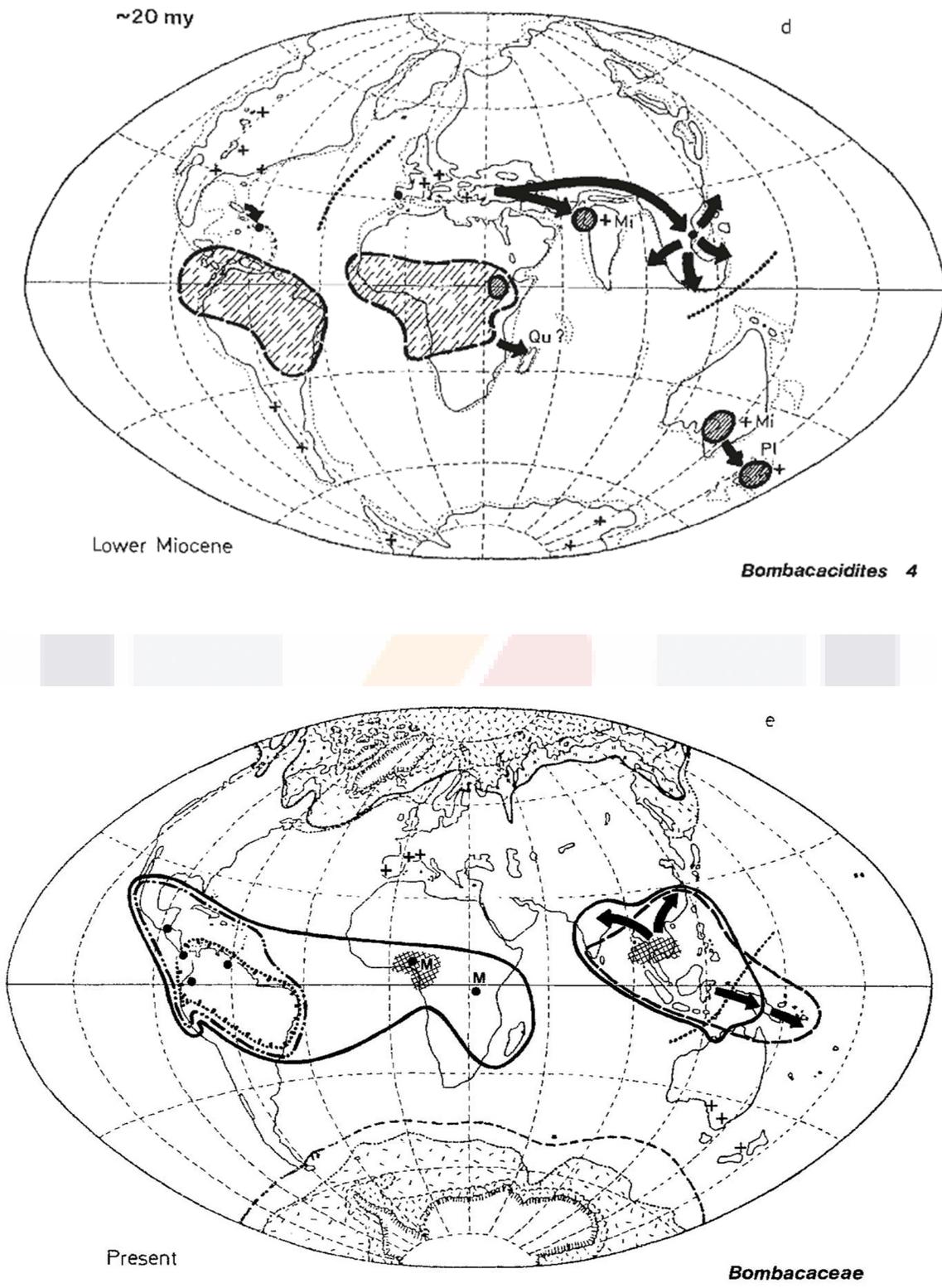


Figura 8 (continuación). Paleocorología de *Bombacacidites*. Tomado de Krutzsch (1989).

1.2 Filogeografía de especies de árboles

Desde el punto de vista evolutivo, la forma de vida arbórea presenta características particulares que le permite incrementar su potencial para la rápida microevolución manteniendo lentas tasas de evolución a nivel macroevolutivo. Estas incluyen un sistema de apareamiento prevalentemente alogámico, reproducción de tipo policárpica, longevidad extrema, gran altura, ciclo de vida prolongado, flujo génico extensivo, selección diversificadora y altos tamaños poblacionales (Loveless y Hamrick, 1984).

Los patrones de diversidad genética resultantes comprenden altos niveles de diversidad genética dentro de las poblaciones con bajos niveles de diferenciación genética entre las poblaciones (Petit y Hampe, 2006). No obstante, la estructura genética derivada de los patrones de diversidad genética, se encuentra influenciada por la acción conjunta de factores como mutación, migración, selección y deriva génica los cuales operan a su vez dentro del contexto histórico y biológico de cada especie. La estructura genética de las plantas equivale a su estructura espacial a causa de la movilidad limitada que presentan (Loveless y Hamrick, 1984).

En adición a los efectos determinísticos de factores ecológicos sobre la estructura genética previamente mencionados, la heterogeneidad ambiental y presiones de selección diferenciales son regularmente considerados como efectos causales de los patrones genéticos y espaciales de las plantas (Loveless y Hamrick, 1984).

El marco conceptual que describe las implicaciones que los procesos ecológicos tienen sobre la estructura genética fue desarrollado por Sewall Wright en 1943. Este marco proporciona el modelo de aislamiento por distancia el cual explica la manera en la que ocurre la subdivisión de poblaciones grandes y aleatoriamente organizadas basándose en el supuesto de que la probabilidad de apareamiento depende de la distancia entre los individuos o de la varianza en la dispersión de los propágulos. El tamaño poblacional que experimenta la misma decadencia de la varianza genética por endogamia o deriva génica que una población panmíctica idealizada se conoce como tamaño efectivo poblacional y es menor que el número real de individuos. Procesos que disminuyen el tamaño efectivo

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

poblacional alteran la estructura genética al incrementar la diferenciación entre poblaciones (Loveless y Hamrick, 1984).

Características particulares de las formas de vida vegetales ejercen un efecto diferencial sobre el tamaño efectivo poblacional. En adición a los rasgos descritos para la forma de vida arbórea, las variables ecológicas que influyen sobre el tamaño efectivo poblacional incluyen la morfología floral, los mecanismos de polinización y de dispersión de semillas, la latencia de semillas, la fenología, el rango geográfico y la estructura espacial de la población (Loveless y Hamrick, 1984).

Los procesos ecológicos previamente descritos complementan la interpretación de los factores causales históricos responsables de la distribución geográfica contemporánea de las poblaciones vegetales. En otras palabras, forman parte del análisis filogeográfico.

1.2.1 Filogeografía de especies de árboles de América.

Las especies de clima templado distribuidas en el continente americano, se encuentran diferencialmente afectadas por el cambio climático dependiendo de la latitud bajo la cual se distribuyan. En particular, el clima ha variado considerablemente en los últimos 3 Ma con el advenimiento de los ciclos glaciales de la época del Pleistoceno (Hewitt, 2000).

En América del Norte, el rango de distribución de la mayoría de las especies de árboles boreales se encontraba cubierto por la capa de hielo Laurentino durante el último máximo glacial. Esto implica que las especies sobrevivieron en refugios sureños a partir de los cuales migraron hacia el norte durante intervalos postglaciales para ocupar su distribución actual (De Lafontaine, Turgeon y Payette, 2010). Por otra parte, las preferencias climáticas y adaptación a distintos tipos de hábitat pueden ejercer efectos diferenciales en especies con distribuciones similares pudiendo observarse cuellos de botella en algunas especies (Saeki et al., 2011).

En Mesoamérica, la distribución y composición de la flora y fauna han sido fuertemente influenciadas por eventos geológicos y climáticos (Cavers, Navarro y Lowe, 2003). Además, la heterogeneidad topográfica y climática de estas regiones han propiciado

migraciones altitudinales, divergencia y diferenciación genéticas (Hewitt, 2000). Esto ha resultado en un alto nivel de endemismos a nivel regional como el observado para los bosques mesófilos de montaña (Hamilton et al., 1995).

En América del Sur, el efecto del clima sobre la vegetación fue menos severo con respecto al inferido para latitudes mayores. Linajes derivados de poblaciones distribuidas en América Central dependieron de eventos geológicos como la formación del istmo de Panamá, para su establecimiento en América del Sur durante períodos climáticamente favorables (Cavers, Navarro y Lowe, 2003).

A continuación, se enlista una selección de estudios filogeográficos sobre especies de árboles de clima templado distribuidas en América. Se indican el tipo de hábitat, mecanismos de polinización y de dispersión de semillas, tipo de marcador empleado y conclusiones derivadas.

América del Norte

a) *Pinus contorta* (Marshall, Newton y Ritland, 2002): Distribuido en el Este de Canadá y noroeste de Estados Unidos en bosque de montaña y subalpinos. Polinización mediada por el viento. Especie alogámica. Abundante producción de semillas y dispersión. Rápido crecimiento juvenil. Tipo de marcador usado: Cloroplasto.

“Expansión postglacial y estructura genética reciente siguiendo gradientes altitudinales y latitudinales. Eventos de dispersión a larga distancia a partir de múltiples poblaciones.”

b) *Picea glauca* (De Lafontaine, Turgeon y Payette, 2010): Distribuido en Canadá y norte de Estados Unidos en bosque boreal. Polinizado y dispersado por acción del viento. Tipo de marcador usado: Cloroplasto.

“Migración partir de refugios glaciales. Expansión de algunas poblaciones hacia el norte alcanzando la tundra durante el Holoceno máximo (6-2.5 Ka). Contracción del rango de distribución por la acción de incendios forestales en Québec (este de Canadá).”

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

c) *Acer rubrum* y *A. saccharinum* (Saeki et al., 2011): Distribuido en el este de Canadá y noroeste de Estados Unidos en bosques deciduos del este de América del Norte. Polinizado y dispersado por acción del viento. Tipo de marcador usado: Cloroplasto.

“Son especies hermanas que divergieron de un ancestro común durante el Plioceno. *A. rubrum* es una especie adaptada a distintos tipos de hábitat y preferencias climáticas estando ampliamente distribuido. Sus poblaciones exhiben estructura filogeográfica y alta diversidad haplotípica. *A. saccharinum* presenta mayor especialización de hábitat y un rango geográfico más restringido. No presenta estructura filogeográfica significativa y posee una baja diversidad haplotípica. Lo anterior sugiere que las poblaciones experimentaron cuellos de botella durante el LGM. *A. rubrum* y *A. saccharinum* comparten haplotipos como resultado de eventos de hibridación durante colonización postglacial en dirección norte.”

Mesoamérica

a) *Cedrela odorata* (Cavers, Navarro y Lowe, 2003): Distribuido en Mesoamérica tropical (del sur de México hasta Colombia) en bosque tropical caducifolio. Árbol deciduo, flores monoicas polinizadas por insectos. Floración anual en árboles de 10-15 años de edad. Las semillas ocurren cada 1 o 2 años. Semillas dispersadas por el viento. Tipo de marcador usado: Cloroplasto.

“Se detectaron 3 poblaciones. Dos de ellas adaptadas a condiciones más secas (norte y centro) mientras que la tercera a condiciones más húmedas (sur). La población del norte es genéticamente más diferente de la población del centro que de la población del sur. Los autores proponen repetidos eventos de colonización para el establecimiento de los patrones biogeográficos observados. Colonización hacia el norte de haplotipos sureños durante periodos climáticamente favorables como aquellos sugeridos para el último máximo glacial. Colonización de haplotipos centrales durante periodos en los que se propició la colonización de formas adaptadas a condiciones secas una vez formado el istmo de Panamá. No se tiene suficiente información para determinar el factor causal de la reducida diversidad genética observada. “

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

b) *Quercus series Virentes* (Cavender-Bares et al., 2011): Distribuidos en el sureste de Estados Unidos, México y América Central. Polinización por viento. Especies interfértiles. *Q. oleoides* ocurre en bosque seco tropical y *Q. virginiana* en bosques en donde las temperaturas de invierno son leves, sin embargo, cuando las temperaturas llegan al punto de congelación son brevemente deciduas. Tipos de marcadores usados: Cloroplasto y núcleo.

“Rupturas geográficas entre México y Estados Unidos durante el Pleistoceno temprano asociadas con el cambio climático en ambas especies. Ruptura geográfica durante el Pleistoceno medio, entre las poblaciones de *Q. oleoides* distribuidas en Costa Rica y Honduras, asociada con la formación de la cordillera de Guanacaste. Alta diferenciación genética y baja diversidad genética en *Q. virginiana* por el cambio climático más pronunciado que se dio en latitudes mayores. Mayor diversidad genética en *Q. oleoides* por el efecto menos pronunciado del cambio climático en latitudes menores (cercanas al trópico).”

c) *Quercus castanea* (Peñaloza-Ramírez et al., 2020): Distribuido en México. Sierra Madre Occidental, Meseta Central, Cinturón Volcánico Transmexicano (CVTM) y Sierra Madre del Sur (SMS) en bosques de encino, pino-encino, mesófilo de montaña y bosque seco tropical. Dispersado por la acción de la gravedad, aves y ardillas. Tipo de marcador usado: Cloroplasto.

“El mayor porcentaje de diversidad genética ocurre entre poblaciones. Alta riqueza de haplotipos y diversidad genética intrapoblacional. Posibles causas de los altos niveles de diversidad genética incluyen introgresión, hibridación, mantenimiento de grandes tamaños efectivos poblacionales por un gran período de tiempo, alta capacidad para colonizar, adaptarse y establecerse en un amplio rango de hábitats y condiciones climáticas. Fuerte estructura filogeográfica. La distribución de la diversidad genética se explica por las subdivisiones en la región oeste del CVTM localizada en Jalisco y la Sierra Madre Occidental. En esta región se originó una depresión tectónica durante el Mioceno

Tardío (graben de Tepic-Zacoalco). Señales de expansión demográfica para las poblaciones distribuidas en el CVTM (5.9 Ma-151 Ka) y la SMS (6.0 Ma-151 Ka). Estas expansiones coinciden con el tiempo de divergencia. Es probable que las poblaciones experimentaron cambios altitudinales en forma de contracciones y expansiones como respuesta a la variación climática opuesto a grandes migraciones latitudinales. El patrón de distribución de diversidad genética observado en adición a la distribución predicha para el UMG, sugiere que los patrones de demografía histórica siguen el modelo de bosque húmedo propuesto por Ramírez-Barahona y Eguiarte (2013) bajo el cual se asume el mantenimiento de la diversidad genética a lo largo del rango de distribución de la especie, niveles importantes de flujo génico y conectividad poblacional durante períodos glaciales.”

América Central

a) *Bursera simaruba*, *Brosimum alicastrum* y *Ficus insípida* (Poelchau y Hamrick, 2011): Distribuidas en El Salvador, Nicaragua, Costa Rica y Panamá en bosques secos y húmedos de tierras bajas. Bosques de galería. *B. simaruba* es polinizada por insectos y dispersada por aves. *B. alicastrum*. es polinizada por insectos y por acción del viento, y dispersada por aves, monos, murciélagos y roedores. *F. insípida*.es polinizado por avispas Agaonidae. Y dispersada por monos, murciélagos y peces. Tipos de marcadores usados: Cloroplasto y núcleo.

“Patrones de estructura genética consistentes con barreras pleistocénicas y disyunciones del Plioceno entre las poblaciones distribuidas en Nicaragua y Costa Rica. En particular, poblaciones de *B. simaruba* no presentan patrones de subdivisión poblacional entre El Salvador y Nicaragua. Variaciones en los patrones de diversidad genética dependen de tolerancias ecológicas diferenciales entre las especies. Potenciales factores históricos que han influido en la estructura genética de las poblaciones incluyen cambio climático, actividad volcánica y cambios en la topografía. Divergencia durante el Pleistoceno. *B. simaruba* no ocurre en América del Sur y probablemente se originó en México. *B. alicastrum* y *F. insípida* se distribuyen de América del Sur a México y probablemente

colonizaron América Central desde América del Sur. No se estimaron eventos de dispersión a larga distancia. Los autores sugieren la existencia de refugios adicionales a los predichos para América del Centro. Lo anterior deriva de observaciones para *B. alicastrum* y *F. insipida*, las cuales ocurren en áreas riparias, bosques de galería, bosques secos y bosques húmedos.”

América del Sur

a) *Otoba parvifolia/glycyarpa*, *Clarisia biflora*, *Poulsenia armata*, *Ficus insipida* y *Jacaratia digitata* (Honorio et al., 2019): Distribuidas en el oeste de la cuenca del Amazonas en bosque húmedo tropical y subtropical. Polinizadas por insectos y dispersadas por vertebrados. Tipos de marcadores usados: Cloroplasto y núcleo.

“Ausencia de estructura filogeográfica entre las especies sugiriendo que no comparten una historia biogeográfica en común. Las especies exhiben patrones idiosincráticos derivados de respuestas específicas a cambios climáticos y geológicos. En adición, la ausencia de patrones filogeográficos que sugieran efectivas barreras climáticas al flujo génico, aboga por la estabilidad climática durante el Pleistoceno en el oeste del Amazonas. Diferenciación genética estimada para el marcador de cloroplasto. Sin embargo, estos patrones no son coincidentes con su posición geográfica. Eventos como la retención de polimorfismos ancestrales e introgresión con subsecuente hibridación durante episodios de recolonización y contacto pueden incrementar la distancia y diferenciación genética entre linajes previamente diferenciados. Especies tolerantes a la sombra presentan mayores niveles de diversidad genética que especies pioneras como consecuencia de las efectividades diferenciales en los mecanismos de flujo génico.”

b) *Carapa spp.*, *C. guianensis* (sensu lato) y *C. surinamensis* (Scotti-Saintagne et al., 2013): Distribuidas en el Escudo guayanés, centro y oeste de la cuenca del Amazonas, región Chocó en Ecuador y América Central en bosque tropical de tierras bajas. Especies monoicas polinizadas por insectos como abejas sin aguijón, escarabajos y polillas. Las

semillas caen debajo del árbol madre y son secundariamente dispersadas por roedores.

Tipos de marcadores usados: Cloroplasto y núcleo.

“Divergencia inicial en el Mioceno. La diversidad haplotípica de *C. surinamensis* se estableció hace aproximadamente 14 Ma mientras que la diversidad haplotípica de *C. guianensis* hace 18 Ma. La distribución de las poblaciones ancestrales derivó de los principales eventos geográficos que determinaron el escenario biogeográfico del Neotrópico. Estos incluyen el levantamiento del istmo de Panamá y de las cordilleras norteñas de los Andes, así como del desarrollo del drenaje amazónico durante el Mioceno tardío. La región oeste de la cuenca del Amazonas alberga la mayor diversidad genética representando putativamente el centro de origen de la diversidad genética de las especies. Subsecuentemente, se dieron eventos de migración hacia la costa del Pacífico de América Central y América del Sur. Por otro lado, la baja diversidad genética observada para América Central es consecuente con los cambios más severos experimentados por la vegetación durante el Pleistoceno dados su hábitat y distribución restringidas. Ausencia de patrón filogeográfico entre América Central y América del Sur como resultado de colonización basada en eventos ocasionales de dispersión a larga distancia a través de corrientes oceánicas. En adición, la posible ineficacia de las barreras geográficas interpoblacionales y de los mecanismos de aislamiento reproductivo entre especies incipientes y crípticas resultan en la ausencia de estructura filogeográfica. La diferenciación genética interpoblacional a nivel regional no se conforma al modelo de aislamiento por distancia. La dispersión limitada de semillas puede constituir un factor responsable de la estructura genética observada. La distribución del polimorfismo compartido entre los genomas nucleares y de cloroplasto sugiere eventos de hibridación.”

1.3 Bosques mesófilos de montaña en Mesoamérica

1.3.1 Definición de bosque mesófilo de montaña

El bosque mesófilo de montaña está compuesto por ecosistemas forestales de distintiva composición florística y estructural. Se caracteriza por la continua entrada de precipitación en forma de cubierta de nubes de índole persistente, frecuente o estacional a nivel de la vegetación. Las nubes envolventes o impulsadas por el viento reducen la radiación solar y el déficit de vapor, mantienen la humectación del dosel y suprimen la evapotranspiración. La precipitación neta en estos bosques aumenta significativamente con la intercepción directa del agua de nube por el dosel y la disminución del uso de agua por la vegetación. Estas condiciones de humedad se dan en zonas altitudinales relativamente estrechas (Hamilton, Juvik y Scatena, 1995) estando su distribución restringida a determinadas regiones montañosas.

En México, el bosque mesófilo de montaña se sitúa entre los 800 y 2,200 msnm (Morrone, 2019). Se localiza de manera fragmentada y como una faja angosta en la vertiente este de la Sierra Madre Oriental extendiéndose desde el suroeste de Tamaulipas hasta el norte de Oaxaca, incluyendo las porciones de San Luis Potosí, Puebla y Veracruz. En Oaxaca incrementa de manera reducida su extensión, pero se interrumpe a nivel del istmo de Tehuantepec. En Chiapas se localiza en la vertiente septentrional del Macizo Central y en los declives de la Sierra Madre (Rzedowski, 1994) y se extiende hacia el núcleo centroamericano abarcando una extensión más amplia (Bruijnzeel et al., 2010). En la vertiente pacífica al oeste del istmo de Tehuantepec su distribución es aún más fragmentada pues se encuentra confinado a los fondos de cañadas y laderas protegidas. Se localiza desde el norte de Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, de la cuenca del Balsas y del valle de México. Únicamente en la vertiente exterior de la Sierra Madre del Sur de Guerrero y Oaxaca existen manchones continuos de cierta consideración (Rzedowski, 1994).

1.3.2 Patrones fitogeográficos

Los bosques mesófilos de montaña neotropicales albergan un alto nivel de biodiversidad como consecuencia del intercambio histórico entre especies de origen neártico y neotropical (Gentry, 1982).

El intercambio de estas especies se ha dado durante diferentes tiempos geológicos siendo el establecimiento de linajes antiguos dependiente de eventos climáticos y geológicos sobrellevados previo al advenimiento de las oscilaciones climáticas del Pleistoceno. Por tanto, los patrones fitogeográficos observados se han desarrollado por el mantenimiento de la diversidad filogenética de linajes antiguos y el establecimiento de linajes tardíamente divergentes (Gentry, 1982; Luna-Vega y Magallón, 2010). La divergencia tardía de linajes ha dependido del cambio climático del Cuaternario (Gentry, 1982).

1.3.3 Patrones biogeográficos de los bosques mesófilos de montaña en México

Corral-Rosas y Morrone (2016) efectuaron un análisis biogeográfico usando métodos cladísticos para determinar correspondencia entre el área de distribución de cenocrones o grupo de organismos que comparten historia biogeográfica en México y sus relaciones filogenéticas. Las provincias biogeográficas evaluadas fueron la Neártica (NEA), Neotropical (NEO), Sierra Madre Occidental (SMOc), Sierra Madre Oriental (SMOr), Sierra Madre del Sur (SMS), cinturón volcánico transmexicano (TVB) y las tierras altas de Chiapas (CHI, Sierra Madre del Sur + Macizo Central de Chiapas). Estas forman la denominada Zona de Transición Mexicana la cual se define como la zona de contacto entre las biotas de origen Neártico y Neotropical. El análisis fue definido en base a tres intervalos de tiempo: Mioceno, Plioceno y Pleistoceno. El cladograma más parsimonioso para el Mioceno indica una secuencia consecutiva de las relaciones entre los cenocrones localizados de norte a sur y relaciones estrechas que coinciden con la proximidad de las regiones. En el Plioceno, se estiman dos clados definidos por latitud norte y sur. El del sur consiste en CHI y NEO y el del norte en SME+SMS y con NEA y SMO+TVB como grupo hermano. Para el Pleistoceno se estiman las mismas relaciones que para el Plioceno, sin embargo, se obtiene un segundo cladograma en el cual las separaciones en norte y sur consisten en NEA con SMO+TVB como

grupo hermano y en CHI+NEO con SMS+SME como grupo hermano respectivamente. La afinidad biogeográfica de la zona de transición mexicana varía en función del cenocrón analizado. Los autores concluyen que, para biota de origen neártico, el Cinturón Neovolcánico Transmexicano puede constituir una ruta de dispersión de norte a sur. Asimismo, se estima que durante el Plioceno y Pleistoceno el Cinturón Neovolcánico Transmexicano, la Sierra Madre Occidental y la Sierra Madre Oriental se encontraban relacionados con la región Neártica.

1.3.4 Estudios filogeográficos en especies de bosque mesófilo de montaña

Se ha propuesto que, durante la edad glacial, las montañas tropicales proporcionaron un hábitat húmedo estable en el cual las especies más antiguas lograron sobrevivir y generar nuevos linajes. La variada topografía de las montañas permite la persistencia de hábitats y linajes mediante cambios altitudinales y la divergencia promovida por disección distribucional (Hewitt, 2000).

La continuidad de la distribución de especies de bosque mesófilo de montaña en Mesoamérica se ha visto interrumpida significativamente por el istmo de Tehuantepec. Más aún, la adaptabilidad de hábitat limitada y restringida de estas especies las hace particularmente susceptibles al cambio climático. La temporalidad e intensidad de cambio climático más estudiados corresponden al ocurrido durante la época del Pleistoceno por ser de índole reciente en tiempo geológico. Las consecuencias demográficas y genéticas de los ciclos glaciales comprenden reducción, mantenimiento o incremento del tamaño efectivo poblacional, extinción, migración, incremento o reducción de los niveles de diversidad genética, divergencia y diferenciación genética. Estas consecuencias varían en función del nivel de idoneidad climática, del mecanismo de dispersión, reproducción y de la historia evolutiva. La descripción y conclusiones derivadas de estudios filogeográficos sobre especies de bosque mesófilo de montaña en Mesoamérica se enlistan a continuación:

- a) *Psittacanthus schiedeanus* (Ornelas et al., 2016): Distribuido en el norte de Mesoamérica. Flores hermafroditas con potencial para la autofertilización. Polinización

mediada por colibríes. Dispersión de semillas (una semilla por fruto) mediada por una variedad de aves. Parasita más de 20 especies de árboles. Tipos de marcadores usados: Cloroplasto y núcleo.

“Bajos niveles de estructura genética. Restricción de flujo génico por diferencias en hábitat. Expansión poblacional e invasión postglaciales independiente del tipo de hospedero. Divergencia simultánea de poblaciones a partir de una población ancestral que data de 217,800 años (previo al período glacial de Illinois (191-130 Ka) asumiendo un tiempo generacional de 11 años. Origen del clado corona en el Plioceno temprano. Diversificación durante el Pleistoceno temprano (2.55 Ma) y separación de *P. auriculatus* 2.80 Ma. Estructura filogeográfica. Cloroplasto muestra subdivisión genética interpoblacional entre grupos separados por hábitat (bosques mesófilos de montaña de San Luis Potosí a Oaxaca y Chiapas (SCHI); vegetación xérica de Oaxaca central (CALY); bosques deciduos tropicales de Chiapas (BREE)). Sin embargo, la ocurrencia extendida de haplotipos de cloroplasto sugiere que la dispersión por aves ha permitido el flujo génico de semillas en dirección norte a sur. El núcleo no muestra diferencias significativas entre grupos. Lo anterior sugiere que la dispersión de semillas es más limitada que la polinización. Baja diversidad nucleotídica. Expansión poblacional del grupo SCHI (80-100 Ka) y durante el UMG siguiendo los patrones de conectividad resultantes de la expansión y migración del bosque mesófilo de montaña hacia elevaciones más bajas. Tamaño efectivo poblacional ancestral mayor que las poblaciones agrupadas por hábitat. Tiempo de divergencia entre SCHI y CALY+BREE de 1 Ma. Migración de CALY+BREE a SCHI. Las poblaciones de *P. schiedeana* presentan cambios poblacionales que siguen la dinámica poblacional y de distribución observadas para especies de bosque mesófilo de montaña en respuesta a procesos geológicos y climáticos.”

- b) *Liquidambar styraciflua* (1. Morris et al., 2008; 2. Ruiz-Sánchez y Ornelas, 2014): Distribuido en el sureste de Estados Unidos, este de México y Guatemala. Árbol monoico. Polinización mediada por el viento. Dispersión de semillas por viento, las cuales también

son consumidas por aves, ardillas y tamias (ardillas rayadas). Especie pionera de rápido crecimiento. Tipo de marcador usado: Cloroplasto.

1: “Altos niveles de variación genética en EUA. México y Guatemala comparten haplotipos con Texas, Mississippi, Kentucky, Ohio y norte de Virginia sugiriendo la retención de polimorfismos ancestrales. Refugio en Florida peninsular a lo largo del este del Atlántico. Los principales clados intraespecíficos (EUA) divergieron hace aproximadamente 8.34 Ma y no coincide con la disyunción entre el este EUA y México. Los clados distribuidos cerca de la costa del este divergieron durante el Pleistoceno (1.89 Ma). Los clados recuperados pueden representar relictos de una especie con mayor distribución en Alaska, Idaho, Georgia, Kansas y este de México y que data del Mioceno.”

2: “Las poblaciones forman tres grupos: a) Bosques mesófilos de montaña de la Sierra Madre Oriental al norte del TMVB, b) Región de los Tuxtlas, c) Sur del TMVB. Flujo génico histórico entre las poblaciones separadas por el TMVB. Fragmentación alopátrica. Llegada a México del elemento templado durante el Mioceno consistente con datos de fósiles y la presencia de *Liquidambar* en la formación Paraje Solo en el sureste de Veracruz. Altos niveles de diversidad genética dentro de las poblaciones. Estructura filogeográfica. Disyunción entre el noreste de Texas y México. La distribución permaneció disyunta durante los ciclos glaciales/interglaciales del Pleistoceno. Sin embargo, el origen de esta disyunción data del Mioceno temprano a Mioceno medio. Esta distribución disyunta resultó posiblemente de vicarianza de un linaje ancestral de distribución más amplia. Sorteó incompleto de linajes. Mayor colonización de sur a norte que de norte a sur. Colonización hacia el norte fue facilitada por similitud de nicho. El clado de la meseta de Cumberland y del sur de los Apalaches es monofilético mientras que el de la costa del golfo en EUA y Mesoamérica es parafilético. El cinturón volcánico transmexicano (TMVB) constituye una barrera que ha impulsado la divergencia genética de las poblaciones de *L. styraciflua* como resultado de las diferencias de nicho ambiental durante el Plioceno y la formación del arco volcánico del Cuaternario (3.6 Ma) y el origen Mesoamericano de las poblaciones en EUA. Esta divergencia data de 4.27-1.42 Ma (Plioceno a Pleistoceno medio). Refugio en las costas del golfo y Atlántico.”

c) *Palicourea padifolia* (Gutiérrez-Rodríguez, Ornelas y Rodríguez-Gómez, 2011): Distribuido en el este de México: Arbusto con separación espacial y morfológica de la polinización floral evitando con ello la autopolinización. Es dispersado por aves. Polinización por pequeñas abejas, abejorros, mariposas y colibríes. Tipo de marcador usado: Cloroplasto.

“Ruptura filogeográfica en el istmo de Tehuantepec. El papel biogeográfico del istmo se encuentra soportado por la correspondencia entre los patrones de estructura geográfica, y la fragmentación histórica y expansión demográfica. Las poblaciones permanecieron aisladas durante los ciclos glaciales y acumularon diferencias genéticas en ausencia de migración a lo largo del istmo. Los resultados no son consistentes con la existencia de los refugios pleistocénicos previamente propuestos para especies de bosque mesófilo de montaña en la región. Rápida expansión demográfica de ambos grupos separados por el istmo a partir de una población ancestral con tamaño efectivo poblacional pequeño. Divergencia y diferenciación en ausencia de flujo génico durante el Pleistoceno medio. Algunos haplotipos se comparten entre los grupos genéticos separados por el istmo, sugiriendo la retención de polimorfismos ancestrales o sorteo incompleto de linajes. Aislamiento por distancia. Alta diversidad genética en la mayoría de las poblaciones. Lo anterior es consistente con los resultados obtenidos para otras especies alogámicas. Esta diversidad genética puede derivar de las siguientes alternativas: 1) La especie no fue drásticamente afectada por las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno, 2) No ocurrieron cambios altitudinales drásticos a lo largo de su rango de distribución, 3) La dispersión de semillas por aves promovió la rápida colonización en bosques mesófilos de montaña, y/o 4) Selección diferencial de los haplotipos de cloroplasto.”

d) *Podocarpus matudae* (Ornelas, Ruiz-Sánchez y Sosa, 2010): Distribuido en México y Guatemala. Árbol dioico polinizado por el viento y dispersado por aves. Tipo de marcador usado: Cloroplasto.

“Las poblaciones son relictos del pre-Cuaternario lo cual coincide con la ocurrencia de datos de fósiles y polen que datan del Mioceno para los elementos florísticos templados de los bosques mesófilos de montaña mesoamericanos. Disyunción entre las poblaciones de la Sierra Madre Oriental, la Sierra de los Tuxtlas, Chiapas y Guatemala data de 10-20 Ma previo a la formación del istmo de Tehuantepec en el Mioceno tardío (6 Ma), la aparición de la Sierra de los Tuxtlas en el Plioceno tardío (3 Ma) y el término de la formación del istmo de Panamá (3 Ma). Las poblaciones de Chiapas y Guatemala se fragmentaron aún más durante los períodos interglaciales del Pleistoceno incrementando la acción de deriva génica y endogamia dentro de cada población aislada, o previo al Cuaternario como lo soportan los registros fósiles y de polen del Mioceno durante el cual se infieren extensos bosques de *Podocarpus*. Divergencia de haplotipos dentro de la Sierra Madre Oriental, Chiapas y Guatemala durante el Pleistoceno coincidiendo con la ocurrencia de refugios. Ausencia de estructura genética dentro de las poblaciones de la Sierra Madre Oriental como posible resultado de eventos de expansión y contracción durante el Pleistoceno mientras que las poblaciones en Chiapas y Guatemala permanecieron sin ser afectadas. Falta de diferenciación genética entre haplotipos separados por el istmo de Tehuantepec que puede reflejar la retención de polimorfismos ancestrales. No hay evidencia de eventos de dispersión a larga distancia. Correlación entre las distancias genéticas y geográficas. Baja diversidad genética en poblaciones aisladas.”

e) *P. matudae*, *P. oleifolius* y *P. guatemalensis* (Ornelas et al., 2019):

P. matudae se distribuye en el norte de Mesoamérica (México y Guatemala) en bosque mesófilo de montaña y de pino/encino. *P. oleifolius* y *P. guatemalensis* se distribuyen en México, América Central y América del Sur. *P. oleifolius* ocurre en bosques mesófilos de montaña, bosques enanos y selva montana baja y *P. guatemalensis* en bosque húmedo de baja elevación. Tipo de marcador usado: Cloroplasto.

“Diferenciación genética entre especies. *P. matudae* y *P. oleifolius* permanecieron *in situ* dentro de su actual distribución fragmentada y expansión espacial hacia tierras bajas

durante el LGM. Sin embargo, únicamente se detectó expansión demográfica en *P. oleifolius*. *P. guatemalensis* no ha presentado cambios significativos en su distribución desde el LIG. Potencial superposición de los rangos distribucionales durante el LGM por la migración hacia tierras bajas. Posible ocurrencia de híbridos, particularmente entre *P. oleifolius* y las otras dos especies. *P. matudae* permaneció *in situ* en la mayoría de su rango de distribución por lo menos desde los últimos 130 Ka. La diferenciación genética de sus poblaciones se encuentra promovida por la fragmentación de los bosques mesófilos de montaña de la región. Los patrones geográficos de diversidad no se explican por divergencia alopátrica de las poblaciones promovida por la presencia de barreras biogeográficas o por cambios en los regímenes de precipitación y temperatura inferidos para los ciclos glaciales del Pleistoceno. La diferenciación genética data de un origen más antiguo previo a la época del Pleistoceno como lo soporta el registro fósil y de polen. Se infiere la llegada de estos elementos templados a Mesoamérica durante el Mioceno y eventos de dispersión a larga distancia durante el Plioceno. La divergencia entre las poblaciones de la Sierra Madre Oriental, Chiapas y Guatemala data del Pleistoceno.”

- f) *Podocarpus matudae* (gimnosperma), *Liquidambar styraciflua*, *Palicourea padifolia*, *Moussonia deppeana* y *Rhipsalis baccifera* (angiospermas), *Peromyscus aztecus*, *Reithrodontomys sumichrasti*, *Habromys lophurus* (roedores), *Amazilia cyanocephala*, *Campylopterus curvipennis*, *Lampornis amethystinus* (colibríes), *Lepidocolaptes affinis* (trepatroncos), *Chlorospingus ophthalmicus*, *Buarremon brunneinucha* y *Basileuterus belli* (paseriformes) (Ornelas et al., 2013): Distribuidos en el norte de Mesoamérica. Tipos de marcadores usados: cloroplasto y núcleo en plantas. Mitocondria en animales.

“La divergencia de la mayoría de las especies ha sido promovida por la ocurrencia del istmo de Tehuantepec. Sin embargo, esta divergencia se ha llevado a cabo durante diferentes tiempos geológicos dentro del Pleistoceno, Plioceno temprano y Mioceno tardío. Rupturas filogeográficas con divergencias no simultáneas, en la Depresión Central de Chiapas, los Tuxtlas (aislada de la Sierra Madre Oriental), las poblaciones de Chiapas y los Tuxtlas separadas por el istmo de Tehuantepec ocurrieron durante el Pleistoceno

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tardío. La historia evolutiva de los linajes contemporáneos que habitan los bosques mesófilos de montaña es compleja y específica de cada linaje por las diferencias en requerimientos de nicho y capacidades de dispersión.”

1.3.5 Refugios pleistocénicos

Las consecuencias genéticas y demográficas sugeridas para especies de bosque mesófilo de montaña durante el último máximo glacial fueron definidas por Ramírez-Barahona y Eguiarte (2013). Estas se definen bajo modelos que describen condiciones climáticas que varían en función de la precipitación.

1.3.5.1 Hipótesis del refugio seco

Este modelo es una extrapolación de la hipótesis propuesta tradicionalmente para bosques tropicales de tierras bajas. Bajo este escenario se proponen refugios localizados en elevaciones medianas de las regiones montañosas en donde las condiciones de temperatura y humedad permanecieron estables durante los intervalos glaciales.

Los bosques mesófilos de montaña fueron desplazados y comprimidos en refugios por los efectos opuestos de aridez y enfriamiento. Subsecuentemente las poblaciones se expandieron y recolonizaron su rango previo de distribución con el inicio de condiciones húmedas y cálidas durante intervalos interglaciales.

El efecto de deriva génica desarrollado por el reducido tamaño y aislamiento de estas poblaciones, comprendería un aumento en la probabilidad promedio de la identidad por descendencia. Este estaría reflejado en el sorteo de alelos y fijación de diferentes alelos en refugios separados. Las poblaciones de diferentes refugios se volverían genéticamente diferentes con la acumulación de nuevas mutaciones y monofilia recíproca. Las poblaciones actuales serían por lo tanto significativamente divergentes y los niveles observados de diferenciación genética serían dependientes de la extensión de las poblaciones en refugios y de los niveles de flujo génico histórico entre ellas.

La contracción demográfica y subsecuente expansión tendrían un efecto marcado sobre la distribución de la frecuencia de las diferencias alélicas. Los linajes derivados de

estas poblaciones estarían caracterizados por un exceso de alelos raros separados por pocos pasos mutacionales. Por tanto, se espera que estas poblaciones en expansión exhiban una distribución unimodal de las diferencias alélicas y una genealogía de genes en forma de estrella.

La recolonización de regiones localizadas fuera de los refugios involucraría eventos repetidos de dispersión a larga distancia a través de grandes áreas geográficas. Este proceso resultaría en una disminución de la riqueza alélica por la repetición de efectos fundadores. La ocurrencia de los efectos fundadores estaría por tanto negativamente asociada con la capacidad de dispersión de la especie.

La disminución de la diversidad genética sería dependiente de la capacidad de dispersión de la especie y del tiempo transcurrido. Los alelos comunes presentes en refugios serían automáticamente más frecuentes en áreas recolonizadas mientras que los alelos raros se acumularían alrededor de las poblaciones refugio resultando en una alta probabilidad de agrupamiento geográfico de estos alelos.

La pérdida de diversidad genética rompería el patrón de aislamiento por distancia inclusive en especies con capacidades de dispersión que promueven dicho patrón. Sin embargo, la dinámica de colonización fuera de un refugio también resultaría en un patrón de aislamiento por distancia porque la diferenciación genética alcanza el estado de equilibrio de aislamiento por distancia relativamente rápido. En resumen, la distribución geográfica de la diversidad genética de linajes existentes derivados de poblaciones que sobrevivieron en refugios sería determinado por la variación genética encontrada en refugios y por la capacidad de dispersión de la especie.

1.3.5.2 Modelo del bosque húmedo

Este modelo sostiene que cambios en la precipitación tuvieron un efecto reducido sobre la continuidad del bosque. El mantenimiento de las condiciones de humedad favoreció la expansión del rango con migración cuesta abajo de la región montañosa, crecimiento demográfico ausente o reducido, y conectividad poblacional durante los

intervalos glaciales, seguidos de fragmentación en poblaciones de alta altitud durante los intervalos cálidos interglaciales.

En poblaciones grandes y continuas el sorteo de linajes y cuellos de botella demográficos tienen poca probabilidad de ocurrir. Poblaciones existentes derivadas de linajes con divergencia previa al último glacial exhibirían marcada diferenciación genética inclusive bajo la ocurrencia del efecto homogeneizador de la variación genética ejercido por el flujo génico durante la expansión del bosque. Sin embargo, a diferencia de lo descrito por el modelo de los refugios secos, los linajes divergentes tendrían una distribución amplia y no mostrarían estructura geográfica. En general, la diversidad genética estaría favorecida y mantenida a lo largo del rango de la especie debido a la heterogeneidad del hábitat y al flujo génico significativo entre las poblaciones.

Posterior a la fragmentación, las poblaciones existentes estarían compuestas básicamente del mismo conjunto de alelos resultando en una estructura génica difusa. Este conjunto de alelos mostraría una genealogía más compleja que la esperada bajo el modelo de los refugios secos. Las diferencias alélicas no mostrarían una distribución unimodal. Los alelos raros serían aleatoriamente producidos a lo largo del rango de la especie y tendrían baja probabilidad de agruparse.

El proceso de recolonización consistiría en migración altitudinal geográficamente localizada. Efectos de fundador repetidos tendrían baja probabilidad de ocurrir durante la colonización cuesta arriba de la región montañosa debido a que la inmigración posterior a la fundación sería altamente probable. Por tanto, la diversidad genética en especies con migración altitudinal no mostraría un evidente gradiente geográfico. En contraste, la conectividad entre las poblaciones resultaría en el desarrollo de un patrón de aislamiento por distancia. Este patrón surge de la restricción geográfica de la dispersión resultando en la acumulación de diferencias genéticas locales y el incremento de la diferenciación genética con la distancia.

1.4 JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo de investigación se encuentra dirigido al estudio filogeográfico de la especie de árbol comúnmente conocida como árbol de las manitas (*Chiranthodendron pentadactylon*). Este es un árbol de hoja perenne que se distribuye en bosque mesófilo de montaña y en menor medida en bosque de pino-encino del sur de México y Guatemala en Mesoamérica. Mesoamérica es una región neotropical que constituye uno de los 25 puntos calientes (*hotspots*) de biodiversidad (Myers et al., 2000). El alto nivel de biodiversidad de esta región resulta de su posición geográfica con respecto a las regiones Neártica y Neotropical (Challenger y Soberón, 2008; Ruíz-Sánchez y Ornelas, 2014; De Albuquerque et al., 2015).

La posición de intersección entre estas regiones ha promovido el intercambio florístico entre las regiones Neártica y Neotropical durante distintos períodos de tiempo resultando en un patrón fitogeográfico particular que consiste en especies filogenéticamente diversas (Luna-Vega y Magallón, 2010). En adición, las heterogeneidades topográfica y climática de las regiones montañosas que albergan los ecosistemas de bosque mesófilo de montaña y de bosque de pino-encino favorecen el establecimiento de microhábitats y del subsecuente desarrollo de especies endémicas (Challenger y Soberón, 2008; Alfonso-Corrado et al., 2017). Por tanto, el mantenimiento de esta biodiversidad representa un importante servicio ecosistémico. Los numerosos servicios ecosistémicos que proporcionan las distintivas especies de bosque mesófilo de montaña (Aldrich et al., 2000; Bubb et al., 2004) incrementan el valor estratégico de conservación abogando por la necesidad de estudios enfocados en la determinación del estado genético de sus poblaciones y de sus correspondientes implicaciones en términos de reproducción y adaptación en particular ante el cambio climático actual.

El estudio filogeográfico de *C. pentadactylon* proporciona información relacionada con la amplitud del efecto de factores históricos y contemporáneos sobre estos ecosistemas con respecto a especies con características ecológicas similares. Como parte del análisis filogeográfico, se estiman valores de diversidad genética y estructura genética. Estos valores representan el estado genético de las poblaciones, el cual permite realizar

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

predicciones acerca de la respuesta al cambio climático en términos de adaptación. En adición, los factores históricos inferidos como determinantes de la distribución geográfica actual de las poblaciones, así como su efecto sobre la dinámica poblacional, constituyen evidencia empírica acerca del modo mediante el cual la especie ha respondido al cambio climático histórico. Esto representa un punto de referencia para la predicción de las respuestas que podría exhibir la especie ante el cambio climático actual.

Los resultados obtenidos del estudio filogeográfico de *C. pentadactylon* complementa el valor estratégico de conservación de los ecosistemas de bosque mesófilo de montaña y de bosque pino/encino. En la actualidad, los ecosistemas forestales en el trópico están amenazados por la influencia de las altas tasas persistentes de deforestación y de degradación forestal, recolecta excesiva, especies invasoras y cambio climático global, factores adversos que podrían hacer que los bosques tropicales sean el epicentro de extinciones actuales y futuras (Gardner et al., 2009).

En la actualidad, *C. pentadactylon* se encuentra clasificada como vulnerable en México por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN por sus siglas en inglés) (González-Espinosa et al., 2011) y como amenazada por la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010) lo cual implica que sus poblaciones podrían encontrarse en peligro de desaparecer a corto y mediano plazo si siguen operando los factores que inciden negativamente en su viabilidad como son el deterioro o modificación de su hábitat o disminución directa del tamaño de sus poblaciones. En Guatemala, está clasificada como amenazada por la IUCN (Vivero et al., 2006) como consecuencia de la disminución de su rango de distribución y tamaño poblacional derivadas de la tala de árboles y explotación.

La conservación de *C. pentadactylon* representa también una necesidad económica pues posee usos en medicina y gastronomía. Además, la forma característica de la flor le ha adjudicado valor religioso y cultural.

1.5 HIPÓTESIS

Chiranthodendron pentadactylon presenta poblaciones naturalmente fragmentadas en bosques mesófilos de montaña y/o pino-encino en México y Guatemala, por lo que se espera presente una estructura genética y filogeográfica, donde sus poblaciones podrían presentar una historia demográfica con disminuciones en el tamaño efectivo poblacional o cuellos de botella debido a las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno, además de inferir las rutas de dispersión de la especie.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 *Objetivo general*

Inferir el patrón filogeográfico de *Chiranthodendron pentadactylon* usando marcadores obtenidos a través de la secuenciación asociada a sitios de restricción (RAD-Seq).

1.6.2 *Objetivos particulares*

Estimar la diversidad genética y estructura genética de poblaciones de *Chiranthodendron pentadactylon*.

Inferir los procesos históricos y demográficos que moldearon la estructura genética y filogeográfica de las poblaciones de *Chiranthodendron pentadactylon*.

Capítulo 2. METODOLOGÍA

2.1 Trabajo de campo.

El muestreo de material vegetal (hojas) se realizó de un número representativo de ejemplares (Tabla 1) localizados a lo largo de la distribución registrada para *C. pentadactylon* en las bases de datos de GBIF (GBIF.org (08 March 2017) GBIF Occurrence Download <https://doi.org/10.15468/dl.nh3qsu>), TROPICOS (<http://legacy.tropicos.org/Name/3900594>, Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO, USA; disponible en: <http://www.tropicos.org>) y REMIB (http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/remib_esp.html). La distribución geográfica de los sitios de colecta se muestra en la Figura 9 en donde: (1) Carrizal de Bravo, Guerrero. (2) San Mateo Río Hondo, Oaxaca. (3) San Cristóbal de las Casas, Chiapas. (4) Motozintla, Chiapas. (5) Volcán Tacaná, Chiapas. (6) Totonicapán. (7) Sierra de los Cuchumatanes, Huehuetenango. (8) Chimaltenango-Quetzaltenango. (9) Volcán Acatenango, Chimaltenango.

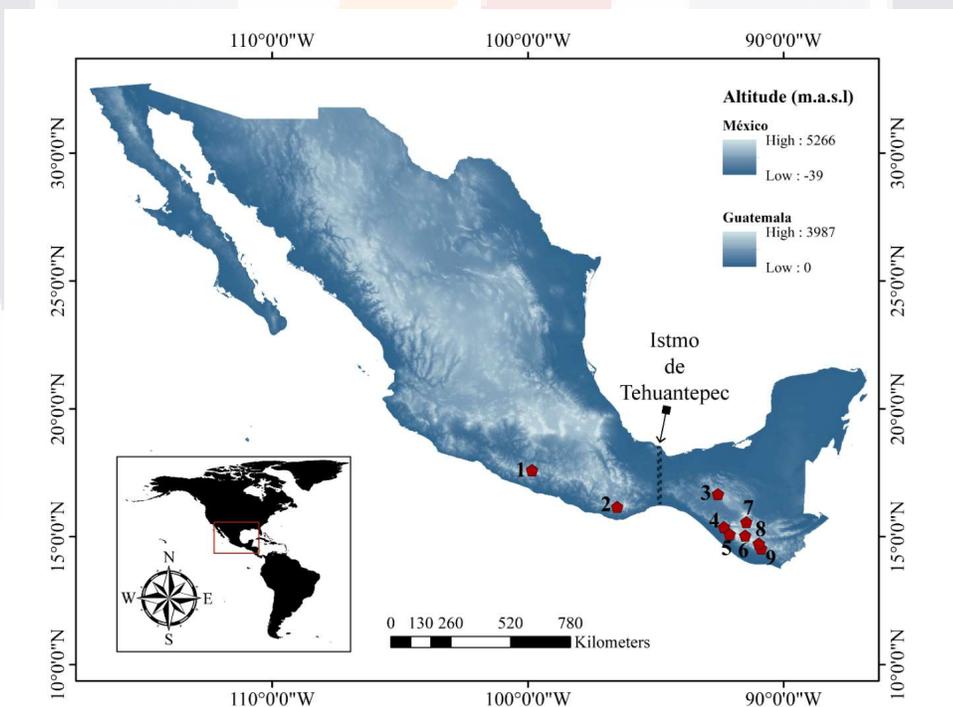


Figura 9. Distribución geográfica de las localidades muestreadas para *C. pentadactylon* en México y Guatemala.

Tabla 1. Información de muestreo. Localidades muestreadas, información geográfica (latitud y longitud), número de ejemplares muestreados (n) y características del sitio incluyendo altitud y tipo de vegetación. En adición, se muestra el nombre del colector y fecha de colecta.

Localidad	n	Latitud (N)	Longitud (O)	Altitud (msnm)	Tipo de vegetación	Colector(es)	Fecha
Carrizal de Bravo, Guerrero, México	10	17° 36' 8.64"	99° 50' 9.6"	2607	Bosque mesófilo de montaña	Prócoro Almazán Ramírez	24/02/2018
San Mateo Río Hondo, Oaxaca, México	10	16° 10' 6.96"	96° 30' 6.84"	2601	Bosque de pino-encino	K. Machuca-Machuca et al.	ND
Motozintla, Chiapas, México	5	15° 22' 53.18"	92° 19' 43.72"	2258	Bosque mesófilo de montaña	Eduardo Ruiz Sánchez	05/11/2017
Unión Juárez, volcán Tacaná, Chiapas, México	5	15° 5' 57.88"	92° 6' 12.35"	2222	Bosque mesófilo de montaña	Eduardo Ruiz Sánchez	05/11/2017
San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México	5	16° 40' 10"	92° 33' 47"	2342	Bosque mesófilo de montaña	Andrés Ortíz	13/08/2018
Chimaltenango, volcán Acatenango, Guatemala	10	14° 32' 23.21"	90° 52' 27.59"	2468	Bosque mesófilo de montaña	D. Hdz Langford, M. E Siqueiros, Mario Véliz	10/04/2018
Chimaltenango-Quetzaltenango, Guatemala	9	14° 44' 7.26"	90° 57' 54.48"	2284	Bosque mesófilo de montaña	D. Hdz Langford, M. E Siqueiros, Luis Velásquez	11/04/2018
Totonicapán, Pologuá, Guatemala	5	15° 2' 43.98"	91° 29' 58.13"	2790	Bosque mesófilo de montaña	D. Hdz Langford, M. E Siqueiros, Luis Velásquez	11/04/2018
Huehuetenango, Sierra de los Cuchumatanes, Guatemala	10	15° 34' 20.21"	91° 27' 16.13"	2904	Bosque mesófilo de montaña	D. Hdz Langford, M. E Siqueiros, Luis Velásquez	12/04/2018

2.2 Trabajo de laboratorio.

2.2.1 Extracción de ADN genómico.

Las muestras de material vegetal (hojas) fueron procesadas para la extracción de ADN genómico de alta calidad basada en el protocolo de extracción descrito por Doyle y Doyle (1990) y modificado por Morse (2017). Este protocolo se caracteriza por el uso del bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) como solución tampón en la extracción de ADN. Es importante señalar que el material de hoja de *C. pentadactylon* contiene grandes cantidades de polisacáridos los cuales interfieren en la cuantificación y evaluación de la calidad de ADN genómico. La remoción del exceso de polisacáridos se realizó mediante adicional incubación con la enzima pectinasa. En adición, se realizó la extracción de ADN genómico de muestras de hojas de las especies *Fremontodendron californicum* y *F. mexicanum* para ser incluidas como grupo externo en subsecuentes análisis.

2.2.2 Pesado de material vegetal y homogeneización del tejido.

Se pesaron de 8 a 10 mg de material vegetal por muestra los cuales se colocaron en un tubo con tapa de rosca y con una capacidad de volumen de 2 ml. En cada tubo representativo de cada muestra se agregaron aproximadamente 40-50 microesferas de sílice para lisis. Posteriormente se sumergió cada tubo en nitrógeno líquido por 30 segundos y el contenido se homogeneizó por agitación mecánica durante 20 segundos.

2.2.3 Remoción de proteínas y lípidos.

Se agregaron 800 μ l de solución CTAB a cada tubo en adición a 5 μ l de enzima proteinasa K, 5 μ l de ARNasa A y 5 μ l de β -Mercaptoetanol. El material adherido a las paredes del tubo fue desprendido con ayuda de un agitador vórtex. Posteriormente cada tubo fue incubado a 50°C en baño María por aproximadamente 45 minutos y a 65°C por 70 minutos. Se transfirió la solución a un tubo nuevo de 1.5 ml en el cual se agregaron 600 μ l de cloroformo y se agitó ligeramente por 10 minutos. Después se centrifugó cada tubo a 12,000 rpm por 10 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo.

2.2.4 Precipitación del ADN y remoción de polisacáridos.

Se agregaron 100 μ l de 3M de acetato de sodio y 800 μ l de etanol absoluto. Se procedió a invertir el tubo varias veces el cual se dejó precipitar por aproximadamente 15-20 minutos. Después se realizó una segunda centrifugación siguiendo las especificaciones antes mencionadas y se eliminó el sobrenadante, quedando la pastilla de ADN adherida al fondo del tubo. Se agregaron 500 μ l de etanol al 70% y se agitó ligeramente por 10 minutos para eliminar el exceso de sales. Se realizó una tercera centrifugación por un periodo de tiempo de 4 minutos y se eliminó el sobrenadante. El etanol residual fue eliminado mediante evaporación por calor seco. La pastilla de ADN fue disuelta en 60 μ l de agua desionizada estéril y se agregaron 800 μ l de solución CTAB y 10 mg de pectinasa para la eliminación del exceso de polisacáridos. Se incubó durante la noche a 50°C en baño María y a 65°C por 45 minutos. Los tubos se dejaron enfriar por un breve período de tiempo y posteriormente se adicionaron 600 μ l de cloroformo y se agitó ligeramente por 10 minutos. Después se procedió a efectuar los pasos de centrifugación, precipitación, lavado y eliminación de etanol residual previamente descritos. Por último, la pastilla de ADN fue disuelta en 60 μ l de agua desionizada estéril.

2.2.5 Evaluación de la integridad del ADN y cuantificación.

La integridad del ADN genómico fue evaluada mediante la preparación de un gel de agarosa al 0.7% y posterior visualización con un transiluminador de luz ultravioleta. La cuantificación de ADN de cada muestra se realizó mediante el fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen).

2.2.6 Preparación de biblioteca genómica y secuenciación.

La recuperación de marcadores nucleares se realizó mediante el muestreo de sitios nucleares con posición adyacente a sitios de restricción. El conjunto de secuencias asociadas a estos sitios (*RAD tags*) denominada biblioteca genómica fue generado mediante el protocolo propuesto por Etter et al (2011) y modificado por Medina (2017). Este protocolo presenta una serie de pasos que preparan la biblioteca genómica para su

secuenciación a través de plataformas de Illumina. La preparación de la biblioteca genómica se efectuó en el *California Botanic Garden* (Claremont, CA, EUA) y en la Universidad de California en Riverside.

2.2.7 Digestión del ADN genómico con la enzima de restricción *Sbf1-HF*.

Las muestras de ADN previamente cuantificadas fueron normalizadas a una concentración de 20 ng/μl. Posteriormente se transfirieron 15 μl de cada muestra a tubos de PCR y se adicionaron 2 μl de 10X NED (*New England Biolabs*) solución buffer 3:1, 0.5 μl de enzima *Sbf1-HF* (*New England Biolabs*) y 2.5 μl de agua desionizada estéril. La solución se transfirió al fondo del tubo con ayuda de centrifugación ligera durante 5 segundos. Después los tubos se incubaron a 37°C durante 1 hora y a 80°C por 20 minutos para inactivar la enzima *Sbf1-HF*.

2.2.8 Ligamiento de adaptador P1.

Las muestras de ADN digerido fueron adicionadas con 2.5 μl de adaptador P1 conteniendo secuencia identificadora (100 nM). Se agregó una solución de enzima ligasa T4 a cada tubo preparada con los siguientes componentes: 0.5 μl de 10X NEB solución tampón, 0.25 μl de ligasa T4 (2,000,000 U/ml) y 3 μl de ATP (10 mM). Posteriormente se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 30 minutos y a 65°C durante 10 minutos para inactivar la enzima ligasa T4.

2.2.9 Multiplexación (*Multiplexing*) y fragmentación del ADN.

Este paso consistió en concentrar las muestras en un solo tubo permitiendo con ello un manejo más rápido y eficiente de las muestras de ADN. Las muestras de ADN constituyen la biblioteca genómica (RAD). 300 μl de las secuencias de ADN contenidas en la biblioteca genómica fueron fragmentadas mediante sonicación usando un sonicador *Covaris* con la finalidad de obtener fragmentos de una longitud promedio de 400 pb de los cuales posteriormente se seleccionaron fragmentos de 300-500 pb a través de electroforesis con gel de agarosa usando el aparato *BluePippin* (*SageScience*).

2.2.10 Reparación de extremos.

Los fragmentos de ADN previamente seleccionados fueron purificados usando columnas *MinElute* y eluidos en 20 μ l de solución tampón de elución (EB). Posteriormente se agregaron 2.5 μ l de solución tampón de generación de extremos romos (*blunt ends*), 2.5 μ l de dNTP (1 mM) y 1.0 μ l de enzima generadora de extremos romos (*blunt enzyme mix*). Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se realizó una segunda purificación usando columnas *MinElute*. La solución fue eluída en 430 μ l de EB.

2.2.11 Adición de extremo 3'-dA.

Para añadir el extremo 3'-dA a los fragmentos de ADN previamente reparados, se agregaron 5.0 μ l de 10X NEB solución tampón, 1.0 μ l de dATP (10 mM) y 3.0 μ l de fragmento Klenow (3'->5' exo-), y se incubaron a 37°C durante 30 minutos y enfriaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente se purificaron usando columnas *MinElute* y eluyeron en 40 μ l de EB.

2.2.12 Ligamiento de adaptador P2.

El adaptador P2 se compone de extremos divergentes en forma de "Y" y de un extremo 3'-dT el cual se une al extremo 3'-dA. Para adicionar el adaptador P2 se agregaron 5.0 μ l de 10X NEB solución tampón, 1.0 μ l de adaptador P2 (10 μ M), 5.0 μ l de ATP (10 mM) y 0.5 de ligasa T4. Posteriormente se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos y se purificó en una columna *MinElute* y eluyó en 50 μ l de EB.

2.2.13 Enriquecimiento por PCR y secuenciación.

La concentración de los fragmentos de ADN previamente procesados se incrementó a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los componentes de la reacción fueron los siguientes: 9.5 μ l de agua desionizada estéril, 12.5 μ l de *Phusion High-Fidelity Master Mix*, 0.5 μ l de oligonucleótido P1 (10 μ M), 0.5 μ l de oligonucleótido P2 (10 μ M) y 20 μ l de biblioteca genómica RAD.

La reacción se implementó aplicando los siguientes períodos de incubación: 30 segundos a 98°C, 18 ciclos de 10 segundos a 98°C, 30 segundos a 65°C, 30 segundos a 72°C

y 5 segundos a 72°C. Posteriormente el producto de PCR fue purificado usando una columna MinElute y eluído en 30 µl de EB. Finalmente se cuantificó el producto usando el fluorómetro Qubit 2.0 y se ingresó a la plataforma de secuenciación NextSeq500 de Illumina para generar lecturas de un solo extremo (*single-end*) de 150 pb.

2.3 Análisis bioinformático

2.3.1 Ensamblaje y alineamiento de las secuencias.

Los datos crudos de las secuencias fueron analizados y ensamblados *de novo* mediante el programa ipyrad v0.7.28 (Eaton, 2015). Los parámetros de ensamblaje especificados para las secuencias dentro de cada muestra fueron los siguientes:

- 1) Delimitación de las secuencias en función de un porcentaje de similitud de 90%. Este nivel de delimitación determinó la homología de las secuencias.
- 2) Probabilidad de identificar incorrectamente 1 en 1000 bases nitrogenadas ($Q = 33$). Este parámetro representa una medida de la calidad de identificación asignado a cada base nitrogenada por la plataforma de secuenciación. Cualquier valor de base inferior a 33 se identifica como ambigua y se le asigna una N.
- 3) Número máximo de bases de baja calidad ($Q < 20$) permitido de 0.
- 4) Homogeneización de la longitud de las secuencias crudas a 140 pb.
- 5) Ensamblaje de las secuencias en base a una profundidad máxima de cobertura de 10,000.
- 6) Número máximo de secuencias ambiguas permitidas por consenso de 1.
- 7) Número máximo de heterocigotos por sitio de 2. Las secuencias consenso dentro de las muestras fueron posteriormente agrupadas y alineadas entre las muestras especificando una delimitación de similitud de 90%. Finalmente se especificaron los parámetros de filtrado siguientes:
 - 8) Número máximo de indeles por locus de 8.
 - 9) Número máximo de sitios heterocigotos en secuencias consenso de 0.5 para descartar parálogos.

10) Número máximo de SNPs por locus de 20.

11) Número de muestras por locus de 66 (95%) maximizando con ello la representatividad del número de muestras por locus.

El número promedio de lecturas que pasaron filtrado fue de 565,948 las cuales se agruparon en un promedio de 8837 agrupamientos por muestra. De estas, el número promedio de agrupamientos de alta profundidad de cobertura fue de 4526 con un número promedio de lecturas consenso de 4075 por muestra.

Finalmente, se recuperaron un promedio de 70 loci (ANEXO A). Cada uno de estos loci fue sometido a comparación en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) mediante la herramienta BLAST. 5 loci resultaron altamente similares a loci de mitocondria de especies relacionadas siendo consecuentemente descartados de futuros análisis.

En adición al archivo de loci nucleares recuperados a través del ensamblaje *de novo* de las secuencias, el programa ipyrad genera archivos que contienen polimorfismos de un sólo nucleótido (SNPs por sus siglas en inglés) y el almacenamiento de información sobre la variación en las secuencias (*variant call format, vcf*).

2.3.2. Diversidad genética y pruebas de neutralidad.

La diversidad genética del conjunto de secuencias representadas en el archivo de texto denominado *variant call format (vcf)*, fue estimada mediante la medida de diversidad nucleotídica (π) propuesta por Nei (1987) e implementada en el programa DnaSP v6 (Rozas et al., 2017). También se estimó la diversidad genética de cada grupo genético subsecuentemente denominado como población usando la totalidad de loci nucleares. DnaSP v6 es apropiado para datos generados por métodos de secuenciación de nueva generación porque incorpora funcionalidades que permiten el análisis de grandes conjuntos de datos.

El supuesto de neutralidad fue evaluado mediante las pruebas propuestas por Fu y Li (1993) implementadas en el programa DnaSP v6 en base al archivo vcf. Bajo este supuesto, el número de mutaciones externas (ramas externas) esperadas es igual a $\theta = 4N_e\mu$, donde

N_e es el tamaño efectivo poblacional y μ la tasa de mutación por gen por generación. Las ramas externas de una genealogía son más susceptibles a procesos de selección. Las mutaciones pueden medirse como número de sitios segregantes (K) o como el número promedio de diferencias nucleotídicas entre dos secuencias (π_n).

Tajima (1989) inicialmente propuso evaluar neutralidad mediante la comparación de estos dos parámetros. Sin embargo, K es fuertemente afectado por el número de mutaciones puntuales por no considerar su frecuencia, derivando en la sobreestimación del número de mutaciones en las ramas externas si el tamaño de muestra es pequeño.

Fu y Li (1993) propusieron un método que se basa en la comparación del número promedio de diferencias nucleotídicas entre las ramas internas y externas. Esta estimación es menos susceptible al número excesivo de mutaciones puntuales por considerar su frecuencia y es por lo tanto más preciso independientemente del tamaño de muestra. La estimación asume una población de tamaño constante, con ausencia de migración. En la presencia de selección purificadora o negativa se espera un exceso de mutaciones puntuales en las ramas externas y bajas frecuencias de alelos deletéreos. También, un exceso de mutaciones puntuales puede deberse a una expansión reciente de la población por la fijación reciente de alelos ventajosos.

Bajo estos supuestos, el valor de los parámetros de Fu y Li tiende a ser negativo. Si el valor obtenido es positivo, se refleja selección balanceadora porque el número de mutaciones está homogéneamente distribuido entre las ramas internas y externas, es decir, algunos alelos son antiguos y otros son recientes (Fu y Li, 1993).

2.3.3. Estructura genética.

El nivel de estructura genética subyacente del conjunto de loci nucleares, fue determinado de manera probabilística a través del algoritmo de agrupamiento bayesiano implementado por el programa STRUCTURE v2.3.4 (Prichard et al., 2012).

Este algoritmo identifica patrones de variación de un conjunto de alelos individuales los cuales son posteriormente asignados a grupos genéticos definidos como poblaciones. El

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

algoritmo asigna una probabilidad posterior o coeficiente de membresía a cada número de grupos genéticos (K) predeterminados y simulados.

Los parámetros bajo los cuales se estimaron las probabilidades posteriores fueron los siguientes:

1) Parámetro de ancestría: Este parámetro estima la proporción con la cual cada población se encuentra subdividida en segmentos de origen ancestral. Para este parámetro se seleccionó el modelo de ocurrencia de mezcla o *admixture*. Esta característica comúnmente define a las poblaciones compuestas por individuos provenientes de ancestros recientes originarios de múltiples poblaciones (Porras-Hurtado et al, 2013).

2) Parámetro de frecuencias alélicas. Para este parámetro se seleccionó el modelo de frecuencias alélicas correlacionadas con la finalidad de asignar la suposición de un nivel de dependencia entre las frecuencias alélicas y permitir en última instancia la diferenciación de poblaciones estrechamente relacionadas (Porras-Hurtado et al., 2013).

La ejecución del análisis se realizó aplicando una longitud de período de calentamiento o *burn-in* de 1,000,000 cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) y 100,000 MCMC para cada réplica de un rango de 1 a 9 K grupos. El número de réplicas asignado fue de 10. El número K de grupos más probable se determinó mediante el método de Evanno et al (2005) implementado en STRUCTURE HARVESTER (Earl y vonHoldt, 2012). Este método estima el máximo valor de Delta K, es decir, el máximo valor de probabilidad posterior estimado para un valor K definido como la derivada de segundo orden de la probabilidad logarítmica de los datos crudos con respecto al número K de grupos simulados.

La matriz correspondiente a los coeficientes de membresía individuales estimados fue ingresada en el programa STRUCTURE PLOT (Ramasamy et al., 2014) para visualizar el nivel estimado de diferenciación genética entre los grupos.

El número K de grupos con el mayor valor de probabilidad posterior obtenido fue especificado *a priori* en la implementación de una segunda evaluación del nivel de estructura genética que consistió en la medición de las diferencias en las frecuencias alélicas (Piñero et al., 2008).

Esta evaluación conocida como Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) e implementada por el programa Arlequin v3.5 (Excoffier y Lischer, 2015) fue realizada en base a la media ponderada calculada para la totalidad de loci almacenados en el archivo de polimórficos de un solo nucleótido (SNPs). Los intervalos de confianza para el índice de fijación (F_{ST}) fueron calculados mediante un muestreo aleatorio con reemplazo (bootstrapping) con 20,000 réplicas.

2.3.4. Reconstrucción filogenética.

La estimación de las relaciones filogenéticas entre y dentro de las poblaciones se efectuó a través del algoritmo *Neighbor-Net* implementado por el programa SplitsTree5 (Huson y Bryant, 2006). La reconstrucción filogenética se realizó en base al conjunto de SNPs. El método de *Neighbor-Net* consiste en la aglomeración del conjunto ponderado de divisiones (*splits*) o particiones que definen el conjunto de taxa y que constituyen los elementos que forman un árbol filogenético.

La red filogenética obtenida representa el espacio de árboles posibles y, por lo tanto, constituye una herramienta útil en la visualización de las relaciones de taxa cuyas historias evolutivas subyacentes pueden no estar representadas por el patrón de ramificación observado para un árbol filogenético, debido a procesos como recombinación, hibridación, conversión génica y transferencia génica (Bryant y Moulton, 2004).

2.3.5 Estimación de tiempos de divergencia.

La estimación del tiempo de divergencia entre las poblaciones se realizó en base a datos de loci nucleares polimórficos y de SNPs ligados. La primera estimación se realizó mediante el cálculo conjunto de árboles filogenéticos calibrados y parámetros poblacionales estimados bajo el modelo coalescente multiespecie implementado en StarBEAST2 (Ogilvie, Bouckaert y Drummond, 2017). StarBEAST2 modela el proceso de sorteo incompleto de linajes entre y dentro especies en ausencia de flujo génico reciente (Heled y Drummond, 2010) y permite variación en las tasas de sustitución de diferentes

genes y especies mediante la aplicación de modelos de reloj molecular relajado (Ogilvie, Bouckaert y Drummond, 2017).

Los árboles calibrados se calcularon a partir de una selección de 36 loci nucleares polimórficos de aproximadamente 140 pb. El modelo de sustitución nucleotídica y heterogeneidad de tasas con distribución gamma, con mayor probabilidad de ajustarse o corresponder a la matriz de datos y filogenia de cada locus fue determinado mediante el programa jModelTest v2.1.10 (Darriba et al., 2012) a través de la implementación del criterio de información de Akaike (AIC por sus siglas en inglés).

Los modelos de sustitución nucleotídica correspondientes a cada locus (ANEXO B) fueron especificados con cuatro categorías de tasa. El modelo de reloj molecular establecido corresponde al modelo no correlacionado de distribución lognormal. El modelo de poblaciones constantes fue seleccionado como parámetro del modelo poblacional mientras que el modelo de Yule calibrado fue establecido como “*tree prior*”.

Los árboles de tiempo fueron calibrados usando un punto de calibración secundario en ausencia de información paleontológica disponible para delimitar una edad mínima de divergencia para *C. pentadactylon*.

El punto de calibración deriva de una filogenia datada de la familia Malvaceae y estimada para inferir tiempos de divergencia y tasas de diversificación dentro del género *Theobroma* (Richardson et al., 2015). De esta filogenia deriva una estimación de la edad de divergencia para la tribu Fremontodendreae (*Chiranthodendron* + *Fremontodendron*) correspondiente a 5 Ma la cual fue especificada como prior informativo con desviación estándar de 0.01 y distribución lognormal.

La longitud de cadenas de MCMC fue de 180,000,000 y registrada cada 5000. Los archivos de registro (*log files*) fueron analizados usando el programa Tracer v1.7.1 para convergencia de parámetros. Se eliminó un 10% de los árboles registrados equivalentes al período de calentamiento o *burn-in* previo a la generación de un árbol con la máxima credibilidad de clados con alturas medias (*median heights*) en TreeAnnotator.

La segunda estimación que corresponde a la efectuada en base SNPs ligados se realizó también mediante el cálculo conjunto de árboles filogenéticos calibrados y parámetros

poblacionales estimados bajo el modelo coalescente multiespecie, pero implementado en el programa StarBEAST (Heled y Drummond, 2010).

Este programa constituye la versión original en donde se implementa el modelo coalescente multiespecie. La diferencia que mantiene con la versión StarBEAST2 es que no permite la aplicación de modelos de reloj molecular relajado. El modelo de reloj molecular seleccionado para el conjunto de SNPs ligados fue el reloj estricto puesto que se están considerando como una única unidad similar al tradicional concepto de haplotipo. El modelo de poblaciones constantes fue seleccionado como parámetro del modelo poblacional mientras que el modelo de población constante coalescente fue establecido como *“tree prior”*. La longitud de cadenas de MCMC fue de 20,000,000 y registrada cada 5000.

2.3.6 Demografía histórica.

La estimación de cambios en el tamaño poblacional bajo un contexto temporal fue efectuada mediante Skyline Plots Bayesianos (BSP por sus siglas en inglés) Coalescentes implementados en BEAST v2.5.2. El método de Skyline Plot reconstruye la demografía histórica de una población basándose en la relación entre la genealogía de los genes muestreados de una población y el tamaño poblacional.

La teoría de la coalescencia proporciona la base estadística para la cuantificación e interpretación de la relación entre la genealogía de genes y su historia demográfica. La genealogía de genes descrita bajo un contexto de coalescencia se encuentra representada por eventos de coalescencia en los cuales un conjunto de genes coalescen hacia un ancestro común. El número de genes o linajes posicionados dentro de un intervalo de tiempo específico conocido como intervalo de coalescencia representa una estimación del tamaño poblacional (Ho y Shapiro, 2011).

Específicamente el método de Skyline Plot realiza la reconstrucción demográfica a través de la estimación conjunta de la genealogía de genes y la historia poblacional. La longitud de ramas de la topología de árbol representativa de la genealogía de genes, debe

ser proporcional al tiempo medido en mutaciones, años o generaciones (Ho y Shapiro, 2011).

El tamaño poblacional promedio en cada intervalo de coalescencia se estima mediante el producto del tamaño del intervalo y el número de linajes. La serie de tamaños poblacionales a lo largo del tiempo constituye la historia demográfica y su representación visual adquiere la forma del contorno de una ciudad (*skyline*) (Ho y Shapiro, 2011).

La reconstrucción demográfica se efectuó por separado para cada grupo genético o poblacional (Oeste y Este) determinado mediante los análisis de estructura genética previamente descritos.

Los archivos de SNPs ligados fueron establecidos como datos de entrada. El modelo de sustitución nucleotídica y heterogeneidad de tasas con distribución gamma, con mayor probabilidad de ajustarse o corresponder a cada conjunto de SNPs fue determinado mediante el programa jModelTest v2.1.10 a través de la implementación del criterio de información de Akaike (AIC por sus siglas en inglés). Los modelos de sustitución nucleotídica correspondientes a cada conjunto de SNPs (ANEXO B) fueron especificados con cuatro categorías de tasa.

El reloj molecular estricto fue especificado como modelo de reloj molecular. La escala de tiempo fue calibrada usando el tiempo de divergencia de 0.873 Ma estimado para el conjunto de poblaciones con una desviación estándar de 0.2 y distribución lognormal. La longitud de cadenas de MCMC para la población “oeste” fue de 10,000,000 y para la población “este” de 15,000,000 y registradas cada 1000. Los archivos de registro (*log files*) fueron analizados usando el programa Tracer v1.7.1 para convergencia de parámetros.

2.3.7 Historia evolutiva.

La historia poblacional de *C. pentadactylon* fue inferida mediante la simulación de escenarios evolutivos alternativos en el programa DIYABC v2.1.0 (Cornuet et al., 2014).

Este programa se caracteriza por aplicar el cálculo Bayesiano aproximado (ABC por sus siglas en inglés) el cual consiste en inferir valores de probabilidad posterior a partir de valores de similitud entre datos simulados y observados.

Las simulaciones consisten de parámetros poblacionales descriptores de las historias poblacionales alternativas que se ajustan a los supuestos establecidos por la teoría de la coalescencia para la creación de genealogías. En adición, se simulan un conjunto de estadísticos de resumen para cada escenario tomando como base los estadísticos de resumen observados de los datos de entrada. Posteriormente se obtienen indicadores de similitud entre los datos observados y simulados los cuales se someten como variable independiente a regresión logística ponderada policotómica y se comparan a un rango delimitado de valores de probabilidad establecido como variable dependiente. La fracción de valores paramétricos simulados con mayor similitud a los valores paramétricos observados se interpreta como probabilidad posterior (Cornuet et al., 2008).

Los datos de entrada constituyeron el conjunto de datos SNPs y se simularon 1 millón de conjuntos de datos por escenario. Los escenarios evolutivos se construyeron considerando los resultados obtenidos de los análisis de estructura genética e inferencia de tiempos de divergencia:

(1) Dos poblaciones (Pop1 y Pop2) han divergido simultáneamente de una población ancestral en t_1 (escenario 1).

(2) Pop2 (población este) divergió de Pop1 (población oeste) en t_1 (escenario 2).

(3) Pop1 divergió de Pop2 en t_1 (escenario 3).

(4) Pop2 derivó de un número reducido migrantes provenientes de la población oeste en t_2 y divergió en t_1 (escenario 4).

(5) Pop1 derivó de un número reducido de migrantes provenientes de la población este en t_2 y divergió en t_1 (escenario 5).

Las probabilidades posteriores de los escenarios se calcularon del 1% de los datos simulados. El ajuste entre los datos simulados y observados se evaluó a través de la implementación de un procedimiento de comprobación de modelos basado en un análisis de componentes principales (PCA por sus siglas en inglés).

La confianza en la elección de escenarios fue evaluada mediante la simulación de 500 conjuntos de datos pseudo observados (PODs por sus siglas en inglés) para cada escenario y la estimación de tasas de error de Tipo I y II.

2.3.8 Modelado de nicho ecológico.

La distribución potencial de *C. pentadactylon* para el tiempo presente, Holoceno Medio (Mid-HLC, 6 Ka), Último Máximo Glacial (LGM, 22 Ka) y Último Interglacial (LIG, 130 Ka) fue predicha usando el método de máxima entropía implementado por el programa Maxent v3.4.1 (Phillips, Dubik y Schapire, 2006).

El método de máxima entropía consiste en la estimación de la probabilidad de distribución que mejor describe la relación entre el conjunto de datos de ocurrencia y un conjunto de variables ambientales. El valor de las variables ambientales asignado a cada pixel que define el área de estudio, se restringe a la media empírica del valor de la respectiva variable ambiental con respecto a un conjunto de datos de ocurrencia (Phillips, Dubik y Schapire, 2006).

Bajo este contexto probabilístico, el modelo predice sitios de distribución potencial o de idoneidad climática, es decir, sitios que exhiben el conjunto de variables ambientales que permiten la sobrevivencia a largo plazo de la especie. La distribución potencial representa por tanto el nicho ecológico fundamental de la especie. Sin embargo, el nicho realizado puede ser menor que el nicho fundamental debido a factores como la influencia humana, interacciones bióticas como competencia interespecífica y depredación, o barreras geográficas que impiden su dispersión y colonización. No obstante, la predicción obtenida acerca de su distribución potencial se puede extrapolar o proyectar a otros tiempos geológicos durante los cuales las condiciones climáticas pudieron haber cambiado (Phillips, Dubik y Schapire, 2006). Estas proyecciones permiten relacionar el cambio climático con la dinámica poblacional histórica de la especie.

La construcción de los modelos de nicho ecológico se realizó en base al conjunto de sitios de colecta georreferenciados y datos geográficos recuperados de las bases de datos de GBIF (GBIF.org (08 March 2017) GBIF Occurrence Download <https://doi.org/10.15468/dl.nh3qsu>), TROPICOS (<http://legacy.tropicos.org/Name/3900594>, Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO, USA; available from: <http://www.tropicos.org>) y REMIB (http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/remib_esp.html) los cuales fueron introducidos como datos

de ocurrencia y de capas climáticas recuperadas de la base de datos *WorldClim* (Hijmans et al., 2005).

Los sitios de ocurrencia representaron 152 localidades únicas después del curado de datos y eliminación de duplicados. La selección de las variables se realizó mediante el método Jackknife resultando en 9 variables (ANEXO C) de resolución espacial de 2.5 minutos de arco.

Las capas para el Mid-HLC y LGM se obtuvieron de los modelos paleoclimáticos CCSM (*Community Climate System Model*) y MIROC (*Model for Interdisciplinary Research on Climate*) mientras que la capa para el LIG se obtuvo únicamente del modelo CCSM por restricciones de disponibilidad. Estos modelos simulan predicciones climáticas diferentes (Varela, Lima-Ribeiro y Terribile, 2015).

Los modelos de nicho ecológico o de distribución potencial se construyeron con 10 réplicas usando las configuraciones preestablecidas y 25% de los datos de ocurrencia fueron seleccionados para la validación del modelo.

Los archivos de salida de Maxent constituyen datos ráster, es decir, capas compuestas por una matriz de píxeles cada uno de los cuales posee información sobre el valor de las variables bioclimáticas en determinado sitio dentro del área geográfica evaluada. Estos archivos fueron transformados a capas binarias mediante el programa ArcGis 10.3 con la finalidad de delimitar valores de probabilidad (0 a 100) correspondientes a la idoneidad climática usando como umbral de corte el valor del percentil 10.

Capítulo 3. RESULTADOS

3.1 Diversidad genética y pruebas de neutralidad.

Los valores de diversidad nucleotídica de Nei (1987) y de pruebas de neutralidad de FuLiD y FuLiF (1993) para el conjunto de secuencias y las poblaciones oeste y este del istmo de Tehuantepec se muestran en la Tabla 2. Los valores señalados con * son estadísticamente significativos ($P < 0.05$).

Tabla 2. Valores de diversidad nucleotídica y de pruebas de neutralidad.

	Total	Oeste	Este
Diversidad nucleotídica (π)	0.01463	0.00219 (SD=0.00009)	0.00080 (SD=0.00007)
FuLiD	0.7832*	0.07500	-2.73098*
FuLiF	0.7300*	0.39224	-2.78856*

3.2 Estructura genética.

El nivel de estructura genética subyacente obtenido mediante el programa STRUCTURE consiste de un valor K de 2 como el número de grupos más probable (ANEXO B). El gráfico de barras que muestra los coeficientes de membresía individuales asignados a cada número K de grupos (K = 2) definidos como poblaciones se generó mediante el programa STRUCTURE plot (Fig. 10) en donde los individuos están clasificados de acuerdo a su sitio de muestreo: 1) Carrizal de Bravo, Guerrero. (2) San Mateo Río Hondo, Oaxaca. (3) Motozintla, Chiapas. (4) Volcán Tacaná, Chiapas. (5) San Cristóbal de las Casas, Chiapas. (6) Volcán Acatenango, Chimaltenango. (7) Chimaltenango Quetzaltenango. (8) Totonicapán. (9) Sierra de los Cuchumatanes, Huehuetenango.

El primer grupo incluye las muestras de individuos con sitios de colecta localizados al oeste del istmo de Tehuantepec (Guerrero y Oaxaca) y el segundo grupo incluye las muestras de individuos con sitios de colecta localizados al este del istmo (Chiapas y Guatemala). Este valor de grupos fue establecido *a priori* en la evaluación del nivel de diferenciación genética a través el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) global implementado por el programa Arlequin.

Los resultados del AMOVA (Tabla 3) indican que la mayoría de la variación (62.88%) se explica por diferencias entre grupos con un índice de fijación (F_{ST}) de 0.62879. La variación genética restante (37.12%) comprende diferencias genéticas a nivel intrapoblacional (dentro de las poblaciones). El nivel estimado de diferenciación genética entre grupos separados oeste y este del istmo de Tehuantepec soporta su atribución como poblaciones separadas (población Oeste y población Este).

Tabla 3. Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) global basada en secuencias nucleares de SNPs ligados.

AMOVA global	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Índice de fijación
Entre las poblaciones	509.750	9.29102	62.87942	$F_{ST} = 0.62879$
Dentro de las poblaciones	733.194	5.48491	37.12058	$P < 0.000$
Total	1242.944	14.77593		

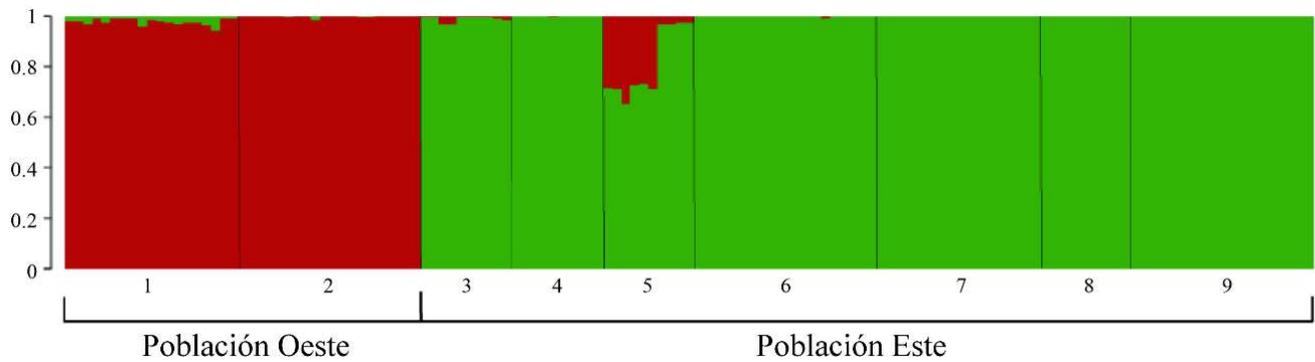


Figura 10. Gráfico de barras obtenido mediante el programa STRUCTURE plot en donde se representan los coeficientes de membresía individuales asignados a cada número K de grupos (K = 2) definidos como poblaciones.

3.3 Reconstrucción filogenética.

La red filogenética estimada mediante el algoritmo *Neighbor-Net* implementado en el programa *SplitsTree* consiste de dos clados (Fig. 11) que corresponden a las poblaciones estimadas mediante los análisis de estructura genética.

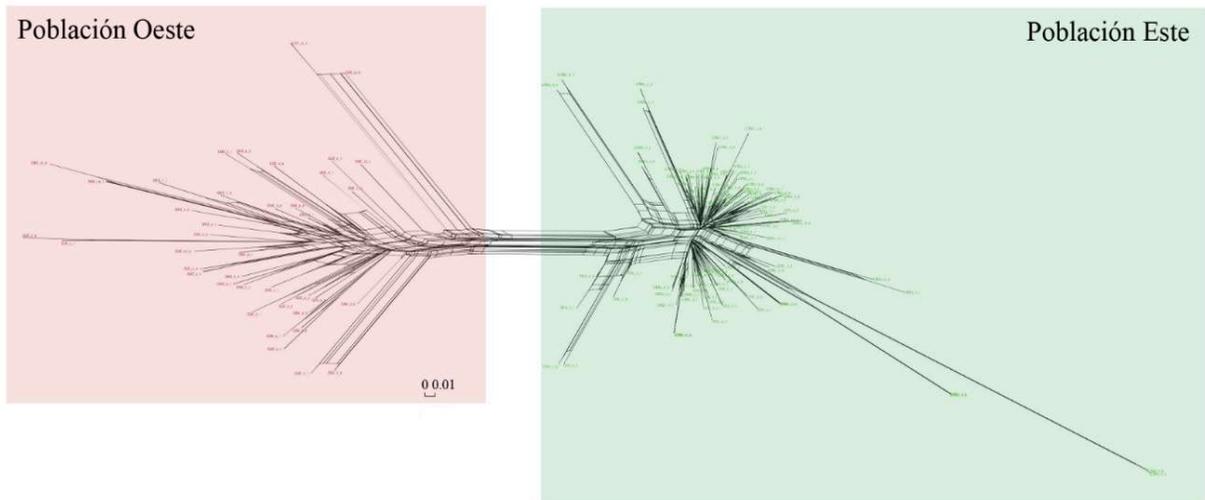


Figura 11. Red filogenética (Neighbor-Net) construida mediante el programa SplitsTree en base a secuencias nucleares de SNPs ligados.

3.4 Tiempos de divergencia.

El árbol consenso de tiempo calibrado estimado en base a 36 loci polimórficos nucleares usando el programa StarBEAST2 muestra un tiempo de divergencia de 0.873 Ma (HPD 95%: 0.693-1.022 Ma) entre las poblaciones Oeste y Este (Fig. 12). El valor de probabilidad posterior estimado fue de 1 (100%) lo cual soporta la diferenciación de los grupos y atribución como poblaciones separadas.

El árbol consenso de tiempo calibrado estimado en base a SNPs ligados usando el programa StarBEAST muestra una resolución mayor de los eventos de divergencia (Fig. 13). Se muestra la edad media del grupo troncal de 7.612 Ma (HPD 95%: 3.577 – 35.528 Ma) con una probabilidad posterior (PP) de 100. También se observa la edad media del grupo corona la cual es de 5.343 Ma (HPD 95%: 0.929 – 17.797 Ma) sin embargo presenta un valor bajo de PP (23.8).

La edad media del ancestro común más reciente (ACMR) de las poblaciones es de 1.306 Ma (HPD 95%: 0.084 – 2.876 Ma) con un valor alto de soporte probabilístico. La edad media de divergencia de la población Oeste es de 0.897 Ma (HPD 95%: 0.042 – 1.387 Ma) mientras que de la población Este es de 0.847 Ma (HPD 95%: 0.039 – 1.156 Ma), ambas con alto soporte probabilístico (PP = 99.9 y 100 respectivamente). Estos valores coinciden con los obtenidos en base a loci nucleares.

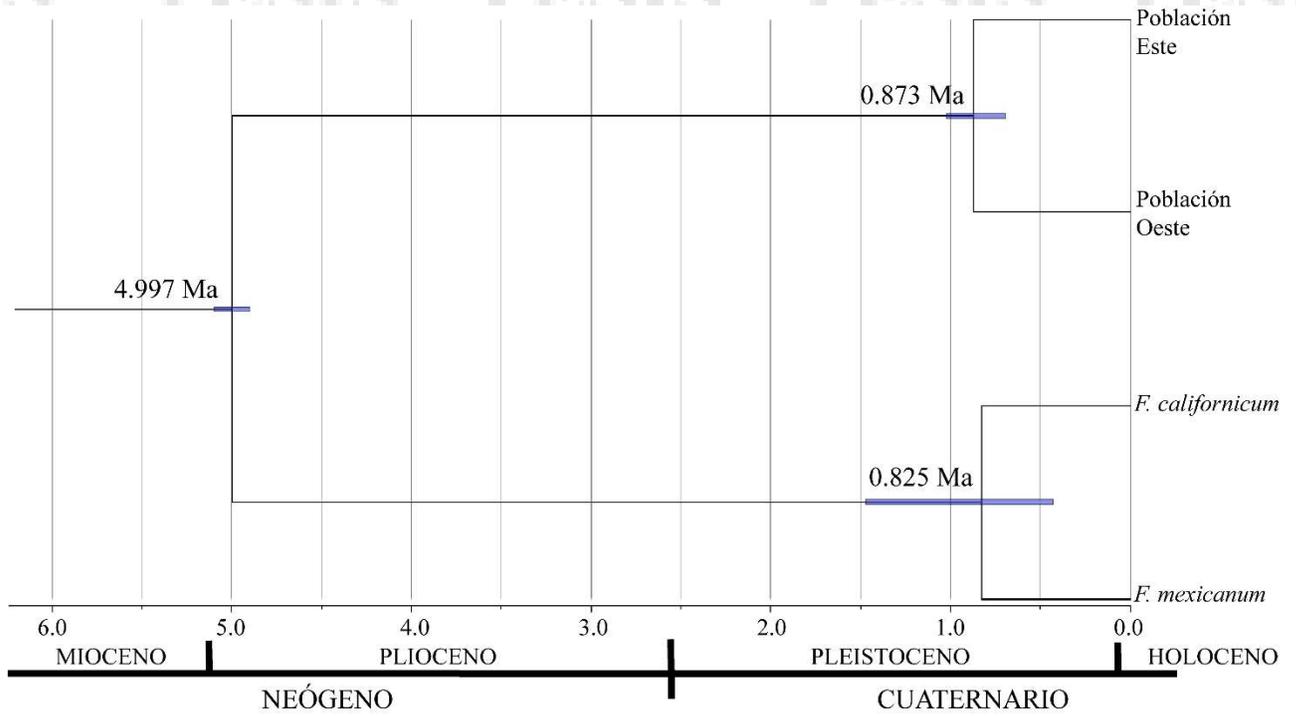


Figura 12. Cronograma de las poblaciones de *C. pentadactylon* basado en árbol consenso calculado usando 36 loci polimórficos nucleares y un modelo coalescente de multiespecies con tamaño constante. Los intervalos de máxima densidad posterior conteniendo 95% de la probabilidad posterior (HPD) se muestran cómo barras moradas.

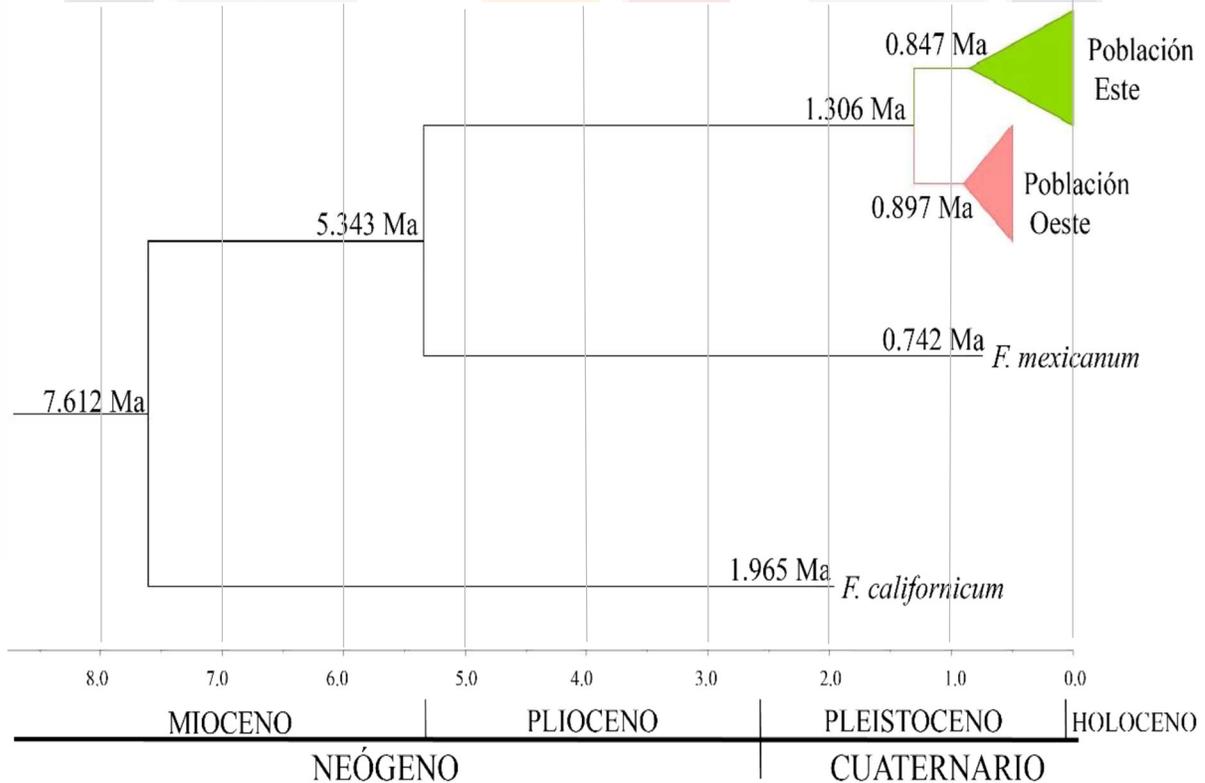


Figura 13. Cronograma de las poblaciones de *C. pentadactylon* basado en árbol consenso calculado usando el conjunto de SNPs ligados y un modelo coalescente de multiespecies con tamaño constante.

3.4 Historia evolutiva.

La representación de escenarios evolutivos alternativos generada mediante el programa DIYABC se observa en la figura 14 en donde: **a)** Escenario 1: Separación simultánea de una población ancestral en tiempo 1 (t_1). **b)** Escenario 2: La población Este (Pop 2) se separó y divergió de la población Oeste en el tiempo 1 (t_1). **c)** Escenario 3: La población Oeste se separó y divergió de la población Este en el tiempo 1 (t_1). **d)** Escenario 4: La población Este se originó de un número reducido de migrantes de la población Oeste en el tiempo 2 (t_2) y divergió en el tiempo 1 (t_1). **e)** Escenario 5: La población Oeste se originó de un número reducido de migrantes de la población Este en el tiempo 2 (t_2) y divergió en el tiempo 1 (t_1).

El escenario evolutivo más probable (Tabla 4) corresponde a la separación o divergencia simultánea de las poblaciones a partir de una población ancestral (escenario 1). La evaluación de la confianza en la elección del escenario 1 se realizó a través del cálculo de tasas de error de Tipo I y II. Los valores de error en la estimación de este escenario fueron bajos (Error tipo I: 0.0260; Error tipo II: 0.2565).

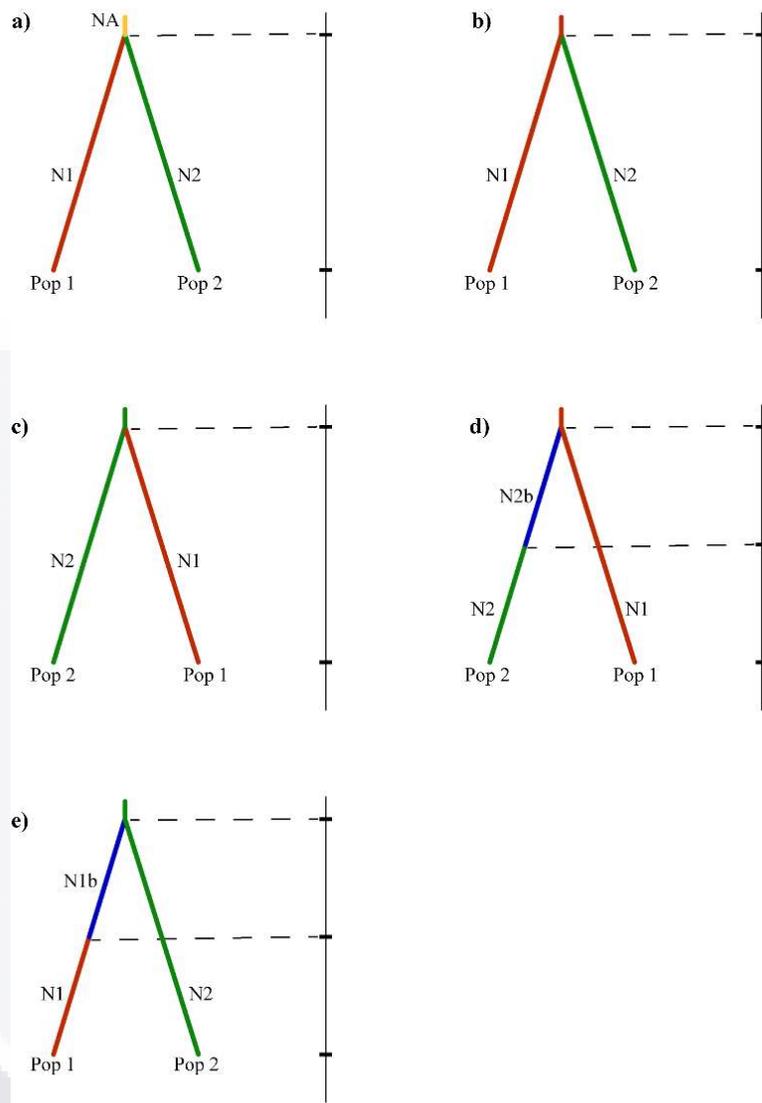


Figura 14. Escenarios demográficos de *C. pentadactylon* simulados mediante el programa DIYABC basados en secuencias nucleares de SNPs ligados.

Tabla 4. Probabilidad posterior de escenarios simulados (Regresión logística Bayesiana).

Escenario	Probabilidad posterior	Intervalo de confianza de 95 %	Error tipo I	Error tipo II
1. Separación simultánea de una población ancestral.	0.8400	0.7906-0.8895	0.0260	0.2565
2. Población Este diverge de población Oeste.	0.0011	0.0000-0.2607		
3. Población Oeste diverge de población Este.	0.0039	0.0000-0.2632		
4. Población Este deriva de pocos migrantes de la población Oeste.	0.0035	0.0000-0.2629		
5. Población Oeste deriva de pocos migrantes de la población Este.	0.1515	0.1046-0.1984		

3.5 Demografía histórica.

Los Skyline Plot Bayesianos Coalescentes estimados para cada población mediante el programa BEAST2 indican un incremento continuo, seguido de expansiones demográficas repentinas que datan de aproximadamente 0.2 Ma (Fig. 15) y subsecuente mantenimiento del tamaño efectivo poblacional.

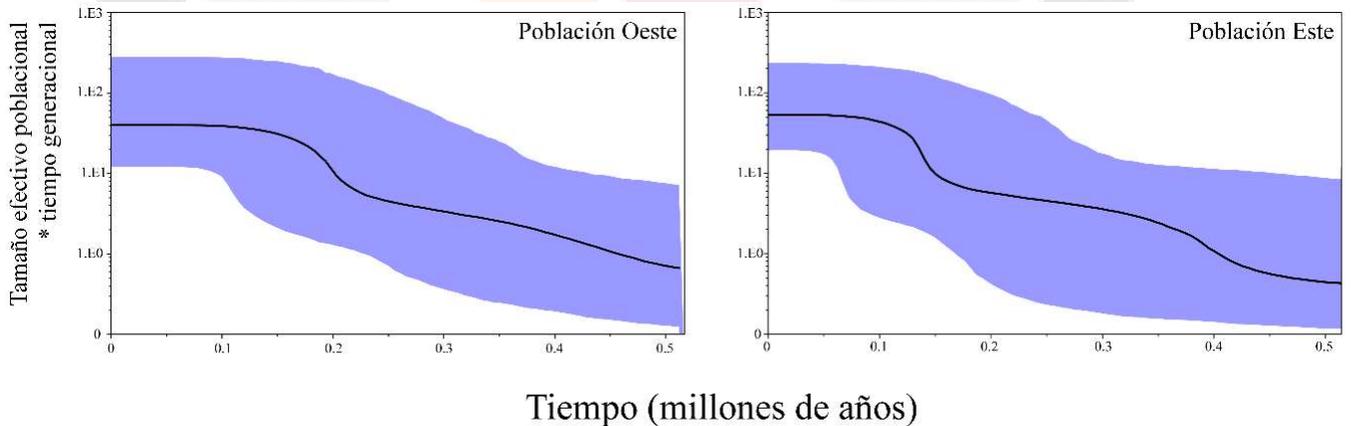


Figura 15. Skyline Plots Bayesianos estimados de secuencias nucleares de SNPs ligados para cada población. El eje-y corresponde al producto entre el tamaño efectivo poblacional y el tiempo generacional, y el eje-x al tiempo transcurrido en millones de años. Líneas sólidas representan el promedio estimado y áreas sombreadas corresponden a intervalos de confianza del 95%.

3.6 Distribución potencial predicha mediante modelado de nicho ecológico.

El área promedio bajo la curva de la característica operativa del receptor (COR) para las réplicas indica que el desempeño discriminatorio del modelo fue bueno (0.970). El modelo de distribución predicha para el Último Interglacial (LIG) (130 Ka) indica una reducción drástica en el nicho ecológico de la especie comparado con la obtenida para el Último Máximo Glacial (LGM) (22 Ka) y Holoceno Medio (Mid-HLC) (6 Ka) en los cuales el nicho ecológico incrementa. La distribución potencial se mantiene durante estos períodos de tiempo, pero incrementa durante el tiempo presente (Fig. 16).

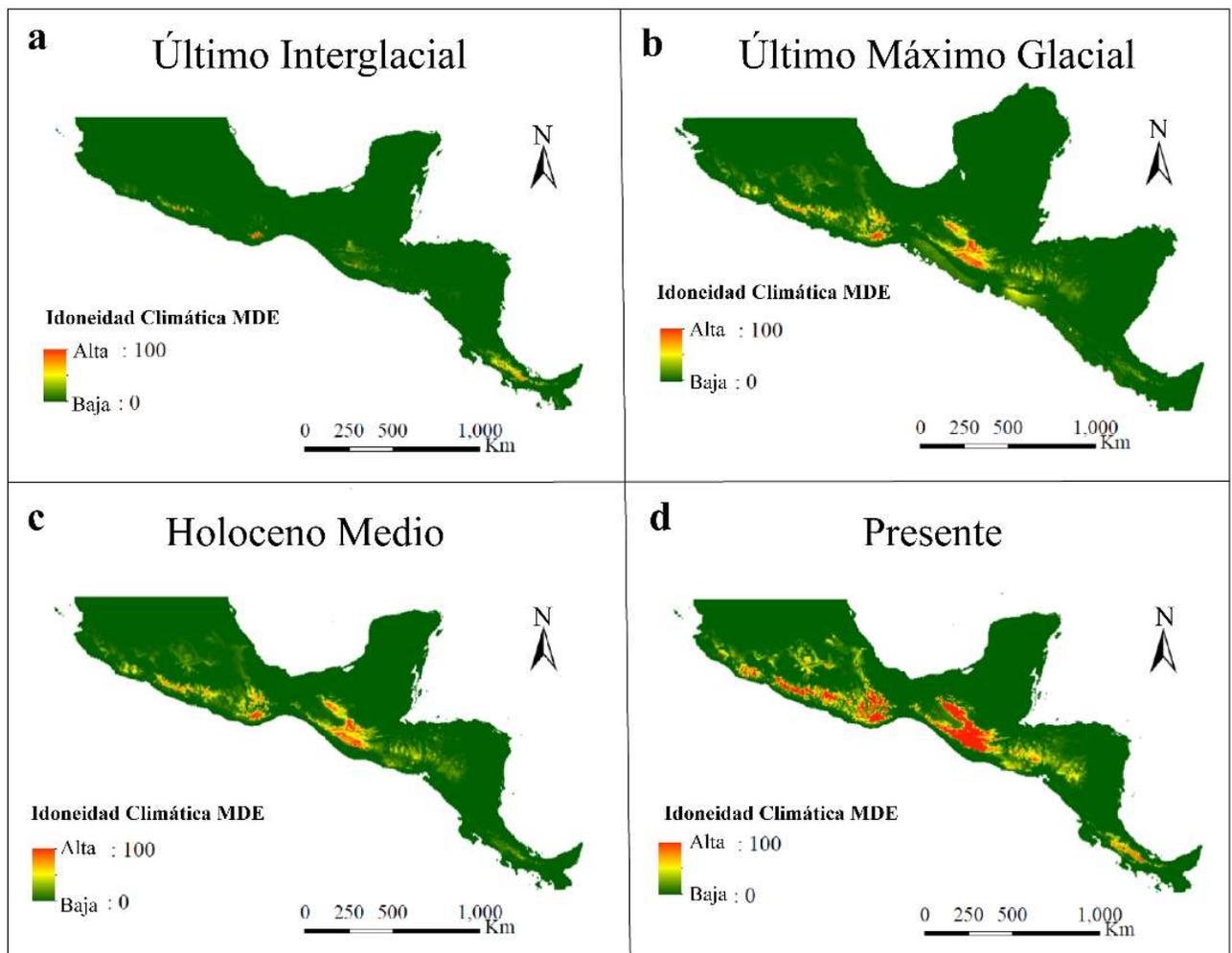


Figura 16. Distribuciones presente e histórica predichas a través de modelado de nicho ecológico implementado por el método de máxima entropía. La probabilidad de ocurrencia basada en idoneidad climática (Idoneidad Climática MDE) se muestra de alta (100) en rojo a baja (0) en verde.

Capítulo 4. DISCUSIÓN

4.1 Efecto vicariante del istmo de Tehuantepec en la formación de patrones de diversidad genética.

Chiranthodendron pentadactylon se distribuye en provincias geográficas separadas por el istmo de Tehuantepec. Los análisis de estructura genética efectuados permitieron determinar esta región como barrera biogeográfica al influir en la distribución de los patrones de variación genética interpoblacional.

Se estimaron altos niveles de estructuración genética o de diferenciación genética entre grupos genéticos distribuidos oeste y este del istmo de Tehuantepec consecuentemente denominados poblaciones. El istmo de Tehuantepec ha sido considerado como barrera biogeográfica para múltiples taxa. Estudios en especies de bosque mesófilo de montaña en Mesoamérica, con distribución adyacente y cercana al istmo, observaron una separación genética y geográfica producida por la ocurrencia del istmo. Por ejemplo, estudios filogeográficos del arbusto *P. padifolia* (Gutiérrez-Rodríguez, Ornelas y Rodríguez-Gómez, 2011) y del cactus muérdago *R. baccifera* (Ornelas y Rodríguez-Gómez, 2015) revelaron una separación genética y poblacional a lo largo del istmo. Más aún, un estudio filogeográfico comparativo que incluyó las especies de plantas *P. matudae*, *L. styraciflua*, *P. padifolia*, *M. deppeana* y *R. baccifera*, las especies de roedores *P. aztecus*, *R. sumichrasti* y *H. lophurus*, y las especies de aves *A. cyanocephala*, *C. curvipennis*, *L. amethystinus* (colibríes), *L. affinis* (trepatroncos), *C. ophthalmicus*, *B. brunneinucha* y *B. belli* (paseriformes) (Ornelas et al., 2013) soportó de manera similar una separación genética y poblacional ocasionada por la ocurrencia del istmo. Por el contrario, en el muérdago *P. schiedeanus* (Ornelas et al., 2016) el efecto vicariante del istmo no es evidente a causa de mecanismos efectivos de flujo génico que resultan en niveles superficiales de estructura genética.

El istmo de Tehuantepec es una región de valle tipo sabana (Ornelas et al., 2013) de alta sismicidad que une el continente de América del Norte con América Central. En el sitio de unión con América del Norte, el istmo se reduce a un ancho de 200 Km. La alta sismicidad del istmo se relaciona con la cercanía que tiene con la unión triple de las placas

norteamericana, de Cocos y del Caribe. Su estructura actual resulta de la superposición de tres tipos distintos de tectonismo: (1) Inclinación de la región este del istmo durante el Mioceno tardío-Plioceno temprano como consecuencia de la deformación de la losa subductora de la placa de Cocos; (2) Hundimiento de la región sur del istmo asociado con el desplazamiento en dirección este de la parte oeste de la placa del Caribe con respecto a la parte sur de la placa norteamericana y (3) Desarrollo de extensiones en la mitad norte del istmo relacionado con la evolución del margen pasivo del golfo de México (Barrier et al., 1998). Estos procesos resultaron en la reducción de las tierras altas y posible embalse marino (Barrier et al., 1998; Ornelas et al., 2013).

Las implicaciones que esta potencial barrera tiene sobre la estructura genética constituyen un incremento en la diferenciación genética por el efecto que el aislamiento de distancia descrito por Sewall Wright (1943) tiene sobre poblaciones subdivididas y aleatoriamente organizadas.

El modelo de aislamiento por distancia indica que la probabilidad de apareamiento depende de la distancia entre los individuos o de la varianza en la dispersión de los propágulos. En particular, poblaciones con mayor separación espacial entre ellas tienen una menor probabilidad de intercambiar genes resultando en un incremento de diferenciación genética por los procesos de deriva génica y sistemas de apareamiento endogámicos. Sin embargo, procesos ecológicos introducen variación en el nivel de intercambio genético o de flujo génico entre poblaciones (Loveless y Hamrick, 1984).

En formas de vida arbórea, características como sistemas de apareamiento alogámicos, reproducción de tipo policárpica y ciclo de vida prolongado (Petit y Hampe, 2006) inducen el flujo génico e influyen en la distribución de los alelos.

El incremento de las tasas de reproducción alogámica disminuye el nivel de estructura genética (Loveless y Hamrick, 1984). Por su parte, *C. pentadactylon* presenta un sistema de apareamiento mixto dada la morfología hermafrodita de las flores. Este factor disminuye la probabilidad de eventos de dispersión a larga distancia (Loveless y Hamrick, 1984) a través del istmo resultando en el aumento de los niveles de diferenciación genética interpoblacional. Además, la naturaleza dicógama de las flores promueve un mecanismo de

reproducción cruzada el cual deriva en niveles moderados de variación genética intrapoblacional (Loveless y Hamrick, 1984).

Por último, la polinización de los vectores altamente vágiles como aves y murciélagos podrían inducir bajos niveles de subdivisión genética intrapoblacional. Dispersión de semillas mediada por aves también podría resultar en bajos niveles de subdivisión genética intrapoblacional.

4.2 Relaciones del tiempo de divergencia poblacional y demografía histórica con cambio climático histórico.

Los bosques mesófilos de montaña constituyen ecosistemas forestales de distintiva composición florística y estructural. Los componentes florísticos están adaptados a condiciones climáticas caracterizadas por el relativo mantenimiento o continuidad de la entrada de precipitación. La extensión espacial de estas condiciones se encuentra restringida pues se encuentran únicamente en franjas altitudinales relativamente estrechas (Hamilton, Juvik y Scatena, 1995).

Factores históricos como eventos geológicos y cambio climático pueden promover cambios distribucionales de estos ecosistemas pues las especies que los componen son particularmente susceptibles a cambios en la precipitación (Foster, 2001). En particular, la distribución de *C. pentadactylon* pudo haber sido afectada por las fluctuaciones climáticas del período Cuaternario.

Para determinar la relación entre la divergencia de poblaciones de *C. pentadactylon* y eventos climáticos del Cuaternario, se estimaron árboles de tiempo calibrado con una calibración secundaria derivada de una filogenia datada de la familia Malvaceae (Richardson et al., 2015). El clado de la filogenia que corresponde a la tribu Fremontodendreae formada por los géneros *Chiranthodendron* y *Fremontodendron* presenta un tiempo de divergencia estimado de 5 Ma (Mioceno Tardío-Inicio del Plioceno) la cual fue establecida como punto de calibración. El tiempo de divergencia estimado en base a 36 loci nucleares polimórficos indica que las poblaciones actuales de *C. pentadactylon* divergieron hace aproximadamente 0.873 Ma. Sin embargo, el árbol de tiempo calibrado obtenido no proporciona una resolución más profunda sobre tiempos de divergencia previos a la separación de las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

poblaciones. En cambio, el árbol de tiempo calibrado obtenido en base a SNPs nucleares ligados proporciona una estimación más detallada sobre los eventos de divergencia. Este árbol indica un tiempo de divergencia para la población Oeste de 0.897 Ma y para la población Este de 0.847 Ma.

Estas edades coinciden con la estimada en base a loci nucleares. En adición, se observa una edad de 1.036 Ma para el ancestro común más reciente de las poblaciones. La edad de divergencia de las poblaciones se aproxima a la edad de la última fase de un proceso de enfriamiento lento desarrollado en los últimos 50 Ma. Las alternaciones entre períodos glaciales fríos e intervalos más cálidos desarrolladas al inicio de la época del Pleistoceno dan lugar a ciclos de una longitud temporal de 40 Ka (1.2-0.6 Ma) y subsecuentemente a ciclos de aproximadamente 100 Ka iniciados 800 Ka (PAGES, 2016). El calentamiento prolongado de este período posiblemente disminuyó y restringió el rango de distribución potencial de *Chiranthodendron* a las tierras altas.

El escenario evolutivo con mayor soporte probabilístico para las poblaciones de *Chiranthodendron* es la divergencia simultánea de las poblaciones a partir de una población ancestral.

Este escenario sugiere una especie ancestral de amplia distribución que subsecuentemente experimentó contracción con el advenimiento de condiciones climáticas desfavorables como aquellas inferidas para los últimos 800 Ka. La contracción del rango de distribución promovió cambios en la continuidad poblacional y aislamiento. El rango de distribución ancestral posiblemente incluyó una localización más septentrional con respecto a la distribución actual. Lo anterior se encuentra soportado por la distribución que mantiene su género hermano *Fremontodendron* en el suroeste de Estados Unidos y noroeste de México (Fig. 17). *Fremontodendron* es un género de arbustos y pequeños árboles de comunidades vegetales típicas de chaparral (Kelman, Broadhurst y Brubaker, 2006) y floras esclerófilas de clima templado y seco (Pavek, 1993).

Se ha sugerido que predecesores de la tribu Fremontodendreae formaron parte de la geoflora del Madro-Terciario la cual evolucionó en respuesta a ambientes subhúmedos de

regiones tropicales y subtropicales a partir de especies adaptadas a climas tropical y cálido templado (geoflora del Neotropical Terciario) (Axelrod, 1958).

Durante el Eoceno Medio, la geoflora del Madro-Terciario ya se encontraba establecida en las zonas secas de los trópicos norteamericanos mientras que para el final del Oligoceno ocupaba gran parte del suroeste de Estados Unidos y noroeste de México. La tendencia hacia condiciones secas está soportada por evidencias derivadas de estudios sobre sedimentología, paleontología de vertebrados y registro de polen fósil de la región de San Diego (flora de *Elsinore*) las cuales indican condiciones secas en invierno con tendencia hacia condiciones frías al inicio del Eoceno Medio y Tardío (Axelrod, 1958).

La composición florística durante este período está representada por la presencia de bosque mixto de coníferas de hoja caduca en las partes altas y comunidades vegetales estacionalmente secas en las partes bajas. Esta tendencia hacia condiciones secas también se hace evidente con el primer evento de rotación de polen en cuyo registro se encuentra polen fósil de tipo *Chiranthodendron-Fremontodendron-Triumfetta*. Las condiciones secas se intensifican durante el Luteniense (47.8-41.2 Ma) Medio y Tardío ejerciendo un efecto más pronunciado en el sur de California durante el Bartoniense (41.2-37.8 Ma) por la disminución de la temperatura. La tendencia hacia condiciones secas y frías culmina durante el Eoceno Tardío-Oligoceno (33.9-23.03 Ma) Temprano con el desarrollo de un bosque paratropical o de tipo sabana con bosques de galería a lo largo de los cuerpos de agua en las partes bajas, y de un bosque mixto de coníferas estacionalmente más seco en las partes altas (Graham, 1999).

Esto marca el inicio del desarrollo del matorral/chaparral-bosque-sabana del actual árido suroeste de Estados Unidos y noroeste de México (Frederiksen, 1991). Durante el Mioceno (23.03-5.33 Ma), Plioceno (5.33-2.58 Ma) Temprano y Medio, el clima seco continúa expandiéndose permitiendo la extensión del rango de distribución de la geoflora del Madro-Terciario en dirección norte, sur, este y oeste (Axelrod, 1958).

Posteriormente, a finales del Plioceno, se desarrolla una diversificación ambiental más marcada (Axelrod, 1958) derivada de la disminución de las temperaturas (Graham, 1999) en el oeste de Estados Unidos resultando en la segregación de la geoflora en un

número de comunidades derivadas de ocurrencias más restringidas. Algunas especies sobreviven en el área de distribución establecida durante el Terciario, mientras que otras derivan en especies adaptadas a los climas templados de las montañas del sur de Arizona, oeste de Texas y las Sierras Madres de México (Axelrod, 1958).

Subsecuentemente se da el inicio de los ciclos glaciales del Pleistoceno (2.58-0.012 Ma) con la formación de la capa de hielo Laurentino en América del Norte (2.58 Ma) (Graham, 1999). Predecesores de las especies de *Fremontodendron* posiblemente se diversificaron durante la época del Pleistoceno como resultado del aislamiento promovido por los intervalos glaciales seguido de expansión postglacial. Mientras que predecesores de *Chiranthodendron* ven favorecida su expansión y migración en dirección meridional con el aumento de la entrada de precipitación proveniente de ciclones de baja presión del océano Pacífico y golfo de México (1.6 Ma) (Graham, 1999).

La estimación de cambios en el tamaño poblacional mediante un enfoque bayesiano, indica un aumento continuo del tamaño efectivo poblacional iniciando 0.5 Ma seguido de aumentos repentinos en el tamaño efectivo poblacional que coinciden con el período glacial de edad aproximada de 0.2 Ma. Estas expansiones demográficas soportan la hipótesis del bosque húmedo la cual predice migración hacia menores altitudes, expansión del rango de distribución y conectividad poblacional durante intervalos glaciales (Ramírez-Barahona y Eguiarte, 2013). Esta hipótesis también predice crecimiento demográfico reducido o limitado. Sin embargo, la alta vagilidad de los vectores de dispersión de *C. pentadactylon* pudo haber favorecido incrementos en el tamaño poblacional. Por otra parte, el bajo nivel de diversidad nucleotídica observado indica expansiones demográficas a partir de una población de tamaño efectivo poblacional pequeño.

En adición, no se detectaron reducciones en el tamaño poblacional o cuellos de botella lo cual refuta la hipótesis alternativa al modelo de bosque húmedo, la hipótesis de los refugios secos. Esta hipótesis indica que las poblaciones fueron comprimidas en refugios por los efectos opuestos de aridez y enfriamiento experimentando reducción en el tamaño poblacional, aislamiento y subsecuente diferenciación genética (Ramírez-Barahona y Eguiarte, 2013).

El modelo de bosque húmedo como descriptor de las consecuencias demográficas de especies de bosque mesófilo de montaña, ha sido soportado por estudios filogeográficos en *L. styraciflua* (Ruiz-Sánchez y Ornelas, 2014), *R. baccifera* (Ornelas y Rodríguez-Gómez, 2015) y *P. schiedeana* (Ornelas et al., 2016) los cuales predicen distribuciones que reflejan una tendencia espacial continua durante el LGM y ausencia de expansiones demográficas significativas. También, estudios sobre estructura geográfica y variación genética de especies de *Podocarpus* distribuidas en Mesoamérica en adición a la reconstrucción de distribuciones potenciales durante el LIG (último interglacial) y LGM (último máximo glacial) (Ornelas et al., 2019) permitieron el reconocimiento de señales demográficas relacionadas con la permanencia *in situ* de largo plazo en múltiples refugios durante el LGM, las cuales comprenden la ausencia de expansión demográfica y flujo génico limitado.

Por otra parte, Gutiérrez-Rodríguez, Ornelas y Rodríguez-Gómez (2011) observan patrones demográficos en *P. padifolia* que coinciden con las esperadas bajo el modelo de bosque húmedo, aunque no describen explícitamente esta correspondencia. Los autores hacen alusión a la hipótesis de refugios pleistocénicos en los trópicos referida a especies de tierras bajas. Esta hipótesis sugiere que durante los períodos glaciales se da una reducción drástica en la precipitación resultando en la compresión, fragmentación y aislamiento en refugios. Por el contrario, en *P. padifolia* se estiman expansiones demográficas repentinas a partir de una población de tamaño poblacional efectivo pequeño y altos niveles de diversidad genética atribuidos a factores evolutivos y ecológicos como la retención de polimorfismos ancestrales o sorteo incompleto de linajes y altas tasas de reproducción alogámica.

La distribución predicha para *C. pentadactylon* mediante modelado de nicho ecológico sugiere una disminución drástica en el rango de distribución para el LIG (130 Ka). Sin embargo, no se detectaron reducciones en los tamaños efectivos poblacionales.

La ausencia de expansiones demográficas puede deberse a la fragmentación de la distribución potencial durante el LIG, promoviendo la subdivisión poblacional. Posteriormente, durante el LGM se incrementa significativamente la distribución potencial, la cual se mantiene durante el Holoceno Medio y aumenta aún más durante el tiempo

presente. No obstante, los tamaños efectivos poblacionales se mantienen. La reducida diversidad nucleotídica observada sugiere que el incremento en el tamaño poblacional se ha dado a partir de un número reducido de individuos con posible prevalencia de tasas de reproducción endogámica promovidas por la fragmentación de las poblaciones impidiendo a su vez el incremento de los tamaños efectivos poblacionales. Factores antrópicos constituyen una variable adicional en el mantenimiento de los tamaños efectivos poblacionales.

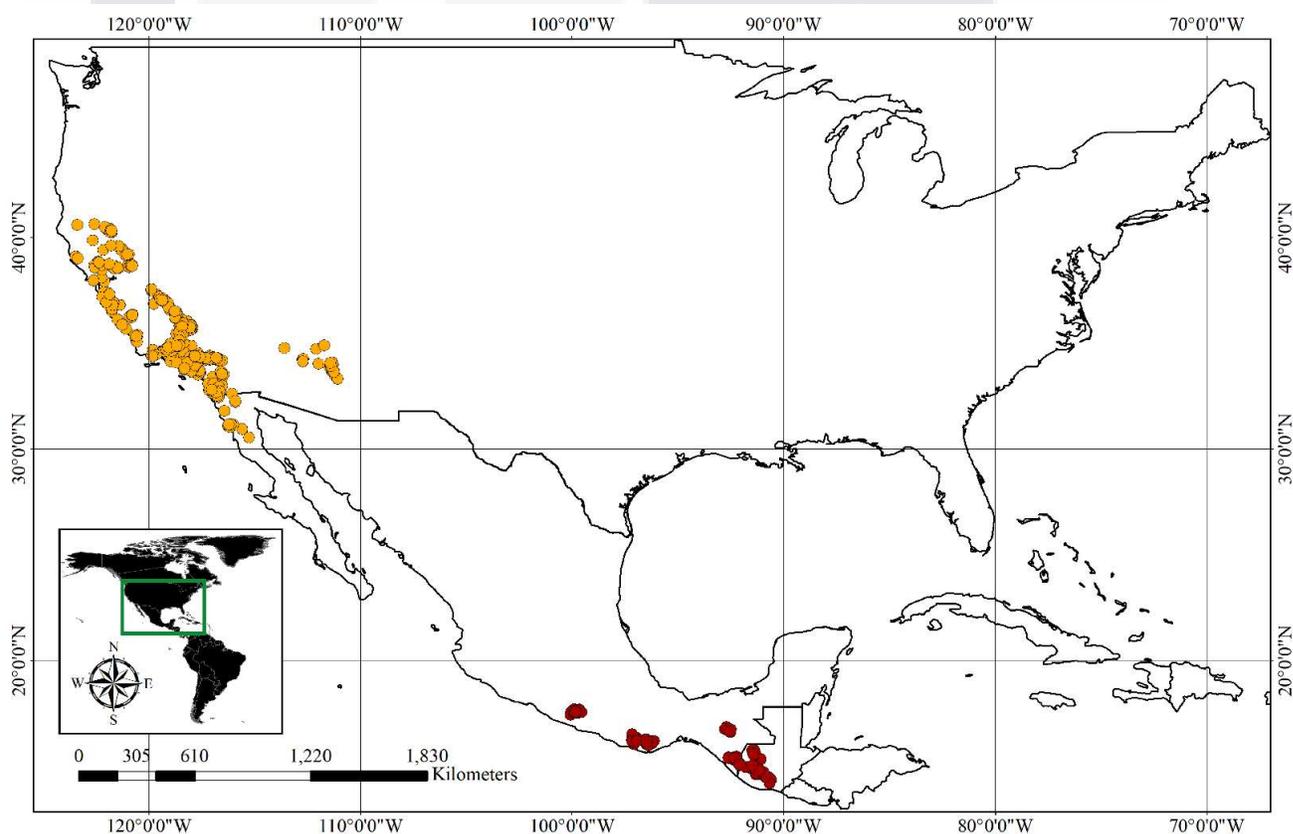


Figura 17. Comparación de las distribuciones de *C. pentadactylon* (rojo) y especies del género *Fremontodendron* (amarillo).

CONCLUSIONES

El enfoque de análisis filogeográfico efectuado permitió estimar valores descriptores del estado genético de las poblaciones de *Chiranthodendron pentadactylon* relacionados con procesos históricos y contemporáneos. Estos procesos constituyen factores determinantes de la estructura genética, geográfica y rango geográfico de las poblaciones actuales de *C. pentadactylon*.

En primera instancia, el resultado de diversidad genética en términos de diversidad nucleotídica obtenido sugiere similitudes genéticas entre los individuos relacionadas con una historia demográfica caracterizada por expansiones demográficas drásticas a partir de poblaciones ancestrales de tamaño efectivo poblacional pequeño.

La estimación de cambios poblacionales temporales realizada a través de un enfoque bayesiano sugiere que la última expansión demográfica drástica ocurrió durante el período glacial que data de aproximadamente 0.2 Ma. En adición, procesos ecológicos como el aumento en las tasas de reproducción endogámicas promovidas por la subdivisión poblacional y geográfica de las poblaciones pueden mantener un nivel de diversidad nucleotídica bajo. El modelado de nicho ecológico permitió estimar una contracción pronunciada en el rango de distribución poblacional con posible fragmentación poblacional durante el LIG (130 Ka) inducida por la disminución en la idoneidad climática.

Los patrones de diversidad genética estimados mediante los análisis que miden el nivel de estructuración genética, indican una subdivisión poblacional y diferenciación genética inducidas por el istmo de Tehuantepec. Los grupos genéticos distribuidos oeste y este del istmo fueron en consecuencia denominados poblaciones. Esta barrera constituye un factor contemporáneo que promueve la diferenciación genética entre las poblaciones. El alto nivel de estructuración genética en adición a las relaciones filogenéticas estimadas entre los individuos sugiere estructuración filogeográfica pues los individuos dentro de cada población son genealógicamente equivalentes entre sí.

La distribución geográfica de *Chiranthodendron* ha resultado de procesos históricos y demográficos acontecidos durante la época del Pleistoceno. La inferencia de estos procesos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

históricos y su interrelación con procesos demográficos se realizó a través de la estimación de cambios poblacionales bajo un contexto temporal, comparación de escenarios evolutivos, estimación de tiempos de divergencia y predicción de distribuciones potenciales para diferentes períodos de tiempo dentro de la época del Pleistoceno (1.8-0.11 Ma).

La estimación de tiempos de divergencia permitió posicionar a las poblaciones en una escala temporal la cual a su vez indica el tiempo de separación de las poblaciones. Las edades estimadas de separación se aproximan al primer período interglacial de extensión temporal de 100 Ka que data de 800 Ka. El incremento de condiciones áridas predichas para este período sugiere una disminución en el rango de distribución para *C. pentadactylon* con subsecuente aislamiento poblacional, divergencia y diferenciación genética.

La comparación de escenarios evolutivos alternativos permitió la asignación de valores de probabilidad. El escenario con mayor soporte probabilístico describe una separación simultánea de las poblaciones a partir de una población ancestral. El rango distribucional de esta población posiblemente abarca una extensión más amplia y de localización septentrional con respecto a la distribución de las poblaciones actuales. Lo anterior lo soporta la distribución que mantiene el género hermano de *Chiranthodendron*, *Fremontodendron*. Este género forma parte de comunidades vegetales de chaparral del actual árido suroeste de Estados Unidos y noroeste de México.

Posibles predecesores de *Chiranthodendron-Fremontodendron* formaron parte de la geoflora del Madro-Terciario la cual se caracterizaba por presentar adaptaciones a condiciones secas y frías desarrolladas en la región durante el Eoceno Medio. Las condiciones secas continúan expandiéndose hasta el Plioceno Medio.

Posteriormente, durante el Plioceno Tardío se da una diversificación ambiental más marcada con la disminución de las temperaturas. Predecesores de *C. pentadactylon* posiblemente adaptados a los climas templados de las montañas del sur de Arizona, oeste de Texas y las Sierras Madres de México ven favorecida su expansión y migración en dirección meridional con el incremento de la entrada de precipitación durante los ciclos glaciales del Pleistoceno. Sin embargo, la temporalidad de los intervalos interglaciales se incrementa induciendo la contracción del rango de distribución, aislamiento, divergencia y

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

diferenciación genética. Las poblaciones Oeste y Este del istmo de Tehuantepec derivadas de esta fragmentación espacial en ausencia o limitación de flujo génico, presentan historias demográficas separadas. No obstante, ambas experimentan una expansión demográfica drástica durante el período glacial de 0.2 Ma a partir de poblaciones ancestrales de tamaño reducido.

El tamaño efectivo poblacional alcanzado se ha mantenido inclusive con la reducción de la distribución potencial predicha para el LIG y el subsecuente aumento de nicho predicho para el LGM, Mid-HLC y tiempo presente. Las consecuencias demográficas inferidas para *C. pentadactylon* durante los intervalos glaciales soportan la hipótesis de bosque húmedo propuesto para especies de bosque mesófilo de montaña. Esta hipótesis predice migración hacia sitios de menor altitud, expansión del rango distribución, conectividad poblacional y ausencia o limitado crecimiento demográfico.

Por tanto, la hipótesis predicha para las poblaciones de *Chiranthodendron* es parcialmente refutada por los resultados obtenido, ya que no se detectaron disminuciones en el tamaño efectivo poblacional o cuellos de botella. Las poblaciones presentan estructuración genética y filogeográfica como consecuencia de las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno.

Las condiciones desfavorables de los intervalos interglaciales inducen una fuerte contracción en el rango de distribución derivando en separación y diferenciación genética interpoblacional. El nivel de diferenciación genética estimado se ha mantenido por el efecto vicariante del istmo de Tehuantepec. En adición, las posibles rutas de dispersión de la especie poseen una localización septentrional con respecto a su distribución actual.

El establecimiento de las rutas de migración se da como consecuencia del aumento de la entrada de precipitación en el norte de México durante los intervalos glaciales de la época del Pleistoceno. Se estimaron expansiones demográficas para el periodo glacial de 0.2 Ma y subsecuente mantenimiento del tamaño efectivo poblacional. Sin embargo, el bajo valor de diversidad nucleotídica estimado en adición al reducido tamaño efectivo poblacional sugiere que esta especie es particularmente susceptible al cambio climático. Más aún, la distribución restringida que mantiene como consecuencia de la restricción

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

espacial del bosque mesófilo de montaña en México y la reducción de las áreas boscosas por la actividad humana, podrían ponerla en peligro de extinción. Actualmente está clasificada por la IUCN y la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-SEMARNAT-2010) como especie amenazada. En virtud de esto, es necesaria la ejecución de planes de conservación que aseguren su sobrevivencia a largo plazo.

Para esto se recomienda la ejecución de estudios enfocados en la ecología de la especie para determinar el papel que desempeña dentro de los ecosistemas forestales y el modo de dispersión de las semillas. La ejecución de estudios filogeográficos basados en el marcador de cloroplasto permitiría determinar el nivel de efectividad de la dispersión de semillas a través del nivel de estructura genética. La información derivada de estos estudios permitiría determinar los requerimientos reproductivos de la especie e incrementar la probabilidad de éxito en la ejecución de planes de conservación. En adición, predicciones a futuro sobre la distribución potencial a través del modelado de nicho ecológico complementarían la información relacionada con los requerimientos ecológicos y de reproducción de la especie como base para la ejecución de planes de conservación.

REFERENCIAS

- Aldrich, M., Bubb, P., Hotstettler, S y Wiel, H. v. d (2000). *Tropical montane cloud forests: Time for action*. Cambridge, UK. IUCN The World Conservation Union.
- Alfonso-Corrado, C., Naranjo-Luna, F., Clark-Tapia, R., Campos, J, E., Rojas-Soto, O, R., Luna-Krauletz, M, D., Bodenhorn, B., Gorgonio-Ramírez, M y Pacheco-Cruz, N. (2017). Effects of Environmental Changes on the Occurrence of *Oreomunnea mexicana* (Juglandaceae) in a Biodiversity Hotspot Cloud Forest. *Forests*, 8(261), 1-15.
- Avice, J, C. (2000). *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
- Axelrod, D, I. (1958). Evolution of the madro-tertiary geoflora. *The Botanical Review*, (24)7, 433-509.
- Barrier, E., Velasquillo, L., Chavez, M y Gaulon, R. (1998). Neotectonic evolution of the Isthmus of Tehuantepec (southeastern Mexico). *Tectonophysics*, 287, 77-96.

- Bayer, C y Kubitzki, K. (2003). Malvaceae. En: K. Kubitzki (Ed.) *The Families and Genera of Vascular Plants* (pp. 276-277) Berlín, Alemania: Editorial Springer.
- Borrell, J, S., Wang, N., Nichols, R, A y Buggs, R, J, A. (2018). Genetic diversity maintained among fragmented populations of a tree undergoing range contraction. *Heredity*, 121, 304-318.
- Brujinzeel, L, A., Kappelle, M., Mulligan, M y Scatena, F, N. (2010). Tropical montane cloud forests: state of knowledge and sustainability perspectives in a changing world. En: L. A. Brujinzeel, F. N. Scatena y L. S. Hamilton (Eds.) *Tropical Montane Cloud Forests: Science for Conservation and Management* (pp. 691-740) Cambridge University Press.
- Bryant, D y Moulton, V. (2004). Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Molecular Biology and Evolution*, 21(2), 255-265.
- Bubb, P., May, I., Miles, L y Sayer, J. (2004). *Cloud forest agenda*, Cambridge UK. UNEP World Conservation Monitoring Centre. ISBN: 92-807-2399-5.
- Bye, R, A y Linares, E. (1983). The role of plants found in the Mexican markets and their importance in ethnobotanical studies. *Journal of Ethnobiology*, 3(1), 1-13.
- Campos-Villanueva, A y Villaseñor, J, L. (1995). Estudio florístico de la porción central del Municipio de San Jerónimo Coatlán, Distrito de Miahuatlán (Oaxaca). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 56, 95-120.
- Cao, Y-N., Wang, I, J., Chen, L-Y., Ding, Y-Q., Liu, L-X y Qiu, Y-X. (2018). Inferring spatial patterns and drivers of population divergence of *Neolitsea sericea* (Lauraceae), based on molecular phylogeography and landscape genomics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 126, 162-172.
- Catalán, H, C., López-Mata, L y Terrazas, T. (2003). Estructura, composición florística y diversidad de especies leñosas de un bosque mesófilo de montaña de Guerrero, México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica*, 74(2), 209-230.

- Cavender-Bares, J., González-Rodríguez, A., Pahlich, A., Koehler, K y Deacon, N. (2011). Phylogeography and climatic niche evolution in live oaks (*Quercus* series *Virentes*) from the tropics to the temperate zone. *Journal of Biogeography*, *38*, 962-981.
- Cavers, S., Navarro, C y Lowe A, K. (2003). Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a Neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. *Molecular Ecology*, *12*, 1451-1460.
- Challenger, A y Soberón, J. (2008). Los ecosistemas terrestres. En J. Soberón, G. Halffter y Llorente-Bousquets. J. (Eds.). Capital natural de México. Vol. I. Conocimiento actual de la biodiversidad (pp. 87-108). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Chimera, C. (2016). TAXON; Chiranthodendron pentadactylon Larreat. Recuperado de: <https://plantpono.org/wp-content/uploads/Chiranthodendronpentadactylon.pdf>
- Cornuet, J-M., Santos, F., Beaumont, M, A., Robert, C, P., Marin, J-M., Balding, D, J., Guillemaud, T y Estoup, A. (2008). Inferring population history with *DIYABC*: a user-friendly approach to approximate Bayesian computation. *Bioinformatics*, *24*(23), 2713-2719.
- Cornuet, J-M., Pudlo, P., Veyssier, J., Dehne-García, A y Estoup, A. (2014). *DIYABC* versión 2.0. A user-friendly software for inferring population history through Approximate Bayesian Computations using microsatellite, DNA sequence and SNP data. Institut National de la Recherche Agronomique.
- Corral-Rosas, V y Morrone, J, J. (2016). Analysing the assembly of cenocrons in the Mexican transition zone through a time-sliced cladistic biogeographic analysis. *Australian Systematic Botany*, *29*, 489-501.
- Darriba, D., Taboada, G, L., Doallo, R y Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, *9*(8), 772.
- Davey, J, W y Blaxter, M, L. (2011). RADSeq: next-generation population genetics. *Briefings in Functional Genomics*, *(9)5*, 416-423.

- De Albuquerque, F, S., Benito, B., Beier, P., Assunção-Albuquerque, M, J y Cayuela, L. (2015). Supporting underrepresented forests in Mesoamerica. *Natureza & Conservação*, 13, 152-158.
- De Lafontaine, G., Turgeon, J y Payette, S. (2010). Phylogeography of white spruce (*Picea glauca*) in eastern North America reveals contrasting ecological trajectories. *Journal of Biogeography*, 37, 741-751.
- Doyle, J, J y Doyle, J, L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Eaton, D, A, R. (2014). PyRAD: assembly of *de novo* RADseq loci for phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 30(13), 1844-1849.
- Earl, D, A y vonHoldt, B, M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4, 359-361.
- Etter, P, D., Bassham, S., Hohenlohe, P, A., Johnson, E, A y Cresko, W, A. (2011). SNP Discovery and Genotyping for Evolutionary Genetics Using RAD Sequencing. *Methods in Molecular Biology*, 772, 157-178.
- Evanno, G., Regnaut, S y Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611-2620.
- Excoffier, L y Lischer, H. (2015). Arlequin ver 3.5. An integrated software package for population genetics data analysis: Swiss Institute of Bioinformatics.
- Fleming, T, H., Geiselman, C y Kress, W, J. (2009). The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective. *Annals of Botany*, 104, 1017-1043.
- Foster, P. (2001). The potential negative effects of global climate change on tropical montane cloud forests. *Earth-Science Reviews*, 55, 73-106.
- Frederiksen, N, O. (1991). Pulses of middle Eocene to earliest Oligocene climatic deterioration in Southern California and the Gulf coast. *Society for Sedimentary Geology*, 6(6), 564-571.
- Fu, Y-X y Li, W-H. (1993). Statistical Tests of Neutrality of Mutations. *Genetics*, 133, 693-709.

- García-Mendoza, A., Tenorio, L, P y Reyes, S, J. (1994). El endemismo de la flora fanerogámica de la mixteca alta, Oaxaca-Puebla, México. *Acta Botánica Mexicana*, 27, 53-73.
- Gardner, T, A., Barlow, J., Chazdon, R., Ewers, R, M., Harvey, C, A., Peres, C, A y Sodhi, N, S. (2009). Prospects for tropical forest biodiversity in a human-modified world. *Ecology Letters*, 12, 561-582.
- Gentry, A, H. (1982). Neotropical floristic diversity: Phytogeographical connections between Central and South America. Pleistocene climatic fluctuations, or an accident of the Andean orogeny? *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 69(3), 557-593.
- González-Espinosa, M., Meave, J, A., Lorea-Hernández, F, G., Ibarra-Manríquez, G y Newton, A, C. (2011). The Red List of Mexican Cloud Forest Trees. Cambridge, UK. Fauna & Flora International. ISBN 9781903703281.
- Graham, A. (1999). *LATE CRETACEOUS and CENOZOIC HISTORY of NORTH AMERICAN VEGETATION*. Nueva York: Oxford University Press.
- Gutiérrez-Rodríguez, C., Ornelas, J, F y Rodríguez-Gómez, F. (2011). Chloroplast DNA phylogeography of a distylous shrub (*Palicourea padifolia*, Rubiaceae) reveals past fragmentation and demographic expansion in Mexican cloud forests. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61, 603-615.
- Hamilton, L, S., Juvik, J, O y Scatena, F, N. (1995). The Puerto Rico Tropical Cloud Forest Symposium: Introduction and Workshop Synthesis. En L. S, Hamilton et al (eds.). Tropical Montane Cloud Forests. Ecological Studies (Analysis and Synthesis). Vol 110. Springer, Nueva York.
- Hare, M, P. (2001). Prospects for nuclear gene phylogeography. *TRENDS in Ecology & Evolution*. 16(12), 700-706.
- Heled, J y Drummond, A, J. (2010). Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution*, 27(3), 570-580.
- Hersch-Martínez, J. (1997). Medicinal Plants and Regional Traders in Mexico: Physiographic Differences and Conservational Challenge. *Economic Botany*, 51(2), 107-120.
- Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405, 907-913.

- Hijmans, R. J., Cameron, S. E., Parra, J. L., Jones, P. G. y Jarvis, A. (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 25, 1965-1978.
- Ho, S. Y. W. y Shapiro, B. (2011). Skyline-plot methods for estimating demographic history from nucleotide sequences. *Molecular Ecology Resources*, 11, 423-434.
- Honorio, C. E. N., Dexter, K. G., Hart, M. L., Phillips, O. L. y Pennington, R. T. (2019). Comparative phylogeography of five widespread tree species: Insights into the history of western Amazonia. *Ecology and Evolution*, 9(12), 7333-7345.
- Huson, D. H. y Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23(2), 254-267.
- Kelman, W., Broadhurst, L. y Brubaker, C. (2006). Genetic relationships among *Fremontodendron* (Sterculiaceae) populations of the Central Sierra Nevada foothills of California. *Madroño*, 53(4), 380-387.
- Krutzsch, W. (1989). Paleogeography and historical phytogeography (paleochorology) in the Neophyticum. *Plant Systematics and Evolution*, 162, 5-61.
- Kuhner, M. K. (2008). Coalescent genealogy samplers: windows into population history. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(2), 86-93.
- Llorente, B. J. y Morrone, J. J. (2001). *Introducción a la biogeografía en Latinoamérica: Teoría, conceptos, métodos y aplicaciones*. Ciudad de México, México: Las Prensas de Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Loveless, M. D. y Hamrick, J. L. (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 15, 65-95.
- Lu, R.-S., Chen, Y., Tamaki, I., Sakaguchi, S., Ding, Y.-Q., Takahashi, D., Li, P., Isaji, Y., Chen, J. y Qiu, Y.-X. (2019). Pre-Quaternary diversification and glacial demographic expansions of *Cardiocrinum* (Liliaceae) in temperate forest biomes of Sino-Japanese Floristic Region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*.
doi: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106693>
- Luna-Vega, I. y Magallón, S. (2010). Phylogenetic composition of Angiosperm diversity in the cloud forests of Mexico. *BIOTROPICA*, 42(4), 444-454.

- McCormack, J. E., Hird, S. M., Zellmer, A. J., Carstens, B. C. y Brumfield, R. T. (2012). Applications of next-generation sequencing to phylogeography and phylogenetics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. doi: 10.1016/j.ympev.2011.12.007
- Marshall, H. D., Newton, C. y Ritland, K. (2002). Chloroplast phylogeography and evolution of highly polymorphic microsatellites in lodgepole pine (*Pinus contorta*). *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 367-378.
- Morris, A. B., Ickert-Bond, S. M., Burke, B. D., Soltis, D. E. y Soltis, P. S. (2008). Phylogeographical structure and temporal complexity in American sweetgum (*Liquidambar styraciflua*; Altingiaceae). *Molecular Ecology*. 17, 3889-3900.
- Morrone, J. J. (2019). Regionalización biogeográfica y evolución biótica de México: encrucijada de la biodiversidad del Nuevo Mundo. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 90, e902980.
- Morse, K. (2017). *Chylismia* Extraction Protocol. [DNA extraction protocols]. California Botanic Garden, Claremont, California, USA.
- Myers, N., Mittermeyer, R. A., Mittermeyer, C. G., da Fonseca, G. A. B. y Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853-858.
- Nei, M. (1975). *MOLECULAR POPULATION GENETICS AND EVOLUTION*. Amsterdam: North-Holland Publishing Company.
- Nei, M. y Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press.
- Ogilvie, H. A., Bouckaert, R. R. y Drummond, A. J. (2017). StarBEAST2 brings faster species tree inference and accurate estimates of substitution rates. *Molecular Biology and Evolution*, 34(8), 2101-2114.
- Ornelas, J. F., Gándara, E., Vásquez-Aguilar, A. A., Ramírez-Barahona, S., Ortiz-Rodríguez, A. E., González, C., Mejía, S. M. T. y Ruíz-Sánchez, E. (2016). A mistletoe tale: postglacial invasión of *Psittacanthus schiedeanus* (Loranthaceae) to Mesoamerican cloud forests revealed by molecular data and species distribution modeling. *BMC Evolutionary Biology*, 16(78), 1-20.

- Ornelas, J, F., Ortíz-Rodríguez, A, E., Ruíz-Sánchez, E., Sosa, V y Pérez-Farrera, M, A. (2019). Ups and downs: Genetic differentiation among populations of the *Podocarpus* (Podocarpaceae) species in Mesoamerica. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 138, 17-30.
- Ornelas, J, F y Rodríguez-Gómez, F. (2015). Influence of Pleistocene glacial/interglacial cycles on the genetic structure of the mistletoe cactus *Rhipsalis baccifera* (Cactaceae) in Mesoamerica. *Journal of Heredity*, 106(2), 196-210.
- Ornelas, J, F., Ruíz-Sánchez, E y Sosa, V. (2010). Phylogeography of *Podocarpus matudae* (Podocarpaceae): pre-Quaternary relicts in northern Mesoamerican cloud forests. *Journal of Biogeography*, 37(12), 2384-2396.
- Ornelas, J, F., Sosa, V., Soltis, D, E., Daza, J, M., González, C., Soltis, P, S., Gutiérrez-Rodríguez, C., Espinosa de los Monteros, A., Castoe, T, A., Bell, C y Ruíz-Sánchez, E. (2013). Comparative phylogeographic analyses illustrate the complex evolutionary history of threatened cloud forests of Northern Mesoamerica. *PLoS ONE*, 8(2), 1-11.
- Ortíz, A, L. [TED^x]. (2012, septiembre 4). Lienzo de Quauhquechollan: un mapa que cuenta una historia: Ana Lucía Ortiz at TEDxUFM. [Archivo de video]. Recuperado de: <https://newmedia.ufm.edu/coleccion/tedxufm/2012-ana-lucia-ortiz-lienzo-de-quauhquechollan-un-mapa-que-cuenta-una-historia/>
- Osuna-Fernández, R., Laguna-Hernández, G., Brechú-Franco, A y Orozco-Segovia, A. (1997). Germinación de *Chiranthodendron pentadactylon* Larr. (Sterculiaceae), en respuesta a la escarificación, temperatura y luz. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 60, 5-14.
- Pan, Y., Wang, X., Sun, G., Li, F y Gong, X. (2016). Application of RAD Sequencing for Evaluating the Genetic Diversity of Domesticated *Panax notoginseng* (Araliaceae). *PLoS ONE*, 11(11), 1-17.
- Past Interglacials Working Group of PAGES. (2016). Interglacials of the last 800,000 years. *Reviews of Geophysics*, 54, 162-219.
- Park, B y Donogue, M, J. (2019). Phylogeography of a widespread eastern North American shrub, *Viburnum lantanoides*. *American Journal of Botany*, 106(3), 389-401.

- Pavek, D, S. (1993) *Fremontodendron californicum*. En: Fire Effects Information System. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fire Sciences Laboratory.
- Recuperado de: <https://www.fs.fed.us/database/feis/plants/shrub/frecal/all.html>
- Peñaloza-Ramírez, J, M., Rodríguez-Correa, H., González-Rodríguez, A., Rocha-Ramírez, V y Oyama, K. (2020). High genetic diversity and stable Pleistocene distributional ranges in the widespread Mexican red oak *Quercus castanea* Née (1801) (Fagaceae). *Ecology and Evolution*, 10(10), 1-16.
- Peterson, A, A y Peterson, A, T. (1992). Aztec exploitation of cloud forests: tributes of liquidambar resins and quetzal feathers. *Global Ecology and Biogeography Letters*, 2, 165-173.
- Petit, R, J y Hampe, A. (2006). Some evolutionary consequences of being a tree. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 37, 187-214.
- Phillips, S, J., Dubik, M y Schapire, R, E. (2006). Maxent software for modeling species niches and distributions (Version 3.4.1). Recuperado de: http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/maxent/
- Piñero, D., Barahona, A., Eguiarte, L., Rocha, O, A y Salas, L, R. (2008). En J. Soberón, G. Halffter y Llorente-Bousquets. J. (Eds.). Capital natural de México. Vol. I. Conocimiento actual de la biodiversidad (pp. 415-435). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Poelchau, M, F y Hamrick, J, L. (2011). Comparative phylogeography of three common Neotropical tree species. *Journal of Biogeography*, 40(4), 1-14.
- Porras-Hurtado, L., Ruiz, Y., Santos, C., Phillips, C., Carracedo, A y Lareu, M, V. (2013). An overview of *STRUCTURE*: applications, parameter settings and supporting software. *Frontiers in Genetics*, 4(98), 1-13.
- Ramasamy, R, K., Ramasamy, S., Bindroo, B, B y Naik, V, G. (2014). STRUCTURE PLOT: a program for drawing elegant STRUCTURE bar plots in user friendly interface. *SpringerPlus*, 3(431), 1-3.

- Ramírez-Barahona, S y Eguiarte, L, E. (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(3), 725-738.
- Ramírez-Marcial, N., Ochoa-Gaona, S y González-Espinosa, M. (1998). Análisis florístico y sucesional en la estación biológica Cerro Huitepec, Chiapas, México. *Acta Botánica Mexicana*, 44, 59-85.
- Raven, P, H y Axelrod, D, I. (1974). Angiosperm biogeography and past continental movements. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 61(3), 539-673.
- Ren, G., Mateo, R, G., Liu, J., Suchan, T., Alvarez, N., Guisan, A., Conti, E y Salamin, N. (2017). Genetic consequences of Quaternary climatic oscillations in the Himalayas: *Primula tibetica* as a case study based on restriction site-associated DNA sequencing. *New Phytologist*, 213, 1500-1512.
- Richardson, J, E., Whitlock, B, A., Meerow, A, W y Madriñán, S. (2015). The age of chocolate: a diversification history of *Theobroma* and Malvaceae. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 3(120), 1-14.
- Riddle, B, R. (1996). The molecular phylogeographic bridge between deep and shallow history in continental biotas. *TREE*, 11(5), 207-211.
- Rosenberg, N, A y Nordborg, M. (2002). Genealogical trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature Reviews Genetics*, 3, 380-390.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J, C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S, E y Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299-3302.
- Ruíz-Sánchez, E y Ornelas, J, F. (2014). Phylogeography of *Liquidambar styraciflua* (Altingiaceae) in Mesoamerica: survivors of a Neogene widespread temperate forest (or cloud forest) in North America? *Ecology and Evolution*, 4(4), 311-328.
- Rzedowski, J. (1994). *Vegetación de México*. México D.F, México: Editorial Limusa.
- Saeki, I., Dick, C, W., Barnes, B, V y Murakami, N. (2011). Comparative phylogeography of red maple (*Acer rubrum* L.) and silver maple (*Acer saccharinum* L.): impacts of

habitat specialization, hybridization and glacial history. *Journal of Biogeography*, 38, 992-1005.

Sakaguchi, S., Kimura, T., Kyan, R., Maki, M., Nishino, T., Ishikawa, N., Nagano, A, J., Honjo, M, N., Yasugi, M., Kudoh, H., Li, P., Choi, H, J., Chernyagina, O, A y Ito, M. (2017). Phylogeographic analysis of the East Asian goldenrod (*Solidago virgaurea* complex, Asteraceae) reveals hidden ecological diversification with recurrent formation of ecotypes. *Annals of Botany*, 00, 1-12.

Scatena, F, N., Brujinzeel, L, A., Bubb, P y Das, S. (2010). Setting the stage. En: L. A. Brujinzeel, F. N. Scatena y L. S. Hamilton (Eds.) *Tropical Montane Cloud Forests: Science for Conservation and Management* (pp. 3-11) Cambridge University Press.

Scotti-Saintagne, C., Dick, C, W., Caron, H., Vendramin, G, G., Guichoux, E., Buonanici, A., Duret, C., Sire, P., Valencia, R., Lemes, M, R., Gribel, R y Scotti, I. (2013). Phylogeography of a species complex of lowland Neotropical rain forest trees (*Carapa*, Meliaceae). *Journal of Biogeography*, (40)4, 1-17.

SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales) (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, México.

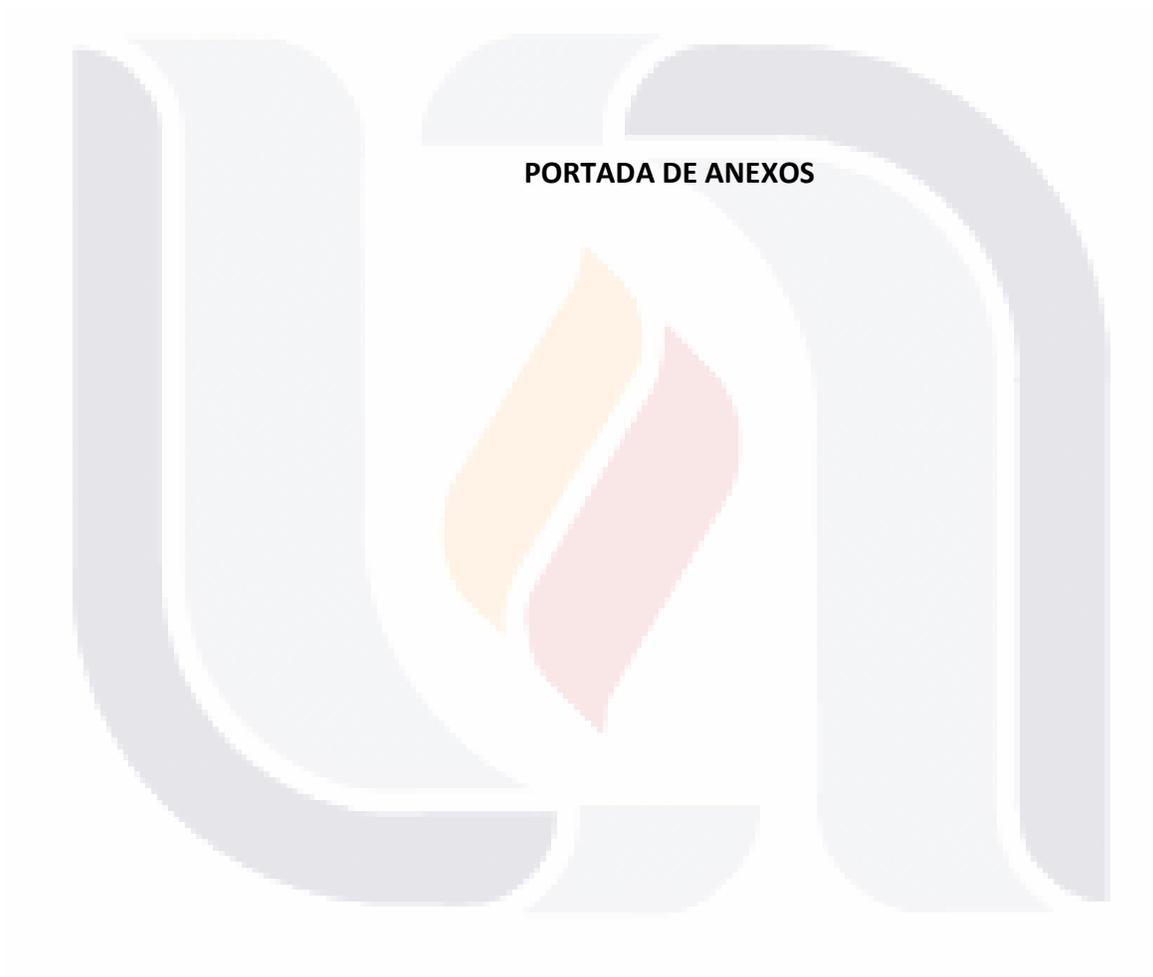
Standley, P, C y Steyermark, J, A. (1949). *Flora of Guatemala*, Volume 24, Part IV, Chicago Natural History Museum.

Toledo, V, M. (1975). *Chiranthodendron pentadactylon* Larreategui (Sterculiaceae): Una especie polinizada por aves percheras. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 35, 59-67.

Universidad Francisco Marroquín [UFM] (2009). Quauhquechollan. El lienzo de la conquista. Recuperado de <https://lienzo.ufm.edu/>

Varela, S., Lima-Ribeiro, M, S y Terribile, L, C. (2015). A short guide to the climatic variables of the last glacial maximum for biogeographers. *PLoS ONE*, 10(6), 1-15.

- Velázquez, C., Calzada, F., Esquivel, B., Barbosa, E y Calzada, S. (2009). Antisecretory activity from the flowers of *Chiranthodendron pentadactylon* and its flavonoids on intestinal fluid accumulation induced by *Vibrio cholerae* toxin in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 126, 455-458.
- Véliz, P, M, E. (1989). *Caracterización de la comunidad de Canac (Chiranthodendron pentadactylon Larreategui) en el volcán de Acatenango* (tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Vivero, J, L., Szejner, M., Gordon, J y Magin, G. (2006). *The Red List of Trees of Guatemala*, Cambridge, UK. Fauna & Flora International. ISBN 1 903703 22 0.
- Wolfe, K, H., Li, W-H y Sharp, P, M. (1987). Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84, 9054-9058.
- Yu, X., Yang, D., Guo, C y Gao, L. (2018). Plant phylogenomics based on genome-partitioning strategies: Progress and prospects. *Plant Diversity*, 40, 158-164.
- Záveská, E., Maylandt, C., Paun, O., Bertel, C., Frajman, B., The STEPPE Consortium y Schönswetter, P. (2019). Multiple auto- and allopolyploidisations marked the Pleistocene history of the widespread Eurasian steppe plant *Astragalus onobrychis* (Fabaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 139, 1-12.
- Zhou, W., Ji, X., Obata, S., Pais, A., Dong, Y., Peet, R y (Jenny) Xiang, Q-Y. (2018). Resolving relationships and phylogeographic history of the *Nyssa sylvatica* complex using data from RAD-seq and species distribution modeling, *Molecular Phylogenetics and Evolution*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.04.001>



PORTADA DE ANEXOS

ANEXO A. Estadísticas del ensamblaje *de novo* de las secuencias alineadas mediante el programa ipyrad. El código de muestra corresponde a los sitios de colecta. Chi1: Motozintla, Chiapas. Chi2: Volcán Tacaná, Chiapas. Chi3: San Cristóbal de las Casas, Chiapas. GTM1: Volcán Acatenango, Chimaltenango. GTM2: Chimaltenango-Quetzaltenango. GTM3: Totonicapán, Pologué. GTM4: Sierra de los Cuchumatanes, Huehuetenango. Gue: Carrizal de Bravo, Guerrero. Oax: Miahuatlán de Porfirio Díaz, Oaxaca.

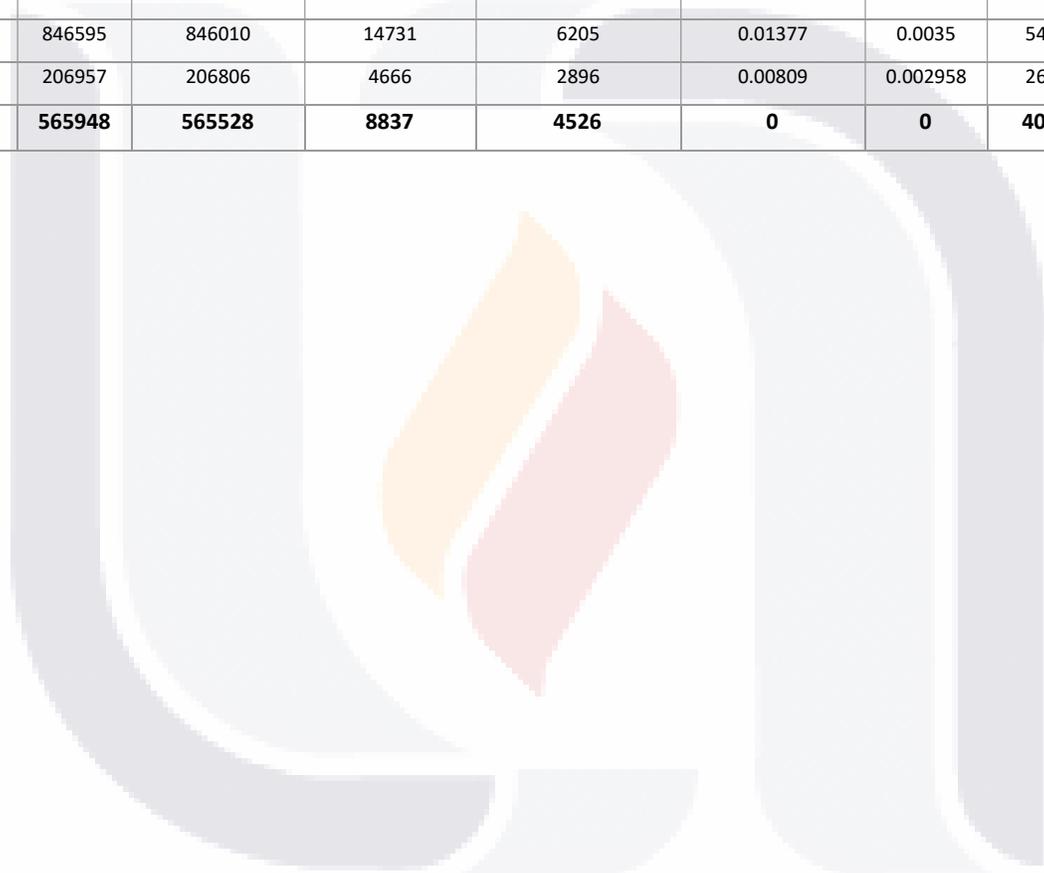
Código/muestra	Lecturas crudas	Número de lecturas que pasaron filtrado	Número total de agrupamientos	Número total de agrupamientos de alta profundidad de cobertura	Heterocigosidad estimada	Error estimado	Lecturas consenso	Número total de loci en el ensamblaje
Chi1_1	546079	545673	9776	5246	0.00969	0.003227	4699	70
Chi1_2	489776	489374	8549	4634	0.00927	0.002942	4182	68
Chi1_3	646230	645729	13421	6967	0.00952	0.003352	6194	70
Chi1_4	840221	839641	12634	5927	0.01018	0.003054	5241	70
Chi1_5	1706978	1705859	19587	8078	0.01229	0.00265	7018	68
Chi2_1	1285631	1284726	13385	5527	0.01029	0.002382	4898	70
Chi2_2	865617	865031	13808	6523	0.0111	0.003457	5729	70
Chi2_3	813890	813261	11112	6236	0.00848	0.002741	5692	70
Chi2_4	924608	923895	12215	5765	0.01009	0.00277	5109	70
Chi2_5	697781	697229	9218	4651	0.0095	0.002816	4183	70
Chi3_1	1702335	1700855	21873	9140	0.0078	0.002523	8312	66
Chi3_2	873901	873260	10508	5022	0.00931	0.002292	4514	68
Chi3_3	730845	730333	9128	4535	0.01024	0.002537	4062	70
Chi3_4	774027	773503	11972	6303	0.00932	0.003038	5713	70
Chi3_5	793729	793164	10747	5240	0.01001	0.003082	4708	70
GTM1_1	185872	185737	4172	2695	0.00657	0.00309	2487	64
GTM1_2	754587	754035	10598	5449	0.00871	0.002992	4939	70
GTM1_3	400025	399803	7275	4372	0.00811	0.002523	3958	69
GTM1_4	581775	581387	9091	4874	0.00639	0.002645	4407	69
GTM1_5	557839	557472	9637	5452	0.00756	0.003161	4989	69
GTM1_6	973189	972392	12610	5403	0.01031	0.00247	4809	70
GTM1_7	1586948	1585662	19984	7039	0.01228	0.002655	6152	69
GTM1_8	940421	939756	12017	5512	0.01024	0.002628	4902	70
GTM1_9	864150	863568	11031	5190	0.01059	0.002459	4612	70
GTM1_10	787584	786987	12062	5839	0.00948	0.002973	5213	70
GTM2_1	357762	357489	6795	3821	0.00901	0.002619	3461	65
GTM2_2	776247	775661	14535	6031	0.01074	0.00366	5376	70
GTM2_3	905071	904355	11853	5468	0.00926	0.002682	4896	70
GTM2_4	394718	394418	7236	4284	0.00866	0.002474	3904	69

ANEXO A. (Continuación)

Código/muestra	Lecturas crudas	Número de lecturas que pasaron filtrado	Número total de agrupamientos	Número total de agrupamientos de alta profundidad de cobertura	Heterocigosidad estimada	Error estimado	Lecturas consenso	Número total de loci en el ensamblaje
GTM2_5	438774	438465	8130	4421	0.00874	0.002923	4002	70
GTM2_6	254366	254153	4722	2946	0.00708	0.002824	2733	69
GTM2_7	397926	397634	6654	3608	0.00847	0.003096	3302	70
GTM2_8	293207	293090	5601	3451	0.0092	0.002435	3151	70
GTM2_9	445555	445240	6449	3773	0.00937	0.002379	3414	69
GTM3_1	252717	252538	4914	3030	0.0086	0.002735	2766	68
GTM3_2	341381	341071	6656	3625	0.00823	0.003314	3266	68
GTM3_3	315385	315113	5877	3255	0.01239	0.003414	2918	67
GTM3_4	96634	96551	2407	1570	0.00529	0.002565	1474	54
GTM3_5	64032	63975	1872	1223	0.00622	0.002228	1125	44
GTM4_1	309955	309724	5880	3345	0.00805	0.003104	3056	69
GTM4_2	514687	514310	7190	4028	0.00896	0.002966	3643	69
GTM4_3	1104390	1103558	12416	5003	0.00965	0.002385	4481	70
GTM4_4	296094	295888	5279	3289	0.00807	0.002673	3025	67
GTM4_5	376992	376742	5961	3569	0.00875	0.00263	3263	67
GTM4_6	290257	290059	5810	3279	0.00905	0.00291	2967	70
GTM4_7	413099	412746	6256	3744	0.00879	0.002388	3392	70
GTM4_8	116993	116901	3684	2092	0.00709	0.002997	1919	59
GTM4_9	987126	986380	16324	7901	0.00814	0.003376	7173	70
GTM4_10	419083	418768	7223	4344	0.00844	0.002865	3965	68
Gue_1	404544	404237	7548	4228	0.00983	0.003388	3764	69
Gue_2	216691	216534	4740	2882	0.00812	0.002978	2628	61
Gue_3	275546	275322	5483	3291	0.0085	0.002944	2992	62
Gue_4	464656	464283	7401	4313	0.00916	0.002524	3946	67
Gue_5	433684	433341	8506	4871	0.0087	0.003707	4412	67
Gue_6	343654	343432	6047	3633	0.00886	0.002659	3311	69
Gue_7	201196	201022	4819	3060	0.0077	0.002653	2800	64
Gue_8	254043	253846	6132	3553	0.00875	0.003888	3198	61
Gue_9	403191	402918	7326	4331	0.00883	0.003231	3913	67
Gue_10	241461	241267	4861	3151	0.00672	0.00356	2905	67
Oax_1	288110	287928	5940	3484	0.00819	0.002799	3180	65
Oax_2	603792	603319	11061	5475	0.01124	0.003272	4850	69
Oax_3	361850	361599	6238	3850	0.00937	0.002727	3482	69

ANEXO A. (Continuación)

Código/muestra	Lecturas crudas	Número de lecturas que pasaron filtrado	Número total de agrupamientos	Número total de agrupamientos de alta profundidad de cobertura	Heterocigosidad estimada	Error estimado	Lecturas consenso	Número total de loci en el ensamblaje
Oax_4	289744	289516	5767	3374	0.00807	0.003374	3068	66
Oax_5	323827	323576	6387	3646	0.00833	0.002959	3299	68
Oax_6	165857	165739	4431	2796	0.00809	0.002323	2549	65
Oax_7	492607	492288	10202	5389	0.01056	0.003581	4790	69
Oax_8	745929	745309	11340	5179	0.01074	0.002999	4622	70
Oax_9	846595	846010	14731	6205	0.01377	0.0035	5411	69
Oax_10	206957	206806	4666	2896	0.00809	0.002958	2655	63
Promedio	565948	565528	8837	4526	0	0	4075	



ANEXO B. Modelos de sustitución estimados usando jModeltest2 y sus equivalentes en StarBEAST2, StarBEAST y BEAST2. *Operadores desactivados. **Frecuencias base establecidas a igual.

Análisis: Estimación de tiempos de divergencia		
Locus nuclear	jModeltest2	StarBEAST2
1	TPM1	HKY+G
2	F81	GTR
3	TrNef	TN93
4	HKY + G	HKY
5	F81	GTR*
6	K80	HKY**
7	F81	GTR*
8	JC	JC69
9	TrNef	TN93**
10	TrN	TN93
11	TPM3uf	HKY+I+G
12	TrNef	TN93**
13	F81	GTR*
14	TPM2uf	HKY
15	TrN	TN93
16	HKY	HKY
17	F81	GTR*
18	TrN+I	TN93
19	GTR	GTR
20	TPM2uf	HKY
21	TIM3	GTR*
22	TPM3uf	HKY+I+G
23	HKY	HKY
24	TPM1uf + G	HKY
25	TPM2uf	HKY
26	TIM1+I+G	GTR*
27	HKY+I	HKY

ANEXO B. (Continuación)

Análisis: Estimación de tiempos de divergencia		
Locus nuclear	jModeltest2	StarBEAST2
28	TIM2+I	GTR*
29	JC	JC69
30	TPM2uf+G	HKY
31	TPM1uf	HKY
32	F81	GTR*
33	TPM2uf	HKY
34	F81	GTR*
35	K80	HKY**
36	HKY	HKY
	jModeltest2	StarBEAST
SNPs ligados	TPM2ef + G	HKY

Análisis: Skyline Plots Bayesianos		
Conjunto de SNPs ligados	jModeltest2	BEAST2
Población Oeste	GTR+G	GTR
Población Este	SYM+G	GTR**

ANEXO C. Variables predictivas usadas en la predicción de distribuciones potenciales mediante el método de máxima entropía.

Variable predictiva	Porcentaje de contribución
BIO8-Temperatura promedio del trimestre más lluvioso	33.7
BIO4- Estacionalidad de la temperatura (desviación estándar * 100)	30.6
BIO2-Rango de temperatura media diurna (media mensual de (temp. máxima – temp. mínima))	12
BIO6-Temperatura mínima del mes más frío	11.4
BIO5-Temperatura máxima del mes más cálido	9.1
BIO10-Temperatura promedio del trimestre más cálido	1.3
BIO1-Temperatura media anual	0.7
BIO9-Temperatura promedio del trimestre más seco	0.7
BIO11-Temperatura promedio del trimestre más frío	0.5

ANEXO D. Resultados del método de Evanno obtenidos del programa STRUCTURE HARVESTER. El número K de grupos más probable es de 2. Este valor lo indica el valor de Delta K el cual se define como la derivada de segundo orden de la probabilidad logarítmica de los datos crudos con respecto al número K de grupos simulados.

<i>K</i>	<i>Reps</i>	<i>Mean LnP(K)</i>	<i>Stdev LnP(K)</i>	<i>Ln'(K)</i>	<i> Ln''(K) </i>	<i>Delta K</i>
1	10	-3025.96	0.0516	-	-	-
2	10	-1824.86	1.1974	1201.1	1120.62	935.874139
3	10	-1744.38	7.3676	80.48	26.07	3.538458
4	10	-1689.97	6.7277	54.41	90.03	13.381931
5	10	-1725.59	234.235	-35.62	69.09	0.29496
6	10	-1692.12	84.0963	33.47	24.77	0.294543
7	10	-1683.42	27.2742	8.7	71.94	2.637662
8	10	-1746.66	275.1114	-63.24	116.71	0.424228
9	10	-1693.19	57.6657	53.47	-	-