



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS  
DE HIDALGO  
FACULTAD DE BIOLOGÍA**

---

División de estudios de posgrado  
Programa institucional de Maestría en ciencias biológicas

“Genética de la restauración  
para poblaciones de *Ceiba aesculifolia*  
en el Área Natural Protegida Punhuato”

TESIS

Que Como requisito para obtener  
el grado de:

Maestro en ciencias Biológicas

Presenta:

Edgar Ismael Olvera Mendoza

Directores:

Dra. Sabina Irene Lara Cabrera  
Dr. Roberto Antonio Lindig Cisneros

Morelia, Michoacán, Marzo de 2012



## *Agradecimientos.*

*Agradezco a la Dra. Sabina y el Dr Roberto por permitirme ser parte de este proyecto, por todas su ayuda y consejos proporcionadas, a mis sinodales Dra Gabriela Dominguez Vázquez, Dra Yvonne Herrerías Diego y el Dr. Cuautemoc Saenz Romero por sus valiosos comentarios durante la elaboración de este trabajo. A la M.C. Brenda Bedolla por toda su ayuda en el laboratorio, y tanto consejo dado. A el entonces director de el Area Natural Protegida Punhuato Dr. Arnulfo Blanco García y trabajadores que mantiene y realizan grandes esfuerzos para mantener ese bonito e importante espacio. A el M.C. Oscar por haber realizado el experimento de establecimiento de las plantulas de Ceiba aesculifolia y su acompañamiento para ubicarlas en el momento de la colecta de las hojas, a mis compañeras de laboratorio, Carmen, Lili, Luz, Mayra e Yocupitzia por ayuda en colecta y/o otras ayudas las cuales fueron surgiendo durante los dos años. A Nacho y Rafa por la ayuda de colecta en Tzitzio. A Mayra y Carlos por el Mapa de vegetación que realizaron y me proporcionaron. A todos mis amigos por todos los tragos dados (los que mas veo y recuerdo: Kike, Andrea, Alfredo, Paty, Beto, Ricardo, Juan Luis, Colin, Rigo, Enrique, Orlando, Sara, Mauro, Osvaldo, Lobo, Cesar, Davicho, Emilio, Matea y Maru), y de estos a alguno que otro que seguro me ayudo en algo pero que se me olvido mencionar lo. A el Gueto de San Miguel Allende, A mis padres y mi hermana Yochabel, por aguantarme tanto cada vez que caigo.*

*Y finalmente Agradezco a la UMSNH, la facultad de Biología y su posgrado, a el financiamiento realizado por el proyecto de la coordinación de la Investigacion Cientifica 8.16, los fondos institucionales del centro de investigaciones en Ecosistemas UNAM, y a Conacyt por la beca proporcionada durante estos dos años.*

*A mis abuelos: Francisco†-Juana,  
Enrique†-Juana† y mi  
Bisabuelo Isaac†.*

## Índice

Resumen. ....	1
Introducción. ....	2
Antecedentes. ....	3
Genética de poblaciones. ....	3
Ecología de la restauración. ....	4
Genética de la restauración. ....	4
Marcadores moleculares. ....	5
AFLP. (Polimorfismo de longitud de Fragmentos Amplificados). ....	6
<i>Ceiba aesculifolia</i> (H.B.K.) Britt. & Baker, Journ. Bot. 34: 175. 1896 Basado en Carranza-Gonzales, 2000). ....	8
Objetivos. ....	9
Hipótesis. ....	9
Metodología. ....	10
Sitios de colecta. ....	10
Extracción del ADN. ....	11
AFLP. (Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados). ....	12
Análisis de los datos. ....	13
Resultados. ....	15
Resultados tomando en cuenta siete poblaciones “E2170, E2200, E2230, E2260, Progenitora, Cuitzeo y Tzitzio” ....	16
Resultados tomando en cuenta cuatro poblaciones “Establecidas, Progenitora, Cuitzeo y Tzitzio” ....	19

Discusiones.	.....	27
Diversidad genética encontrada.	.....	27
Conectividad genética entre las poblaciones evaluadas.	.....	28
Mayor diversidad encontrada en poblaciones con numero menor de individuos.	.....	30
¿Existen genotipos distintivos entre las poblaciones?	.....	30
Conclusiones.	.....	32
Bibliografía.	.....	33

## Índice de tablas, figuras y anexos.

### Tablas.

Tabla 1.	Total de combinaciones posibles por medio de los 8 primers MseI y los 8 primers EcoRI para AFLP. ....	6
Tabla 2.	Sitios de procedencia de las muestras colectadas. ....	11
Tabla 3.	Combinación de los 15 oligonucleótidos evaluados. ....	12
Tabla 4.	Primers seleccionados, numero de Loci encontrados por cada una de las combinaciones y en total. ....	15
Tabla 5.	Estructura genética intra-poblacional, de 7 poblaciones de <i>C. aesculifolia</i> 18 .....	16
Tabla 6.	Distancia genética inter-poblacional (GD) de 7 poblaciones. ....	16
Tabla 7.	Prueba para la diferenciación entre poblaciones “Exact test”, en base a la frecuencia alélica entre 7 poblaciones.....	18
Tabla 8.	Estructura genética intra-poblacional de 4 poblaciones de <i>C. aesculifolia</i> .....	19
Tabla 9.	Distancia genética inter-poblacional (GD) de 4 poblaciones .....	19
Tabla 10.	Prueba para la diferenciación entre poblaciones “Exact test”, en base a la frecuencia alélica entre 4 poblaciones.....	21
Tabla 11.	Aportación porcentual para cada agrupamiento Ks encontrado en cada una de las 7 poblaciones. ....	23
Tabla 12.	Aportación porcentual para cada agrupamiento Ks encontrado en cada una de las 4 poblaciones. ....	25
Tabla 13.	Rangos de diversidad genética encontrados en arboles, por medio de AFLP. ....	27
Tabla 14.	Aportación porcentual para cada agrupamiento Ks encontrado en cada una de las poblaciones y diversidad genética ( $H_E$ ). ....	30

### **Figuras.**

Figura 1.	Distribución de <i>Ceiba aesculifolia</i> , Mapa modificado de Gibbs P., y Semir J. (2003). .....	8
Figura 2.	Ubicación de los sitios de las poblaciones Progenitora, Establecidas y Externas a el ANP Punhuato. ....	10
Figura 3.	Pseudo-imagen del gel con la combinación de primers EcoRI-ACC-FAM/CTA-MseI. ....	15
Figura 4.	Dendrograma de UPGMA basado en los valores de $F_{ST}$ pareados entre 7 poblaciones de <i>C. aesculifolia</i> . ....	17
Figura 5.	Dendrograma de UPGMA basado en los valores de $F_{ST}$ pareados entre 4 poblaciones de <i>C. aesculifolia</i> . ....	20
Figura 6.	Se destaca a K3 dentro dentro de los agrupamientos propuestos....	21
Figura 7.	Gráfica de barras proporcionada por Structure V 2.3 para K3. En a) 7poblaciones y en b) 4 poblaciones. ....	22
Figura 8.	Aporte porcentual de cada combinación de genotipo, dentro de cada población, tomando en cuenta 7 poblaciones. ....	23
Figura 9.	Combinación del dendrograma (Figura 4), con la proporción de cada Ks observadas con Structure V 2.3 (Pritchard <i>et al.</i> 2000).....	24
Figura 10.	Aporte porcentual de cada combinación de genotipo, dentro de cada población, tomando en cuenta 4 poblaciones. ....	25
Figura 11.	Combinación del dendrograma (Figura 5), con la proporción de cada Ks observadas con Structure V 2.3 (Pritchard <i>et al.</i> 2000).....	26
Figura 12.	Vegetación existente entre sitios. ....	29
Figura 13.	Diferencias entre cuatro pares de poblaciones detectada con Exact Test, ilustradas con proporciones genotípicas encontradas con Structure. ....	31

### **Anexos**

Anexo 1.	Protocolo de Extracción y limpieza de ADN MINI-PREP (Lefort y Douglas, 1999). .....	37
Anexo 2.	Protocolo para AFLP de Applied Biosystem. ....	39
Anexo 3.	Valores Ln P(D) obtenidos por Structure V 2.3 (Pritchard <i>et al.</i> 2000) para cada diferente numero de agrupamientos, de K1 a k10. ....	41
Anexo 4	Probabilidades individuales para los 123 individuos calculados por Structure V 2.3 (Pritchard <i>et al.</i> 2000) de k3 seleccionado.	42



### Resumen

La genética de la restauración es la síntesis de la ecología de restauración con la genética de poblaciones, en la cual se incorpora la diversidad genética en las decisiones de colecta de semilla para la restauración para lograr éxito en el establecimiento al largo plazo manteniendo el potencial evolutivo. En el presente trabajo se estima la diversidad genética de los individuos establecidos en un esfuerzo de restauración de *Ceiba aesculifolia* en el Área Natural Protegida Cerro del Punhuato (ANP-CP) Morelia Michoacán de Ocampo. Se muestrearon 90 individuos en el ANP incluyendo la población progenitora, los establecidos (E) en cuatro cotas altitudinales (2170, 2200, 2230 y 2260) y dos poblaciones externas al ANP-CP, Cuitzeo y Tzitzio. Se amplificaron 445 bandas de AFLP (Polimorfismo de la Longitud de Fragmentos Amplificados) utilizando tres combinaciones de primers. En AFLP-SURV version 1.0 se obtuvo de 38.4% a 62.5% de polimorfismo; una diversidad genética total  $H_T = 0.1724$  y diversidad genética por población  $H_E$  de 0.13 a 0.22, siendo Cuitzeo la población con menor diversidad genética y E2170 la más diversa. Las poblaciones más similares (GI) fueron E2170 y E2230. El dendrograma UPGMA basado en los valores pareados de  $F_{ST}$  muestra que las poblaciones más parecidas son la Progenitora con E2200. Mediante un análisis Bayesiano en Structure (K3; LP(D) = -16081.68), se determinaron tres combinaciones genéticas (alelos) en diferentes proporciones para las 7 poblaciones; las poblaciones E2200 y E2230 que tuvieron mayor sobrevivencia en el esfuerzo de restauración presentaron la combinación de alelos Ks1 en mayor proporción y son más similares a la Progenitora sugiriendo un desplazamiento altitudinal con efectos selectivos. Se evidencia molecularmente la necesidad de migrar esta especie altitudinalmente, para lograr mejor establecimiento de *C. aesculifolia* en el ANP-CP.

### **Introducción.**

La gran diversidad de formas y aptitudes de los organismos, incluyendo los procesos fisiológicos, la tolerancia a ambientes extremos, la habilidad de colonizar y dispersarse, se mantienen resguardadas en el material genético de los distintos individuos, las variantes ahí resguardadas forman parte de la diversidad genética, la cual esta compuesta por una gran complejidad de alelos, que son las variantes de los distintos genes que permiten las diferentes adaptaciones en los organismos (Furnier 2004, Cambell *et al.* 1996). Esta diversidad genética entre los organismos permite que se incremente la probabilidad de que algunos individuos sobrevivan y se reproduzcan, variando así su adecuación, y permitiendo que existan futuros progenitores para las subsiguientes generaciones (Curtis 2001, Falk *et al.* 2009). La incorporación de marcadores moleculares en trabajos de investigación con poblaciones nos permiten determinar la diversidad genética inter e intra poblacional (Agarwal *et al.* 2008), de tal manera que con esta información es posible crear estrategias de conservación (Shanon *et al.* 1996), además de ser incorporados en trabajos de restauración ecológica permitiendo conocer el potencial que podría tener una plantación a largo plazo, procurando que la diversidad genética sea alta, para tener mayor probabilidad de persistencia y mantener el potencial evolutivo de las especies (McKay, 2005).

En el presente trabajo se incorporó el uso del marcador molecular AFLP, Polimorfismo de la Longitud de Fragmentos Amplificados (Vos *et al.* 1995) a un estudio de restauración ecológica iniciado en 2007, dentro del Área Natural Protegida del Cerro del Punhuato (ANP-CP), Morelia, Michoacán de Ocampo, por Valle-Díaz y colaboradores (2009)- En ese estudio se documentó un cambio en el rango altitudinal óptimo para el establecimiento de las plantas de esta especie, encontrándose la mayor tasa de sobrevivencia 160 m más alto al límite altitudinal mostrado por los adultos progenitores, y cercano al límite más alto reportado para la especie en una escala regional de 2200 msnm.

En este trabajo se determinó la diversidad genética inter e intra poblacional de los individuos establecidos a las cuatro cotas altitudinales utilizadas en Valle-Díaz y colaboradores (2009), la población progenitora de la cual se colectó la semilla para dar origen a los establecidos, y dos poblaciones externas a el ANP-CP. Y poder comprobar si existen genotipos diferentes entre los individuos de las distintas poblaciones, principalmente la cotas establecidas con mayor éxito y la población de origen, permitiéndonos conocer si existe una relación de los sobrevivientes y su genotipo.

## ***Antecedentes.***

### ***Genética de poblaciones.***

La genética de poblaciones es la disciplina que estudia los procesos que ocasionan cambios en los alelos (Cambell *et al.* 1996), esta proporciona un marco de referencia del estado de una especie al muestrear algunos parámetros básicos como el número de alelos, diversidad genética, niveles esperados y observados de heterocigosidad y parámetros de variación entre poblaciones (Nelson, 2005). En esta disciplina la herramienta fundamental es la ley de Hardy-Weiberg, que establece: a partir de cualquier frecuencia genotípica inicial, a la siguiente generación se da una relación en cuanto a la frecuencia de los genes, la cual se mantiene si se cumplen las siguientes cuatro condiciones: 1) el tamaño de la población sea muy grande; 2) todos los apareamientos se lleven a cabo al azar; 3) todos los individuos sean igualmente competentes para dejar descendencia; y 4) que no lleguen alelos de fuentes externas ; así las fuerzas que rompen este equilibrio y moldean la variación son: la selección natural, mutación, flujo génico-migración, deriva génica y endogamia (Eguiarte, 1999).

De los estudios genéticos poblacionales con plantas, se ha demostrado que ambientes distintos generan diferentes presiones de selección y esto a su vez lleva a una heterogeneidad genética, aunque existen también excepciones donde especies con alta plasticidad fenotípica además de ser grandes colonizadoras, muestran bajos niveles de variación genética, como es con el pasto *Bromus tectorum* L 1753 Poaceae (Linhart *et al.* 1996). Por lo contrario, se da el caso de plantas que muestran poca variación, debido a que están presentes en ambientes homogéneos, como lo muestran algunas plantas acuáticas estudiadas. Otro tipo de estudios apoyan la idea de que la adaptación local a través de gradientes largos geográficos y climáticos es la norma. Con *Pinus ponderosa* Lawson & C. Lawson *Pinaceae* en las montañas rocosas de Colorado (EUA), la adaptación local se refleja en la variación de un locus con dos alelos, siendo uno de estos más común a elevaciones altas y más frías, mientras que el otro en elevaciones más bajas y cálidas (Linhart *et al.* 1996). Esto es relevante en la biología de la conservación, manejo de recurso y la restauración ecológica porque nos muestra que en muchos sitios los cuales poseen novedosos y severos cambios en la vegetación solo ecotipos específicos serán capaces de sobrevivir (Lesica y Allendorf 1999).

### ***Ecología de la restauración.***

La ecología de la restauración es definida como: “el proceso de asistir en la recuperación de un ecosistema que ha sido degradado, dañado o destruido (Clewell *et al.* 2004). En la actualidad queda más claro para el restaurador que el grado de recuperación de dicho ecosistema degradado dependerá del grado de perturbación provocado; y no del ideal planteado de “poner exactamente igual lo que había antes” como lo planteo Bradshaw (1984), manteniendo la alternativa de recrear el sitio de alguna otra forma, siempre y cuando sea benéfica para la sociedad y no perjudicial para el entorno o el paisaje adjunto (Clewell *et al.* 2004), además de considerar no sólo las condiciones pasadas como referencia, sino que se deben considerar las condiciones en el presente y lo que se espera que ocurra en el futuro (Hobbs, 2001).

Una de las preocupaciones que se tiene al realizar trabajos de restauración es el de constatar que se ha creado una gran probabilidad de supervivencia, sustentabilidad y resiliencia en las poblaciones, atributos que determinan el éxito en un trabajo de restauración (Clewell *et al.* 2004, Falk *et al.* 2009). De aquí se desprende la importancia de la genética de poblaciones, de la cual nos permite conocer la diversidad genética, la cual es esencial para la evolución adaptativa y la persistencia de las poblaciones, con esto podríamos decir que surge la idea de procurar aplicar ese conocimiento en trabajos de restauración para asegurarse de que el potencial evolutivo sea mantenido (McKay, 2005), y por lo contrario se debería evitar en los trabajos de restauración crear descensos bruscos en la diversidad genética dentro de las poblaciones, previniendo cuellos de botella (Eguiarte, 1999), además de evitar depresión endogamia (Shannon *et al.* 1996).

### ***Genética de la restauración.***

El conocimiento generado por la genética de poblaciones, se vuelve importante para la restauración debido a que proporciona información sobre la variación genética; la cual puede estar afectando la sobrevivencia y permanencia de los individuos (Falk *et al.* 2009). Por lo que en los últimos 6 años, la diversidad genética ha tomado relevancia en el campo de la restauración ecológica y se enfoca en el estudio de la diversidad genética con fines prácticos (Falk *et al.* 2009, Lindig-Cisneros *et al.* 2005) En la actualidad ha surgido una nueva modalidad de nombrar a el estudio de diversidad genética en

trabajos de restauración, como “genética de la restauración”, en esta nueva disciplina se plantean preguntas tales como: ¿qué nivel de diversidad genética se requiere para tener éxito en un proyecto de restauración?, ¿cómo son afectadas las poblaciones existentes (adaptadas a sus condiciones locales) por la introducción de nuevos genes y genotipos?, y a ¿qué nivel la diversidad genética se mantiene estable? (Hufford y Mazer 2003). Se vuelve necesario un mejor entendimiento de la variación adaptativa para facilitar decisiones de translocación y asegurar que la población tenga la habilidad de respuesta a cualquier tipo de cambio y en especial al cambio climático rápido (McKay 2005).

### ***Marcadores moleculares.***

Los marcadores moleculares son una serie de análisis genético moleculares que permiten detectar polimorfismos a nivel de ADN. Con ellos, se han realizado infinidad de estudios para determinar la diversidad genética (Agarwal *et al.* 2008), principalmente aquellos elaborados en genética de poblaciones con plantas en condiciones naturales, los cuales a pesar de ser enfocados a pocas especies permitieron determinar patrones genéticos (Linhart *et al.* 1996), y dieron lugar al conocimiento necesario para la aplicación de estudios con fines de manejo y conservación (Tang *et al.* 2003, Schaal *et al.* 2005, Kindt 2009), además de permitir aplicarse en estudios con poblaciones pequeñas en peligro de extinción (Shanon *et al.* 1996). Posteriormente han sido involucrados en la literatura de restauración ecológica, donde principalmente se han referido a las implicación de la diversidad genética para el establecimiento exitoso a largo plazo de las poblaciones, proveyendo un potencial adaptativo de las comunidades a restaurar y así obtener éxito en la restauración (Broadhurst *et al.* 2008). En estos trabajos se llega a conclusiones muy importantes de recomendación para el restaurador, como el de preferir establecer individuos con alta diversidad genética, cuando el grado de disturbio y el tamaño del área a ser restaurada son altas, justificando que los genotipos híbridos de distintas fuentes en sitios muy perturbados tendrían mayor posibilidad de sobrevivir, a diferencia de las plantas locales que no están adaptadas a las condiciones de perturbación tan severos (Lesica y Allendorf, 1999), o donde se advierte de los peligros que se pueden tener al establecer genotipos no locales, provocando exogamia que no produce adecuación, ya que estos no están adaptados y provocarían un mayor daño (Hufford y Mazer 2003). Entre los marcadores moleculares que se han usado en genética de la restauración son los RAPD Polimorfismo amplificadas al azar (Bedolla-García *et al.* 2011) y AFLP Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificadas (Sinclair *et al.* 2009).

**AFLP. (Polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados)**

Los AFLP son la amplificación selectiva de fragmentos de restricción por medio de PCR de ADN digerido (Vos *et al.* 1995). Esta técnica consiste en tres etapas: 1) Reconocer y cortar el ADN por medio de dos enzimas de restricción (MseI y EcoRI) y ligar adaptadores a los fragmentos del ADN cortados (fragmentos de restricción), siendo los adaptadores universales, 2) Realizar dos amplificaciones (preamplificación y amplificación selectiva) de los fragmentos recortados por medio de primers que constan de nucleótidos selectivos mediante PCR, en la primera amplificación se realiza con oligo universales, mientras que la segunda se lleva a cabo con la posibilidad de combinar 8 primers de tipo MseI con 8 de tipo EcoRI, dando un total de 64 posibles combinaciones a poderse utilizar (Tabla 1), y 3) análisis de los fragmentos amplificados en un sistema automatizado por medio de fluorescencia (Vos *et al.* 1995). Las ventajas de estos marcadores es que son muy polimórficos, no es necesario el conocimiento del ADN a utilizar, y han sido ampliamente utilizados en trabajos de genética de poblaciones para determinar diversidad intra e inter poblacional (Agarwal *et al.* 2008).

Tabla 1. Total de combinaciones posibles por medio de los 8 primers MseI y los 8 primers EcoRI para AFLP.

MseI EcoRI	CAA	CAC	CAG	CAT	CTA	CTC	CTG	CTT
AAC	1	2	3	4	5	6	7	8
AAG	9	10	11	12	13	14	15	16
ACA	17	18	19	20	21	22	23	24
ACC	25	26	27	28	29	30	31	32
ACG	33	34	35	36	37	38	39	40
ACT	41	42	43	44	45	46	47	48
AGC	49	50	51	52	53	54	55	56
AGG	57	58	59	60	61	62	63	64

Algunos de los trabajos realizados con el marcador AFLP en especies de árboles son los siguientes: *Calycophyllum spruceanum* (Benth) Hook f en K. Shchum 1889 Rubiaceae (Russell *et al.* 1999), *Lonchocarpus costaricensis* (Dom. Sm) Pittier 1917 Fabaceae (Navarro *et al.* 2005), *Vochysia ferruginea* Mart 1948 Vochysiaceae (Caver *et al.* 2005), *Adansonia digitata* L. 1759 Malvaceae (Assogdadjo *et al.* 2006), *Cedrela odorata* L. 1759 Meliaceae (De la torre *et al.* 2008), *Crescentia cujete* L. 1753 Bignoniaceae (Arango-Ulloa *et al.* 2009), *Uapaca kirkiana* Mull. Arg 1864 Phyllantaceae (Mwase *et al.* 2010).

No existen trabajos donde se evalúen especies de arboles directamente involucrados en genética de la restauración, menos aun con los marcador molecular AFLP, solo el de un arbusto; *Daviesia divaricata* Benth (Sinclair *et al.* 2009).

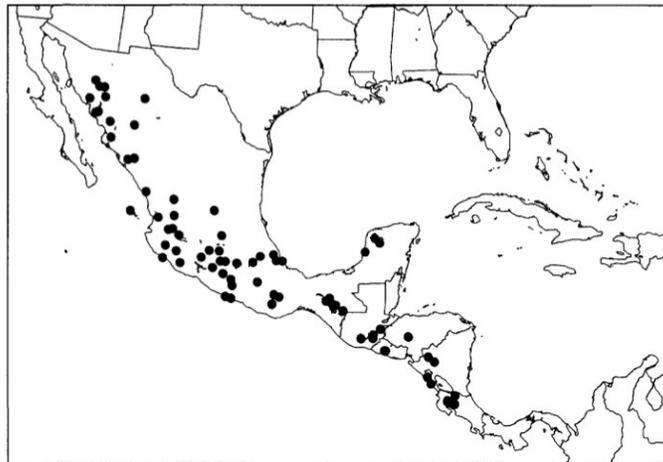
Este trabajo es el primero en incorporar a los marcadores moleculares AFLP y una especie arbórea en un trabajo de restauración. El Trabajo de restauración es llevado acabo dentro del ANP-CP, y en el cual Valle-Díaz y colaboradores (2009), evaluaron el efecto de una isla de calor urbano, en el establecimiento de plantulas de *Ceiba aesculifolia* a lo largo de un gradiente altitudinal, con el fin de probar la posibilidad de realizar migración asistida, como respuesta al cambio climático, con fines de restauración. Para ello colectaron semillas en una zona adyacente a el sitio a restaurar, se germinaron y dejaron crecer durante seis meses, para poder introducir las en el ANP-CP. Se establecieron un total de diez y seis parcelas con veinte plántulas cada uno, en cuatro diferentes altitudes: 2170, 2200, 2230, y 2260 msnm. Se evaluó a lo largo de dos años y se cuantifico la supervivencia. Además se evaluador parámetros químicos del suelo: pendiente, radiación solar, pH, porcentaje de materia orgánica y los micro-nutrientes N, P, K, Ca y Mg. Como resultado se encontraron mayores valores de supervivencia a los 2200 y 2230msnm. Lo que implica un cambio altitudinal óptimo para el establecimiento de las plántulas. Por lo que es necesario saber que es lo que sucede en cuanto a diversidad genética en las cotas establecidas que mostraron mayor numero de sobrevivientes, comparándoles con las cotas de menor numero de sobrevivientes, la población de donde se tomo la semilla y dos poblaciones alejadas de las anteriores poblaciones.

***Ceiba aesculifolia* (H.B.K.) Britt. & Baker, Journ. Bot. 34: 175. 1896. Basado en Carranza-Gonzales, 2000.**

Es un árbol de 4 a 12m de alto, de copa irregular; tronco de 15 a 60 cm de diámetro, con espinas fuertes, cónicas, de 3 a 5 cm de largo, con flores solitarias o dispuestas en pares; pétalos café-tomentosos en el exterior y glabros y blancos internamente, fruto cilíndrico-elipsoide, de 10 a 118 cm de largo, de 2 a 6.5 cm de diámetro, café-grisáceo, cáliz persistente; semillas de color moreno oscuro, de 8 a 9 mm de largo, embebidas en abundante y suave fibra sedosa de color blanco.

A esta especie, inicialmente se le consideraba perteneciente a la familia Bombacácea, actualmente esta familia se circunscribe en la familia Malvaceae (Judd *et al.* 1997). *C. aesculifolia* tiene una amplia distribución desde Costa Rica hasta el Norte de México (Figura 1.), donde se le conoce como Pochote, en la zona costera de Jalisco se le ha visto ser polinizada por dos especies de murciélagos *Glossophaga soricina* y *Leptonycteris curasoae* (Quesada *et al.* 2004). En cuanto a su utilidad, uno de sus usos mayormente conocidos es que sus filamentos en forma de algodón se usan para la elaboración de almohadas y colchones realizados por la comunidad indígena de Tomatlan Jalisco (Román *et al.* 2006), mientras que las semillas se consumen y comercializan por las comunidades del valle de Tehuacán Puebla (Avendaño-Gómez *et al.* 2007).

Figura 1. Distribución de *Ceiba aesculifolia*, Mapa modificado de Gibbs P., y Semir J. (2003).



**Objetivos.**

- Determinar la variación genética inter e intra poblacional de poblaciones de *Ceiba aesculifolia* reintroducidas a cuatro diferentes cotas altitudinales como parte del esfuerzo de restauración, incluyendo también la población progenitora y dos poblaciones externas.
- Conocer si existen genotipos distintivos para las poblaciones.
- Conocer el probable efecto de la altitud, que determina factores como la temperatura, en las poblaciones de *Ceiba aesculifolia* establecidos como parte del esfuerzo de restauración.

**Hipótesis.**

Las poblaciones reintroducidas a diferentes cotas altitudinales al sitio de restauración tendrán una diversidad genética que será similar, pero menor, a la de la población progenitora y con genotipos novedosos.

Las poblaciones del ANP-CP, serán menos diversas que las que se encuentran fuera del ANP-CP, debido a que la población progenitora tiene un tamaño poblacional pequeño, y las reintroducidas como parte del esfuerzo de restauración por la presión de selección diferencial a diferentes cotas altitudinales.

### **Metodología.**

#### **Sitios de colecta.**

Se colectaron 129 muestras de hojas de *Ceiba aesculifolia*, las cuales fueron trasladadas en una hielera para mantenerlas frías y posteriormente colocarlas en un Ultracongelador a  $-70^{\circ}\text{C}$ . En total fueron cuatro sitios de colecta, (Figura 1, Tabla 2) representando cada uno de estos sitios una población. El primer sitio fue dentro del ANP-CP, Los individuos sobrevivientes del experimento de Vallez-Diaz *et al.* (2009), las cuales están ubicados a 1170, 1200, 1230 y 1260 msnm y serán llamadas “**Establecidas**”, mientras que cada cota individualmente sera reconocida como ; “**E1170, E1200, E1230 y E1260**” respectivamente, (Tabla 2) El segundo sitio fue en el lugar donde se colecto la semilla para realizar el establecimiento del experimento de Vallez-Diaz *et al.*, por tal motivo se identificaran como “**Progenitora**”, esta se encuentra a un costado del ANP-CP a una distancia de 700m. El tercer y cuarto sitio representan las dos poblaciones externas a el ANP-CP; la llamada “**Cuitzeo**” que se encuentra a 24km al Nor-Oeste de ANP-CP, y “**Tzitzio**” a 27km hacia el Sur-Este de el ANP-CP, Figura 2.

Figura 2. Ubicación de los sitios de las poblaciones de *Ceiba aesculifolia* nombradas como: Progenitora, Establecidas y Externas Image © 2011 DigitalGlobe - Google Earth.

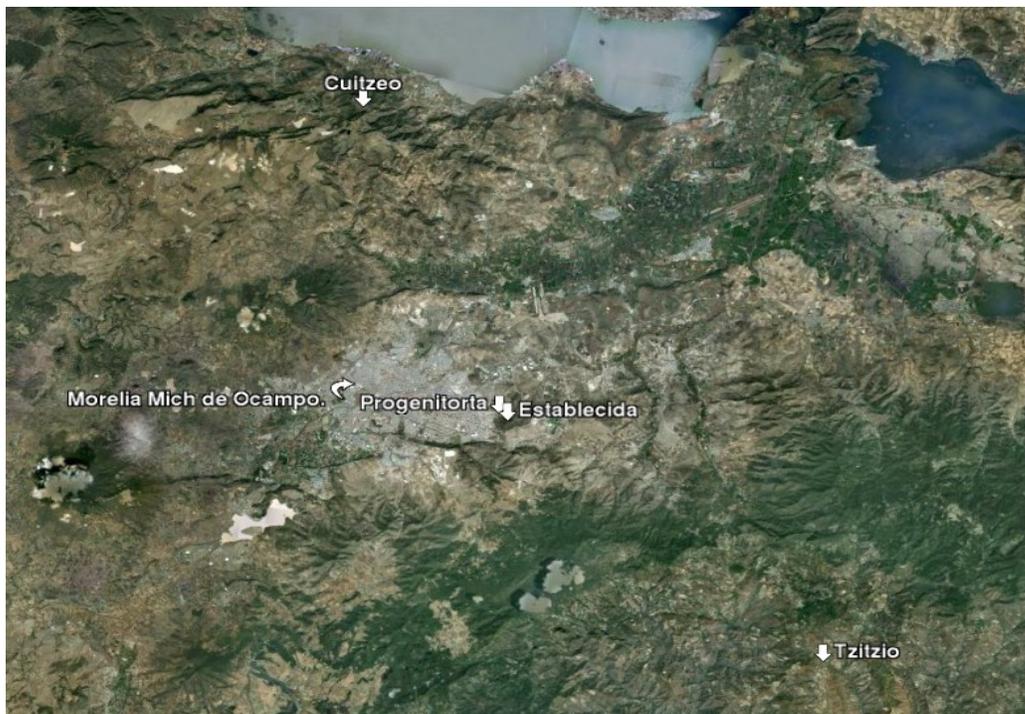


Tabla 2. Sitios de procedencia de las muestras colectadas.

Sitio de procedencia	Altitud en msnm	Norte	Oeste	Numero de individuos
1)Establecidas	2170 a 2260	19°41'59"	101°07' 49"	75
E2170	2170	19°41'59"	101°07' 49"	7
E2200	2200	19°41'59"	101°07' 49"	22
E2230	2230	19°41'59"	101°07' 49"	30
E2260	2260	19°41'59"	101°07' 49"	16
2)Progenitora	2020 a 2060	19°42'60"	101°8'21.29"	15
3)Cuitzeo	2000	19°53'56.05"	100°07'40.20	18
4)Tzitzio	1600	19°34'48.47"	100°55'27.61	21
			Total	129

### ***Extracción del ADN.***

La extracción del ADN se realizó a 129 muestras colectadas, por medio del protocolo MINI-PREP de Lefort y Douglas (1999) (Anexo 1).

**AFLP. (Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados).**

Para la amplificación de los fragmentos polimórficos se utilizó el Kit para genoma de tamaño regular (N/P 402004) de Applied Biosystem®, siguiendo sus indicaciones (Anexo 2). Previo a la amplificación del total de las muestras, se realizó una prueba piloto con dos individuos, con la finalidad de determinar cuales de quince combinaciones mostraban mayor polimorfismo (Tabla 3).

Tabla 3. Combinación de los 15 oligonucleótidos evaluados, marcados con una X. En horizontal los primers MseI y en vertical los EcoRI.

	CAA	CAC	CAG	CAT	CTA	CTC	CTG	CTT
AAC		X						X
AAG								
ACA								
ACC		X		X	X	X		X
ACG					X			X
ACT		X			X	X		X
AGC								
AGG		X						X

Una vez seleccionadas las tres combinaciones de oligonucleótidos, se enviaron a Macrogen Inc. Korea, para que se llevara a cabo el análisis de los fragmentos amplificados por medio de un sistema de automatización.

### **Análisis de los datos.**

Los archivos con los resultados mostrados en la amplificación selectiva, obtenidos por el servicio MacroGen Inc. Korea, fueron visualizados por medio del programa Peak Scanner v1.0 (Figura. 3), con este software se eliminaron aquellas bandas que mostraban intensidad o altura de pico  $< 100$  en el electroferograma. Posteriormente las bandas restantes fueron detectadas con el paquete RawGeno (Arrigo *et al.* 2009) dentro de R (Repley *et al.* 2005) donde se eliminaron las bandas menores a 50pb. Se realizó la reconstrucción de una llamada pseudo-imagen donde se muestra el corrido de las bandas, y se exportó la reconstrucción de la matriz de caracteres binarios donde se representa la ausencias-presencias de las bandas.

Con esta matriz se estimó la estructura genética de las poblaciones, asumiendo equilibrio Hardy-Weinberg por medio del software AFLP-SURV version 1.0 (Vekemans, X. 2002), el cual utiliza el promedio esperado de heterocigotos de acuerdo al método de Lynch y Milligan (1994) o Nei (1987), creando una matriz de distancias genéticas y una prueba de permutaciones para diferenciación genética inter-poblacional. La prueba de permutaciones consiste en comparar el Índice de fijación de Wright ( $F_{ST}$ ), con 10000 permutaciones, en esta prueba, si el valor de  $F_{ST}$  real es mayor que aquellos valores obtenidos por las permutaciones, aceptamos la hipótesis nula; es decir que no existe diferenciación genética inter-poblacional, en caso contrario es rechazada y aceptamos la alterna, la cual nos indica que si hay variación entre ellas.

Utilizando la matriz de distancias basada en los valores de  $F_{ST}$  pareados, se generaron los agrupamientos de las poblaciones con UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmeticmeans), con una medida de similitud Euclidiana en PAST v. 1.55 (Hammer *et al.*, 2001) además de calcularse las correlaciones cofenéticas para estimar la distorsión durante el proceso de agrupamiento y los valores de soporte bootstrap para cada nodo con 1000 replicas.

Para evaluar la homogeneidad de la frecuencia alélica entre las poblaciones se realizó un análisis utilizando la prueba "Exact test" de Fisher (Raymond *et al.*, 1995) el cual utiliza un algoritmo designado para marcadores dominantes, implementada en el programa TFGAv. 1.3 (Miller, 1997).

Además se utilizó el software Structure V 2.3 (Pritchard *et al.* 2000), el cual caracteriza agrupamientos de individuos genéticamente homogéneos, mediante un algoritmo Bayesiano (Falush *et al.* 2007); en base a la frecuencia de alelos en cada locus, los individuos de la muestra son analizados y asignados probabilísticamente a dos o más poblaciones en caso de que sus genotipos indiquen que hay entrecruzamiento (mezclados). Esto se puede valorar con agrupamientos “K” conocidos o desconocidos. De otra manera, se puede decir que cada K se caracteriza por una serie de frecuencia de alelos en cada locus, por lo que cada K será una combinación particular de una combinación genotípica. Se generan búsquedas para probar una segunda combinación o frecuencia de alelos distinta, y se determinará probabilísticamente la probabilidad de cada individuo de pertenecer a una segunda combinación genotípica (K2), y así se van generando búsquedas de distintas combinaciones posibles K, hasta el número de K que uno considere adecuado averiguar. Con esto se logra obtener en cada uno de los individuos analizados la probabilidad de pertenecer a una u otra K, ambas o más si su genotipo se encuentra mezclado.

Se utilizó el modelo de mezcla, con la opción de frecuencia de alelos correlacionados entre poblaciones y el modo Locprior (Falush *et al.* 2003) de esta manera se analizaron los datos a partir de  $K = 2$  hasta  $K = 10$ , esto se hace para determinar cuantos agrupamientos genotípicos existen probando desde dos agrupamientos hasta diez. Y al final se podrá saber si existe mezcla entre el número de agrupamientos seleccionados. Para seleccionar el número de agrupamientos seleccionados (K), se utilizó el método mostrado por Evanno *et al.* (2005). Con corridas realizadas de 10,000 generaciones burn-in, datos colectados a partir de 100,000 pasos adicionales y 10 replicas para cada K posible.

Es importante mencionar que los análisis de los datos anteriormente descritos se realizaron en dos versiones, la primera considerando cuatro poblaciones “Establecidas, Progenitora, Cuitzeo y Tzitzio” y la segunda considerando como población a cada cota altitudinal, resultando un total de siete poblaciones “E2170, E2200, E2230, E2260, Progenitora, Cuitzeo y Tzitzio “

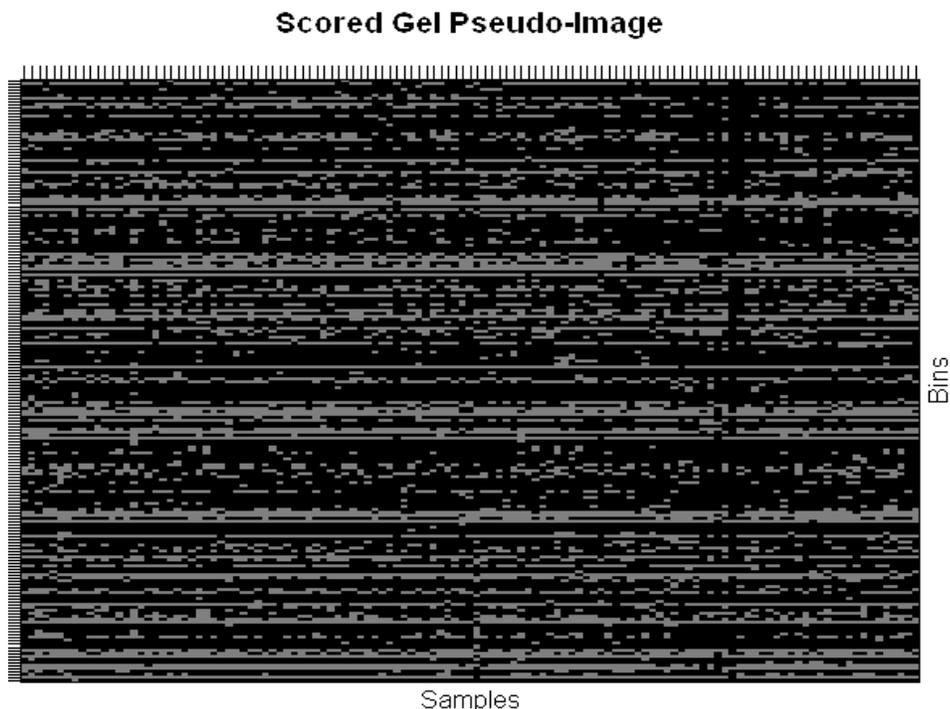
### Resultados.

Se obtuvo un total de 445 loci con las tres combinaciones seleccionadas, de las quince combinaciones de primers de AFLP evaluados, para un total de 123 individuos (Tabla 3). Se excluyeron 6 individuos en los análisis, porque no fueron correctamente detectados el análisis de los fragmentos; 1 individuo de Tzitzio, 2 de Cuitzeo y 3 Establecidos. La combinación que mostró mayor número de bandas fue MseI CAT- con EcoRI ACC (Tabla 4). En la Fig 3. Se puede ver una de las pseudo-imagenes donde se ve el bandeo recreado por RawGeno (Arrigo *et al.* 2009).

Tabla 4. primers seleccionados, numero de Loci encontrados por cada una de las combinaciones y en total.

Primers seleccionados	No. de loci encontrados
MseI CAT- EcoRI ACC	195
MseI CTA-EcoRI ACC	126
MseI CTC-EcoRI ACT	124
Total	445

Figura 3. Pseudo-imagen del gel con la combinación de primers EcoRI-ACC-FAM/CTA-MseI. En el eje de las X cada una de las muestras, y en el de las Y el tamaño de las bandas, viendo de arriba hacia abajo en rango de 50 pb hasta 600pb, los puntos grises representan las presencias de la banda y los negros las ausencias.



**Resultados tomando en cuenta siete poblaciones “E2170, E2200, E2230, E2260, Progenitora, Cuitzeo y Tzitzio”**

La diversidad genética total ( $H_T$ ) que se obtuvo es de 0.1724. El porcentaje de loci polimórficos más alto fue de 62.5% para la población E2170, y el más bajo de 38% para la población de Cuitzeo (Tabla 5). También se puede observar que este mismo orden corresponden a las población que mostró mayor y menor diversidad genética.

Tabla 5. Estructura genética intra-poblacional, de 7 poblaciones de *C. aesculifolia*.

Marca de las Poblaciones	No de Individuos	No de loci	No de loci polimórficos	% loci polimórficos	H <sub>J</sub> diversidad genética de Nei, análogo a H o H <sub>E</sub>
E2170	7	445	278	<b>62.5%</b>	<b>0.22012</b>
E2200	21	445	231	51.9%	0.17050
E2230	30	445	227	51.0	0.17164
E2260	14	445	247	55.5%	0.20934
Progenitora	15	445	194	43.6%	0.16183
Cuitzeo	16	445	171	<b>38.4%</b>	<b>0.13963</b>
Tzitzio	20	445	252	56.6%	0.18016

En cuanto a la **distancia genética inter-poblacional e identidad genética de Nei** (Tabla 6) el valor más alto es de 0.9999 indicando mayor similitud entre las poblaciones E2170 y la E2230. Mientras que el más bajo es de 0.9756 indicando menor similitud entre la población de Tzitzio y la E2260.

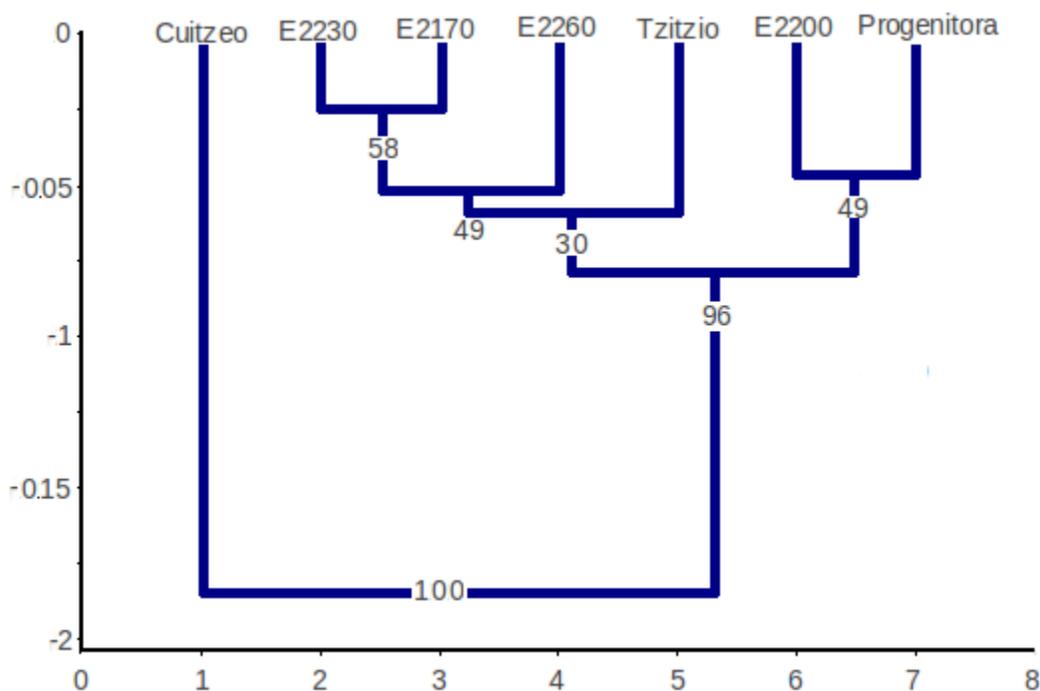
Tabla 6. Distancia genética inter-poblacional (GD) de 7 poblaciones, sobre la diagonal en negritas e identidad genética de Nei (GI) debajo de la diagonal.

	E2170	E2200	E2230	E2260	Progenitora	Cuitzeo	Tzitzio
E2170	***	<b>0.0025</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0013</b>	<b>0.0052</b>	<b>0.0227</b>	<b>0.0037</b>
E2200	0.9975	***	<b>0.0007</b>	<b>0.0090</b>	<b>0.0009</b>	<b>0.0114</b>	<b>0.0044</b>
E2230	<u>0.9999</u>	0.9993	***	<b>0.0051</b>	<b>0.0051</b>	<b>0.0213</b>	<b>0.0066</b>
E2260	0.9987	0.9910	0.9949	***	<b>0.0126</b>	<b>0.0244</b>	<b>0.0086</b>
Progenitora	0.9948	0.9991	0.9949	0.9874	***	<b>0.0047</b>	<b>0.0073</b>
Cuitzeo	0.9773	0.9886	0.9787	<u>0.9756</u>	0.9953	***	<b>0.0153</b>
Tzitzio	0.9963	0.9956	0.9934	0.9927	0.9927	0.9847	***

En el análisis de **diferenciación genética inter-poblacional** por medio de permutaciones, se obtuvo un valor real de  $F_{ST} = 0.0373$ , el cual es mayor al creado en las permutaciones  $-0.0085$  con probabilidad de 95%, por lo que se acepta la hipótesis nula, es decir que no existe diferencia entre las poblaciones.

El **dendrograma de UPGMA** (Figura. 4) basado en las distancias  $F_{ST}$ , muestra dos grandes grupos de poblaciones, el primero y con mayor soporte bootstrap del 100%, separando a la población de Cuitzeo de las demás poblaciones y el segundo grupo con bootstrap del 96%, separa por un lado a la población Progenitora junto con la E2200, y por el otro las poblaciones de Tzitzio y las E2170, E2230 y E2260.

Figura 4. Dendrograma de UPGMA basado en los valores de  $F_{ST}$  pareados entre 7 poblaciones de *C. aesculifolia*. Los números en las ramas indican el soporte bootstrap de 1000 replicas.



La prueba de diferenciación de poblaciones en base a la frecuencia alélica revelan diferencias significativas entre las poblaciones: Tzitzio – E2230, Tzitzio – Cuitzeo, Cuitzeo - E2230 y Cuitzeo - 2260 (Tabla 7).

Tabla 7. Prueba para la diferenciación entre poblaciones “Exact test”, en base a la frecuencia alélica. En negritas se revelan valores que muestran diferencias significativas < 0.05

	E2170	E2200	E2230	E2260	Progenitora	Cuitzeo	Tzitzio
E2170	*****						
E2200	1	*****					
E2230	1	1	*****				
E2260	1	0.8424	0.9991	*****			
Progenitora	1	1	1	0.7526	*****		
Cuitzeo	0.0698	0.5313	<b>0</b>	<b>0</b>	1	*****	
Tzitzio	1	0.9234	<b>0.0015</b>	0.2902	0.9532	<b>0.0004</b>	*****

**Resultados tomando en cuenta cuatro poblaciones “Establecidas, Progenitora, Cuitzeo y Tzitzio”**

La diversidad genética para cuatro poblaciones es igual que cuando se toma en cuenta siete poblaciones ( $H_T$ ) de 0.1724. El porcentaje de loci polimórficos más alto fue de 56.6% para Tzitzio (Tabla 8) con mayor diversidad genética, y el más bajo de 38% para la población de Cuitzeo con menor diversidad genética.

Tabla 8. Estructura genética intra-poblacional de 4 poblaciones de *C. aesculifolia*.

Marca de las Poblaciones	No de Individuos	No de loci	No de loci polimórficos	% loci polimórficos	H <sub>J</sub> diversidad genética de Nei, análogo a H o H <sub>E</sub>
Establecidas	72	445	235	52.8%	0.17624
Progenitora	15	445	194	<b>43.6%</b>	<b>0.16183</b>
Cuitzeo	16	445	171	38.4%	0.13963
Tzitzio	20	445	252	<b>56.6%</b>	<b>0.18016</b>

**La distancia genética inter-poblacional, e identidad genética de Nei** más alta fué de 0.9952, indicando mayor similitud entre las poblaciones Progenitora y Establecidas, mientras que el más bajo es de 0.9809 indicando menor similitud entre la población de Cuitzeo y las Establecidas (Tabla 9).

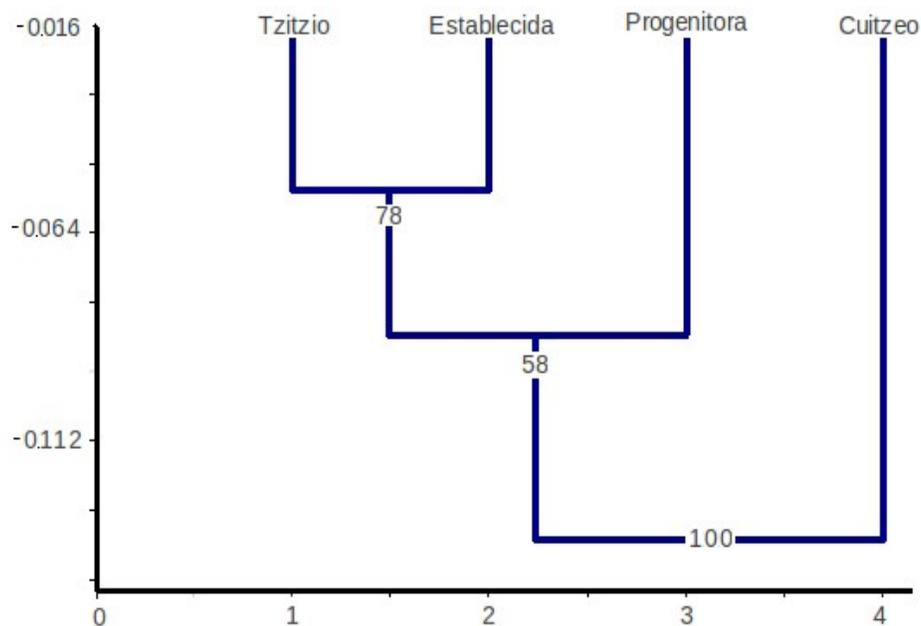
Tabla 9. Distancia genética inter-poblacional (GD) de 4 poblaciones sobre la diagonal en negritas e identidad genética de Nei (GI) debajo de la diagonal.

	Establecidas	Progenitora	Cuitzeo	Tzitzio
Establecidas	*****	<b>0.0048</b>	<b>0.0191</b>	<b>0.0052</b>
Progenitora	<u>0.9952</u>	*****	<b>0.0047</b>	<b>0.0073</b>
Cuitzeo	<u>0.9809</u>	0.9953	*****	<b>0.0153</b>
Tzitzio	0.9948	0.9927	0.9847	*****

En el análisis de **diferenciación genética inter-poblacional** por medio de permutaciones, se obtuvo un valor de  $F_{ST} = 0.04757$ , que es mayor al valor creado en las permutaciones  $-0.0074$  con probabilidad de 95%, por lo que aceptamos la hipótesis nula, es decir que no existe diferencia entre las poblaciones.

El **dendrograma de UPGMA** (Figura 5) basado en las distancias  $F_{ST}$ , muestra dos grandes grupos de poblaciones, el primero con mayor soporte bootstrap 100%, separando a la población de Cuitzeo de las demás poblaciones y el segundo grupo con bootstrap del 78% formado por la población de Tzitzio, y la población Establecidas.

Figura 5. Dendrograma de UPGMA basado en los valores de  $F_{ST}$  pareados entre 4 poblaciones de *C. aesculifolia*. Los números en las ramas indican el soporte bootstrap de 1000 replicas.



La prueba de diferenciación entre poblaciones en base a la frecuencia alélica revelan diferencias significativas para las poblaciones: Cuitzeo – Tzitzio, Establecida - Cuitzeo-Establecida y Cuitzeo-Tzitzio (Tabla 10).

Tabla 10. Prueba para la diferenciación entre poblaciones “Exact test”, en base a la frecuencia alélica. En negritas se revelan valores que muestran diferencias significativas < 0.05

	Establecidas	Progenitora	Cuitzeo	Tzitzio
Establecidas	*****			
Progenitora	1	*****		
Cuitzeo	<b>0</b>	1	*****	
Tzitzio	<b>0</b>	0.9635	<b>0.0003</b>	*****

Con Structure V 2.3 los valores Ln P(D), para las posibles K, desde K1 a K10 obtenidos, se pueden ver en el Anexo 3. Se destaca K3 (Figura 6) el cual tiene un valor promedio de LP(D) = -16081.68 en Structure V 2.3 . El agrupamiento K3 (Anexo 4) revela la existencia de tres agrupamientos distintos, o tres combinaciones de genotipos distintivos entre los individuos muestreados, los cuales a partir de aquí se nombraran Ks1, Ks2, Ks3. En la gráfica de Barras originada por Structure V 2.3(Figura 7. a y b) se pude ver como hay una mezcla de los tres distintos genotipos entre cada uno de los individuos, revelando que existe una mezcla de los tres genotipos dentro de las poblaciones.

Figura 6. Se destaca a K3 dentro dentro de los agrupamientos propuestos.

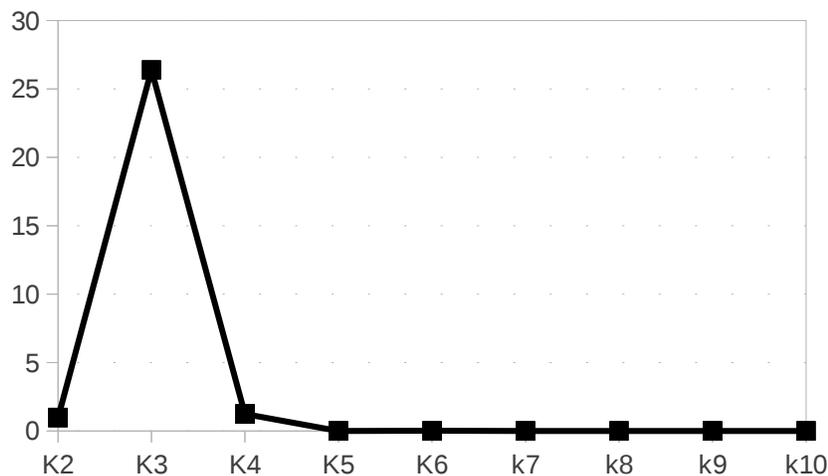
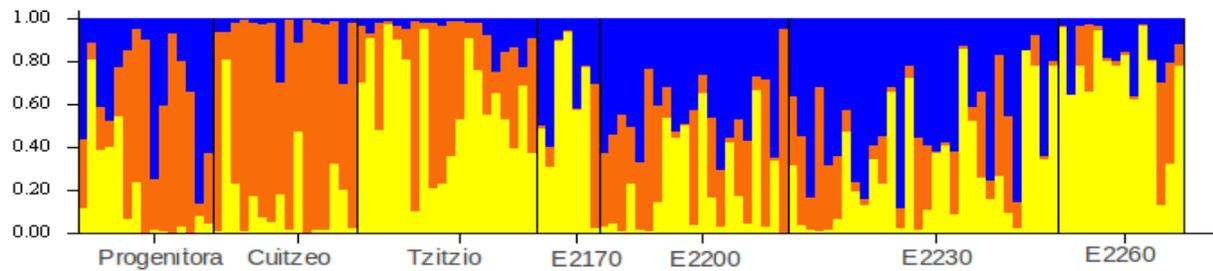
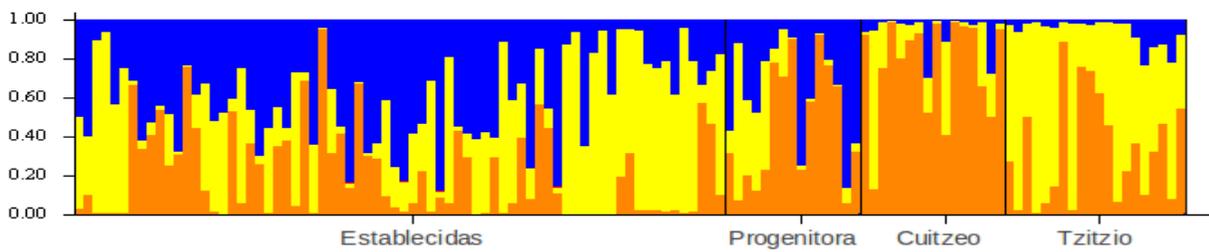


Figura 7. Gráfica de barras proporcionada por Structure V 2.3 para K3. En a) 7 poblaciones y en b) 4 poblaciones. En ambos casos se muestra a cada individuo representado por cada una de las columnas, la línea negra divide a cada población, y cada uno de las diferentes combinaciones de genotipos esta representada por un color, los individuos con dos o más colores son producto de una mezcla de genotipos.

a)



b)



El porcentaje de cada una de las combinaciones de los agrupamientos Ks tomando en cuenta siete poblaciones “E2170, E2200, E2230, E2260, Progenitora, Cuitzeo y Tzitzio” (Figura 8), se puede ver numéricamente en la Tabla 6. Las poblaciones que muestran proporción mayor a 40% para cada una de las Ks son: para Ks1: E2200 (44.97%) y E2230 (50.25%); para Ks2 Progenitora (46.07%), Cuitzeo (77.35%); y finalmente para ks3: E2170(57.45%), E2260 (371.72%) y Tzitzio (60.29%).

Figura 8. Aporte porcentual de cada combinación de genotipo, dentro de cada población. tomando en cuenta 7 poblaciones.

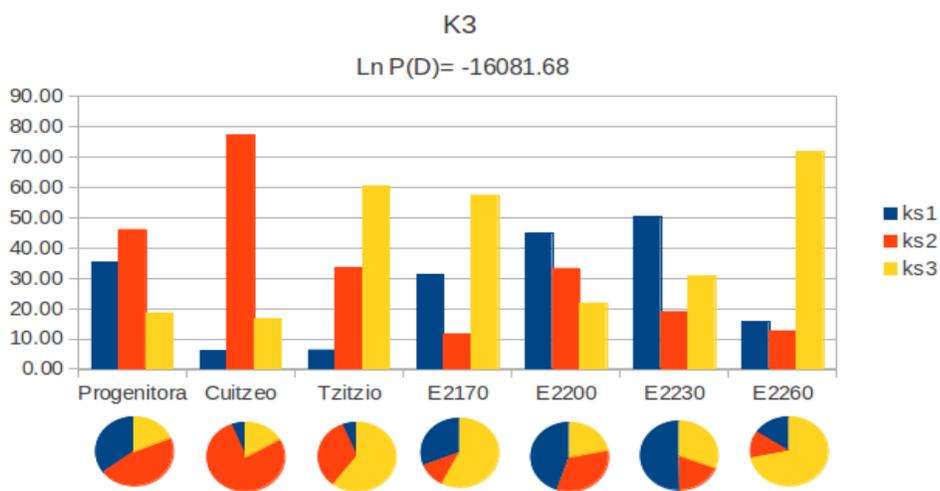
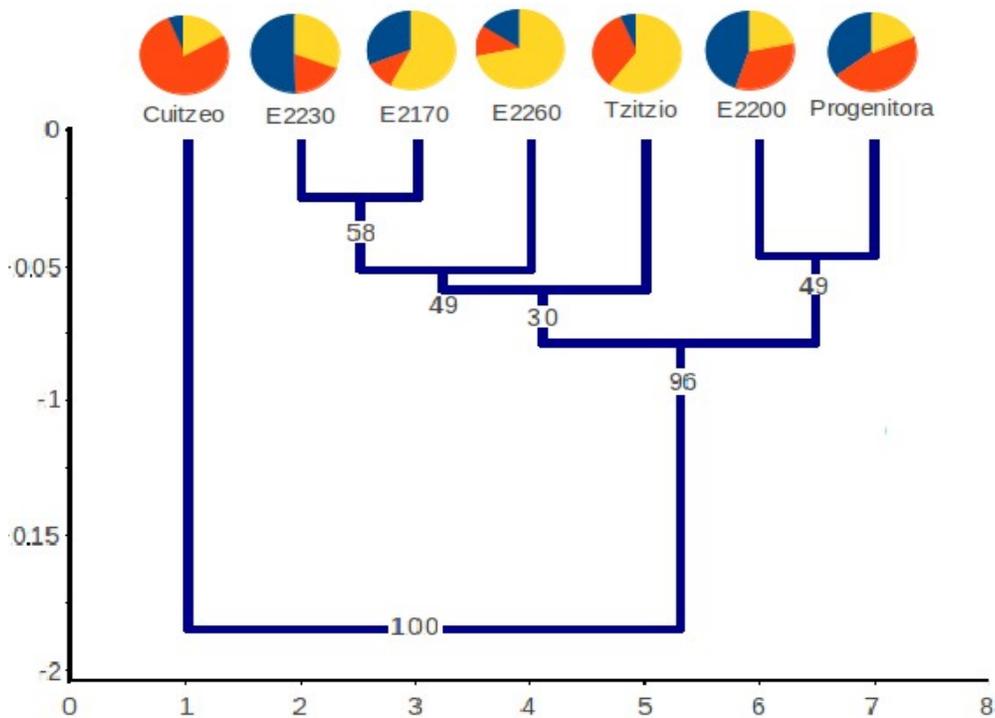


Tabla 11. Porcentaje para cada agrupamiento Ks encontrado en cada una de las 7 poblaciones. En negritas valores mayores a 40%.

Poblaciones	ks1	ks2	ks3
E2170	31.13	11.42	<b>57.45</b>
E2200	<b>44.97</b>	33.26	21.78
E2230	<b>50.25</b>	18.98	30.77
E2260	15.69	12.59	<b>71.72</b>
Progenitora	35.39	<b>46.07</b>	18.55
Cuitzeo	6.15	<b>77.35</b>	16.50
Tzitzio	6.32	33.39	<b>60.29</b>

En Figura 9 podemos ver la combinación del dendograma basado en las distancias  $F_{ST}$  de la Figura 4 con la proporción de cada K3 obtenidas por Structure V 2.3, para cada población obtenido con Structure tomando en cuenta siete poblaciones “E2170, E2200, E2230, E2260, Progenitora, Cuitzeo y Tzitzio”.

Figura 9. Combinación del dendograma basado en las distancias  $F_{ST}$  de la Figura 4 con la proporción de cada K3 obtenidas por Structure V 2.3



El porcentaje de cada una de las combinaciones de los agrupamientos Ks tomando en cuenta cuatro poblaciones “Establecidas, Progenitora, Cuitzeo y Tzitzio” (Figura 10). Las poblaciones que muestran proporción mayor a 40% para cada una de las Ks son: para Ks1: Establecidas (40.32); para ks2 Progenitora (46.09%), Cuitzeo (77.46%) ; y finalmente para ks3: Tzitzio (60.49%) (Tabla 12).

Figura 10. Aporte porcentual de cada combinación de genotipo distintivo, dentro de cada población, tomando en cuenta 4 poblaciones.

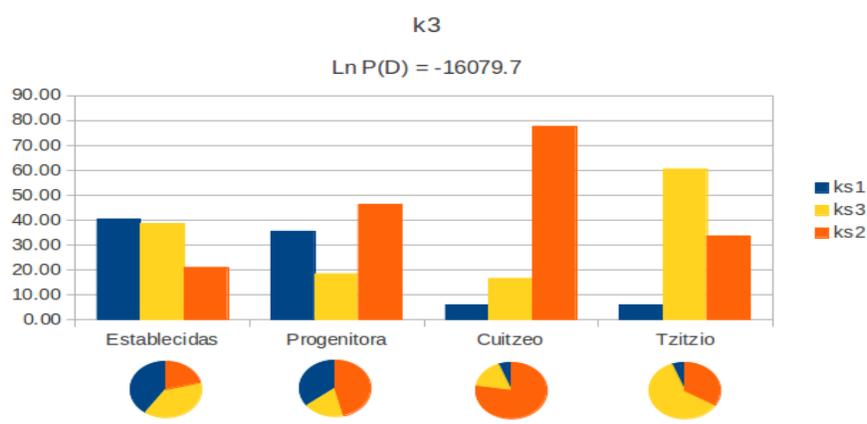
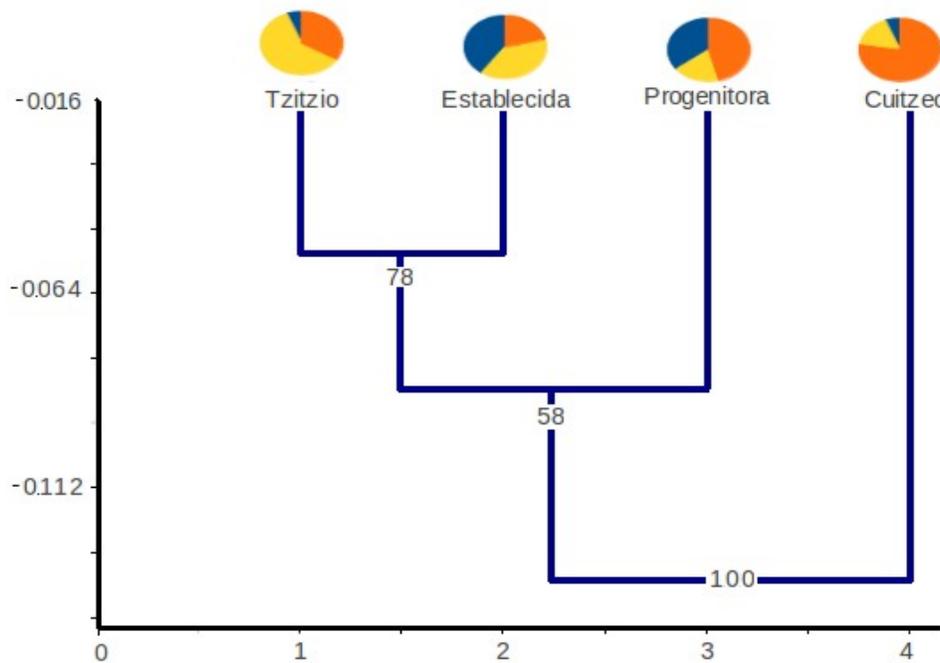


Tabla 12. Aportación porcentual para cada agrupamiento Ks encontrado en cada una de las 4 poblaciones. En negritas valores mayores a 40%.

Poblaciones	ks1	ks2	ks3
Establecidas	<b>40.32</b>	38.65	21.03
Progenitora	35.50	<b>46.09</b>	18.41
Cuitzeo	5.95	<b>77.46</b>	16.59
Tzitzio	5.93	33.58	<b>60.49</b>

Por ultimo, en Figura 11 podemos ver la combinación del dendograma basado en las distancias  $F_{ST}$  de la Figura 5 con la proporción de cada Ks obtenidos por Structure V 2.3. para cada población obtenido con Structure V 2.3 (Pritchard *et al.* 2000) tomando en cuenta cuatro poblaciones “Establecidas, Progenitora, Cuitzeo y Tzitzio”.

Figura 11. Combinación del dendograma basado en las distancias  $F_{ST}$  de la Figura 5 con la proporción de cada Ks obtenidos por Structure V 2.3.



### Discusiones.

#### Diversidad genética encontrada.

La diversidad genética encontrada en las poblaciones de *Ceiba aesculifolia* tiene un rango de 0.13 a 0.22, este rango al ser comparado con *Adansonia digitata*, perteneciente a la misma familia (0.28 a 0.35) es bajo (Assogbadjo *et al* 2006). Pero debe tomarse con precaución, porque esta variación representa una escala muy pequeña de la distribución total que tiene *C. aesculifolia* (Figura 1). Por otro lado, se conoce el caso de especies de árboles que aunque no pertenecen a la misma familia muestran rangos de diversidad genética similares a la encontrada en este trabajo, particularmente *Cedrela odorata* (Tabla 13) para la cual se estudiaron nueve poblaciones dentro del Sur-Este de Perú, y las cuales no representan más que una pequeña fracción de su distribución total que abarca de México hasta el norte de Argentina.

Tabla 13. Rangos de diversidad genética encontrados en arboles, por medio de AFLP.

Especie	Familia	Rango de H <sub>E</sub>	Autor	Propagación
<i>Adansonia digitata</i>	Malvaceae	0.28 a 0.35	Assogbadjo <i>et al.</i> 2006	
<i>Vochysia ferruginea</i>	Vochysiaceae	0.16 a 0.32	Caver <i>et al.</i> 2005	Viento
<i>Cedrela odorata</i>	Meliaceae	0.13 a 0.21	De la Torre <i>et al.</i> 2008	Viento
<i>Uapaca kirkiana</i>	Euphorbiaceae	0.18 a 0.32	Mwase <i>et al.</i> 2010	Humanos, pajaros, murcielagos, monos y roedores
<i>Lonchocarpus costaricensis</i>	Papilionaceae	0.19 a 0.28	Navarro <i>et al.</i> 2005	Viento
<i>Calycophyllum spruceanum</i>	Rubiaceae	0.25 a 0.34	Russel <i>et al.</i> 1999.	Viento e hidrocoria
<i>Crescentia cujete</i>	Bignoniaceae	0.22 a 0.82	Arango-Ulloa <i>et al.</i> 2009	Hidrocoria y Humanos

En el caso mas contrastante donde se muestran un rango muy amplio de variación genética de 0.22 a 0.82 lo muestra el árbol *Crescentia cujete*, esta variación tan amplia puede ser debida al monitoreo realizado en su estudio que aunque no abarca su totalidad de su distribución es de una zona donde existen condiciones ambientales muy distintas (Arango-Ulloa et al. 2009 ).

### ***Conectividad genética entre las poblaciones evaluadas.***

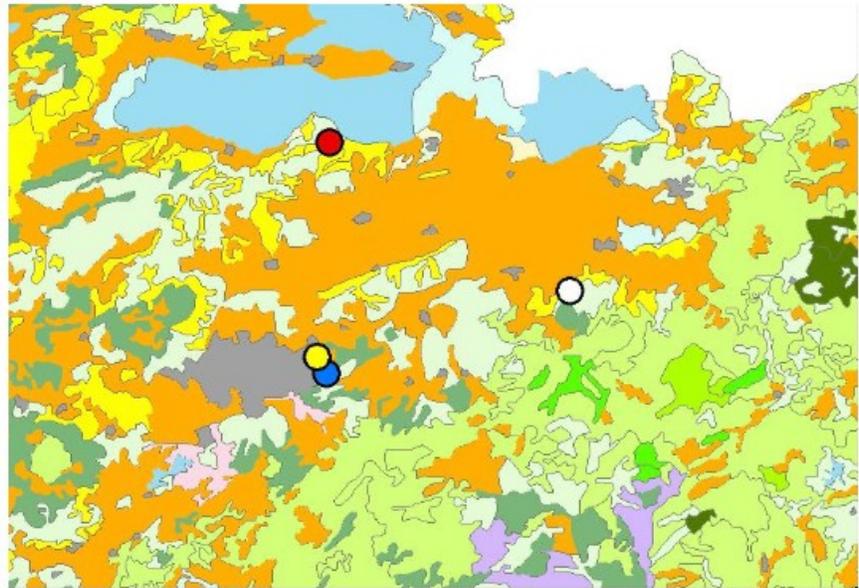
En el análisis de estructura de las poblaciones realizado con Structure V 2.3 (Fig. 7) se observó, que ha existido intercambio genético entre las poblaciones, esto se evidenció también por que la diversidad genética entre las poblaciones no fue significativamente distinta. *C. aesculifolia* es una especie polinizada por murciélagos, dispersores de polen a larga distancia ( Herrerias-Diego et al. 2006, Fleming 2009), además de que sus semillas son dispersadas por el viento (Greene et al. 2008), en estudios de especies arbóreas se ha observado que se mantiene la conectividad genética cuando hay alto grado de dispersión de polen y semillas (Cavers et al. 2005, Kindt et al. 2009) como es el caso en *C. aesculifolia*.

La conectividad genética de las poblaciones de *C. aesculifolia* se puede explicar por el efecto de sus polinizadores, aunque no se sabe qué especies la polinizan en la zona de estudio (Figura 12) en un trabajo realizado para la costa de Jalisco, se observo que *C. aesculifolia* es polinizada por *Glossophaga soricina* y *L. curasoae* (Quesada et al. 2004) tienen la capacidad de visitación en habitats perturbados y no perturbados, (Herrerias-Diego et al. 2006). *L. yerbabuena* llega a recorrer distancias de hasta 100 km en una noche (Russell et al. 2006). La determinación de *L. curasoae* y *L. yerbabuena* ha tenido problemas taxonómicos sin embargo se les considera una misma especie (Arita 1988).

Figura 12. Vegetación existente entre sitios: Establecidas (Circulo azul), Progenitora (Circulo amarillo), Cuitzeo (Circulo rojo) y Tzitzio (Circulo blanco).

**TIPOS DE VEGETACION**

- AGRICULTURA
- ASENTAMIENTOS HUMANOS
- BOSQUE DE ENCINO
- BOSQUE DE MESOFILO DE MONTAÑA
- BOSQUE DE OYAMEL
- BOSQUE DE PINO
- BOSQUE DE PINO-ENCINO
- CUERPO DE AGUA
- MATORRAL
- MEZQUITAL
- PALMAR
- PASTIZAL INDUCIDO
- PLANTACION FORESTAL
- RIEGO SUSPENDIDO
- SELVA BAJA CADUCIFOLIA



**Mayor diversidad encontrada en poblaciones con número menor de individuos.**

Observando los valores de diversidad genética, la mayor diversidad encontrada fue para las poblaciones donde hay menos individuos, es decir en E2170 y E2260 (Tabla 14) lo que contradice nuestra hipótesis planteada. En un estudio con *Adansonia digitata* (Malvaceae) se obtuvo la variación más alta de 0.35 para una población de 6 individuos en un rango de 0.22 y 0.32 para otras 10 poblaciones (Assogbadjo *et al.* 2006), similarmente en *Vochysia ferruginea* (Vochysiaceae) se encontró la diversidad más alta de 0.32 para una población de solo 6 individuos y diversidades de 0.16 a 0.30 para otras 5 poblaciones con 16 a 20 individuos (Cavers *et al.* 2005); este patrón se ha observado en especies de sucesión temprana o media como una forma de compensación; esto mismo puede estar sucediendo en las *C. aesculifolia* del ANP-CP.

**¿Existen genotipos distintivos entre las poblaciones?**

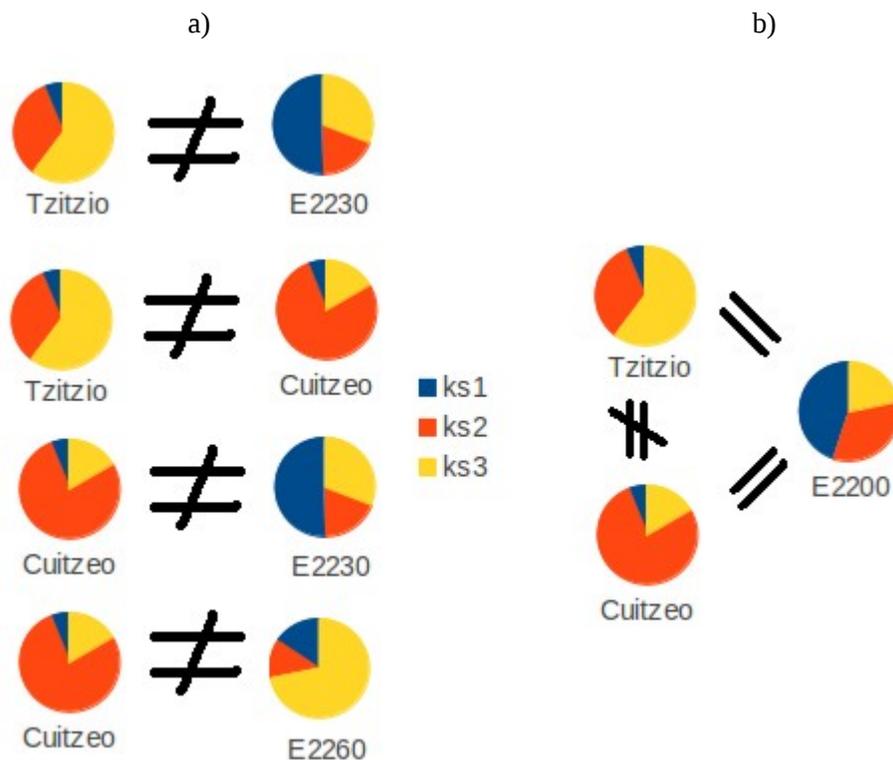
En este estudio se puede apreciar que existen tres combinaciones de genotipos distintos, ks1, ks2 ks3; vemos que existen proporciones distintivas de las combinaciones genotípicas entre las poblaciones que coinciden con los valores de diversidad genética; en otras palabras las poblaciones con diversidad más baja, Cuitzeo y la Progenitora, tienden a tener mayor proporción de la combinación genotípica ks2. Mientras que las que tienen combinación más alta, E2170, E2260 y Tzitzio muestran mayor proporción de ks3. Con esto, se muestra que en las poblaciones hay variación en cuanto respecta a la proporción de

Tabla 14. Aportación porcentual para cada agrupamiento Ks encontrado en cada una de las poblaciones y diversidad genética ( $H_E$ ).

Poblaciones	ks1	ks2	ks3	$H_E$	No de individuos
E2170	31.13	11.42	57.45	.220	7
E2200	44.97	33.26	21.78	.170	22
E2230	50.25	18.98	30.77	.171	30
E2260	15.69	12.59	71.72	.209	16
Progenitora	35.39	46.07	18.55	.161	15
Cuitzeo	6.15	77.35	16.50	.139	18
Tzitzio	6.32	33.39	60.29	.180	21

genotipos, además de que la prueba de “Exact test” determino diferencias significativas al comparar cuatro pares de poblaciones. Estas poblaciones muestran distintas proporciones de un determinado Ks en cada población encontrado por Structure: Tzitzio (Ks3) – E2230 (Ks1), Tzitzio(Ks3) – Cuitzeo(Ks2), Cuitzeo(Ks2) – E2230 (Ks1) y Cuitzeo (Ks2) – E2260 (Ks1) (Figura 13a). Mientras que las similitudes existentes en el resto de las combinaciones entre poblaciones nos indican que comparten alelos de tal manera que no son significativamente distintas entre ellas. Por ejemplo: Tzitzio(Ks3) con Cuitzeo(Ks2) son diferenciadas por compartir distintos alelos, pero E2200 (Ks1) es considerada igual a Tzitzio(Ks3) e igual a Cuitzeo (Ks2) por compartir ambas poblaciones alelos, a pesar de mostrar proporciones distintas entre ellos. (Figura 13b)

Figura 13. a) Diferencias entre cuatro pares de poblaciones detectada con Exact Test, ilustradas con proporciones genotípicas encontradas con Structure. b) E2200 comparte alelos de Tzitzio y Cuitzeo, siendo estas ultimas significativamente distintas entre ellas.



### ***Conclusiones.***

La diversidad genética del sitio en restauración es equiparable a la de la población progenitora y las poblaciones externas por lo que podría considerarse adecuadas para el trabajo del restaurador. Se evidencio poca diferenciación entre ellas, lo que confirma conectividad genética entre todas las poblaciones. Con lo anterior se recomienda coleccionar semilla hasta un radio de 27km del sitio a restaurar utilizando esta especie, sin problema de introducir un genotipo bastante diferente a el ANP-CP. Además se encontró que las poblaciones mantienen tres combinaciones de genotipos distintas, los cuales se encuentran en diferentes proporciones dentro de las poblaciones. Por ultimo es importante mencionar que las altitudes donde se reporto la supervivencia más alta en el trabajo de Vallez-Diaz y colaboradores fueron las altitudes intermedias E2200 y 2230. La segunda de estas poblaciones es la que se parecen más a la progenitora ver dendograma y en la proporción de genotipos, lo que refuerza que la zona óptima para *Ceiba aesculifolia* esta desplazada altitudinalmente debido a la isla de calor urbano. Por lo que se evidencia la necesidad de migrar esta especie altitudinalmente.

**Bibliografía:**

- Arita H.T., y Stephen R. H. 1988. Revisión taxonómica de los murciélagos magueyeros del genero *Lepronycteris* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Acat zoologica Mexicana*. 29
- Arango-Ulloa J., Bohorquez M. C., Duque M.C., y Maass B. L. 2009. Diversity of the calabash tree (*Crescentia cujete* L.) in Colombia . *Agroforest Systems* 76:543–553 .
- Assogbadjo D. A., Kyndt T., Sinsin B., Gheysen G., y Vandamme P. 2006. Patterns of genetic and morphometric Diversity in Baobab (*Adansonia digitata*). Populations across different climatic zones of Benin (West Africa). *Annals of Botany* 97: 819–830.
- Agarwal M., Shrivastava N., y Padh H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*. 27;617-631.
- Avendaño-Gómez A., Lira-Saade R., Dávila-Aranda P, Casas-Fernández A., y De La Torre-Almaraz R. 2007. Caracterización de un hongo asociado a la planta macho del pochote (*Ceiba aesculifolia* (H.B.& K.) Britten & Baker f. Subsp. *Parvifolia* (Rose) P. E. Gibbs & Semir) En Tehuacán-Cuicatlán, México. *Agrociencia*. 41: 205-215.
- Bedolla-García B. Y., Lindig-Cisneros R. y Lara-Cabrera S. I. 2011. Diferenciación genética en poblaciones de *Salvia elegans* (Lamiaceae). *Biológicas* 13(1): 59-64
- Bradshaw A.D. 1984. Land restoration: now and the future. *Royal Society*. 223:1-23.
- Broadhurst, L.M., Lowe, A., Coates, D. J., Cuningham, S.A., McDonald, M., Vesk, P. A. y Yates, C. 2008. Seed supply for broadscale restoration: maximizing evolutionary potential. *Evolutionary Applications*. 1:587-597.
- Curtis H., Barnes, A. Schnek A., y Flores G. 2001 *Biología*. 6ta edición. Panamericana. Pp 1487
- Carranza-Gonzales E., y Blanco-Garcia A. 2000. Bombacacea. Flora del bajo y regiones adyacentes. Fasciculo 90.
- Cavers S., Navarro C., Hopkins P., Ennos R. A., y Lowe A. J. 2005. Regional and populatio-scale influences on genetic diversity partitioning within Costa Rican population of the pioneer tree *vochysia ferruginea* Mart. *Silvae Genetica*, 54, 258–264.

- Clewell A., Aronson J., y Witherhalder K. (2004) Society for Ecological Restoration International Science & Policy Working Group. 2004. The SER International primer on Ecological Restoration. [www.ser.org](http://www.ser.org) & Tucson: Society for Ecological Restoration International.
- De la Torre, A., López C., Yglesias E., y Comelius, J. P. 2008. Genetic (AFLP) diversity of nine *Cedrela odorata* populations in Madre de Dios, Southern Peruvian Amazon. *Forest Ecology and Management*. 255:334-339.
- Eguiarte L. E., y Nuñez-Efraín J. 1999. Evolución Biológica. Primera edición. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp: 35-50.
- Evanno G., Rehnatut S., y Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*. 14: 2611-2620.
- Falush, D., Stephens M., Pritchard J. K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*. 164: 1567-1587.
- Falk. D. A., Richards C. M., Montalvo A. M., y Knapp E. E. (Population and ecological genetics in restoration Ecology En: Palmer M. A., Falk D.A., y Zedler J. B. 2009. Foundations of restoration Ecology. Island Press Washington. Pp15-41.
- Judd. W. S. and Manchester S. R. 1997. Circumscription of (Malvales) as determined by a preliminary cladistic analysis of morphological, anatomical, palynological, and chemical characters. *Brittonia*, 49(3): 384-405.
- Furnier G. R. 2004. Métodos para medir variación genética en las plantas En: Vargas H. J., Bermejo B., y Leding F. T. Manejo de los recursos genéticos forestales. Sernarnat-Conafor. Pp 21-30.
- Greene D. F., Quesada M., Calogeropoulos C. 2008. Dispersal of seeds by the tropical sea breeze. *Ecology*. 89(1): 118-125.
- Gibbs P., Semir J. 2003. Revisión taxonómica del genero *Ceiba* Mill. (Bombacaceae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. 60(2): 259-300.
- Google Earth (versión 5.2.1.1588) [de software]. Mountain View, CA: Google Inc. (2010). Disponible en: <http://www.google.com/earth/index.html>

- Herrerias-Diego Y., Quesada M., Stoner K E., Lobo J. A. 2006. Effects of forest fragmentation on phenological patterns and reproductive success of the tropical dry forest tree *Ceiba aesculifolia*. *Conservation Biology*. 20(4):1111-1120.
- Hobbs. R.J. Harris. J. A. Repairing the earths ecosystems in the new millennium. 2001. *Restoration Ecology* 9(2): 239-246.
- Hufford K. M., y Mazer S.J. 2003. Plant ecotypes genetic differentiation in the age of ecological restoration. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 147-155.
- Lesica P., y Allendorf F. W. 1999. Ecological genetics and the restoration of plan communities: mix or match?. *Restauration Ecology*. 7(1): 42-50.
- Lindig Cisneros, R., A. Blanco García y C. Sáenz Romero. 2005. La restauración ecológica de bosques. *Biológicas* 7: 13-21.
- Linhart Y. B y Grant M.C. 1996. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Ecol. Syst.* 27: 237-277.
- McKay J. K., Christian E. C., Harrison S., y Rice K.J. 2005. How local is local? A rewie of practical and conceptual issue in the genetics of restauration. *Restauration Ecology*. 13(3): 432-440.
- Miller, M. 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: a windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Department of Fisheries and Wildlife, Utah State University, Logan, UT, USA. Available at website <http://bioweb.usu.edu/mpmbio/index.htm>.
- Mwase W. F., F. K. Akinnifesi F. W., Stedje B, Kwapata M. B., Bjørnstad A. 2010. Genetic diversity within and among southern African provenances of *Uapaca kirkiana* Muell. Arg using morphological and AFLP markers. *New Forest* 40(3):383-389.
- Navarro C., Cavers S., Colpaert N., Hernandez G., Breyne P., y Lowe A. J. 2005. *Silvae Genetica*, 54 (6):293-300.
- Nei., 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York. Pp 512.

- Nelson C. D. 2005. Marcadores de ADN, diversidad genética y conservación de especies forestales En: Vera C. G. Vargas H. J. J., y Dorantes J. L. Memorias del simposium "Uso y conservación de recursos genéticos forestales" Colegio de Postgraduados-Comision Nacional Forestal, México. Pp 91.
- Pritchard J, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of populatio structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.
- Quesada M., Stoner K. E., Lobo A. J., Herrerias-Diego Y., Palacios-Guevara C., MunguiA-Rosas M. A., O.-Salazar K. A., y Rosas-Guerrero V. 2004. Effects of forest fragmentation on pollinator activity and consequenes for plant reproductive success and mating patterns in bat-pollinated Bonbacaceous trees. *Biotropica*. 36(2): 131-138.
- Raymond M. L., y Rousset F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280–1283.
- Román, M. M. L., Mora, S. A., Carvajal, H. S., y Ochoa, R. H. 2006. Especies forestales con diversidad de usos en un bosque tropical caducifolio de la comunidad indígena de Tomatlán, Jalisco, México. En Carvajal, S. *Avances en la Investigación Científica en el CUCBA*. ISBN: 970-27-1045-6.
- Russell J.R., Weber. J. C., Booth A., Powell W., Sotelo-Montes C., y Dawson I.K. 1999. Genetic variation of *Calycophyllum spruceanum* in the Peruvian amazon basin, reveled by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analisis. *Molecular Ecology*. 8, 199-204.
- Russell C.F., Wilson D.E. 2006. *Leptonycteris yerbabuenae*. *Mammalian species*. 797: 1-7.
- Schaal A. B., y Leverich J.W. 2005. Conservation genetics: theory and practice. *Ann. Missouri. Bot. Gard.* 92;1-11. *New Forests* 40:383–399.
- Shannon S., y Lande R. 1996. The role of genetic variation in adaptation and population persistence in a changing enviroment. *Evolution*. 50(1): 434-437
- Sinclair A. E., Y Hobbs R. J. 2009. Sample size effects on estimates of population genetic structure: implification for ecological restoration. *Restoration Ecology*. 17(2): 837-844.

**Anexo 1:** Protocolo de Extracción y limpieza de ADN MINI-PREP ( Lefort y Douglas, 1999).

1. Pesar de 100 a 150 mg de tejido foliar.
2. Moler el tejido en mortero agregando nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino.
3. Inmediatamente añadir 180 µl de solución CTAB Previamente calentado en Baño María a 65 °C
4. Moler hasta obtener una consistencia de pasta.
5. Añadir 620 µl de solución de la Porta y moler hasta obtener una consistencia homogénea y líquida.
6. Transferir a microtubos de 1.5ml esterilizados y etiquetados.
7. Agregar 100 µl de SDS al 20%.
8. Agitar vigorosamente con las manos durante 2 minutos.
9. Incubar los tubos en Baño María a 65°C por 5 minutos, posteriormente agitar lo tubos vigorosamente por 1 minutos e incubar por otros 5 minutos.
10. Agregar otros 180 µl de solución de acetato de potasio 5M mantenida a -20°C, y agitar los tubos durante 2 minutos.
11. Refrigerar los tubos por 5 minutos a -20 °C, enseguida centrifugar durante 20 minutos a 13, 000rpm.
12. Transferir el sobrenadante a tubos nuevos.
13. Añadir 600 µl de Isopropanol previamente enfriado a -20°C y agitar los tubos.
14. Incubar a -20°C durante 20 minutos.
15. Centrifugar a 13, 000rpm durante 20 minutos.
16. Tirar el sobrenadante y escurrir los tubos invirtiéndolos sobre una sanita.
17. Agregar 600 µl de TE y agitar hasta que el pellet se disuelva.
18. Centrifugar durante 10 minutos a 13,000rpm.
19. Agregar 600µl de Isopropanol a -20 °C y 60Ml de Acetato de Sodio 3M
20. Agitar e incubar los tubos a -20°C durante 10 minutos.
21. Centrifugar durante 5 minutos a 13,000 rpm.
22. Tirar el sobrenadante y escurrir los tubos invirtiéndolos sobre papel secante.

23. Para obtener el ADN más limpio, se agrega 600  $\mu$ l de etanol al 70% previamente enfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

24. Centrifugar durante 30 minutos a 8,000rpm.

25. Tirar el sobrenadante y escurrir los tubos invirtiéndolos sobre papel secante.

26. Dejar secar el ADN durante 3 horas en la estufa a  $60^{\circ}\text{C}$ .

27. Resuspender el DNA en 50  $\mu$ l de agua estéril.

Una vez disuelto el pellet se almacena el ADN a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Lefort, F. y G. C. Douglas. 1999. An Efficient micro-method of DNA Isolation from nature leaves of for hardwood tree species *Acer Fraxinus*, *Pinus* and *Quercus*. *Ann. For. Sci.* 56: 259-263.

**Anexo 2. Protocolo de AFLP****DIGESTIÓN:**

En un tubo para PCR se agrega 2 µl de ADN más 1.0 µl de la enzima EcoRI.

Se agita el tubo por 5 segundos y se centrifuga por 10 segundos. Se incuba a 37°C por 2 horas (Shaking Incubator, Lab Tech).

Se corre un gel de agarosa al 0.8% en TBE 0.5 X a 50 V aproximadamente 50 minutos (Cámaras de electroforesis MUPID 50 V-100 V).

**ALINEAMIENTO DE LOS PARES DE ADAPTADORES**

1. **LIGACIÓN:** un par de adaptadores (EcoRI y MseI).
2. Se calientan los tubos en baño María a 95° C por 5 minutos.
3. Se enfrían los tubos en hielo por un periodo de 10 minutos.
4. Centrifugar por 10 segundos a 5000 rpm.

**PREPARACIÓN DE LAS REACCIONES RESTRICCIÓN-LIGACIÓN**

En un tubo de 0.5 ml se combina los siguientes reactivos:

- 1.5µl (0.5 µg) ADN
- 1 µl MseI 5 U/ µl (50, 000 U/ml New Englad BioLabs).
- 1 µl EcoRI 10 U/ µl (100, 000 U/ml)
- 1 µl Buffer MseI (10X)
- 0.5 µl BSA 1.0 mg/ml (New Englad BioLabs 10 mg/ml)
- 1 µl NaCl 0.5 M
- 1 µl Adaptador MseI
- 1 µl Adaptador EcoRI
- 0.1 µl Ligasa ADN incluye ATPs (T4 DNA Ligase 400,000 cohesive end units/ml)
- 1 µl Buffer Ligase
- 1.8 µl H<sub>2</sub>O destilada estéril

Se agita el tubo por 5 segundos y se centrifuga por 10 segundos. Las reacciones se incuban a 37° C por 2 horas (Shaking Incubator, Lab Tech).

**AMPLIFICACIÓN PRESELECTIVA**

**DILUCIÓN:** Se agrega 189 µl de buffer TE 0.1 M a pH 8.0 a la reacción de restricción-ligación (la mezcla dura un mes a 2-6 °C y más de un mes a -25°C). Agitar la mezcla.

Reacción en un tubo para PCR.

- 4 µl ADN diluido preparado por restricción ligación.
- 1 µl pares de primers preselectivos AFLP

- 15 µl Core Mix

Guardar a 2-6 °C después de la preamplificación.

Termociclador Applied Biosystems 2720

Verificar el éxito de amplificación.

Cargar 10 µl del producto de amplificación en un gel de agarosa a 1.5 % en TBE 1X a 4 V/cm por 3-4 horas. El producto de amplificación preselectiva crea un barrido visible en un rango de alrededor 100-1500 pb. (Cámaras de electroforesis Accesolab 250V / 250 mA con una fuente Termo electrocorporation EC250-90)

DILUCIÓN: Se agrega 190 µl buffer TE 0.1 M a pH 8.0 a los 10 µl de amplificación preselectiva. Agitar y centrifugar por 10 segundos.

### AMPLIFICACIÓN SELECTIVA

Reacción en un tubo para PCR. Evitar que le de luz a las reacciones.

- 4 µl producto diluido de amplificación preselectiva
- 1 µl MseI (Cxx-primer) a 5 µM
- 1 µl EcoRI (Axx-primer-Dye) a 1 µM
- 15 µl Core Mix AFLP

HOLD		CICLOS		NÚMERO DE CICLOS
94°C	94 °C	66 °C	72 °C	1
20 min.	20 seg.	30 seg.	2 min.	
—	94 °C	65 °C	72 °C	1
	20 seg.	30 seg.	2 min.	
—	94 °C	64 °C	72 °C	1
	20 seg.	30 seg.	2 min.	
—	94 °C	63 °C	72 °C	1
	20 seg.	30 seg.	2 min.	
—	94 °C	62 °C	72 °C	1
	20 seg.	30 seg.	2 min.	
—	94 °C	61 °C	72 °C	1
	20 seg.	30 seg.	2 min.	
—	94 °C	60 °C	72 °C	1
	20 seg.	30 seg.	2 min.	
—	94 °C	59 °C	72 °C	1
	20 seg.	30 seg.	2 min.	
—	94 °C	58 °C	72 °C	1
	20 seg.	30 seg.	2 min.	
—	94 °C	57 °C	72 °C	1
	20 seg.	30 seg.	2 min.	
—	<b>94 °C</b>	<b>56 °C</b>	<b>72 °C</b>	<b>20</b>
	20 seg.	30 seg.	2 min.	
60°C	-	-	-	1
30 min.				
4°C	-	-	-	1

Termociclador de gradiente Eppendorf

**Anexo 3:** Valores Ln P(D) obtenidos por Structure V 2.3 (Pritchard *et al.* 2000) para cada diferente numero de agrupamientos, de K1 a k10.

Replica	1	2	3	4	5
K1	-17767.2	-177766.9	-17773.7	-17768	-17780.5
K2	-16392.5	-16387.7	-16833.3	-16391.6	-1638.5
K3	-16086.2	-16076.7	16.083.6	-16.088.2	-16073.7
K4	-15825.0	-15816.5	-15804.6	-15829.2	-15827.6
K5	-15831.9	-15709.1	-18535.6	-16264.6	-15690.3
K6	-15694.2	-17193.6	-16381.1	-16302.7	-16292
K7	-15625.2	-16955.6	-15654.9	-15806.8	-16301.5
K8	-16578.5	-15570.0	-19753.9	-18404.5	-16323.5
K9	-15550.5	-27774.6	-15693.8	-14636.4	-14738.8
K10	-17678.9	-30106.6	-16251.9	-19037.0	-24689.9

Replica	6	7	8	9	10
K1	-17767.8	-17771.4	-17768.1	-17768.3	-17781.5
K2	-1639.5	-16389.6	-16384.1	-16389.4	-16390.1
K3	-16084.6	-16078.4	-16085.5	-16085.2	-16070.0
K4	-15815.4	-15812.9	-15823.8	-15831.6	-15827.3
K5	-15691.0	-15692.2	-15991.2	-15822.8	-15708.4
K6	-1745.7	-16743.1	-17938.1	-16315.3	-16838.9
K7	-15510.0	-25167.8	-15639.2	-16473.4	-16189.0
K8	-16554.7	-18039.3	-23827.5	-17346.9	-17573.4
K9	-18600.8	-23254.3	-21525.4	-21810.5	-30311.6
K10	-23727.3	-15512.0	-24555.4	-25740.1	-18270.6

**Anexo 4:** Probabilidades individuales para los 123 individuos calculados por Structure V 2.3 (Pritchard *et al.* 2000) de k3 seleccionado.

El Primer renglón indica el individuos , el cual esta formado por una letra más un numero (E “Establecidas”, P ”Progenitora”, C “Cuitzeo” y T “Tzitzio”). El segundo renglón marca la población a la cual pertenece cada individuo (2170 “E2170”, 2200 ”E2200”, 2230 “E2230”, 2260 “E2260”, 2 ”Progenitora”, 3 “Cuitzeo” y 4 “Tzitzio”) por ultimo el tercero, cuarto y quinto renglón indican las probabilidades para cada obtenidas para cada K.

E1	E2170	0.5002	0.4707	0.0290	E30	E2230	0.5456	0.0382	0.4161
E2	E2170	0.5932	0.3013	0.1055	E31	E2230	0.8402	0.0201	0.1397
E3	E2170	0.1061	0.8859	0.0080	E32	E2230	0.3160	0.0117	0.6723
E4	E2170	0.0635	0.9265	0.0101	E33	E2230	0.6808	0.0150	0.3042
E5	E2170	0.4289	0.5634	0.0077	E34	E2230	0.6339	0.0752	0.2909
E6	E2170	0.2480	0.7408	0.0112	E35	E2230	0.4109	0.4908	0.0982
E7	E2170	0.3111	0.0219	0.6670	E36	E2230	0.7565	0.2070	0.0364
E8	E2200	0.6190	0.0423	0.3387	E37	E2230	0.8285	0.1531	0.0184
E9	E2200	0.5280	0.0615	0.4106	E38	E2230	0.5849	0.3574	0.0577
E10	E2200	0.4419	0.0176	0.5404	E39	E2230	0.5299	0.2474	0.2227
E11	E2200	0.4795	0.2649	0.2556	E40	E2230	0.3090	0.6751	0.0159
E12	E2200	0.6717	0.0202	0.3081	E41	E2230	0.8844	0.0275	0.0881
E13	E2200	0.2293	0.0130	0.7576	E42	E2230	0.1893	0.7526	0.0581
E14	E2200	0.3806	0.1763	0.4431	E43	E2230	0.5487	0.0176	0.4337
E15	E2200	0.3261	0.5503	0.1236	E44	E2230	0.5823	0.1220	0.2957
E16	E2200	0.5153	0.4689	0.0157	E45	E2230	0.6077	0.3852	0.0071
E17	E2200	0.4732	0.5201	0.0067	E46	E2230	0.5734	0.4179	0.0086
E18	E2200	0.4048	0.0604	0.5348	E47	E2230	0.6067	0.1004	0.2929
E19	E2200	0.2463	0.6917	0.0620	E48	E2230	0.1110	0.8760	0.0130
E20	E2200	0.4606	0.1732	0.3662	E49	E2230	0.4124	0.5272	0.0605
E21	E2200	0.6960	0.0444	0.2595	E50	E2230	0.3269	0.2760	0.3972
E22	E2200	0.5536	0.4380	0.0084	E51	E2230	0.7582	0.1625	0.0793
E23	E2200	0.4444	0.2046	0.3509	E52	E2230	0.1489	0.2810	0.5701
E24	E2200	0.5532	0.0628	0.3840	E53	E2230	0.4550	0.0976	0.4474
E25	E2200	0.2672	0.6897	0.0430	E54	E2230	0.8636	0.0251	0.1113
E26	E2200	0.2662	0.0476	0.6862	E55	E2230	0.1283	0.8666	0.0052
E27	E2200	0.6372	0.3533	0.0095	E56	E2230	0.0620	0.7955	0.1426
E28	E2200	0.0382	0.0106	0.9512	E57	E2230	0.6498	0.3378	0.0125
E29	E2230	0.3530	0.3288	0.3182	E58	E2230	0.1681	0.8137	0.0181

E59	E2260	0.0531	0.9366	0.0103	C5	3	0.0163	0.1775	0.8063
E60	E2260	0.3847	0.6091	0.0062	C6	3	0.0236	0.0776	0.8989
E61	E2260	0.0486	0.7579	0.1935	C7	3	0.0138	0.0564	0.9298
E62	E2260	0.0497	0.6315	0.3188	C8	3	0.2949	0.1805	0.5246
E63	E2260	0.0555	0.9163	0.0282	C9	3	0.0039	0.0169	0.9792
E64	E2260	0.2271	0.7494	0.0235	C10	3	0.1118	0.4772	0.4111
E65	E2260	0.2483	0.7253	0.0264	C11	3	0.0030	0.0047	0.9923
E66	E2260	0.2124	0.7702	0.0173	C12	3	0.0142	0.0151	0.9707
E67	E2260	0.3848	0.5930	0.0222	C13	3	0.0238	0.0154	0.9608
E68	E2260	0.0385	0.9476	0.0139	C14	3	0.0117	0.3252	0.6631
E69	E2260	0.2121	0.7734	0.0145	C15	3	0.2781	0.2196	0.5023
E70	E2260	0.3328	0.0926	0.5747	C16	3	0.0168	0.0256	0.9576
E71	E2260	0.2581	0.2764	0.4655	T1	4	0.0273	0.6984	0.2744
E72	E2260	0.1732	0.7248	0.1020	T2	4	0.0622	0.9154	0.0224
P1	2	0.5662	0.1132	0.3206	T3	4	0.0147	0.4816	0.5037
P2	2	0.1169	0.8054	0.0778	T4	4	0.0120	0.9749	0.0132
P3	2	0.4139	0.3847	0.2014	T5	4	0.0319	0.9050	0.0631
P4	2	0.4778	0.3998	0.1224	T6	4	0.0393	0.8133	0.1474
P5	2	0.2083	0.5593	0.2324	T7	4	0.0092	0.1001	0.8908
P6	2	0.1447	0.0704	0.7849	T8	4	0.0147	0.9570	0.0283
P7	2	0.0497	0.2362	0.7141	T9	4	0.0173	0.2186	0.7641
P8	2	0.0916	0.0050	0.9034	T10	4	0.0283	0.2307	0.7411
P9	2	0.7493	0.0165	0.2341	T11	4	0.0131	0.3615	0.6255
P10	2	0.4074	0.0105	0.5821	T12	4	0.0107	0.5305	0.4588
P11	2	0.0681	0.0050	0.9269	T13	4	0.0157	0.9129	0.0713
P12	2	0.2037	0.0305	0.7658	T14	4	0.0200	0.7580	0.2220
P13	2	0.3338	0.0067	0.6594	T15	4	0.0860	0.5492	0.3648
P14	2	0.8635	0.0741	0.0624	T16	4	0.2285	0.6644	0.1070
P15	2	0.6301	0.0435	0.3265	T17	4	0.1381	0.5399	0.3220
C1	3	0.0643	0.0126	0.9231	T18	4	0.1257	0.4027	0.4716
C2	3	0.0559	0.8114	0.1328	T19	4	0.2193	0.6993	0.0814
C3	3	0.0140	0.2302	0.7558	T20	4	0.0720	0.3853	0.5427
C4	3	0.0057	0.0085	0.9858					