



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**Análisis de la Estructura Genética de *Laelia speciosa* (HBK) Schlechter
(Orchidaceae), en la Cuenca de Cuitzeo Michoacán, México**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

KARLA JOANNA ROJAS MÉNDEZ

DIRECTOR DE TESIS: D. C. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA

MORELIA, MICHOACÁN; JUNIO 2012



Lo que vemos de un árbol es solo una parte,
importante, sin duda, que nada sería sin sus raíces.

José Saramago

Las mías:

Juan Manuel Rojas y Celia Méndez

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ken Oyama por darme la oportunidad de aprender de él, de participar en su laboratorio y brindarme la confianza para la realización de este trabajo.

Al Dr. Víctor Rocha, por sus enseñanzas en el laboratorio, su apoyo, consejos y amistad.

Al Dr. Juan Manuel Peñaloza, sin el no habría podido terminar esta tesis; gracias por tu paciencia, enseñanzas y dedicación al presente trabajo; por mostrarme lo increíble que es la genética, pero sobre todo por tu amistad.

A los compañeros de laboratorio Wil, Pacobeto, Ana, Gabriela, Rafa, Pau, Faby, a la señora lolita, Cesar, Lorena gracias por su apoyo en este trayecto.

A la facultad de Químico Farmacobiología y sus profesores quienes me han orientado para formarme como profesional. A la UNAM, por permitir realizar este trabajo en sus instalaciones.

A Juan Manuel Rojas y Celia Méndez por ser los mejores padres del mundo y su apoyo en cada parte de mi vida, a mi hermana Carmen por siempre estar para mí.

A mis amigos y compañeros de la universidad por que han dejado una huella importante en mi vida, en especial a Maga, Marlene, Fer, Noé, Vianey y Sandybell.

A mis amigas Tere, Dalia, Cerelly, Licea, Rincón quienes son como una segunda familia para mi, gracias por estar en las buenas y en las malas.

A mis sinodales, el D.C. Carlos Cortes, D.C. Rafael Ortiz, I.Q. Ricardo Martínez, M.C. Luz Elena Alvarado y M.C. Rosa María García gracias por el tiempo que han dedicado a este trabajo y sus observaciones realizaron para el mejoramiento del presente trabajo.

CONTENIDO

1	RESUMEN.....	1
2	INTRODUCCIÓN.....	4
3	ANTECEDENTES	6
3.1	FAMILIA ORCHIDACEAE	6
3.2	ORQUÍDEAS EPIFITAS	7
3.2.1	CARACTERÍSTICAS.....	7
3.3	<i>LAELIA SPECIOSA</i>	8
3.3.1	SISTEMA REPRODUCTIVO.....	10
3.3.2	DISTRIBUCIÓN	12
3.3.3	HÁBITAT.....	13
3.4	SITIO DE ESTUDIO.....	13
3.5	MARCADORES MOLECULARES.....	15
3.5.1	PCR O REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA.....	16
3.5.2	MICROSATÉLITES (SSR).....	18
3.5.3	GENÉTICA DE POBLACIONES.....	19
3.5.4	DIVERSIDAD GENÉTICA.....	19
4	OBJETIVOS	20
4.1	OBJETIVO GENERAL	21
4.2	OBJETIVOS PARTICULARES	21
5	METODOLOGÍA.....	21
5.1	SITIOS DE COLECTA.....	22
5.2	AMPLIFICACIÓN DE DNA.....	22
6	ANÁLISIS DE DATOS	27
6.1	MICRO-CHECKER.....	27
6.1.1	RIQUEZA ALÉLICA.....	28
6.1.2	NÚMERO EFECTIVO DE ALELOS (N_E)	28
6.1.3	HETEROCIGOCIDAD (H).....	28

6.1.4	ESTADÍSTICOS F	29
6.1.5	FLUJO GENÉTICO.....	30
6.1.6	DIFERENCIACIÓN GENÉTICA Y ANÁLISIS DE VARIANZA MOLECULAR (AMOVA).....	32
6.1.7	CAMBIOS EN EL TAMAÑO DE LAS POBLACIONES Y PRUEBAS DE SELECCIÓN.....	32
6.1.8	ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO BAYESIANO.....	34
7	RESULTADOS.....	36
7.1	VARIABILIDAD GENÉTICA.....	36
7.1.1	PRUEBA DE DETECCIÓN DE CUELLOS DE BOTELLA.....	37
7.1.2	AMOVA.....	39
7.2	ESTRUCTURA GENÉTICA.....	40
7.2.1	PRUEBAS DE SELECCIÓN.....	40
7.2.2	FLUJO Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA.....	41
7.2.3	ASIGNACIÓN BAYESIANA Y BARRERAS GENÉTICAS.....	44
8	DISCUSIÓN.....	48
8.1	VARIACIÓN GENÉTICA.....	48
8.1.1	ÍNDICE DE ENDOGAMIA.....	50
8.1.2	PRUEBA DE DETECCIÓN DE CUELLOS DE BOTELLA.....	51
8.1.3	AMOVA.....	52
8.2	ESTRUCTURA GENÉTICA.....	53
8.2.1	PRUEBAS DE SELECCIÓN.....	53
8.2.2	FLUJO Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA.....	54
8.2.3	ASIGNACIÓN BAYESIANA Y BARRERAS GENÉTICAS.....	56
9	CONCLUSIONES.....	59
10	BIBLIOGRAFÍA.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CARACTERÍSTICAS Y COORDENADAS DE LAS POBLACIONES DE <i>L. SPECIOSA</i>	22
TABLA 2. CARACTERÍSTICAS DE LOS PRIMERS UTILIZADOS	22
TABLA 3. GRUPOS DE PRIMERS CONFORME A LA TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO	25
TABLA 4. DIVERSIDAD GENÉTICA, EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG Y DETECCIÓN DE CUELLOS DE BOTELLA PARA LAS POBLACIONES DE <i>L. SPECIOSA</i>	38
TABLA 5. DISTRIBUCIÓN DE LA VARIACIÓN GENÉTICA (AMOVA) EN LAS POBLACIONES DE <i>L. SPECIOSA</i>	39
TABLA 6. PRUEBAS DE SELECCIÓN NATURAL PARA LAS POBLACIONES DE <i>L. SPECIOSA</i>	40
TABLA 7. FLUJO GENÉTICO ENTRE LAS POBLACIONES DE <i>L. SPECIOSA</i>	41
TABLA 8 DIFERENCIACIÓN GENÉTICA PAREADA PARA LAS POBLACIONES DE <i>L. SPECIOSA</i>	43

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. <i>LAELIA SPECIOSA</i>	9
FIGURA 2. USO ORNAMENTAL DE LA ORQUÍDEA <i>LAELIA SPECIOSA</i>	10
FIGURA 3. POLINIZADORES DE <i>L. SPECIOSA</i>	11
FIGURA 4. <i>QUERCUS DESERTÍCOLA</i> Y <i>LAELIA SPECIOSA</i>	12
FIGURA 5. LOCALIZACIÓN DE LA CUENCA DE CUITZEO EN MICHOACÁN.....	15
FIGURA 6. PASOS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	18
FIGURA 7. TERMOCICLADOR EPPENDORF MASTERCYCLER.....	24
FIGURA 8. EQUIPO PARA ELECTROFORESIS Y ELECTROFORESIS EN GEL.....	24
FIGURA 9. SECUENCIADOR AUTOMÁTICO ABI PRISM 3100-AVANT SEQUENCER.....	26
FIGURA 10. CORRELACIÓN ENTRE EL ÍNDICE DE ENDOGAMIA F_{IS} Y LATITUD PARA LAS POBLACIONES DE <i>L. SPECIOSA</i>	37
FIGURA 11. GRAFICA DE AMOVA PARA LAS POBLACIONES DE <i>L. SPECIOSA</i>	39
FIGURA 12. VALOR MÁS PROBABLE PARA K.....	45
FIGURA 13. PROPORCIÓN DE ANCESTRÍA Y UBICACIÓN GEOGRÁFICA DE LAS POBLACIONES EN LA CUENCA DE CUITZEO.....	46
FIGURA 14. ESTIMACIÓN DE GRUPOS GENÉTICOS Y CORRELACIÓN ESPACIAL DE LAS POBLACIONES DE <i>LAELIA SPECIOSA</i> EN LA CUENCA DE CUITZEO POR MEDIO DEL PROGRAMA GENELAND.....	47

1. RESUMEN

México contribuye con el 10 % de la riqueza biológica global, por lo que tiene gran relevancia en el tema de recursos genéticos. En la actualidad la biodiversidad enfrenta una crisis; los ecosistemas naturales están siendo fragmentados por el desarrollo agrícola, la producción industrial y la urbanización, ocasionando pérdida de la biodiversidad, la cual no sólo se produce por la extinción de especies, sino también por la pérdida de la diversidad genética dentro de las especies. La variabilidad genética en sentido amplio es un componente básico de la biodiversidad y el estudio y comprensión de ésta, así como de la estructura genética es de suma importancia para establecer planes de gestión para preservar la biodiversidad y proteger la fuente genética de las especies.

Una de las especies más afectadas en México, perteneciente a la familia Orchidaceae es *Laelia speciosa* comúnmente llamada flor de mayo, es una especie de orquídea endémica de la parte central de México que se encuentra incluida en la norma oficial vigente PROY-NOM-059-ECOL-2002.

En este estudio, se realizó el análisis genético de 11 poblaciones distribuidas en la cuenca de Cuitzeo, Michoacán, México. Se utilizó ADN genómico para las reacciones de amplificación usando microsatélites, por medio de los cuales se determinó la variación y estructura genética dentro y entre las poblaciones de *Laelia speciosa*, así como el número efectivo de alelos por locus analizado, la diferenciación genética y el flujo genético entre poblaciones. De la misma, se realizaron pruebas que determinan el número efectivo de grupos genéticos así como las posibles discontinuidades genéticas entre las poblaciones. Finalmente, se realizaron pruebas que nos permitieran evidenciar cuellos de botella recientes así como estadísticos que nos permitan explorar si algunos loci de microsatélites se han desviado de la neutralidad como señal de la influencia de algún tipo de selección natural, ya sea balanceadora o direccional.

En las poblaciones de *L. speciosa* en la Cuenca de Cuitzeo encontramos una alta diversidad genética. Estos resultados pueden deberse al tipo de polinización cruzada que presenta, debido a que se ha sugerido que los polinizadores pueden permitir el establecimiento de zonas estables de intercambio genético manteniendo una variabilidad adecuada en las poblaciones. Otro factor importante es la dispersión de las semillas a larga distancia a través del viento y a su auto-incompatibilidad evitando así la endogamia.

La diversidad genética se encuentra principalmente distribuida dentro de las poblaciones y esta va disminuyendo conforme la latitud decrece por lo que las poblaciones del sur presentan un menor flujo genético que las poblaciones del norte y la mayor diferenciación entre poblaciones se encuentra entre las del centro y sur de la Cuenca. El índice de endogamia disminuye conforme la latitud aumenta, lo que concuerda con un mayor flujo génico en las poblaciones del norte. Al parecer las poblaciones de *Laelia speciosa* no muestran evidencia genética de haber sufrido un cuello de botella reciente, ni muestra las consecuencias de la destrucción del hábitat, cambio del uso del suelo y tala de su hospedero natural *Quercus desertícola*, así como de la severa extracción de los individuos de las especie con fines ornamentales.

Por otro lado, la distribución de los genotipos muestra la presencia de dos grupos genéticos ampliamente distribuidos a lo largo de la Cuenca, lo cual puede deberse a que las poblaciones pertenecían anteriormente a un área común de bosque pino-encino que no había sido fragmentada. Uno de los genotipos está más restringido y se ve mejor representado principalmente en algunas de las poblaciones del sur, donde el flujo génico es menor que en las poblaciones del norte y centro. Además, es donde se presentan valores altos de endogamia; lo cual puede ser resultado de las barreras genéticas que presentan las poblaciones de esta región. Este grupo presentó selección positiva en el loci Lspe 10 y selección balanceadora en el Lspe 12, la selección positiva la que se presenta principalmente en las poblaciones que han sufrido algún tipo de presión medioambiental como es el caso de las poblaciones de *L. speciosa*; mientras que

el otro grupo presenta selección balanceadora en los loci Lspe 4 y Lspe 7; este tipo de selección promueve una alta diversidad genética, manteniendo el polimorfismo dentro de las poblaciones. El área sur de la Cuenca presenta dos barreras genéticas, la barrera uno es compuesta y delimita las poblaciones de esta región lo que puede ser el causante que en esta región se presenten una menor diversidad genética en comparación con las poblaciones del norte.

Las poblaciones de *Laelia speciosa* analizadas en la Cuenca de Cuitzeo no evidencian de forma notoria el impacto que están sufriendo por la fragmentación de su medio ambiente, ni los efectos de la excesiva extracción de los individuos de su hábitat natural; sin embargo, aún así se observa como la fragmentación ha restringido las poblaciones entre sí, delimitando el flujo génico y dando pie a una mayor diferenciación entre ellas.

2. INTRODUCCIÓN

México ocupa el cuarto lugar del mundo en términos de biodiversidad ya que contribuye con el 10 % de la riqueza biológica global (Soberón, 2010). La gran heterogeneidad climática del territorio mexicano ha permitido el desarrollo de una gran variedad de ecosistemas y del origen y diversificación de un gran número de linajes de plantas y animales (López-Barrera, 2010). Sin embargo, actualmente la mayoría de los ecosistemas se encuentran severamente degradados. Una de las causas principales de este problema es la perturbación y destrucción de las comunidades naturales debido al creciente impacto de las actividades humanas sobre ellas (Ávila-Díaz & Oyama, 2002). Al fragmentarse el ecosistema ocurre un aislamiento espacial de las poblaciones, lo cual puede modificar la actividad de los polinizadores (Maya-García, 2010).

Dentro de los ecosistemas, las plantas desempeñan un papel fundamental, siendo los productores primarios y una parte estructural muy importante; además, es el grupo biológico con el mayor número de taxa reportados en las listas de las especies raras, en peligro o amenazadas (Ellstrand & Elam, 1993). En México, cerca de 2583 especies se encuentran en alguna categoría de amenaza, de acuerdo con la lista oficial de especies en riesgo (NOM-059-SEMARNAT-2001). De todas las especies de plantas conocidas hasta el momento en México, entre el 50 % y el 60 % son consideradas endémicas a nuestro país. En este sentido, Rzendowski (1991) registra en México entre 22, 000 y 30, 000 especies de plantas vasculares de las cuales el 15 % se encuentra en peligro de extinción (Vovides, 1995). De todas las especies de plantas vasculares en el mundo, alrededor del 10 % son epífitas (Nieder *et al.*, 2001), y aproximadamente el 70 % de las epífitas son orquídeas (Madison, 1977; Bennett, 1988).

La flora orquideológica de México comprende 1106 especies y subespecies, distribuidas en 159 géneros. Una de sus características más sobresalientes es la alta proporción de especies endémicas, ya que se han

registrado 444 especies o subespecies endémicas que corresponden aproximadamente a 40 % del total de taxa registrados en el país (Soto-Arenas, 1996). No obstante, actualmente existen cerca de 180 especies de orquídeas que han sido incluidas en la norma oficial vigente PROY-NOM-059-ECOL-2002 en alguna categoría de riesgo. Dentro de este grupo se encuentra la orquídea *Laelia speciosa* (HBK) Schlechter, como una especie sujeta a protección especial. Se le considera una de las especies más bellas de su género y una de las más colectadas en México por su valor ornamental, económico y cultural (Halbinger, 1993). Por lo tanto, podemos plantear que pudieran existir efectos negativos del saqueo intensivo junto con la destrucción de los bosques templados de pino-encino y de encino de los cuales es hospedero y aunado al acelerado cambio de uso del suelo han provocado que las poblaciones silvestres hayan sido afectadas severamente ocasionando una fragmentación extensiva en sus poblaciones. Esta situación conlleva al deterioro de la diversidad genética de la especie (Soto-Arenas, 1996). Las consecuencias de la pérdida de diversidad biológica son muchas, y están directamente asociadas con la disminución del bienestar del ser humano y su desarrollo económico (Millennium Ecosystem Assessment, 2005).

De esta manera, y con el fin de plantear estrategias para la conservación de la especie, es necesario evaluar primero cuanta diversidad genética reside entre las poblaciones distribuidas dentro de la cuenca de Cuitzeo, Michoacán. Para lo cual se utilizaron marcadores moleculares, los cuales nos permitirán conocer su diversidad genética, diferenciación, el flujo génico y obtener estimaciones de parámetros evolutivos como la deriva génica y endogamia entre otros (Eguiarte & Souza, 2007). En el caso particular de este trabajo, se eligieron ocho microsatélites nucleares; debido a que son altamente polimórficos, y se les encuentra repartidos por todo el genoma, son de herencia co-dominante (se distinguen todos los homocigotos entre sí y estos de los heterocigotos) y son reproducibles.

3. ANTECEDENTES

Las orquídeas son plantas herbáceas perennes o sub-arbustivas, que se pueden encontrar tamaños desde unos cuantos centímetros hasta 10 m de largo (Maya-García, 2010), pueden ser epífitas, terrestres, litófitas y rara vez paludícolas o saprofitas, siendo más abundantes en las regiones tropicales (Rzendowsky, et al., 2001). Las orquídeas han sido unas de las plantas más admiradas y apreciadas desde hace muchos siglos por diferentes civilizaciones debido a su alto valor comercial y hortícola, estas cualidades han favorecido la extracción masiva de individuos de las poblaciones silvestres (Ávila-Díaz & Oyama, 2002) lo cual han provocado la disminución de las poblaciones llevándolas casi a la extinción (Maldonado-Flores, 2006).

3.1 Familia Orchidaceae

La familia Orchidaceae es una de las familias más diversas morfológicamente y con el mayor número de especies, ya que se estima que cuenta con alrededor de 850 géneros, con unas 25 000 especies [poco más de la mitad son epífitas] (Dressler, 1990), dentro de las cuales México posee 1 106 especies y subespecies, distribuidas en 159 géneros (Soto-Arenas, 1996). Una de sus características más sobresalientes es la alta proporción de especies endémicas, ya que se han registrado 444 especies o subespecies son endémicas (Soto-Arenas, 1996). Esto hace a la flora de orquídeas mexicanas proporcionalmente una de las más ricas en endemismo entre los países no tropicales del continente. Entre las plantas vasculares, la familia Orchidaceae es una de las mayores familias que presenta plantas con flores y que exhiben una amplia gama de atributos biológicos y ecológicos, tales como múltiples estrategias de reproducción, gran tamaño de las poblaciones, variadas adaptaciones a las particularidades del medioambiente y una gran distribución geográfica (Chung *et al.*, 2006).

3.2 Orquídeas epífitas

Dentro del grupo de las epífitas, las orquídeas son componentes esenciales de los bosques tropicales y templados, se consideran indicadores de la calidad ecológica y del estado de conservación en el que se encuentran los bosques (Barthlott *et al.*, 2001; Hietzl, 1998). Ya que dichos organismos al estratificarse de manera vertical ocasionan que la estructura de los hospederos funcione como fuente de recursos para otros organismos componentes del ecosistema, así como en la generación de diferentes pisos del dosel (Flores-Palacios & García-Franco, 2003). Además, influyen de manera muy particular en el funcionamiento de los bosques a través de su participación en los ciclos bio-geoquímicos de estos ecosistemas (Maldonado-Flores, 2006).

3.2.1 Características

A las orquídeas epífitas se les encuentra ampliamente distribuidas en los trópicos, carecen de raíces en el suelo y crecen sobre plantas hospederas, por lo general sobre los árboles del bosque, pero a diferencia de las parasitarias no toman nutrimentos directamente de ellos (Benzing, 1990; Maya-García, 2010). Pero si dependen enormemente de la precipitación y han desarrollado estructuras (tallos modificados, hojas suculentas y velamen en la raíz) que le permiten almacenar agua; se nutren de la descomposición del detritus, hojarasca y organismos muertos que se encuentran en el hospedero (Granados-Sánchez *et al.*, 2003). Tienen un tallo con hojas aisladas o reducidas a escamas, y muchas raíces aéreas colgantes recubiertas por el velamen, que tiene función principalmente absorbente y cuyo ápice verde realiza la fotosíntesis. En el ciclo de nutrientes son una parte importante ya que el desarrollo de las poblaciones permite tener una mayor obtención de nitrógeno el cual proviene de lluvia, polvo y aire (Martínez-Ramos, 2008).

Las plantas epífitas como las orquídeas que exponen sus tejidos a la luz solar directa durante prolongados periodos del día viven en un ambiente de

relativa aridez. Estas epífitas poseen la función fotosintética tipo CAM lo que les permite capturar carbono durante la noche y cerrar los estomas durante el día, evitando así pérdidas fuertes de agua por la transpiración (Fu & Hew, 1982). En general, muchas de estas plantas tienen propagación vegetativa; sin embargo, la especificidad del hospedero puede determinar su estructura genética (Piñero *et al.*, 2008). A pesar de la gran diversidad de las epífitas y la importancia ecológica de éstas, la mayoría de los estudios genéticos sobre las orquídeas se han centrado en las epífitas terrestres (Ávila-Díaz & Oyama, 2007).

Dentro de la familia Orchidaceae, particularmente el género *Laelia* es uno de los géneros más importantes con un total de once especies, es endémico de nuestro país y se encuentra en una gran variedad de nichos ecológicos (Santos *et al.*, 2006). Entre estas especies se encuentra *Laelia speciosa* una planta epífita, la cual se encuentra dentro de la NOM-059_ECOL-2002, en la categoría de amenazada, debido a la extracción masiva y la perturbación de sus hábitats, las poblaciones naturales se encuentran declinando cada vez más (Hernández, 1992; Pérez-Pérez, 2003; Ávila-Díaz & Oyama, 2007).

3.4 *Laelia speciosa*

Laelia speciosa (Figura 1) comúnmente llamada flor de mayo, es una flor epífita, perenne de larga vida. Presenta pseudobulbos globulares u ovoides de color verde claro; pueden tener de 3 a 6 cm de largo. Tienen de 1 a 2 hojas por pseudobulbo que miden de 7.5 a 16 cm de largo por 2 a 3.5 cm de ancho. La inflorescencia presenta de 1 a 3 flores grandes de 10 a 16 cm de diámetro. Son vistosas y muy abiertas con pétalos y sépalos casi en el mismo plano, que pueden ser de color rosa pálido a rosa lila, labelo blanco, con los márgenes frecuentemente coloreados con manchas y rayas púrpura variable (Pérez-Pérez, 2003).

Se le considera como una de las especies más hermosas del género y la orquídea silvestre más ampliamente colectada en México (Halbinger, 1993; Soto-

Arenas, 1996). Se estima que en la época de máxima floración se venden alrededor de 1 500 flores diarias y para el estado de Michoacán se estima que se extraen alrededor de 6 000 plantas o segmentos de éstas al año (Ávila-Díaz & Oyama, 2002). El uso de esta orquídea se encuentra muy relacionado con actividades productivas y culturales. Los artesanos de varias localidades del estado de Michoacán extraen una sustancia mucilaginosa a partir de sus pseudobulbos para la elaboración de artesanías llamadas “figuras de pasta de caña” (Miranda, 1997; Artesanos, com. pers. Con Ávila-Díaz). También se utilizan grandes cantidades de flores en celebraciones religiosas (Figura 2) como es la fiesta de Jueves de Corpus (Solano-Gómez *et al.*, 2010), lo que ha disminuido severamente sus poblaciones naturales (Ávila-Díaz & Oyama, 2007).



Figura 1. *Laelia speciosa*

(foto tomado por Karla y Juan Peñaloza 2006)

Existen otros factores que influyen en la reducción de las poblaciones de *L. speciosa*, por ejemplo: el crecimiento lento de las plantas, el desprendimiento natural de las mismas, la formación escasa de semillas y la existencia de áreas fragmentadas en la cuenca por efecto de actividades como agricultura de temporal, pastoreo, incendios y deforestación (Santos *et al.*, 2006).



Figura 2. Uso ornamental de la orquídea *Laelia speciosa* en festejos de comunidades rurales de Michoacán.

Foto: Isadora Torres y Jorge Penosa

3.4.1 Sistema Reproductivo

El sistema reproductivo de las plantas representan todos los aspectos que determinan los patrones de transmisión de genes y con ello la variación genética, afectando, por consiguiente, la adecuación biológica individual y el tamaño poblacional (Dafni, 1992). Dentro de las poblaciones de orquídeas la reproducción está limitada por el número de polinizadores (Tremblay *et al.*, 2005). La mayoría de las especies de orquídeas son autocompatibles pero presentan barreras morfológicas que previenen la autopolinización (Dressler, 1981, 1993; Van Der Pijl & Dodson, 1996; Borba & Semir, 1999). Por lo general, presentan la columna que facilita la polinización mediante insectos y a la vez previene la autogamia

espontánea (Dressler, 1981), pero incluso se ha reportado la autoincompatibilidad genética (Barrett *et al.*, 1998), ya que existen mecanismos bioquímicos presentes en estas plantas los cuales rechazan los propios granos de polen dentro del estigma, evitando la fertilización (Dafni, 1992). Por ejemplo, en la especie *Laelia speciosa*, Ávila-Díaz (2007) reporta que presenta un sistema de polinización cruzada favoreciendo la exogamia. En las orquídeas, el nivel de la estructura genética de la población está fuertemente influenciado por el comportamiento de los polinizadores (Neiland & Wilcock, 1998; Cozzolino & Widmer, 2005; Tremblay *et al.*, 2005). Para esta especie en particular se ha documentado a las especies *Bombus pennsylvanicus sonorus* y *Bombus ephippiatus* (

Figura 3) como sus polinizadores potenciales (Maya-García, 2010).



Figura 3. Polinizadores de *L. speciosa*

(A) *Bombus pennsylvanicus sonorus*; (B) *Bombus ephippiatus*

En algunos casos, la dispersión de semillas puede ser incluso más importante que el polen para el flujo de genes entre poblaciones (Peakall & Beattie, 1991; Rasmussen, 1995; Cozzolino *et al.*, 2003; Brzosko *et al.*, 2004). En general, se sabe que las semillas de Orchidaceae son muy pequeñas y ligeras, y que pueden ser dispersadas por el viento a largas distancias (Dressler, 1981, 1993; Ackerman & Ward, 1999; Chung *et al.*, 2004), promoviendo la homogeneidad genética entre poblaciones (Dressler, 1981; Mürrén & Ellison,

1998; Trapnell & Hamrick, 2004; Trapnell *et al.*, 2004). También se ha sugerido que el flujo de genes en epífitas podría ser más susceptible a los cambios microambientales que otras especies debido al tipo de hábitat y a las estrategias específicas de la polinización de estas especies (Ackerman & Ward, 1999; Tremblay & Ackerman, 2001; González-Astorga *et al.*, 2004; Trapnell *et al.*, 2004).

3.4.2 Distribución

Laelia speciosa (HBK) Schlechter, se encuentra ampliamente distribuida en bosques de encino. Las plantas crecen sobre las especies de encino, en particular sobre *Quercus deserticola* Trel. (Figura 4) que se encuentra en bosques deciduos y abiertos, de hoja caduca, en altitudes entre 1440 a 2500 m (Halbinger & Soto, 1997). *L. speciosa* se le encuentra distribuida en los bosques de encino de la Sierra Madre Occidental y Oriental, la parte meridional de la altiplanicie Mexicana (Altiplano Mexicano), y el Eje Neovolcánico Transversal (Faja Volcánica Trans-mexicana) en los estados de Durango, Zacatecas, Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, Michoacán, Querétaro, Hidalgo, San Luis Potosí y Tamaulipas (Halbinger & Soto, 1997; Ávila-Díaz & Oyama, 2007).



Figura 4. *Quercus deserticola* y *Laelia speciosa*

A) Árboles de *Quercus deserticola*, B) *L. speciosa* sobre tronco de *Q. deserticola*

A pesar de poseer una distribución geográfica relativamente grande, la extracción de plantas en gran parte de su hábitat natural (McVaugh, 1985; Wiard, 1987), ha venido reduciendo una gran cantidad de poblaciones. Aunado a esto sus poblaciones se han visto perjudicadas por la destrucción de los bosques y hábitats en donde viven (Ávila-Díaz, 1996). Como resultado, la mayoría de las poblaciones naturales están declinando y han traído severas consecuencias a la producción de semillas de las poblaciones silvestres e incluso en algunos sitios las poblaciones consisten de pocos individuos dispersos (Cortés-Palomec *et al.*, 2008).

3.4.3 Hábitat

Las condiciones ambientales donde viven los encinos pueden llegar a ser muy estresantes para las epífitas que habitan sobre ellos, las cuales tienen que adaptarse a la escasez de agua y nutrientes (Hágsater *et al.*, 2005). Por ejemplo, se ha observado que forman grupos compactos sobre ramas de las plantas hospederas que se encuentran menos expuestas a la intensidad solar. Sus raíces no toleran el exceso de humedad, ni el agua estancada, ya que esto podría ocasionar que se pudrieran. Están totalmente adaptadas a una época de sequía de cada año, y es en ese momento cuando producen nuevas raíces, retoños, crecimiento vegetativo y floración (Damon, 2006; Maya-García, 2010). Sin embargo, y a pesar de las condiciones estresantes donde crecen estas orquídeas, los pocos estudios que se han realizado sobre ellas han demostrado que estas plantas en general presentan alta diversidad genética, una baja diferenciación genética entre las poblaciones y altos niveles de flujo génico a lo largo de su distribución geográfica (Ávila-Díaz & Oyama, 2007).

3.5 Sitio de estudio

El estado de Michoacán se localiza en la parte centro occidente de la República Mexicana. En Michoacán se distinguen dos grandes regiones

climáticas; la correspondiente a la Sierra Madre del Sur y la pendiente limítrofe del sur (Eje Neovolcánico), con predominancia de climas cálidos y semicálidos subhúmedos, y la del Eje Neovolcánico, con climas templados y semifríos subhúmedos (INEGI, 2007). El estado es extraordinariamente rico; ocupa el quinto lugar nacional por su riqueza de especies. Sin embargo, al igual que en el resto del país, la situación ambiental es preocupante debido al alto grado de deterioro que presentan tanto nuestros ecosistemas como las poblaciones de flora y fauna que en ellos viven (Estrategia para la Conservación y Uso Sustentable de la Diversidad Biológica de Michoacán, 2007).

En las últimas décadas, Michoacán ha presentado tasas de deforestación bastante elevadas. En particular, este cambio se ha dado como resultado del incremento de la agricultura y los pastizales a costa de la pérdida de los ecosistemas naturales como bosques y selvas. El cambio más drástico se ha dado en la región Cuitzeo seguido por la región Tierra Caliente. (Estrategia para la Conservación y Uso Sustentable de la Diversidad Biológica de Michoacán, 2007). La cuenca endorreica del lago de Cuitzeo (

Figura 5), el segundo lago más grande de México, se localiza en el Sistema Neovolcánico Transversal y la sub-provincia de las Sierras y Bajíos Michoacanos (Rojas, 1991). Esta cuenca incluye los estados de Michoacán (parte norte) y Guanajuato y ocupa una superficie de aproximadamente 4,000 km² en 26 municipios de los cuales 21 pertenecen a Michoacán (Pasquarè *et al.*, 1991; Mendoza *et al.*, 2002).



Figura 5. Localización de la Cuenca de Cuitzeo en Michoacán

Mapa de México (al fondo) y del estado de Michoacán, con la ubicación de la Cuenca del Lago de Cuitzeo

La cobertura vegetal y el uso del suelo corresponden de manera predominante a matorrales, bosque y cultivos (López-Granados *et al.*, 2001). La distribución espacial indica que el área de estudio se ubica en una zona transicional, entre los climas templado-secos a templado-húmedos, con una precipitación promedio anual menor de 1 000 mm y una temperatura media de 15 °C (López-Granados *et al.*, 2002).

3.6 Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares han sido definidos como toda aquella molécula (proteínas o ADN principalmente) que pueden identificarse y caracterizarse para definir un genotipo determinado. Existen varios tipos de marcadores moleculares, en este sentido tenemos dos grandes grupos de marcadores: (Salazar, 2007) los no basados en la técnica de PCR y los basados

en la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa); dentro de este último grupo se encuentran los microsatélites (Salazar, 2007).

3.6.1 PCR o Reacción en Cadena de la Polimerasa

La técnica PCR, o reacción en cadena de la polimerasa, desarrollada por Mullis *et al.* (1986), es una reacción enzimática catalizada por una ADN polimerasa (Salazar, 2007), consiste en la amplificación de fragmentos específicos de ADN a partir de una pequeña cantidad original de ADN molde usando para la síntesis, un par de oligos denominados iniciadores o «primers». (Aranguren-Méndez & Jordana, 2001). Los primers son fragmentos de ADN de una única hebra cuya secuencia es complementaria de las que enmarca la región que se va a amplificar. La reacción es cíclica, de modo que las copias obtenidas aumentan de manera exponencial, obteniendo millones de ellas a partir de una cantidad inicial muy pequeña de ADN. Una vez extraído el ADN del material a utilizar, los principales pasos del PCR (

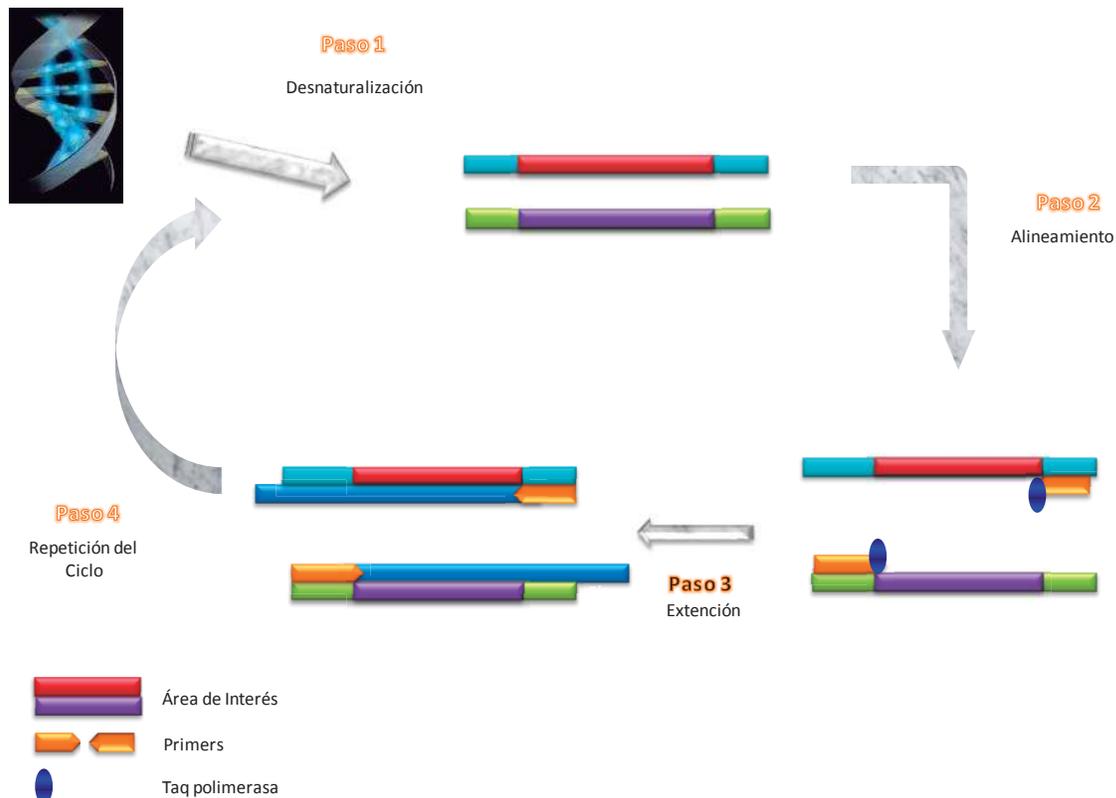


Figura 6) son los siguientes:

1. Desnaturalización de las hebras de ADN a través de altas temperaturas comúnmente 95 °C.

2. Se induce el alineamiento o reconocimiento del cebador con las secuencias complementarias o molde del ADN. Esto se conoce como hibridación y ocurre al bajar la temperatura (p.e. 55 °C).

3. Por medio de la enzima Taq polimerasa se lleva a cabo la extensión o alargamiento de la molécula iniciadora (cebador); o sea, la síntesis de la cadena complementaria. La temperatura de elongación suele ser de 72 °C.

4. Los ciclos se repiten la cantidad de veces que sea necesario hasta obtener el número de copias de ADN que se requiere (Avisé, 1994).

Estos procesos tienen lugar en un termociclador, el cual se encarga de realizar los cambios de temperatura necesarios para que se desarrollen las etapas o ciclos pertinentes (Tautz, 1989; Williams *et al.*, 1990).

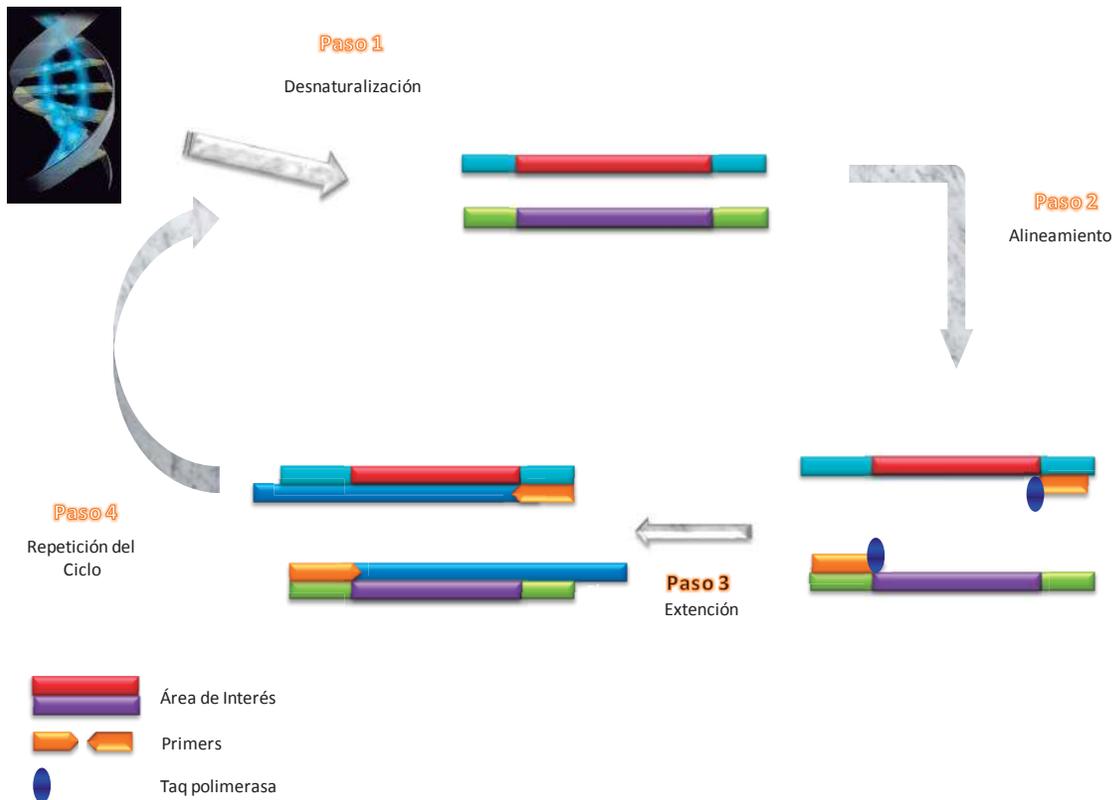


Figura 6. Pasos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

3.6.2 Microsatélites (SSR)

Los marcadores microsatélites también conocidos como SSR (Simple Sequence Repeats), son segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pares de bases (pb), los cuales se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma de los seres vivos. El número de repeticiones puede variar, por lo que las diferencias o polimorfismos se detectan con una heterogeneidad de tamaños (Tautz, 1989; Engel *et al.*, 1996; Ramel, 1997; Hoelzen, 1998). Una de las ventajas de estos marcadores *versus* otros (minisatélites, RFLP, RAPD, etc.) radica en que están considerados, por la mayoría de autores como una herramienta muy útil para los estudios de genética de poblaciones, evolución, ecología genética y genética de la conservación debido a sus altos niveles de polimorfismo (Cheng & Crittenden, 1994). Presentan herencia mendeliana simple, son codominantes (pudiéndose

diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos), fáciles de reproducir, medir y analizar (Pinheiro *et al.*, 2009). El elevado polimorfismo que presentan los microsatélites los hace muy útiles para identificaciones individuales. (Aranguren-Méndez & Jordana, 2001). Una de las principales utilidades de este tipo de marcador, es la posibilidad de estimar los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones y analizar las relaciones genéticas existentes entre las mismas (Bowcock *et al.*, 1994; Ponsuksili *et al.*, 1999). Evaluar el efecto de la fragmentación del paisaje en el flujo de genes, en la delimitación de las especies y en el origen y el mantenimiento de las barreras reproductivas entre las especies (Pinheiro *et al.*, 2009).

3.6.3 Genética de Poblaciones

Es el estudio de los cambios en las frecuencias génicas a poblaciones completas de organismos y, como tal, se relaciona estrechamente con la genética evolutiva (Barbadilla, 2007). En la genética poblacional los cambios evolutivos se contemplan como consecuencia de los cambios genéticos en las poblaciones y no de los individuos. Estos cambios también son el resultado del estudio de los cambios en las frecuencias alélicas y genotípicas basadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg. Por lo tanto, la genética de poblaciones incluye el estudio de varias fuerzas que dan como resultado los cambios evolutivos en las especies a través del tiempo (Hartl & Clark, 1997; Fontdevila & Moya, 1999; González-González, 2008).

3.6.4 Diversidad genética

La diversidad genética se puede definir como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie (Piñero *et al.*, 2008). La diversidad que se presenta en las poblaciones, permite entender cómo es que las especies se

adaptan y evolucionan; es así, que la variabilidad genética constituye la base de la respuesta genética (Aranguren-Méndez & Jordana, 2001; Rochambeau *et al.*, 2000). Por lo que la pérdida de esta, merma la capacidad para mantenerse y reduce la aptitud para hacer frente a nuevas condiciones ambientales (FAO, <http://fao.org/dad-is>)

Entre los principales factores que delimitan la variabilidad genética están la distribución geográfica, los sistemas de reproducción, las formas de vida y las características de dispersión del polen y las semillas; todos estos influyen fuertemente en la estructura genética de las poblaciones naturales de plantas (Santos *et al.*, 2006).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- ➔ Determinar la diversidad y estructura genética de las poblaciones de *Laelia speciosa* (Orchidaceae) en la Cuenca de Cuitzeo Michoacán, México.

4.2 Objetivos Particulares

- ➔ Estimar los niveles de diversidad genética de las poblaciones de *L. speciosa* por medio del uso de microsatélites.
- ➔ Comparar los niveles de diferenciación genética, el flujo génico entre sus poblaciones y conocer la estructura genética espacial.
- ➔ Determinar si existen evidencias de selección natural entre las poblaciones de *L. speciosa*.
- ➔ Contribuir, desde la perspectiva genética, a la aplicación y desarrollo de los posibles planes de recuperación que se puedan establecer en una especie que ha sido grandemente afectada por los procesos de fragmentación y por el saqueo intensivo.

5. METODOLOGÍA

5.1 Sitios de Colecta

Las muestras de *L. speciosa* se colectaron de 11 fragmentos de bosques dentro de la cuenca del lago de Cuitzeo (Tabla 1), recolectando de 12 a 20 individuos por población, los ejemplares fueron tomados de árboles de *Q. deserticola* separados entre ellos por al menos 30 m cada uno.

Tabla 1. Características y Coordenadas de las Poblaciones de *L. speciosa*

Población	Código	N	Coordenadas	
			Latitud	Longitud
Zacazonapan	Zac	15	19° 53' 50.64" N	100° 46' 5.16" O
Indaparapeo	Inm	15	19° 44' 35.88" N	100° 57' 16.92" O
Puente Roble	Rob	16	19° 43' 59.88" N	100° 54' 47.88" O
San Felipe	Fel	16	19° 42' 16.92" N	100° 58' 36.48" O
Cerro del Águila	Agu	19	19° 36' 57.60" N	101° 19' 36.12" O
Lagunillas 1	Lag	20	19° 35' 6.01" N	101° 23' 18.10" O
Caurio de Guadalupe	Cgm	15	19° 37' 57.00" N	101° 29' 12.12" O
San Carlos Coapas 1	Coa	16	19° 32' 17.52" N	101° 17' 55.32" O
El Olvido	Olm	15	19° 32' 21.36" N	101° 25' 6.93" O
Potrerosillos 1	Pot	12	19° 42' 16.92" N	101° 25' 45.48" O
Potrerosillos 2	P-2	16	19° 30' 51.84" N	101° 24' 24.48" O

Nombre de las poblaciones de estudio con el respectivo código, N= número de individuos utilizados de cada población y coordenadas de las poblaciones.

5.2 Amplificación de DNA

La amplificación del ADN de los individuos de *L. speciosa* se realizó a partir de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando algunos de los microsatélites nucleares desarrollados previamente por Córtes-Palomec *et al.* (2008); los cuales se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Características de los primers utilizados

Nombre	Secuencia de primer 5'-3'	Repetición	MF	No
--------	---------------------------	------------	----	----

Lspe 1	F: AGAGAAAGCCCTTGTGTTGG R: TCAGCTCTTCCGATTCTGGT	(TC) ₉ CCC(TC) ₄	6-FAM	EF439820
Lspe 2	F: GCAGATCCCACCATGAACTC R: AATGTTGGAAATCGGTAGCA	(GA) ₁₇	6-FAM	EF439821
Lspe 6	F: GAAGCCCGTCGTCAGAAGTA R: AAAAGAAGACCCCGAGCCTA	(CTT) ₆	6-FAM	EF439826
Lspe 7	F: CTTGAGGTGGGGAGTGATGT R: GGCTTAGCTGTTTGGAATCG	(TC) ₄	VIC	EF439827
Lspe 8	F: AAGCTCCTAGTGCCTGCTTG R: CATGTGGCTCTGGATTGTTG	(AG) ₅ GA(G) ₆ (AG) ₃ . . . (AG) ₁	6-FAM	EF439828
Lspe 12	F: GGGGAAACAGAAGAAGGAAGA R: AGACCTGGAGCAACTTTCCA	(AC) ₄ AG(AAG) ₃	VIC	EF439832
Lspe 13	F:TCTCTAAATACCATAAGTGGAGTGAAA R: TTCAACCGAGAGCCACCTAC	(GAA) ₅	6-FAM	EF439835
Lspe 14	F: TGAGACGAAAAACCCATTCTT R: GGTTACCAGCCATTCCCTTT	(CTTT) ₂ CTT(CTTT) ₃ (CTTT) ₂	VIC	EF439836

Se muestra las secuencias de los primers, así como la repetición, el tipo de marcador fluorescente para los primers forward (MF) y el número de acceso en GenBank

Los primers “forward” se marcaron con fluorescencia, mientras que los primers “reverse” quedaron sin marcar.

Posteriormente, se llevo a cabo un PCR en un termociclador de gradiente Eppendorf Mastercycler (Figura 7), para definir la temperatura de alineamiento más adecuada usando las condiciones siguientes:

Como primer paso se realiza una desnaturalización a 95 °C por 4 min, posteriormente se realizaron 35 ciclos que comprenden: desnaturalización, alineamiento y extensión, a 94 °C por 30 seg, de 39.5 – 60.1 °C por 35 seg y 72 °C por 1 min respectivamente, se incluyo una extensión final por 1 min a 72° C.

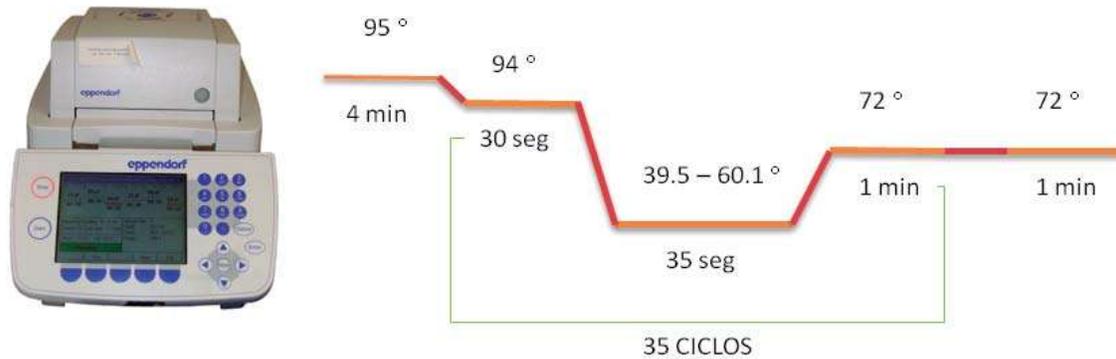


Figura 7. Termociclador Eppendorf Mastercycler

Imagen del termociclador utilizado para realizar las reacciones de PCR y condiciones que se llevaron a cabo para la obtención de la temperatura de alineación.

Una vez obtenido el producto de PCR del gradiente de temperatura se realizó una electroforesis (

Figura 8) utilizando geles de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ml) en TBE al 0.5 %. Después se introdujeron dentro de una cámara para electroforesis aplicándole una corriente eléctrica de 100 voltios por 30 minutos aproximadamente, donde se observaron posteriormente con luz UV, para definir la temperatura de alineamiento (Figura 8) adecuada para la amplificación. Una vez definida se agruparon los primers en tres grupos de acuerdo a la temperatura en la cual se alinean a los primers (Tabla 3).

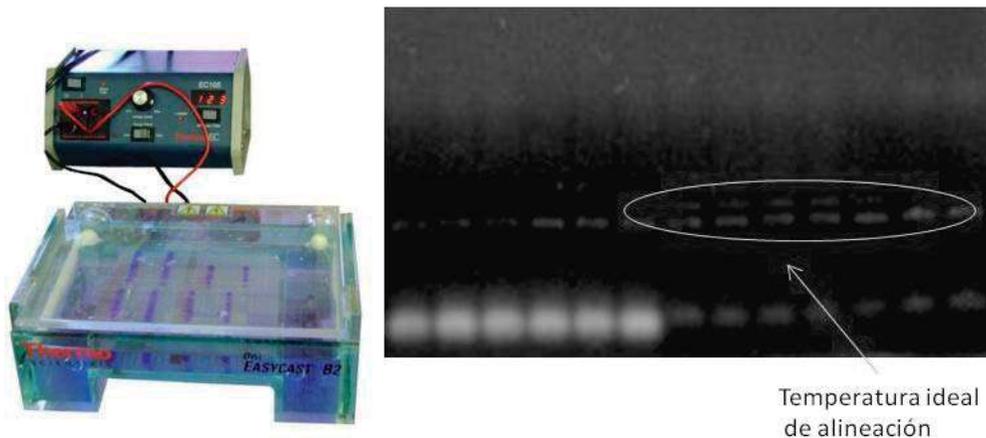


Figura 8. Equipo para electroforesis y electroforesis en gel

(izquierda) Se muestra un aparato en la cual se lleva a cabo la electroforesis. (Derecha) Gel de agarosa visto con luz UV para definir las temperaturas de alineamiento (encerrados en ovalo amarillo) más adecuadas para formar los grupos para el PCR múltiple.

El PCR se efectuó usando el kit QIAGEN Multiplex (QUIAGEN) en 5 μ l de reacción como volumen total:

- ◆ 3 μ l de Múltiplex PCR master Mix
- ◆ 1 μ l de mezcla de primers
- ◆ 1 μ l de DNA

Con los productos de PCR múltiplex (1 μ l de DNA) se realizó la reacción con 10 μ l de Hidi (foramida), 0.3 μ l de GeneScan-500 Liz y se corrieron en el secuenciador automático ABI PRISM 3100-Avant sequencer (Figura 9). Finalmente, los microsatélites que se amplificaron fueron leídos por medio del programa Peak Scanner software v 1.0 Applied Biosystems.

Tabla 3. Grupos de Primers conforme a la temperatura de alineamiento

Temperatura de alineación (°C)	Nombre de Primer
54.5	Lspe 8 Lspe 12
54.5	Lspe 1 Lspe 4 Lspe 7
58.1	Lspe 6 Lspe 10

Los grupos para realizar los PCR múltiples se designaron de acuerdo a su afinidad en la temperatura de alineamiento

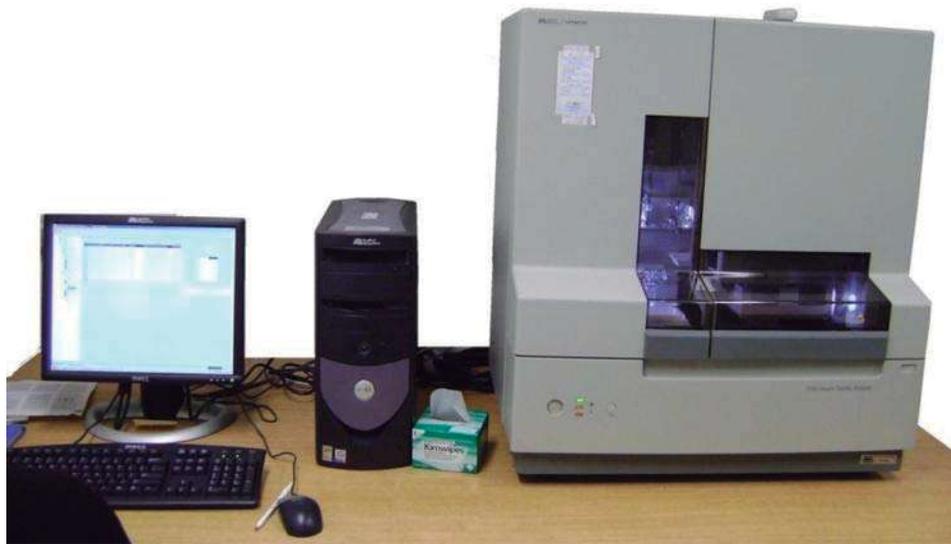


Figura 9. Secuenciador automático ABI PRISM 3100-Avant sequencer

6. ANÁLISIS DE DATOS

6.1 MICRO-CHECKER

Se llevó a cabo una revisión de la base de datos de los microsatélites nucleares obtenida para las poblaciones de *L. speciosa*, para determinar cualquier tipo de error en el genotipado, por medio del programa MICRO-CHECKER v 2.2.3 (Van-Oosterhout *et al.*, 2006) con 1000 permutaciones "bootstrap" y un intervalo de confiabilidad del 95 %. Estos errores pueden ser producto de la errónea marcación o los llamados "stuttering" en los picos, es decir un deslizamiento durante la amplificación producida por tartamudeos adicionales que difieren de la plantilla original por múltiplos de repetición de la unidad de longitud (Shinde *et al.*, 2003). Este tartamudeo se presenta principalmente en locus dinucleótidos por la amplificación de alelos pequeños ("dropout"), es decir, la deserción de alelos grandes o de alelos cortos (Wattier *et al.*, 1998). La presencia de alelos nulos pueden dar como resultado falsos homócigos producidos por mutaciones en los sitios de la cartilla debido a que no pueden amplificarse (Shaw *et al.*, 1999) y errores tipográficos que se deben a una baja concentración del ADN evitando que algunos alelos se amplifiquen.

La variación genética que reside en las poblaciones de las especies, puede revelarse mediante marcadores moleculares y por lo tanto, medirse a través de diversos índices siendo los más utilizados la riqueza alélica, número promedio de alelos por locus (A), número efectivo de alelos (N_E), la heterocigosidad esperada (H_E) y la heterocigosidad observada (H_O) (González-González, 2008). Todos estos índices fueron estimados en las poblaciones de *L. speciosa* en la cuenca de Cuitzeo, la cual se realizó utilizando el programa GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004). Además, se analizaron las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weimberg (exceso o déficit de heterocigosidad) con el programa GENEPOP 4.1 (Raymond & Rousset, 1995), usando el método de quemado de la cadena de Markov MCMC (10^3 iteraciones, 1000 muestreos aleatorios y 10^3 iteraciones por muestreo).

6.1.1 Riqueza alélica

La riqueza alélica (A) o número observado de alelos (N_a), es el número medio de alelos por locus y cuantifica el número total de alelos diferentes detectado en cada uno de los locus de una población (Sytsma & Schaal, 1985; González-González, 2008). La riqueza alélica basa su utilidad en la medición de las posibles reducciones de la variación genética y en la detección del efecto producido por la deriva genética (Sosa *et al.*, 2002; González-González, 2008) y se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$A = \sum (n_i / m)$$

donde: n_i es el número de alelos observados en el locus i , m es el número total de loci.

6.1.2 Número efectivo de alelos (N_E)

Es el número n de alelos con las mismas frecuencias que pueden ser requeridos para producir la misma homocigosidad (Hartl & Clark, 1997). El cual se obtiene mediante la fórmula de Nei (1987):

$$N_E = 1 / \sum p_i^2$$

6.1.3 Heterocigosidad (H)

La heterocigosidad puede ser descrita como la heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_E). La H_o se define como la frecuencia relativa de individuos heterocigotos observados en la muestra para cualquiera de los locus y se calcula por cómputo directo; mientras que la heterocigosidad esperada de una población (H_E) es la media de los valores obtenidos para cada locus en dicha población (González-González, 2008). Nei (1987) asegura que el promedio de heterocigosidad o diversidad genética es el método de medición más adecuado de la variación genética, pues no depende la arbitrariedad de la definición de polimorfismo y puede ser definida sin ambigüedad en términos de frecuencias

alélicas. Además, la comparación entre la heterocigosidad observada (H_O) y la esperada (H_E) permite evaluar la estructura genética de las poblaciones (Nei, 1987; González-González, 2008)

El cálculo de la H_E en la población puede realizarse a través de:

$$H_E = 1 - \sum p_i^2$$

siendo $\sum p_i^2$ = (homocigosidad) o también su equivalente:

$$H_E = \sum p_i (1 - p_i)$$

siendo este término también conocido como diversidad génica de Nei [1977].

Estos parámetros fueron calculados con el programa GENETIX v 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004), mediante una prueba de 10 000 permutaciones.

6.2 Estadísticos F

Para los estudios de la estructura de la población los análisis estadísticos F han mostrado ser una herramienta útil para dilucidar los patrones y extraer la variación genética residente entre y dentro de las poblaciones. Según estos estadísticos, la variabilidad de una población global puede ser subdivida entre sus subpoblaciones (Aranguren-Méndez *et al.*, 2002).

Wright (1965) definió tres estadísticos F o coeficientes de endogamia que se utilizan para estimar la cantidad variación genética que hay en poblaciones subdivididas debido al efecto de la endogamia (Hartl & Clark, 1997). Provee una descripción jerárquica de las diferencias entre subpoblaciones (Weir, 1996), en tres niveles: total poblacional (T), en poblaciones subdivididas (S) y a nivel individual (I) los cuales son: F_{IT} , F_{ST} y F_{IS} . Estos coeficientes se calculan a partir de la proporción de heterocigotos.

6.2.1 Índice de fijación individual

Mide la proporción de la desviación del equilibrio de HW en un individuo de una subpoblación, debido al apareamiento no al azar. Cuando el valor es positivo indica una deficiencia de heterocigotos y el valor negativo indica un exceso de heterocigotos (Hedrick, 2000).

$$F_{IS} = H_S - H_0 / H_S$$

6.2.2 Índice de fijación subpoblacional

Mide el grado de divergencia o diferenciación genética entre subpoblaciones, debido a la reducción de heterocigotos por la subdivisión de la población. Wright (1978) sugirió varios rangos de interpretación de la F_{ST} los cuales son los siguientes: 0 a 0.05 puede ser considerado como poca diferenciación genética, 0.05 a 0.15 indica moderada diferenciación genética, 0.15 a 0.25 indica gran diferenciación genética. Los valores cercanos o arriba de 0.25 indican una alta diferenciación genética.

$$F_{ST} = H_T - H_S / H_T$$

6.3 Flujo genético

Se utilizó el programa MIGRATE v 3.2.7 (Beerli & Felsenstein, 2001) para obtener una estimación del intercambio genético entre poblaciones o el valor del flujo de genes (Nm), el tamaño efectivo de la población (N_E) y la tasa de migración (M). Inferencias de $M=m/\mu$ entre poblaciones de *L. speciosa*. Los análisis fueron realizados comenzando con 20^6 de cadenas de Markov MCMC, con un quemado de las cadenas cada 50^3 iteraciones y guardando cada 1000 iteraciones de las cadenas de Markov MCMC y fueron replicadas varias veces para verificar la eficiencia de cada corrida.

El flujo génico se refiere al movimiento e incorporación de alelos entre las poblaciones lo que también podríamos llamar como migración; y es de suma

importancia para el proceso evolutivo de las especies, su principal efecto es el de reducir el grado de diferenciación de entre las poblaciones de una especie con el fin de mantener la variabilidad de estas a lo largo de toda su distribución (Rockwell & Barrowclough, 1987), ya que puede homogeneizar a diversas poblaciones; pero también puede retardar la fijación de adaptaciones locales por la entrada de genes de poblaciones externas (Rockwell & Barrowclough, 1987).

Rockwell & Barrowclough (1987) y Mills (1996) sugieren que un migrante es suficiente para minimizar los efectos de la deriva (pérdida de polimorfismo genético y heterocigosidad) manteniendo al mismo tiempo las diferencias alélicas entre las subpoblaciones; pero mientras mayor sea el flujo génico menor será el grado de diferenciación

El flujo génico se puede calcular a partir del índice de diferenciación genética,

$$F_{ST} \approx 1 / (4Nm+1)$$

Con este valor, se puede hacer una aproximación indirecta (Slatkin, 1994) mediante la aproximación propuesta por Sewall Wright

$$Nm \approx ([1/F_{st}-1]/4)$$

N es el tamaño de la población y m es la tasa de migrantes de dicha población.

Los valores de $Nm > 1$ indican que las poblaciones se comportan como una población panmíctica y el flujo genético restringe el efecto de la deriva (Hartl & Clark, 1989; Slatkin, 1994), mientras que los valores menores a 1 indican que las subpoblaciones sufren de diferenciación genética, lo cual puede ser debido a la deriva genética actuando independientemente en cada subpoblación (Stalkin, 1994).

6.4 Diferenciación genética y análisis de varianza molecular (AMOVA)

La diferenciación genética pareada de poblaciones F_{ST} y R_{ST} se estimó usando el modelo de alelos infinitos (IAM) y el modelos de pasos (SMM) con el programa Arlequín 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005) usando 10^4 permutaciones. Con este mismo programa se realizo el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para observar cómo se distribuye la varianza genética dentro y entre poblaciones y entre grupos utilizando los dos grupos genéticos obtenidos con el programa STRUCTURE (Evanno *et al.*, 2005).

El AMOVA es un análisis estadístico no paramétrico propuesto por Excoffier *et al.* (1992), para estudiar la variación molecular dentro de una especie. Se basa en el análisis de la varianza de las frecuencia de los genes y el número de mutaciones entre los haplotipos moleculares (previamente evaluados); para definir los posibles niveles de estructuración genética como son, entre los grupos, dentro de los grupos (entre las poblaciones) y dentro de las poblaciones; se someten a una prueba no paramétrica utilizando los procedimientos de permutación (Excoffier *et al.*, 1992). Esto se realiza a partir de una matriz de distancias euclidianas al cuadrado, las cuales proveen información sobre las diferencias en el contenido alélico entre los genotipos.

6.5 Cambios en el tamaño de las poblaciones y pruebas de selección

El desarrollo y mantenimiento de la estructura genética dentro de poblaciones de plantas se ve influida por las fuerzas evolutivas tales como el flujo de genes, deriva genética y la selección.

6.5.1 BOTTLENECK

Se utilizó el programa BOTTLENECK v 1.2 (Piry *et al.*, 1999) para detectar cuellos de botella recientes en las poblaciones, lo cual puede definirse como una población donde los alelos raros son los primeros en desaparecer, por lo tanto. El número medio de alelos por locus disminuye. En contraste, la heterocigosidad se ve menos afectada, produciendo un exceso transitorio de heterocigosidad en relación con lo esperado dado el número de alelos resultantes (Cornuet & Luikart, 1996; Luikart & Cornuet, 1998).

Se utilizaron un total de 10 000 interacciones realizadas con intervalos de confianza del 90% y 10%. También se determinó utilizar la prueba de Wilcoxon para determinar si las poblaciones presentaban un exceso significativo de diversidad genética bajo los modelos de mutación por pasos (SMM), modelo de alelos infinitos (IAM) y el modelo de mutación en dos fases [TPM] (Di Rienzo *et al.*, 1994).

6.5.2 LOSITAN

Se utilizó el programa de LOSITAN (Antao *et al.*, 2008) para conocer los patrones observados para cada uno de los loci analizados en las poblaciones de *L. speciosa*. Por ejemplo, valores atípicos que presenten alguno de los loci, son analizados evaluando la relación entre la diferenciación genética (F_{ST}) y la heterocigosidad esperada (H_E). De acuerdo a la teoría, una historia demográfica compartida debe dar lugar a valores similares de F_{ST}/H_E para todos los loci. Sin embargo, aquellos que se desvían del equilibrio Hardy-Weinberg (HW), pueden ser candidatos para selección balanceadora o positiva (Lewontin & Krakauer, 1975 (73); Beaumont, 2005). Se realizaron 95,000 simulaciones a partir de F_{ST} neutrales usando todas las poblaciones de *L. speciosa*, con un intervalo de confianza del 95% y usando el modelo de mutación por pasos SMM.

6.5.3 FDIST2

Se utilizó un método frecuentista para probar selección natural implementado en el programa FDIST2 (Beaumont & Nichols, 1996; Beaumont & Balding, 2004). Este método provee evidencias de posible selección buscando loci que se comporten con desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg, como valores altos o bajos de diferenciación genética o heterocigosidad (Beaumont & Balding, 2004). Las simulaciones se llevaron a cabo usando el modelo de mutación por pasos SMM con un intervalo de confianza de 95 % y utilizando 100 000 simulaciones.

6.6 Análisis de agrupamiento Bayesiano

6.6.1 STRUCTURE

El análisis de agrupamiento Bayesiano se realizó utilizando el programa STRUCTURE v 2,3 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003; Hubisz *et al.*, 2009), para determinar la posible estructura genética de las poblaciones. El análisis consiste en determinar el número efectivo de grupos genéticos asignando los individuos existentes a un grupo predeterminado (K) de manera probabilística (Evanno *et al.*, 2005). Las simulaciones se realizaron cambiando el valor de K de 1 a 10 para determinar el número óptimo de grupos; el programa se corre 10 veces por cada valor de K , con el fin de determinar el valor máximo de la probabilidad posterior Bayesiana [$\ln P(D)$]. Cada corrida se realizó utilizando 10^4 periodos de quemado de las cadenas de Markov y 10^6 de simulaciones de las cadenas de Markov (MCMC) después del quemado. Seleccionamos el modelo que permite el intercambio entre las poblaciones y utilizando las frecuencias correlacionadas. Incluso, se determinó el valor más probable de grupos genéticos (K) usando el máximo valor de ΔK de acuerdo con Evanno *et al.* (2005) e implementado en el programa STRUCTURE HARVESTER v 0.6.8. (Earl *et al.*, 2011).

6.6.2 GENELAND

Adicionalmente, se utilizó el programa GENELAND 3.2.4 (Guillot *et al.*, 2005) implementando el programa R- para Windows [R development team 2009] para analizar el número más probable de grupos genéticos (K). Esta metodología combina la asignación Bayesiana de los individuos a genotipos definidos con la información geográfica (coordenadas); los grupos son deducidos realizando 50^4 periodos de quemado de las cadenas de Markov y 60^6 interacciones de las cadenas de Markov (MCMC) después del quemado, variando el número K del 1 al 10. También se utilizaron el modelo de mezcla con las frecuencias alélicas correlacionadas tal cual se estimaron en Structure.

7. RESULTADOS

7.1 Variabilidad Genética

Los resultados de diversidad genética Tabla 4 muestran para las 11 poblaciones de *Laelia speciosa* en la cuenca de Cuitzeo, valores de diversidad moderado–altos; para la población de Zac ($H_O = 0.7107$ y $N_E = 6.87$), que incluso tiene el valor más bajo de endogamia ($F_{IS} = 0.00948$) después de la población Inm ($F_{IS} = 0.0064$) quien también presenta valores altos de diversidad ($H_O = 0.7188$ y $N_E = 7.25$), ambas pertenecientes al grupo genético uno (obtenido de STRUCTURE) y localizadas al norte y centro de la Cuenca, respectivamente. En este mismo contexto, las poblaciones Rob y Fel (Centro de la Cuenca) del grupo dos presentan valores más bajos de diversidad que las anteriormente descritas ($H_O = 0.5891$, $N_E = 7.37$; $H_O = 0.6646$, $N_E = 7.62$, respectivamente) presentando Rob un índice de endogamia alto con un valor de $F_{IS} = 0.21553$ entre las poblaciones del centro. Las poblaciones localizadas al sur conforman en su mayoría el grupo genético uno (Cgm, Lag, Olm, P-2 y Coa), las tres últimas poblaciones presentan los valores más altos en endogamia ($F_{IS} = 0.27995$; 0.2083 y 0.2340 , respectivamente) y valores de diversidad moderados para Olm, P-2, Coa y Lag ($H_O = 0.5938$ y $N_E = 9.62$; $H_O = 0.628$ y $N_E = 8.5$; $H_O = 0.669$; $N_E = 6.25$; $H_O = 0.6033$ y $N_E = 7.75$, respectivamente) y valores altos para Cgm ($H_O = 0.715$; $N_E = 7.15$). Las poblaciones de Agu ($H_O = 0.5889$; $N_E = 7.0$; $F_{IS} = 0.19116$) y Pot ($H_O = 0.6821$; $N_E = 6.875$; $F_{IS} = 0.1307$) pertenecientes al grupo dos y localizadas al sur de la Cuenca presentaron una diversidad e índice de endogamia moderada. En cuanto a las correlaciones de los parámetros de la diversidad genética y las variables ambientales (altitud, latitud y longitud), tan sólo se encontró una sola correlación negativa significativa (Figura 10) entre F_{IS} y la latitud ($r = 0.4122$, $P = 0.0332$) de las poblaciones, lo cual sugiere que a medida que se incrementa la latitud o las poblaciones se encuentren más hacia el norte van a tener una tendencia menor a la endogamia.

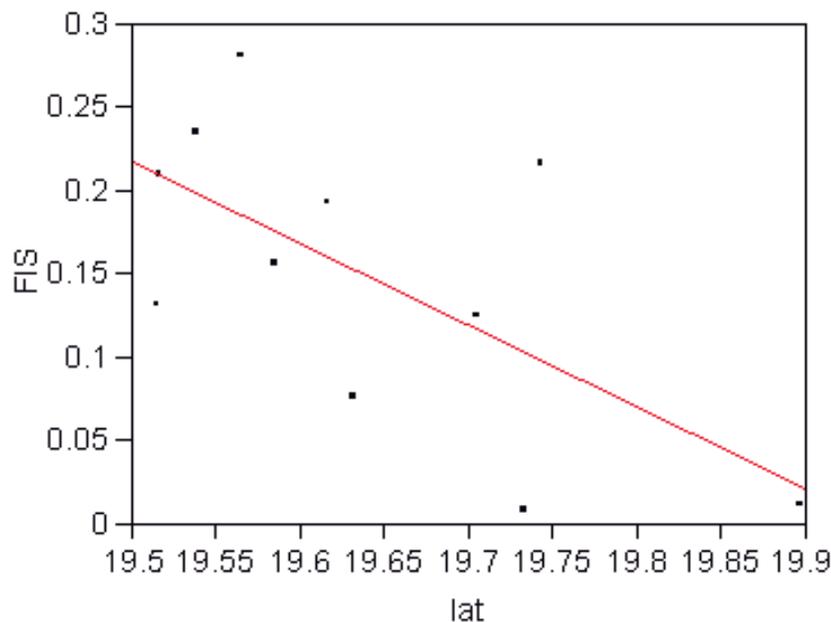


Figura 10. Correlación entre el índice de endogamia F_{IS} y latitud para las poblaciones de *L. speciosa*

Conforme la latitud aumenta el índice de endogamia (F_{IS}) decrece por lo cual se considera una correlación negativa.

7.1.1 Prueba de detección de cuellos de botella

En cuanto a los resultados sobre el equilibrio Hardy-Weinberg (Tabla 4) se observa en todas las poblaciones un déficit de heterocigos en la mayoría de los loci a excepción del locus Lspe1 el cual presenta exceso de heterocigos en ocho de las 11 poblaciones estudiadas y también el locus Lspe 12 que presenta exceso en las poblaciones Fel y Rob que se encuentran situadas al norte de la Cuenca y Pot y P-2 situadas hacia el sur. Por otro lado, los resultados de las pruebas de detección de cuellos de botella recientes (exceso de heterocigosidad) usando el modelo de alelos infinitos (IAM), modelo de dos fases (TPM) y el modelos de mutación por pasos (SMM) no muestran evidencias significativas de exceso de heterocigosidad para las poblaciones de *Laelia speciosa*, lo que sugiere que las poblaciones no han experimentado un cuello de botella recientemente.

Tabla 4. Diversidad Genética, Equilibrio Hardy-Weinberg y detección de cuellos de botella para las poblaciones de *L. speciosa*

Pob	Grupo	N	N_E	H_O	H_E	F_{IS}	HW (HD)	HW (HE)	IAM	TPM	SMM
Zac	Uno	16	6.875	0.7107 (0.2313)	0.6937 (0.1012)	0.00948	(7, 10) 0.0038 **	(1,8) 0.0078**	n.s.	0.03 (HD)	0.02 (HD)
Inm	Uno	15	7.250	0.7158 (0.2557)	0.6948 (0.1228)	0.00649	(4,6,8) 0.0038**	(1,14) 0.0065**	n.s.	n.s.	0.02 HD
Rob	Dos	16	7.375	0.5891 (0.199)	0.7215 (0.1342)	0.21553	(4,6,7,10,14) 0.000**	(1,12) 0.0132**	0.03 HE	n.s.	n.s.
Fel	Dos	18	7.625	0.6646 (0.2962)	0.734 (0.0934)	0.12409	(4,6,7) 0.000**	(8,12) 0.0010**	n.s.	n.s.	0.03 HD
Agu	Dos	18	7.000	0.5889 (0.2962)	0.7027 (0.0747)	0.19116	(4,6,10,14) 0.000**	(1) 0.0001**	n.s.	n.s.	0.01 HD; 0-03 HD/HE
Lag	Uno	20	7.750	0.6033 (0.3048)	0.693 (0.1249)	0.15484	(4,6,10,12) 0.000**	(1) 0.000**	n.s.	0.01 HD; 0.02 HD /HE	0.01 HD
Coa	Uno	16	6.250	0.535 (0.3641)	0.669 (0.1507)	0.23408	(4,6,7,10,14) 0.000**	(1,8) 0.000**	n.s.	0.02 HD	0.01 HD; 0.03 HD /HE
P-2	Uno	16	8.500	0.6287 (0.2066)	0.7616 (0.1166)	0.20834	(4,6,7,8,10,14) 0.000**	(12) 0.469**	n.s.	n.s.	n.s.
Pot	Dos	12	6.875	0.6821 (0.2486)	0.7441 (0.0818)	0.13075	(4,6,7,10,14) 0.000**	(1,12) 0.0046**	n.s.	n.s.	n.s.
Olm	Uno	15	9.625	0.5938 (0.238)	0.7876 (0.0805)	0.27995	(4,6,7,10,14) 0.000**	n.s.	n.s.	0.01 HD	0.01 HD; 0.03 HD/HE
Cgim	Uno	14	7.625	0.715 (0.231)	0.7421 (0.0736)	0.07439	(4,6,7,10) 0.000**	(1,14) 0.0077**	n.s.	n.s.	0.01 HD; 0.02 HD/HE.

Grupo = Grupo genético al que pertenecen las poblaciones de acuerdo con los resultados de STRUCTURE; N= número de individuos analizados por población; Valores de diversidad genética: N_E = Número efectivo de alelos; H_O = Heterocigocidad esperada; H_E = Heterocigocidad esperada; F_{IS} = índice de Endogamia; HW(HD)= Equilibrio de Hardy-Weinberg déficit de heterocigos ; HW(HE) = Equilibrio Hardy-Weinberg con exceso de heterocigos. Detección de Cuellos de Botella: IAM = Modelo de alelos infinitos; TPM = Modelos de dos fases; SMM = modelo de mutación por pasos

7.1.2 AMOVA

El análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado con el programa ARLEQUIN muestra una mayor variación dentro de las poblaciones de *Laelia speciosa* con un valor de 89.487 %, mientras que la variación entre los grupos y la variación de las poblaciones dentro de los grupos es de 5.25 % para cada uno como se puede ver en la Tabla 5 y en la Figura 11.

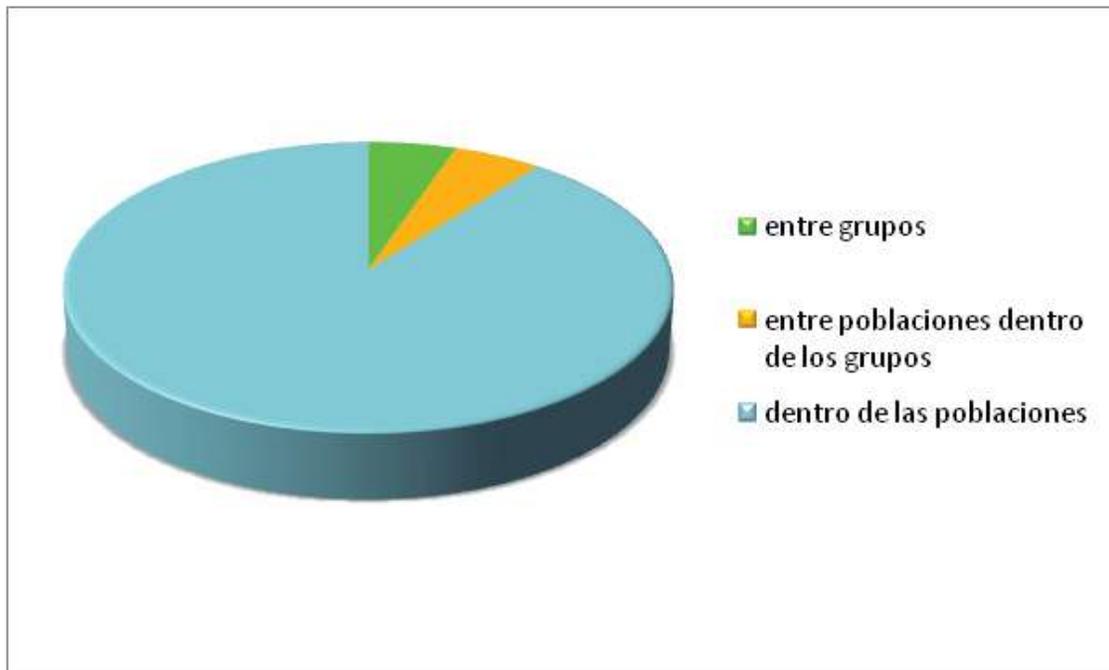


Figura 11. Grafica de AMOVA para las poblaciones de *L. speciosa*

Tabla 5. Distribución de la variación genética (AMOVA) en las poblaciones de *L. speciosa*

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Componentes de Variación	Porcentaje de variación
Entre grupos	36.020	0.17488	5.25453
Entre poblaciones dentro de los grupos	74.279	0.17499	5.25792
Dentro de Poblaciones	978.571	297.829	89.48755
Total	1088.86	332.817	

7.2 Estructura Genética

7.2.1 Pruebas de selección

Los análisis para detectar señales de selección natural probadas con el programa LOSITAN y FDIST2 (

Tabla 6), se identificaron cuatro loci con valores atípicos los cuales fueron detectados con una alta o baja variabilidad o diferenciación con respecto a lo esperado en neutralidad. Para el grupo 1, los loci Lspe 4 ($H_E = 0.90$, $F_{ST} = 0.04$ y $P = 0.01$, respectivamente) y Lspe 7 ($H_E = 0.79$, $F_{ST} = 0.02$ y $P = 0.001$) son candidatos para selección balanceadora, mientras que el locus Lspe 10 ($H_E = 0.82$, $F_{ST} = 0.18$ y $P = 0.01$) es candidato a ser sometidos a selección positiva en las poblaciones del grupo 2 y para el locus Lspe 12 ($H_E = 0.69$, $F_{ST} = 0.001$ y $P = 0.002$) es candidato en la selección balanceadora en este mismo grupo.

Tabla 6. Pruebas de selección natural para las poblaciones de *L. speciosa*

Grupo1	LOSITAN test			FDIST2 test			Selección
	H_E	F_{ST}	P	H_E	F_{ST}	P	
Lspe 1	0.6771	0.0633	0.2332	0.6733	0.0649	0.4641	-----
Lspe 4	0.9084	0.0402	0.0145	0.9078	0.0389	0.0704	Balanceadora
Lspe 6	0.8190	0.0595	0.1540	0.8153	0.0621	0.4148	-----
Lspe 7	0.7972	0.0279	0.0001	0.7962	0.0257	0.0275	Balanceadora
Lspe 8	0.8696	0.0753	0.4076	0.8676	0.0733	0.3836	-----
Lspe 10	0.8514	0.1285	0.9531	0.8556	0.1298	0.0062	-----
Lspe 12	0.7905	0.1071	0.7834	0.7884	0.1074	0.0663	-----
Lspe 14	0.6982	0.0495	0.0878	0.6921	0.0469	0.2209	-----
Grupo 2							
Lspe 1	0.7410	0.0497	0.5100	0.7402	0.0500	0.4169	-----
Lspe 4	0.8560	0.0422	0.3457	0.8555	0.0414	0.2430	-----
Lspe 6	0.9149	0.0478	0.5592	0.9167	0.0527	0.4764	-----
Lspe 7	0.7586	0.0205	0.0619	0.7562	0.0204	0.0560	-----
Lspe 8	0.8589	0.0412	0.3147	0.8596	0.0418	0.2487	-----
Lspe 10	0.8228	0.1853	1.0000	0.8276	0.1890	0.0000001	Positiva
Lspe 12	0.6930	0.0011	0.0023	0.6921	0.0010	0.0012	Balanceadora
Lspe 14	0.6572	0.0402	0.3683	0.6572	0.0426	0.3239	-----

Pruebas estimadas con los programas LOSITAN y FDIST2 para los grupos genéticos obtenidos por

medio de STRUCTURE para las poblaciones de *L. speciosa*.

7.2.2 Flujo y Diferenciación Genética

Los niveles de intercambio de genes para las poblaciones de *L. speciosa*, estimados con el programa MIGRATE fueron de moderado a altos en general; el mayor valor de flujo de genes (Tabla 7) se encontró del fragmento 1 hacia el fragmento 3 ($Nm = 2.188$), los valores moderados se encuentran del fragmento 1 a los fragmentos 2 y 4 ($Nm = 1.349$ y 1.354 , respectivamente), del fragmento 2 hacia los fragmentos 3 y 4 ($Nm = 1.522$ y 1.122 , respectivamente), del fragmento 3 hacia los demás fragmentos (1, 2 y 4) con valores de $Nm = 1.176$, 1.947 y 1.969 , respectivamente y del fragmento 4 hacia el fragmento 1 ($Nm = 1.307$) y 3 ($Nm = 1.195$). Por último el menor número de migrantes se encontró entre el fragmento cuatro hacia el fragmento dos con un valor ($Nm = 0,712$). En este sentido, Slatkin (1993) sugiere que valores de $Nm < 1$ o bajo-moderado flujo génico entre las poblaciones es suficiente para generar diferenciación entre ellas, donde la deriva génica actúe independientemente en cada población, y el flujo génico alto o $Nm > 1$ provoca que las poblaciones restrinjan el efecto de la deriva comportándose como una población panmíctica en la cual todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse y este es principalmente al azar.

Tabla 7. Flujo genético entre las poblaciones de *L. speciosa*

Fragmento	1	2	3	4
1	-----	0.999	1.176	1.307
2	1.349	-----	1.947	0.712
3	2.188	1.522	-----	1.195
4	1.354	1.122	1.969	-----

El análisis de flujo se realizó entre las poblaciones de los fragmentos de vegetación de la Cuenca de Cuitzeo. La primera columna corresponde al fragmento que recibe los migrantes.

En cuanto a la diferenciación genética (Tabla 8) pareada entre las poblaciones de *L. speciosa*, podemos observar que la mayor diferenciación genética entre las poblaciones se encuentra entre Coa/Fel ($R_{ST} = 0.14137$), Fel/Olm ($R_{ST} = 0.14365$) y Olm/Lag ($R_{ST} = 0.14957$) basadas en R_{ST} y los valores basados en F_{ST} que se obtuvieron van de 0.021 a 0.143; donde los valores más altos de F_{ST} se presentaron entre la población de P-2/Rob con un valor de 0.1313 y P-2/Fel con $F_{ST} = 0.1450$ siendo P-2 parte del grupo genético uno y Rob y Fel del grupo dos; lo que evidencia una mayor diferenciación entre grupos genéticos, con excepción de las poblaciones Olm/Lag ($F_{ST} = 0.1332$) ambas pertenecientes al grupo uno. En 1978, Wright propuso para una mejor interpretación de los valores de F_{ST} una escala donde los valores entre 0,0 a 0.05 indican poca diferenciación genética, mientras que los valores que se encuentran entre 0.05 a 0.15 se consideran como moderados, así como valores que van de 0.15 a 0.25 indican una gran diferenciación y por ultimo aquellos valores que sobrepasen 0.25 se consideran que tienen una diferenciación muy grande.

Tabla 8. Diferenciación Genética pareada para las poblaciones de *Laelia speciosa*

Población	Zac	Inm	Rob	Fel	Agu	Lag	Coa	P-2	Pot	Olm	Cgm
Zac	-----	0.02770	0.08876	0.12279	0.08626	0.06156	0.03603	0.12020	0.11449	0.11241	0.11814
Inm	0	-----	0.06690	0.12101	0.06947	0.07144	0.02197	0.11423	0.09143	0.10773	0.09302
Rob	0.06892	0.04080	-----	0.02084	0.04569	0.07853	0.04475	0.13136	0.06042	0.07287	0.08982
Fel	0.01428	0.08269	0.07910	-----	0.02691	0.08649	0.09725	0.14350	0.08139	0.12593	0.10433
Agu	0	0	0.03019	0.00177	-----	0.04526	0.04914	0.08419	0.05345	0.11168	0.06776
Lag	0.01342	0	0.10716	0.01402	0.01757	-----	0.05288	0.11103	0.09733	0.13327	0.09939
Coa	0.01969	0.00678	0.05011	0.14137	0.03376	0.05001	-----	0.08938	0.08108	0.08003	0.07769
P-2	0.05379	0.04411	0	0.09742	0.03614	0.08050	0.01507	-----	0.02778	0.03858	0.01557
Pot	0.04894	0.05385	0	0.08145	0.02499	0.06721	0.02890	0	-----	0.03285	0
Olm	0.11835	0.11333	0.00755	0.14365	0.08607	0.14957	0.04903	0.00918	0	-----	0.05611
Cgm	0.00487	0.01677	0	0.04684	0.00589	0.03433	0.02870	0.01239	0	0.00169	-----

Diferenciación genética pareada obtenida por medio del programa ARLEQUIN. Los valores que están superiores representan la diferenciación por medio de alelos infinitos F_{ST} , mientras que los valores en la parte baja representan la diferenciación por medio del modelo de pasos R_{ST} .

7.2.3 Asignación Bayesiana y Barreras Genéticas

La proporción de ancestría genética para cada población de *L. speciosa* se encuentra representada geográficamente por medio del programa de asignación Bayesiana STRUCTURE (Figura 13) y por el programa GENELAND (Figura 14). En ambos casos, el número efectivo de grupos genéticos corresponde a dos grupos, el cual fue obtenido siguiendo las reglas de Evanno *et al.* (2005) (Figura 12). La distribución del genotipo **verde** en STRUCTURE (Grupo 1 en **GENELAND**) se encuentra ampliamente distribuido en las poblaciones del norte (población Zac) y centro de la Cuenca del Cuitzeo (Inm, Rob y Fel) e incluso se le encuentra distribuido en las poblaciones del sur de la Cuenca de Cuitzeo, como son las poblaciones de Cgm, Agu, P-2 y Pot. Por otro lado, la distribución del genotipo **rojo** en STRUCTURE (Grupo 2 en **GENELAND**), se le encuentra moderadamente distribuido en todas las poblaciones de *L. speciosa* en la Cuenca del Cuitzeo. Sin embargo, este genotipo rojo se encuentra mejor representado en las poblaciones del sur de la Cuenca como son: Olm, Lag y Coa; es muy importante poder utilizar dos herramientas de asignación genética bayesiana como GENELAND y STRUCTURE, para poder obtener el número efectivo de grupos y comparar los grupos entre ellos, de esta manera poder hacer las inferencias de una forma robusta.

En cuanto a las discontinuidades genéticas encontradas por el programa BARRIERS, se muestran en la Figura 13 junto con los gráficos circulares que muestran la ancestría genética para cada población en el mapa de la Cuenca de Cuitzeo. Podemos observar tres barreras que presentan valores de Bootstrap de entre el 50% al 100% de soporte para cada barrera encontrada. La primera barrera es una barrera compuesta que se encuentra localizada entre las poblaciones de Lag y Agu que están separadas de la población Olm y Cgm. Así como también la barrera 1 separa las poblaciones de Pot, P-2 y Coa entre si. La

segunda barrera separa la población de Cgm del resto de las poblaciones incluyendo las pertenecientes al fragmento 3 (Lag, Agu, Olm); la barrera tres separa la población Rob y la poblaciones Inm y Fel, las cuales se encuentran en el norte de la Cuenca todas pertenecientes al grupo uno de GENELAND.

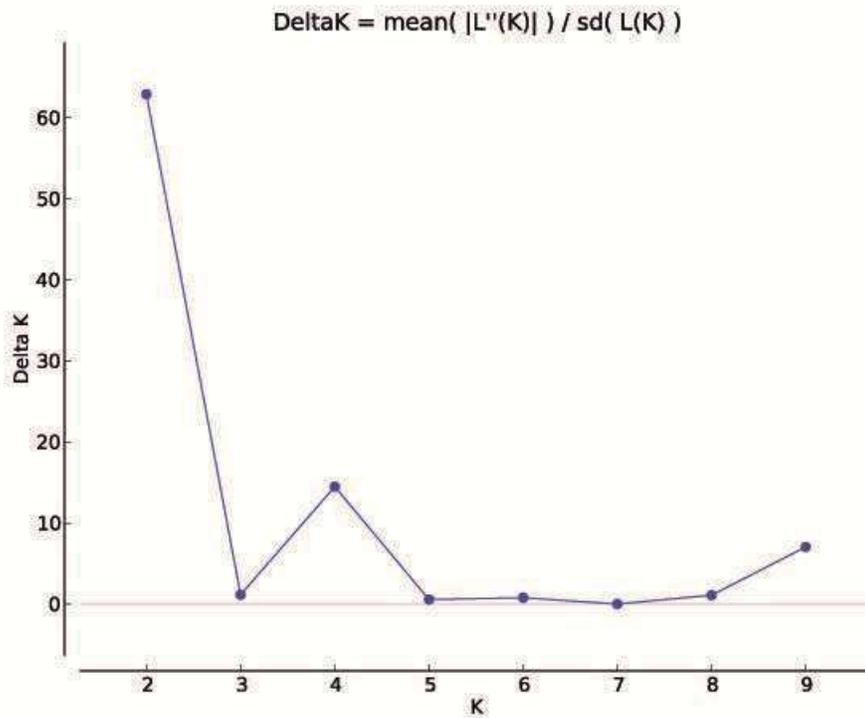


Figura 12. Valor más probable para K

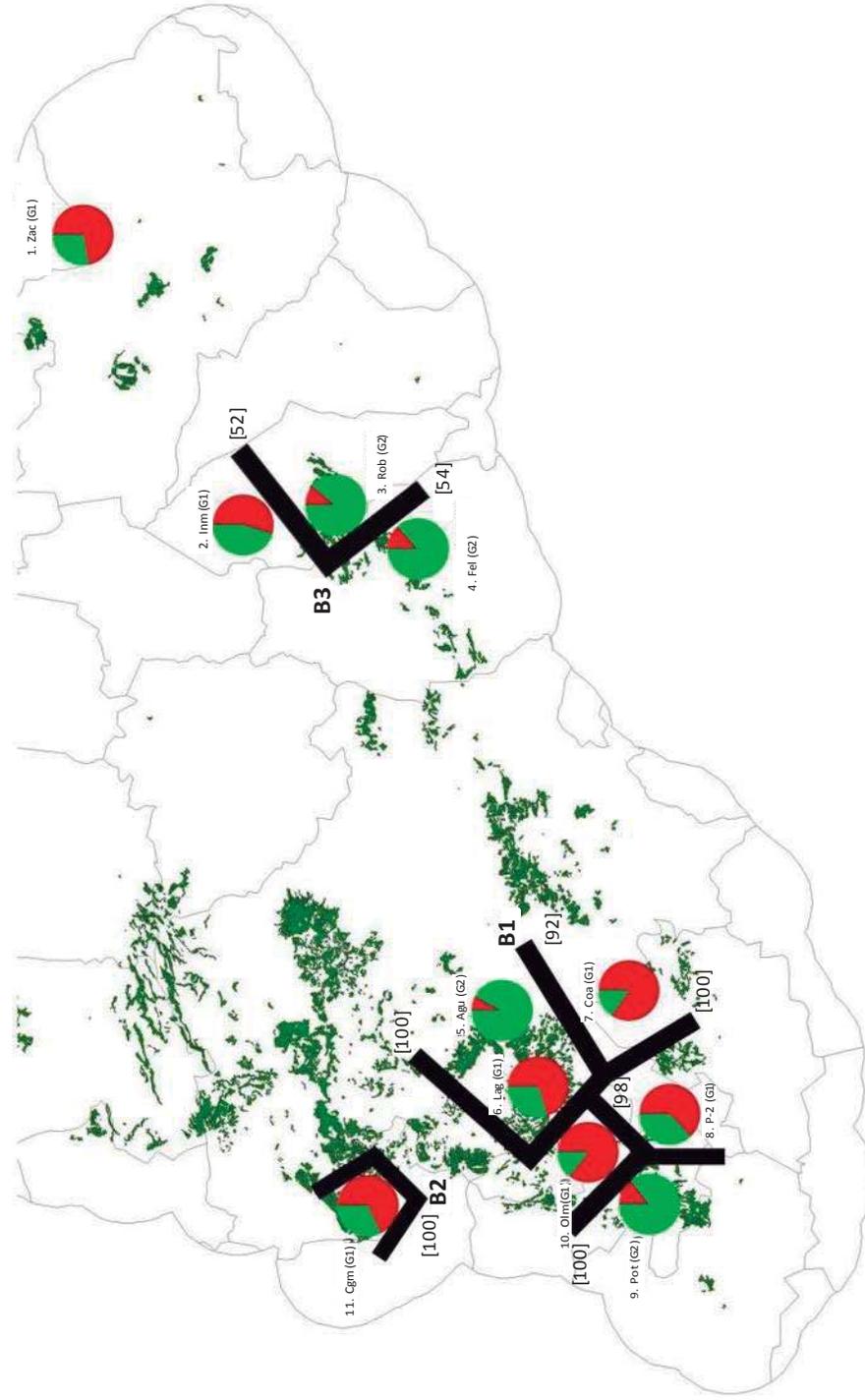


Figura 13. Proporción de ancestría y ubicación geográfica de las poblaciones en la Cuenca de Cuitzeo. Nota: las líneas negras corresponden a las barreras genéticas obtenidas

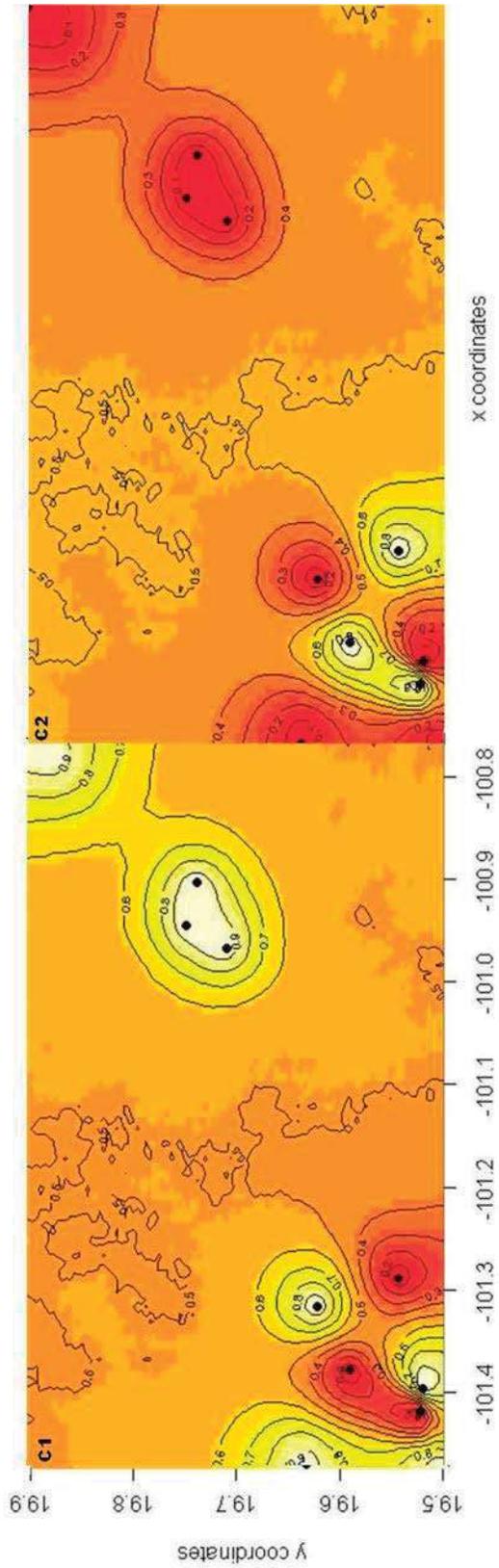


Figura 14. Estimación de grupos genéticos y correlación espacial de las poblaciones de *Laelia speciosa* en la Cuenca de Cuitzeo por medio del Programa GENELAND

8. DISCUSIÓN

8.1 Variación Genética

La fragmentación de los hábitats y la extracción selectiva de individuos de una población natural modifican la estructura genética de las plantas debido a que los cambios que se producen al reducirse el tamaño de las poblaciones, provocan el aislamiento y la subsecuente reducción de la diversidad genética (Jump & Peñuelas, 2006). En este estudio, se analizó la estructura genética de las poblaciones de una especie de orquídea que ha sido grandemente amenazada por la destrucción y fragmentación de su hábitat, así como por la gran extracción indiscriminada a la que se ha visto sujeta. Sin embargo, y muy sorpresivamente el status genético obtenido por microsatélites nucleares para *Laelia speciosa* en la Cuenca de Cuitzeo en Michoacán, nos muestra valores de diversidad genética (N_E , H_O) altos en varias de las poblaciones analizadas. Cabe resaltar que dos de las poblaciones presentaron valores de heterocigosidad mayores a los que se esperaban. En las poblaciones del sur se observaron valores moderados en su diversidad genética (H_O) que van de 0.535 a 0.6821, y el N_E que presentaron varió de 6.25 a 8.5; los valores más bajos de diversidad se encontraron en las poblaciones de Olm, Lag y Agu ($H_O = 0.5938$; 0.6033 y 0.5889, respectivamente).

Estudios previos sobre *Laelia speciosa* utilizando isoenzimas (Ávila-Díaz & Oyama, 2007), sugieren también que esta especie tiene una diversidad genética alta ($A= 3.34$, $H_E=0.382$), y cuyos valores encontrados son comparables con otros estudios realizados en orquídeas epifitas y rupícolas que muestran una alta diversidad genética (Ackerman & Ward, 1999; Bush *et al.*, 1999; Borba *et al.*, 2001; Mürren, 2003; Trapnell & Hamrick, 2004; Trapnell *et al.*, 2004). A pesar de que nuestros análisis no son comparables debido al uso de distintos marcadores moleculares como son las isoenzimas y microsatélites, este último utilizado en el presente estudio, de manera general puede observarse una diversidad considerada como alta en esta especie, la cual puede sea debida en parte a su

historia de vida, es decir su tipo de polinización, a su sistema de autoincompatibilidad, a su dispersión a larga distancia de sus miles de semillas la cual es mediada por viento y la relación estrecha que tienen con hongos específicos que le permiten tener un mecanismo eficiente de uso de recursos que le brindaran un mejor desempeño como plántulas hasta su desarrollo en adultos (Ávila-Díaz datos no publicados).

Además, otros estudios con orquídeas han resaltado los altos niveles de diversidad genética como es el caso de *Cypripedium calceolus* para la cual Case (1994) reportó una heterocigosidad que se encuentra por encima del promedio reportado para plantas que poseen características similares a las de *C. calceolus*; la amplia diversidad genética en este caso es explicada principalmente por la polinización cruzada a distancias lejanas. Particularmente, esta especie posee características similares a las de *L. speciosa* como que son plantas herbáceas perennes de larga vida y semillas dispersadas por el viento (Hamrick & Godt, 1989). Otros estudios han mostrado estos mismos patrones donde las orquídeas con polinización cruzada muestran una alta diversidad genética, lo cual concuerda con el patrón esperado para las plantas polinizadas por animales y dispersión de semillas por el viento tal como ocurre en las especies de orquídeas (Scacchi *et al.*, 1990), *Orchis morio* (Rossi *et al.*, 1992), *Orchis papilionacea* (Arduino *et al.*, 1995), *Cephalanthera longifolia* (Scacchi *et al.*, 1991), *Spiranthes diluvialis* (Arft & Ranker, 1998), *Spiranthes sinensis* (Sun, 1996) y *G. odoratissima* (Gustafsson *et al.*, 2002). Estos resultados concuerdan con lo reportado previamente por Avila-Diaz & Oyama (2007) para la especie bajo estudio quien explica que sus resultados pueden deberse principalmente a que esta especie de orquídea presenta polinización cruzada, lo cual pudiera ayudar a mantener una variación genética alta, que aun no se vea afectada por la extracción de plantas en las localidades.

Otra posible explicación al respecto podría ser aquella que tomando en cuenta que los individuos del estudio provienen de una generación adulta, estos resultados obtenidos pueden ser un indicador de que la extracción de la especie y

la fragmentación de su hábitat aun no han tenido un efecto en las frecuencias de heterocigosidad y en los alelos de las poblaciones que provoquen la deriva genética de las poblaciones y por lo tanto, no se ha presentado una diferenciación entre ellas. Incluso, González-Astorga & Castillo-Campos (2004) sugieren que el papel de los polinizadores de las especies de plantas, pudieran permitir que se establezcan zonas estables de intercambio genético (vía flujo génico) con lo cual se mantendría una variabilidad genética adecuada en poblaciones.

8.1.1 Índice de Endogamia

Los resultados de este estudio muestran para *L. speciosa* valores del índice de endogamia oscilan 0.07434 a 0.27995, con excepción de dos poblaciones (Zac e Inm) cuyos valores no son significativamente diferentes de cero (0.00948 y 0.00649, respectivamente); las poblaciones con el F_{IS} más alto (0.2799; 0.234 y 0.2083 para Olm, Coa y P.2, respectivamente) se encuentran localizadas en el sur (Figura 13) y pertenecen al grupo dos (GENELAND) donde predomina el genotipo rojo; y la población con menor índice de endogamia significativo fue para Cgm ($F_{IS} = 0.07434$), seguido de Fel ($F_{IS} = 0.1240$). Como puede observarse, el índice de endogamia tal como lo muestra la correlación (Figura 10), disminuye a medida que la latitud aumenta, por lo que podemos sugerir que entre más al norte se encuentren las poblaciones tienen mayor flujo genético ya que presentan menos restricciones que las poblaciones del sur (Figura 13).

En un estudio con isoenzimas, Bacles *et al.* (2004) para *Sorbus aucuparia* reportó valores bajos de F_{IS} que oscilan entre -0,500 y 0.344, detectando un déficit significativo de heterocigotos reflejando un alejamiento del apareamiento al azar. Otro estudio que muestra los efectos de la fragmentación es el realizado por Mathiasen *et al.* (2007) sobre *Embothrium coccineum* en Chile donde se reportaron altos niveles de endogamia ($F_{IS} \pm SE = 0.324 \pm 0.072$), lo cual muy posiblemente sea debido a la actividad de los polinizadores, para los cuales se

reporto que visitan con mayor frecuencia los fragmentos pequeños (Smith-Ramírez & Armesto, 2003), y que las semillas que provenían de los fragmentos pequeños, presentaban una alta tasa de exogamia, lo que implica una conexión genética entre los fragmentos (Guevara & Laborde, 1993; Aldrich & Hamrick, 1998), por lo cual se ha sugerido que se ha incrementado la conexión entre fragmentos por árboles que se encuentran aislados espacialmente (Nason & Hamrick, 1997). Otro estudio donde sugieren que los árboles aislados funcionan como posibles peldaños de flujo génico entre las poblaciones es el del los árboles tropicales como es *Samanea saman* (Cascante *et al.* 2002) donde se reporta un coeficiente de endogamia [0.005 (0.001) 0.044 (0.018)], donde podemos observar que el flujo génico y la conectividad en la poblaciones es mantenido por los polinizadores. El hábito epifito en *L. speciosa* pudiera ser un factor que está contribuyendo al aumento del flujo genético vía polinizadores o por dispersión a larga distancia entre las poblaciones de la especie en estudio. Y más aun, que las poblaciones de *L. speciosa* hasta el momento no muestran un efecto de la fragmentación en su estructura genética. Sin embargo, el hecho de que solamente árboles aislados son los que están prevaleciendo en las poblaciones de la Cuenca del Cuitzeo, sugiere que en un futuro cercano pudiera tener un efecto negativo en los niveles de diversidad y endogamia en las poblaciones aisladas.

8.1.2 Prueba de detección de cuellos de botella

Las poblaciones de *L. speciosa* no presentaron evidencia de que haya ocurrido recientemente un cuello de botella bajo ninguno de los tres modelos analizados (IAM, SMM y TPM). En este sentido Luikart *et al.* (1998) menciona que la prueba se basa en la presencia de un exceso de heterocigotos en las poblaciones cuando éstas han sufrido un cuello de botella reciente. Estos resultados son contrarios a lo reportados en este estudio para *L. speciosa* donde en la mayoría de los loci analizados mostraron un déficit de heterocigos, la prueba

presenta una limitante ya que solo puede detectarse los cuellos de botella en un periodo de tiempo corto después de que este se haya producido. Por lo tanto, en las poblaciones de *L. speciosa* podemos observar que no hay evidencia de cuellos de botella recientes lo cual puede deberse principalmente a que los efectos de la fragmentación del hábitat y la frecuente extracción de ejemplares que han sufrido las poblaciones es reciente y sus consecuencia no se han hecho evidentes en las poblaciones aquí estudiadas, las cuales se conforman principalmente de individuos adultos.

8.1.3 AMOVA

El análisis molecular de varianza (AMOVA) realizado para las poblaciones de *L. speciosa* nos dice que la mayor variación esta dentro de las poblaciones con un 89.5%. Este resultado concuerda con un estudio realizado con aloenzimas sobre la estructura de tres especies de orquídeas donde Sun y Wong (2001) mencionan que las plantas con polinización cruzada suelen presentar mayor diversidad dentro de las poblaciones. De la misma manera Hamrick y Godt (1989) explican que especies con cruzamiento lejano presentan una variación mayor a la esperada la cual se encuentra principalmente dentro de las poblaciones y no entre ellas. Incluso, Case (1994) explica que estos patrones son atribuibles a la familia Orchidaceae donde se han observado frecuentemente valores relativamente altos de flujo génico interpoblacional a pesar de tener como característica el existir en poblaciones pequeñas y espaciadas. Otro estudio realizado por Chung *et al.* (2006) sobre orquídeas autocompatibles como son *Liparis kumokiri* y autoincompatibles como *Liparis makinoana* (Orchidaceae), para esta última se reportó altos niveles de variación genética dentro de las poblaciones, lo que concuerda con las especies autoincompatibles donde predomina un sistema de reproducción cruzada, al igual que en el caso de *Laelia speciosa* que evita su auto-polinización (Vander Pijl & Dodson, 1996; Dressler, 1981, 1993; Borba & Semir, 1999) y favorece más la polinización cruzada.

8.2 Estructura Genética

8.2.1 Pruebas de selección

Dentro de los grupos genéticos obtenidos por medio del programa STRUCTURE, el grupo uno presentó selección balanceadora tanto en el locus Lspe 4 como en el Lspe 7. Este tipo de selección promueve una alta diversidad genética, debido al proceso por el cual los alelos con menor aptitud adaptativa disminuyen hasta desaparecer (Castillo-Cobian, 2007). Esto se debe generalmente a que los heterocigotos se adaptan de mejor manera que los homocigotos los cuales tienen dos alelos iguales, esto es conocido como ventaja del heterocigoto o sobredominancia, en consecuencia se conserva el polimorfismo genético. Este tipo de selección representa la forma de selección natural que se encarga de mantener el polimorfismo genético dentro de las poblaciones, como es el caso de *L. speciosa* y se presenta principalmente en las poblaciones del grupo genético 1, el cual está muy bien distribuido en las poblaciones y donde podemos observar los mayores niveles de diversidad genética. Por lo tanto, podemos sugerir que los procesos de fragmentación en la Cuenca del Cuitzeo están provocando la desviación de la neutralidad de algunos loci (Lspe 4 y 7) hacia la selección balanceadora que está influyendo en el mantenimiento de la diversidad de esta especie de orquídea.

Dentro del grupo genético dos, se observó la posible señal de la selección balanceadora para el locus Lspe 12 y selección positiva para el locus 10, este tipo de selección favorece a largo plazo la perseverancia de múltiples alelos nuevos (Wright & Gaut, 2005). Este tipo de selección representa una ventaja en la fijación de una mutación sobre el promedio de la población incrementándose así las frecuencias de esta en las siguientes generaciones en una sola dirección (Li, 1997) reduciéndose así los niveles de variación genética. Watterson (1975) y Tajima (1989a, 1989b) explica que al presentarse este tipo de selección en consecuencia las frecuencias alélicas de estos nuevos alelos se verán

incrementadas siendo independiente de su posición frente a otros alelos, y con el tiempo se volverán fijos.

La selección positiva se presenta con mayor frecuencia cuando las poblaciones sufren algún tipo de presión medioambiental, siendo en este caso particular la extracción de los individuos y la tala de su hospedero natural pudiera ser un posible factor para que se presente este tipo de selección. Otro posible causa pudiera estar asociada con el índice de endogamia, el cual disminuye a medida que la latitud aumenta, por lo que podemos sugerir que entre más al norte se encuentren las poblaciones tienen una mayor probabilidad de flujo genético ya que presentan menos restricciones que las poblaciones del sur, donde al parecer el solapamiento de generaciones, la existencia de dos barreras genéticas entre las poblaciones y la falta de flujo génico con otras poblaciones ha posiblemente provocado este déficit de heterocigos.

8.2.2 Flujo y Diferenciación Genética

En *L. speciosa* el flujo génico calculado con el programa MIGRATE se encontró el mayor valor entre las población del norte hacia las poblaciones superiores del sur ($Nm= 2.188$), y el menor valor se dio las poblaciones del sur (Pot, P-2 y Coa) hacia las del centro ($Nm= 0.712$). Estos valores concuerdan con los valores de diferenciación genética R_{ST} pareada que se presentan entre las poblaciones. El hecho de que la mayor diferenciación encontrada sea entre poblaciones del norte-sur puede ser debido a que presentan una mayor separación geográfica (Figura 13), aunado a esto la presencia de la ciudad de Morelia puede ser un factor para la limitación del flujo genético y su subsecuente diferenciación genética. Por otro lado, la menor diferenciación y un mayor flujo génico ocurre entre las poblaciones centro-sur, lo cual puede ser explicado por la existencia de pequeños fragmentos de bosque que se encuentran entre estas poblaciones, y que tomarían el papel de corredores de vegetación donde potencialmente los árboles aislados funcionen como posibles peldaños de flujo

génico entre las poblaciones, tal como en el caso de *S. saman* (Cascante *et al.* 2002). Loveless & Hamrick (1984) sugieren que la diferenciación genética es el resultado de la dispersión del polen y las semillas y en el caso particular de las orquídeas donde son dispersadas por el viento y que son capaces de recorrer largas distancias se espera que la diferenciación genética sea baja entre las poblaciones (Hamrick & Godt, 1989; Gustafsson *et al.*, 2002). Sharma (2003) reportó para *P. picta* un valor alto de flujo génico ($Nm = 1.15$), sugiriendo que estos valores pueden ser debido a varios factores como son la alta fecundidad (Jones, 1988), la dispersión de semillas por el viento y por su sistema de polinización cruzado (Dressler, 1981). En el caso de *L. speciosa* que presenta valores altos de flujo génico (con Nm mayores a 0,999) estos resultados concuerdan con otros estudios realizados en orquídeas donde se encuentra una baja diferenciación ($G_{ST} = 0.07$) (Scacchi *et al.*, 1991), *Orquideas papilionaceae* ($G_{ST} = 0.03$) (Arduino *et al.*, 1995), *Orquidea morio* ($G_{ST} = 0.05$) (Rossi *et al.*, 1992), *Orquidea longicornu* ($G_{ST} = 0.01$) (Rossi *et al.*, 1992), *Cyperipedium candidum* ($G_{ST} = 0.06$) (Case, 1993), *Gymnadenia conopsea* ($G_{ST} = 0.04$) (Scacchi & De Angelis, 1989), y *Leporella fimbriata* ($G_{ST} = 0.04$) (Peakall & Beattie, 1989).

Sin embargo, en el caso particular de las poblaciones Lag-Olm quienes tienen el valor más grande de diferenciación a pesar de pertenecer al mismo grupo, en la Figura 13 puede observarse que la población Olm se encuentra restringida de las demás poblaciones por la barrera uno, que pudiera estar relacionada con fragmentos de vegetación aislados entre si donde el intercambio es limitado. En el caso de los árboles Young *et al.* (1996) propuso que los efectos esperados de la fragmentación del hábitat son una disminución de la variación genética entre las poblaciones y un aumento en la diferenciación genética entre ellas. En estudios sobre flujo génico en árboles tropicales se ha reportado que este es más intenso en árboles aislados en poblaciones fragmentadas (Young *et al.*, 1993; White *et al.*, 2002; Dick *et al.*, 2003). En cambio, otras investigaciones indican que las especies de árboles incluso dependen predominantemente de

intercambio de genes a través del polen y de la dispersión de semillas también podría contribuir sustancialmente al flujo de genes (Petit *et al.*, 2005). También se ha reportado que las semillas de las orquídeas al ser dispersadas por el viento y poseer una capacidad de dispersión a larga distancia (Hamrick & Godt, 1989) como es el caso de *L. speciosa* que posee unas semillas diminutas (como el polvo) (Ackerman & Ward, 1999; Arditti & Ghani, 2000), las cuales pueden entrar en la "columna de aire", por lo que muy posiblemente se dispersan a través de distancias considerables (hasta varios kilómetros) con la ayuda de un viento fuerte (Sharma *et al.*, 2000; Trapnell & Hamrick, 2004), por lo que es de esperar un aumento importante en el flujo de genes y que los valores de diferenciación genética sean bajos. Sharman *et al.* (2003) sugiere que las largas distancias de dispersión son efectivas para mantener el flujo de genes y por tanto la diversidad genética, entre las poblaciones de plantas, solventando así los efectos de la fragmentación.

8.2.3 Asignación Bayesiana y Barreras Genéticas

Se detectaron dos grupos genéticos (representados por colores: rojo y verde) a partir del programa STRUCTURE y del grupo uno y dos según el programa GENELAND, lo cual puede ser explicado desde el punto de que las poblaciones anteriormente pertenecían a un área en común de bosque de pino-encino y bosque de encino (Cuenca de Cuitzeo), que no había sido fragmentada. Sin embargo, la fragmentación por parte del humano causó la desaparición de los pinos principalmente en un inicio, debido a su potencial maderero y para construcciones. Posteriormente, se llevó a cabo la utilización de la madera de los encinos, que se utiliza principalmente como fuente de carbón vegetal, la cual es una actividad muy importante en la Cuenca de Cuitzeo. Esta actividad se realiza principalmente de las especies de encinos rojos como *Quercus castanea* y de la especie de encino blanco *Q. deserticola*, la cual es uno de los principales hospederos de la especie bajo estudio *L. speciosa* en la Cuenca. Cabe resaltar

que las inflorescencias de *L. speciosa* forman parte de los arreglos de las ofrendas que se ofrecen en los panteones del parte centro-norte de Michoacán, por lo que esta especie se ha visto sometida a una extracción sin medida por parte de los pueblos donde existe de manera natural esta especie de orquídea. De esta manera, con el tiempo se fueron reduciendo la cobertura de bosque, quedando reducida la cubierta de bosque a fragmentos de bosque en el norte de la cuenca, la parte central y la parte sur de la misma. Sin embargo, nuestros resultados sobre las poblaciones de *L. speciosa* han mostrado una alta diversidad y flujo genético lo cual incrementa el intercambio de genes entre las poblaciones. Esta evidencia sugiere que aun no se han hecho evidentes los efectos de la fragmentación que ocurren en la cuenca del Cuitzeo.

Por medio del programa STRUCTURE y GENELAND se encontraron dos grupos genéticos (Figura 13): verde (corresponde al grupo uno en GENELAND) y el rojo (Grupo dos en GENELAND), ambos bien distribuidos a lo largo de la Cuenca. En la Figura 14-A se observa que el genotipo verde está mejor repartido que el rojo que se encuentra restringido en las poblaciones del sur.

En las poblaciones del norte de la cuenca (Zac) pertenece al mismo grupo genético de las poblaciones del centro de acuerdo con lo obtenido con GENELAND (Figura 14) Presenta el segundo valor más bajo de $F_{IS} = 0.00948$ y el valor de diferenciación más alto que presentó la población de Zac/Olm fue de 0.11835; la población del norte así como la población Inm (población del centro que presenta el menor índice de endogamia $F_{IS} = 0.00649$). Entre esta dos regiones (norte – centro) el flujo génico es moderado aún siendo geográficamente las más cercanas, donde el norte contribuye con $Nm = 1.349$ hacia el centro y este, con $Nm = 0.999$ hacia el norte. En la región del centro las poblaciones se encuentran aisladas entre sí por la barrera tres (Figura 13) lo que contribuye a que los valores de diferenciación entre ellas sean más altos a los esperados principalmente entre las poblaciones Fel/Rob con $R_{ST} = 0.0781$ y entre Fel/Inm con un $R_{ST} = 0.0826$. Esta región contribuye de manera moderada con el flujo génico con valores de $Nm = 1.522$ y 1.122 hacia ambas secciones de las

poblaciones del sur; dentro de esta región la población Rob presenta el tercer valor más alto de endogamia con un $F_{IS} = 0.2155$.

En las poblaciones del sur el flujo genético se encuentra restringido entre ellas por la barrera compuesta uno donde se registra un mejor flujo de las poblaciones superiores (Agu, Lag Olm y Cgm) hacia las inferiores (Pot, P-2 y Coa) con un valor de $Nm = 1.969$: dentro de esta región se obtuvo la mayor diferenciación $R_{ST} = 0.14957$ entre las poblaciones Lag/Olm, como puede verse en la Figura 13 ambas poblaciones se encuentran aisladas por la barrera uno lo que puede impedir el intercambio de genes entre ella. La población Olm presenta el mayor índice de endogamia con $F_{IS} = 0.2799$ y como puede verse en la Figura 13 esta población se encuentra rodeada por la barrera compuesta uno lo que puede explicar que su flujo de genes se encuentre restringido y por lo tanto los individuos se estén reproduciendo entre sí. La población Cgm a su vez se encuentra aislada del resto de las poblaciones por la barrera dos teniendo un $F_{IS} = 0.0743$, su mayor diferenciación se presenta con la población Fel con un valor de 0.0468 y a su vez presenta uno de los menores valores de diferenciación $R_{ST} = 0.00487$ con la población Zac situada en el norte; la cual a su vez contribuye con el mayor nivel de flujo génico que reciben las poblaciones del sur con $Nm = 2.188$. En las poblaciones inferiores del sur (Pot, P-2 y Coa) las cuales se encuentran también subdivididas por la barrera compuesta uno, se encuentra mejor representado el genotipo rojo (Grupo dos en GENELAND); estas poblaciones son las que contribuyen en menor medida al flujo génico con $Nm = 0.712$ siendo el receptor las poblaciones del centro y dos de estas poblaciones (P-2 y Coa) presenta altos valores en índice de endogamia con $F_{IS} = 0.2083$ y 0.2340. Como puede observarse las poblaciones del sur tienen mayores restricciones geográficas por lo que el flujo genético se ve a su vez restringido, principalmente cuando el flujo se presenta hacia el norte lo que conlleva a que la diferenciación sea más grande entre poblaciones del norte – sur. Esto se ve confirmado con los resultados obtenidos con la correlación entre los cuales indican que la endogamia será menor cuanto mayor sea la latitud.

9. CONCLUSIONES

- ➔ Las poblaciones de *Laelia speciosa* presentaron altos niveles de diversidad genética que indican que la fragmentación de los bosques y la extracción selectiva y aprovechamiento de orquídeas no han tenido un efecto sobre las poblaciones estudiadas. Las características de historia de vida y la forma de crecimiento de *L. speciosa* sugieren que esta especie ha mantenido altos niveles de diversidad genética.
- ➔ Las poblaciones de *Laelia speciosa* no han sufrido un cuello de botella reciente como consecuencia de la extracción de la especie y la deforestación de su habitat. Esto puede deberse a que el análisis genético se realizó con individuos adultos colectados en poblaciones no tan afectados. Se esperaría que el efecto de la extracción a corto plazo se debería de ver reflejado en la diversidad de las progenies y en los individuos jóvenes ya que en las siguientes generaciones podrían ser las que presenten una reducción en el número de individuos en las poblaciones y por consecuente se presenten evidencia de cuello de botella.
- ➔ El índice de endogamia disminuye conforme la latitud aumenta, concordando con la presencia de menor diversidad a menor latitud. Esto es resultado de un mayor flujo génico en las poblaciones del norte y centro de la cuenca en el pasado, debido principalmente a los polinizadores y a la dispersión de semillas por el viento. El aumento de F_{IS} en las poblaciones del sur se pueden deber a la restricción que presentan las poblaciones entre sí al ser fragmentados por el establecimiento de las comunidades urbanas.
- ➔ Las poblaciones de *Laelia speciosa* se encuentran estructuradas genéticamente por dos grupos genéticos. Uno de ellos, denominado en este estudio como el genotipo rojo, se encuentra restringido principalmente

en el sur de la cuenca, donde se encuentra una barrera que aísla a las poblaciones de esta región entre sí delimitando el flujo entre ellas; esto puede ser un factor de que este genotipo esté menos distribuido.

- ➔ Las pruebas de selección mostraron que los loci Lspe4 y Lspe7 presentan selección balanceadora en el grupo genético dos y el Lspe12 en el grupo genético uno, este tipo de selección ayuda a que se mantenga una alta variabilidad genética, lo que puede estar contribuyendo a que las poblaciones de *Laelia speciosa* mantengan altos niveles de diversidad. El grupo uno presento selección positiva en el locus Lspe10; la cual se presenta cuando las poblaciones presentan alguna presión ambiental como es el caso de la especie en estudio.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Ackerman J. D., & Ward S. 1999. Genetic variation in a widespread, epiphytic orchid: where is the evolutionary potential?. *Systematic Botany* 24: 282–291.
- Aldrich, P. R., & J. L. Hamrick. 1998. Reproductive dominance of pasture trees in a fragmented tropical forest mosaic. *Science* 281:103–105.
- Antao, T., Ana Lopes, Ricardo J. Lopes, Albano Beja-Pereira, & Gordon Luikart. 2008. LOSITAN: A workbench to detect molecular adaptation based on a *Fst*-outlier method. *BMC Bioinformatics*, 9:323.
- Aranguren-Méndez, José A., & Jordi Jordana. 2001. Utilización de marcadores de ADN (microsatélites) en poblaciones de animales domésticos en peligro de extinción.
- Aranguren-Méndez, J. A., M. Gómez, & J. Jordana. 2002. Hierarchical analysis of genetic structure in Spanish donkey breeds using microsatellite markers. *Heredity*. 89: 207-211.
- Arditti, J., & Ghani A. K. 2000. Numerical and physical properties of orchid sedes and their biological implications. *Tansley Review No 110. New Phytologist* 145: 367–421.
- Arduino, P., R. Cianchi, W. Rossi, B. Corrias, & L. Bullini. 1995. Genetic variation in *Orchis papilionacea* (Orchidaceae) from the Central Mediterranean region: taxonomic inferences at the intraspecific level. *Plant Systematics and Evolution*, 194, 9–23.
- Arft, A. M., & T. A. Ranker. 1998. Allopolyploid origin and population genetics of the rare orchid *Spiranthes diluvialis*. *American Journal of Botany* 85: 110–122.
- Ávila, D. I. 1996. Orquídeas Michoacanas. Internet. <http://www.ccu.unimich.mx>.
- Ávila-Díaz, I. 2007. Biología de poblaciones *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. (Orchidaceae) para su manejo y conservación. Tesis de Doctoral. Centro de Investigaciones en ecosistemas de la Universidad Autónoma de México.
- Ávila-Díaz, I., & K. Oyama. 2002. Manejo sustentable de *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Biodiversitas: Boletín bimestral de la comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad*. (43), 9-12.
- Ávila-Díaz & Ken Oyama. 2007. Conservation genetics of an endemic and endangered epiphytic *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 94(2): 184–193.
- Avise, J.C. 1994 *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman & Hall. First Publication. New York, USA. 511p.

- Bacles, C. F. E., A. J. Lowe, & R. A. Ennos. 2004. Genetic effects of chronic habitat fragmentation on tree species: the case of *Sorbus aucuparia* in a deforested Scottish landscape. *Molecular Ecology* (2004) 13, 573–584.
- Barbadilla, Antonio. 2007. La Genética DE Poblaciones. Departamento de Genética y Microbiología. Bellaterra Universidad Autónoma de Barcelona.
- Barrett, B. A., K. K. Kidwell, & P. N. Fox. 1998. Comparison of AFLP and pedigree-based genetic diversity assessment methods using wheat cultivars from the pacific northwest. *Crop Science* 38: 1271-1278.
- Barthlott, W., V. Schmit-Neuerburg, J. Nieder, & S. Engwald. 2001. Diversity and abundance of vascular epiphytes: a comparison of secondary vegetation and primary montane rain forest in the Venezuelan Andes. *Plant Ecology* 152: 145-156.
- Beaumont, M. A. 2005. Adaptation and speciation: what can Fst tell us? *Trends Ecol Evol*, 20(8):435-440.
- Beaumont, M. A., & D. J. Balding. 2004. Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans. *Mol Ecol* 13: 969–980.
- Beaumont, M. A., & R. A. Nichols. 1996. Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society of London*.
- Beerli, P., & J. Felsenstein. 2001. Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 4563-4568.
- Belkhir, K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste, & F. Bonhomme. 2004. Genetix 4.05. Université de Montpellier II, France.
- Bennett, B. C. 1988. A comparison of life history traits in selected epiphytics and saxicolous *Tillandsia* (Bromeliaceae) from Florida and Peru. Ph. D. Dissertation. University of North Carolina at Chapel Hill. U. S. A.
- Benzing, D. H. 1990. Vascular epiphytes. Cambridge University Press. Cambridg. ***
- Borba, E. L., & J. Semir. 1999. Temporall variation in pollinarium size after it removalal in species of *Bulbophyllum*: a different mechanism preventing self-pollination in Orchidaceae. *Plant Systematics and Evolution* 217: 197 – 204.
- Borba, E. L., J. M. Felix, V. N. Solferini, & J. Semir. 2001. Flypollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *American Journal of Botany* 88: 419–428.

- Bowcock, A. M., A. Ruiz-Linares, J. Tomfohrde, E. Minch, J. Kidd *et al.*, 1994 High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368: 455–457.
- Brzosko, E., A. Wróblewska, & I. Talalaj. 2004. Genetic variation and genotypic diversity in *Epipactis helleborine* populations from NE Poland. *Plant Systematics and Evolution* 248: 57–69.
- Bush, S. P., W. E. Kutz, & J. M. Anderton. 1999. RAPD variation in temperate populations of the epiphytic orchid *Epidendrum conopseum* and the epiphytic fern *Pleopeltis polypodioides*. *Selbyana* 20: 120–124.
- Cascante, A., M. Quesada, J. J. Lobo, & E. A. Fuchs. 2002. Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. *Conservation Biology* 16:137–147.
- Case, M. A. 1993. High levels of allozyme variation within *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) and low levels of divergence among its varieties. *Systematic Botany* 18: 663–677.
- Case, M. A. 1994. Extensive Variation in the Levels of Genetic Diversity and Degree of Relatedness Among Five Species of *Cypripedium* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*, Vol. 81, No. 2, pp. 175-184.
- Castillo-Cobián, Amanda. 2007. *Capítulo 1. La selección natural a nivel molecular*, en *Ecología Molecular*. México. pp 594.
- Cheng, H. H. & L. B. Crittenden. 1994. Microsatellite markers for genetic mapping in the chicken. *Poultry Sci.* 73:539-546.
- Chung, M. Y., Chong-Wook Park, Eric R. Myers, & Myong GI Chung. 2006. Contrasting levels of genetic diversity between the common, self-compatible *Liparis kumokiri* and rare, self-incompatible *Liparis makinoana* (Orchidaceae) in South Korea. 41-48 pp.
- Chung, M. Y., J. D. Nason, & M. G. Chung. 2004. Spatial genetic structure in populations of the terrestrial orchid *Cephalanthera longibracteata* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 91: 52–57.
- Cornuet, J. M., & G. Luikart. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001–2014.
- Cortés-Palomec, A., R. Mccauley, & K. Oyama. 2007. Isolation, characterization and crossamplification of polymorphic microsatellite loci in *Laelia speciosa* (Orchidaceae): *Molecular Ecology Notes*.

- Cortés-Palomec, Aurea C, Ross A. Mccauley, & Ken Oyama. 2008. Isolation, characterization and cross-amplification of polymorphic microsatellite loci in *Laelia speciosa* (Orchidaceae). *Molecular Ecology Resources*. 8 , 135 –138.
- Cozzolino, S., & A. Widmer. 2005. Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecology and Evolution* 20: 487–494.
- Cozzolino, S., D. Cafasso, G. Pellegrino, A. Musacchio, & A. Widmer. 2003. Fine-scale phylogeographical analysis of Mediterranean *Anacamptis palustris* (Orchidaceae) populations based on chloroplast minisatellite and microsatellite variation. *Molecular Ecology* 12: 2783–2792.
- Dafni, A. 1992. *Pollination ecology: practical approach*. Oxford University Press, New York.
- Damon, A. 2006. Las epífitas. <http://www.ecosur.mx/Difusi%F3n/ecofronteras/>
- Di Rienzo, A., A. C. Peterson, J. C. Garza, A. M. Valdes, M. Slatkin, & N. B. Freimer. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 91: 3166-3170.
- Dick, C.W., G. Etchelecu, & F. Austerlitz. 2003. Pollen dispersal of tropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. *Mol. Ecol.* 12, 753–764.
- Dressler, R. L. 1981. *The orchids: natural history and classification*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Dressler, R. L. 1990. *The orchids: Natural history and classification*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Dressler, R. L. 1993. *The Orchids: natural history and classification*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Earl, Dent A., & vonHoldt Bridgett M. 2011. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* DOI: 10.1007/s12686-011-9548-7.
- Eguiarte, E. Luis, & V. Souza. 2007. *Ecología Molecular*: 1-7.
- Ellstrand, N., & D. Elam. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation.. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 24: 217-42.
- Engel, S. R., R. A. Linn, J. F. Taylor, & S.K. Davis. 1996. Conservation of Microsatellite Loci across Species of Artiodactyls: Implications for Population Studies. *Journal of Mammalogy* 77: 584-518.

- Estrategia para la Conservación y Uso Sustentable de la Diversidad Biológica de Michoacán. 2007. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Secretaría de Urbanismo y Medio Ambiente (SUMA) y Secretaría de Desarrollo Agropecuario (SEDAGRO). México.
- Evanno G., S. Regnaut, & J. Goudet et al., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14, 2611 – 2620.
- Excoffier L., G. Laval, & S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolution Bioinformatics*. 1:47-50.
- Excoffier, L., P. Smouse, & J. Quattro. 1992 Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Falush, D., M. Stephens, & J. K. Pritchard. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies *Genetics* 164: 1567–1587.
- FAO. 1995. World watch list for Domestic Animal Diversity. 2nd Ed. FAO, Rome. (FAO, <http://fao.org/dad-is>).
- Flores-Palacios, A., & J. G. García-Franco. 2003. Effects of floral display and plant abundance on fruit production of *Rhyncholaelia glauca* (Orchidaceae). *Revista de Biología tropical* 51: 71-78.
- Fontdevila, A., & A. Moya. 1999. Introducción a la Genética de Poblaciones. Editorial Síntesis S.A. Madrid, España. 349p.
- Fu, C. F., & C. S. Hew. 1982. Crassulacean acid metabolism in orchids under water stress. *Botanical Gazette* 143 : 294-329.
- Granados-Sanchez, D., G. F. López-Ríos, M. A. Hernández-García, & A. Sánchez-González. 2003. Ecología de las plantas Epífitas. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 9(2): 101-111.
- González-Astorga, J., A. Cruz-Angón, A. Flores-Palacios, & A. P. Vovides. 2004. Diversity and genetic structure of the Mexican endemic epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae). *Annals of Botany* 94: 545–551.
- Gonzalez-Astorga, Jorge, & Gonzalo Castillo-Campos. 2004. Genetic Variability of the Narrow Endemic Tree *Antirhea aromatic* Castillo-Campos & Lorence, (Rubiaceae, Guettardeae) in a Tropical Forest of Mexico. *Annals of Botany* 93: 521±528.
- González-González, Edna Amanda. 2008. Análisis de la Diversidad Genética en Poblaciones Naturales de Especies Vegetales Amenazadas: *Ilex perado* ssp.

Lopezilloi (Aquifoliaceae), *Silene nocteolens* (Caryophyllaceae) y *Sorbus aria* (Rosaceae). Tesis Profesional. Universidad de las Palmas de Gran Canaria.

- Guevara, S., & J. Laborde. 1993. Monitoring seed dispersal at desolated standing trees in tropical pastures: consequences for local species availability. *Vegetatio* 107/108:319–338.
- Guillot, G., A. Estoup, F. Mortier, & J. F. Cosson. 2005. A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* 170: 1261–1280.
- Gustafsson, S., & P. Sjögren-Gulve. 2002. Genetic diversity in the rare orchid, *Gymnadenia odoratissima* and a comparison with the more common congener, *G. conopsea*. *Conservation Genetics* 3: 225–234.
- Hágsater, E., M. Á. Soto Arenas, G. A. Salazar- Chávez, R. Jiménez Machorro, M. A. López Rosas, & R. L. Dressler. 2005. Las orquídeas de México. Instituto Chinoín, México.
- Halbinger, F. 1993. *Laelias de México*. Asociación Mexicana de Orquideología, A.C., México.
- Halbinger, F., & M. Soto. 1997. *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. En: *Laelias of Mexico. Orquídea (Méx.)* 15 : 135-139.
- Hamrick, J. L., & M. J. W. Godt. 1989. Allozyme diversity in plant species. In A. H. D. Brown, M. T. Clegg, A. L. Kahler, and B. S. Weir [eds.], *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*, 43-63. Sinauer, Sunderland, MA.
- Hartl, D. L., & A. G. Clark. 1989. *Principles of population genetics*, 2nd ed. Sinauer, Sunderland, MA.
- Hartl, D. L., & A. G. Clark. 1997. *Principles of Population Genetics*. Third Edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusetts, USA. 542p.
- Hedrick, P. W. 2000. *Genetics of Populations*. 2nd Ed. Jones & Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts.
- Hernández-Apolinar, M. 1992. Dinámica poblacional de *Laelia speciosa* (HBK) Schltr (Orchidaceae). B.Sc. thesis. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico.
- Hietzi, P. 1998. Diversity and conservation of epiphytes in a changing environment. Invited lecture presented at the International Conference on Biodiversity and Bioresources: Conservation and Utilization, 23-27 November 1997, Phuket, Thailand. *Pure Appl. Chem.*, 70(11). 2114 pp.

- Hoelzen, A. R. 1998. *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. Second Edition. IRL Press at Oxford University Press. New York, USA. 445p.
- Hubisz, M., D. Falush, M. Stephens, & J. Pritchard. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* 9: 1322–1332.
- INEGI. 2007. Anuario estadístico del estado de Michoacán. Boletín estadístico de información. Morelia, Michoacán. 56 p
- Jones, D.L. 1988. *Native Orchids of Australia*. Reed Press Pty. Ltd, New South Wales, Australia, p. 637.
- Jump, Alistair S., & Josep Peñuelas. 2006. Genetic effects of chronic habitat fragmentation in a wind-pollinated tree. *PNAS*. Vol. 103, no. 21.
- Lewontin, R. C., & J. Krakauer. 1975. Testing the heterogeneity of F values. *Genetics*, 80(2):397-398.
- Li, W. H. 1977. Distribution of nucleotide differences between two randomly chosen cistrons in a finite population. *Genetics* 85:331-337.
- López-Barrera, G. 2010. Estructura filogeográfica de *Dendroctonus approximatus* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) en México. Universidad Michoacana de san Nicolás de Hidalgo, Tesis de Licenciatura. Morelia, Michoacán. México. 86 pp.
- López-Granados, E. M., G. Bocco, & M. E. Mendoza 2001. «Cambio de cobertura vegetal y uso de suelo». En: Mendoza, M. E., G. Bocco & E. López 2001. *Regionalización ecológica, conservación de recursos naturales y ordenamiento territorial en la cuenca del lago de Cuitzeo, Michoacán*. Informe Técnico. Proyecto No. 98306024. Programa SIMORELOS–CONACYT, México 273 pp.
- López-Granados, Erna, Manuel Mendoza, & Alejandra Acosta. 2002. Cambio de cobertura vegetal y uso de la tierra. El caso de la cuenca endorreica del lago de Cuitzeo, Michoacán. En *Gaceta Ecologica*, INE-SEMARNAT, México, núm. 64.
- Loveless, M. D., & J. L. Hamrick. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annu. Rev. Ecol.* 15, 65–95.
- Luikart, G., & J. M. Cornuet. 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conserv. Biol.* (12), 228–237.
- Luikart, G., W. B. Sherwin, B. M. Steele, & F. W. Allendorf. 1998. Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks via monitoring genetic change. *Molecular Ecology* 7:963-974.

- Madison, M. 1977. Vascular epiphytes: their systematic occurrence and salient features. *Selbyana* 2: 1-3.
- Maldonado-Flores, C. 2006. Patrón de Distribución espacial y dinámica Poblacional de *Oncidium crista galli*, una especie de orquídea epífita de Chiapas. Tesis Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. 50 pp.
- Martínez Ramos, M. 2008. Grupos funcionales, en *Capital natural de México*, vol. I: *Conocimiento actual de la biodiversidad*. Conabio, México, pp. 365-412.
- Mathiasen, Paula, Adriana E. Rovere, & Andrea C. Premoll. 2007. Genetic Structure and Early Effects of Inbreeding in Fragmented Temperate Forests of a Self-Incompatible Tree, *Embothrium Coccineum* *Conservation Biology* Volume 21, No. 1, 232–240.
- Maya-García, R. 2010. Sistema de apareamiento y tasa de exocruzamiento de *Laelia speciosa* (HBK) Shcltr (ORCHIDACEAE) en poblaciones sujetas a diferente grado de perturbación. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tesis de Licenciatura. Morelia, Michoacán. México. 72 pp.
- McVaugh, R. 1985. *Flora Novo-Galiciana: a Descriptive Account of the Vascular Plants of Western Mexico*, Vol. II. Orchidaceae. University of Michigan Press, Ann Arbor, Michigan.
- Mendoza, M.E., G. Bocco, & M. Bravo. 2002. (en prensa). «Spatial prediction in hydrology: status and implications in the estimation of hydrological processes for applied research». *Progress in Physical Geography* 26 (3).
- Miranda, F. 1997. Sobrevivencia de artesanías prehispánicas. En *Manos michoacanas*. Colegio de Michoacán, México, pp. 35-48.
- Millennium Ecosystem Assessment. 2005. *Ecosystems and Human Well-being: Biodiversity. Synthesis*. Washington, D.C., World Resources Institute.
- Mills, S., & F. Allderndorf. 1996. The one-Migrant-per-Generation Rule in Conservation and Management. *Conservation Biology* 10-6: 1509-1518.
- Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn, & H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51, 263-273.
- Murren, C. J. 2003. Spatial and demographic population genetic structure in *Catasetum viridiflavum* across a human-disturbed habitat. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 333–342.
- Murren, C. J., & A. M. Ellison. 1998. Seed dispersal characteristics of *Brassavola nodosa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 85: 675–680.

- Nason, J. D., & J. L. Hamrick. 1997. Reproductive and genetic consequences of forest fragmentation: two case studies of Neotropical canopy trees. *Journal of Heredity* 88:264–276.
- Nei, M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annu. Hum. Genet.* 41, 225–233..
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA.
- Neiland, M. R., & C. C. Wilcock. 1998. Fruit set, nectar reward and rarity in the Orchidaceae. *American Journal of Botany* 85: 1657–1671.
- Nieder, J., J. Prosperí, & G. Michaloud. 2001. Epiphytes and their Contribution to canopy diversity. *Plant Ecology* 153:51-63.
- Pasquarè, G., L. Ferrari, V. H. Garduño, A. Bibaldi, & L. Vezzoli. 1991. Geologic map of central sector of Mexican Volcanic Belt, State of Guanajuato and Michoacan, Mexico. Map and Chart Series MCH072. Geological Society of America.
- Peakall, R., & A. J. Beattie. 1989. Pollination of the orchid *Microtis parviflora* R. Br. by flightless worker ants. *Funct. Ecol.* 3:515-522.
- Peakall, R., & A. J. Beattie. 1991. The genetic consequences of worker ant pollination in a self-compatible, clonal orchid. *Evolution* 45: 1837–1848
- Pérez-Pérez, M. A. 2003. Demografía de *Laelia speciosa* (HBK) Schltr. (Orchidaceae) bajo diferentes condiciones de manejo en la zona centro-norte del estado de Michoacán. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.
- Petit, Rémy J., Jérôme Duminil, Silvia Fineschi, Arndt Hampe, Daniela Salvini, & Giovanni G. Vendramin. 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology* 14, 689–701.
- Pinheiro, Fábio, Clarisse Palma-Silva, Fábio de Barros, & Salvatore Cozzolino. 2009. Cross-amplification and characterization of microsatellite loci for the Neotropical orchid genus *Epidendrum*. *Genetics and Molecular Biology*, 32, 2, 337-339.
- Piñero, D., et al. 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, en *Capital natural de México*, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México, pp. 437-494.
- Piry, S., G. Luikart, & J. M. Cornuet. 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *J Hered* 90:502–503.

- Ponsuksili, S., K. Wimmers, F. Schmoll, P. Horst, & K. Schellander. 1999. Comparison of Multilocus DNA fingerprints and Microsatellites in an Estimate of Genetic Distance in Chicken. *J. Hered.* 90(6) 656-659.
- Pritchard, Jonathan K., Matthew Stephens, & Peter Donnelly. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155: 945–959.
- R- para Windows [R development team 2009] __ R Development Core Team: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; 2007. [ISBN 3-900051-07-0].
- Ramel, C. 1997. Mini and Microsatellite. *Environmental Health Perspectives* 105: 781-789.
- Rasmussen, H. N. 1995. Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant. Cambridge: Cambridge University Press.
- Raymond, M., & F. Rousset. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.
- Rochambeau, H., F. Fournet-Hanocq, & J. Vu Tien Khang. 2000. Measuring and managing genetic variability in small populations. *Ann. Zootech.* 49: 77-93.
- Rojas, M. J. 1991. Estudio de la Flora y la Vegetación Acuática Vascular del Lago de Cuitzeo, Michoacán. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México: 78 pp.
- Rockwell, F., & G. F. Barrowclough. 1987. *Gene Flow and the Genetic Structure of Populations* En: F. Cooke and P.A. Buckley (Ed.) *Avian Genetics*. A population and ecological approach pp. 223-253. Academic Press London.
- Rossi, W., B. Corrias, P. Arduino, R. Cianchi, & L. Bullini. 1992. Gene variation and gene flow in *Orchis morio* (Orchidaceae) from Italy. *Plant Systematics and Evolution*, 179, 43–58.
- Rzendowski, J. 1991. Diversity and origins of the phanerogamic flora of the Mexico. In Ramamoorthy *et al.* (ed). *Biological diversity of Mexico: Origins and distribution*. Oxford University Press.
- Rzendowsky, G., J. Rzendowsky, & M. Peña. 2001. Flora Fanerogámica del Valle de México 2ª ed., Instituto de Ecología A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán) 1046 pp.
- Salazar, Efraín G. 2007. Uso de marcadores moleculares en taxonomía: Unidad de Biotecnología INIA-CENIAP Maracay. Simposio. XVII Con. Ven. Bot.

- Santos, H. Leticia, Ernesto Aguirre L., Jorge E. Campos C., & Martha Martínez G. 2006. Conservación in situ de la flora mexicana: La orquídea: *Laelia albida*, en una reserva de la biosfera. Ciencia y desarrollo en internet.
- Scacchi, R., & G. De Angelis. 1989. Isozyme polymorphism in *Gymnadenia* and its inferences for systematics within this species. *Biochem. Syst. Ecol.* 17, 25–33.
- Scacchi, R., G. De Angelis, & R. M. Corbo. 1991. Effect of the breeding system on the genetic structure in three *Cephalanthera* spp. (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 176: 53–61.
- Scacchi, R., G. De Angelis, & P. Lanzara. 1990. Allozyme variation among and within eleven *Orchis* species (fam. Orchidaceae), with special reference to hybridizing aptitude. *Genetica* 81: 143- 150.
- Sharma, I. K., M. A. Clements, D. L. Jones. 2000. Observation of high genetic variability in the endangered Australian terrestrial orchid *Pterostylis gibbosa* R. Br. (Orchidaceae). *Biol. Syst. Ecol.* 28, 651–663.
- Sharma, I. K., D. L. Jones, & C. J. French. 2003. Unusually high genetic variability revealed through allozymic polymorphism of an endemic and endangered Australian orchid, *Pterostylis* aff. *Picta* (Orchidaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 513–526.
- Shaw, P. W., G. J. Pierce, & P. R. Boyle. 1999. Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. *Mol. Ecol.* 8: 407-417.
- Shinde, D., Y. L. Lai, F. Z. Sun, & N. Arnheim. 2003. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)(n) and (A/T)(n) microsatellites. *Nucleic Acid Research*, 31, 974 – 980.
- Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47: 264–279.
- Slatkin, M. 1994. Linkage disequilibrium in growing and stable populations. *Genetics* 137:331-336.
- Smith-Ramírez, C., & J. J. Armesto. 2003. Foraging behaviour of bird pollinators on *Embothrium coccineum* (Proteaceae) trees in forest fragments and pastures in southern Chile. *Austral Ecology* 28:53–60.
- Soberón, J. 2010. La diversidad biológica: importancia y actores sociales. Medio ambiente/ José Luis Lezama y Boris Graizbord, coordinadores -- 1a. ed. -- México, D.F. : El Colegio de México, 429 p. (Los grandes problemas de México;v. 4).

- Solano-Gómez, Rodolfo, Cruz Lustre Gabriela, Martínez-Feria Aarón, & Lagunez-Rivera Luicita. 2010. Plantas Utilizadas en la Celebración de la Semana Santa en Zaachila, Oaxaca, México. Polibotánica, Instituto Politécnico Nacional. México Núm. 29, marzo-sin mes, 2010, pp. 263-279.
- Sosa, P., F. Batista, M. A. González, & N. Bouza. 2002. La Conservación Genética de las Especies Amenazadas en: Biología de la Conservación de Plantas Amenazadas: Técnicas de Diagnóstico del Estado de Conservación. Bañares, A. (Ed.). Organismo Autónomo de Parques Nacionales, España. pp. 133-160.
- Soto-Arenas, M. A. 1996. México (Regional account), pp 53-58. En IUCN/SSC Orchids Specialist Group. Orchids. Status Survey and Conservation Action Plan, IUCN.
- Sun, M. 1996. Effects of population size, mating system and evolutionary origin on genetic diversity in *Spirantes sinensis* and *S.hongkongensis*. *Conservation Biology*, 10, 785–795.
- Sun, M., & K. C. Wong. 2001. Genetic structure of three orchid species with contrasting breeding systems using rapd and allozyme markers. *American Journal of Botany* 88(12): 2180–2188.
- Sytsma, K. J., & B. A. Schaal. 1985. Genetic Variation, Differentiation, and Evolution in Species Complex of Tropical Shrubs based on Isozymic Data. *Evolution* 39: 582-593.
- Tajima, F. 1989a. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595,.
- Tajima, F. 1989b. The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* 123:597-601.
- Tautz, D. 1989. Hipervariability of a Simple Sequence as a General Source for Polymorphic DNA Markers. *Nucleic Acids Researches* 7: 6463-6470.
- Trapnell, D. W., & J. L. Hamrick. 2004. Partitioning nuclear and chloroplast variation at multiple spatial scales in the neotropical epiphytic orchid, *Laelia rubescens*. *Molecular Ecology* 13: 2655–2666.
- Trapnell, D. W., J. L. Hamrick, & J. D. Nason. 2004. Three-dimensional finescale genetic structure of the neotropical epiphytic orchid, *Laelia rubescens*. *Molecular Ecology* 13, 1111–1118.
- Tremblay, R. L., & J. D. Ackerman. 2001. Gene flow and effective population size in *Lepanthes* (Orchidaceae): a case for genetic drift. *Biological Journal of the Linnean Society* 72: 47–62.

- Tremblay, R. L., J. D. Ackerman, J. K. Zimmerman, & R. N. Calvo. 2005. Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal of the Linnean Society* 84: 1–54.
- Van der Pijl, L., & C. H. Dodson. 1996. *Orchid Flowers, Their Pollination and Evolution*, University of Miami Press.
- Van Oosterhout, C., D. Weetman, & W. F. Hutchinson. 2006. Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium populations. *Molecular Ecology Notes* 6 : 255 – 256.
- Vovides, A. 1995. Experiencias & avances en el conocimiento de las plantas mexicanas en peligro de extinción. En: Linares, E. *et al.* [eds.]. *Conservación de las plantas en peligro de extinción: Diferentes enfoques*. UNAM. 139-144.
- Watterson, G. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theor. Popul. Biol.* 7: 256-276.
- Wattier, R., C. R. Engel, P. Saumitou-Laprade, & M. Valero. 1998. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Mol. Ecol.* 7: 1569-1573.
- Weir, B. S. 1996. *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Assoc., Inc., Sunderland, MA, USA.
- Wiard, L. A. 1987. *An Introduction to the Orchids of Mexico*. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- White, G. M., D. H. Boshier, & W. Powell. 2002. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: an example from *Swietenia humilis* Zuccarini. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 99, 2038–2042.
- Williams, G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, & S. V. Tingey. 1990. DNA Polimorphism Amplified by Arbitrary Primers are useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Researches* 18: 6531-6535.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evol* 19: 395-420.
- Wright, S. 1978. *Evolution and the genetics of populations*. University of Chicago Press, Chicago, IL. USA.
- Wright, Stephen I., & Brandon S. Gaut. 2005. Molecular Population Genetics and the Search for Adaptive Evolution in Plants. *Mol. Biol. Evol.* 22(3):506–519.

Young, A. G., H. G. Merriam, & S. I. Warwick. 1993. The effects of forest fragmentation on genetic variation in *Acer saccharum* Marsh. (sugar maple) populations. *Heredity* 71: 277 – 289.

Young, A., T. Boyle, & T. Brown. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution* 11: 413 – 418.