



**Universidad Autónoma del Estado  
de México**



**Facultad de Ciencias**

TESIS

**Diferenciación genética y demografía histórica de la salamandra microendémica *Pseudoeurycea robertsi* Taylor, 1939 (Caudata: Plethodontidae) usando DNA mitocondrial.**

Que para obtener el título de:

**BIÓLOGO**

Presenta:

**José Luis Duarte de Jesús**

Directores:

Dr. Armando Sunny García Aguilar

Dr. Hermilo Sánchez Sánchez

**Toluca, Estado de México**

**2018**

## **Agradecimientos**

A mis padres Álvaro y Catalina, la familia y el hogar que me dieron han sido el crisol donde se forjaron todos mis sueños y metas. El cariño, libertad y confianza que me dieron me han permitido crecer y darle rienda suelta a mis sueños. Soy lo que soy por y para mí pero también por ellos, de esta forma mi éxito no es solo mío, sino de todos los que me precedieron y acompañaron.

A mis hermanos Katia y Daniel, quienes han sido mis más viejos amigos y acompañantes. Con su cariño y enseñanzas se abrió el sendero sobre el que pude conocer mis propias convicciones y quienes me han exhortado y puesto el ejemplo para seguirlas hasta las últimas consecuencias.

A mis sobrinos Sebastián y Santiago, de su sencillez emana la alegría que disipa mis dudas, reafirma mis convicciones y me anima a seguir.

A mis mejores amigos, Arlene, Roberto, Sonia, Daniel y Mayeli, a quienes he visto y me han visto crecer y con quienes he probado momentos amargos pero también la dulce victoria. Ustedes son mi equipo, mis guerreros de batalla y me honra el conocerlos.

A mi asesor Sunny, a quien le debo el poder desarrollar este tema que resulto de mi principal interés (cosa que no siempre pasa en tesis de licenciatura) y me recordó que los maestros también pueden volverse amigos. Sin su ayuda este trabajo tal vez no existiría (tal vez otro lo hubiera hecho) y yo seguramente no tendría título (vientos Sunny ☺). Si más maestros fueran como tú, habría más alumnos haciendo lo que les gusta.

A la profesora Fabiola Ramírez Corona, por su indispensable ayuda con el equipo y reactivos de laboratorio pero también por sus consejos y su ánimo personal. Ojalá que más profesores entendieran la necesidad imperante apoyar a los alumnos para que se pueden lograr buenos proyectos, así como usted lo hizo conmigo.

A la ciencia en general y a la biología en particular, por cuyo sendero he conocido las más grandes bellezas que nos ofrece este universo y cuyo estudio me ha dado a conocer un profundo sentido y significado de vivir así como un sentido de satisfacción que tal vez ninguna otra rama o práctica del conocimiento humano me hubiera podido ofrecer.

A la Universidad Autónoma del Estado de México, que guardó de mí y donde pude seguir cultivando mi conocimiento e interés por las ciencias naturales y por cuya intermediación he conocido a gente increíble y recolectado experiencias invaluableles.

A las salamandras pletodóntidas, a través de ellas pude poner en práctica una de las teorías más integrales, sobrecogedoras y hermosas de la biología, como lo es la evolución. Debemos seguir buscando esfuerzos para conservar la integridad funcional de los ecosistemas.

Por último, quisiera agradecer a mi asesor Hermilo Sánchez Sánchez y mis revisores Armando Sunny, Marco Suárez Atilano y Octavio Monroy Vilchis por su refuerzo y comentarios en la calidad y estructura de este trabajo. Sobre opiniones valiosas como las tuyas pude tener un panorama más general y divisar el largo camino que aún me queda por recorrer.

*“El comienzo es la parte más difícil de toda empresa, sin embargo es también la más importante”. Platón.*

*“La Tierra ama nuestras pisadas y teme por nuestras manos” Tenek.*

*“Juntos veremos el final de esto” A.*

## Índice general

Resumen.....	- 1 -
Introducción .....	- 2 -
Marco teórico.....	- 3 -
1. DNA mitocondrial y relaciones genealógicas .....	- 3 -
2. Teoría de coalescencia y demografía histórica .....	- 6 -
Antecedentes .....	- 11 -
Hipótesis.....	- 14 -
Objetivos .....	- 14 -
1. Objetivos Particulares .....	- 14 -
Materiales y métodos .....	- 15 -
1. Zona de Estudio .....	- 15 -
2. Muestreo en Campo.....	- 16 -
3. Extracción de DNA.....	- 16 -
4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	- 17 -
5. Electroforesis del producto de PCR.....	- 17 -
6. Secuenciación de las muestras.....	- 17 -
7. Búsqueda BLAST .....	- 17 -
8. Edición y alineamiento de secuencias.....	- 18 -
9. Análisis de diversidad genética .....	- 18 -
10. Relaciones genealógicas.....	- 18 -
11. Estructura genética .....	- 19 -
12. Estadísticos de resumen.....	- 19 -
13. Distribuciones mismatch .....	- 19 -
14. Bayesian Skyline Plots (BSP's) .....	- 20 -
15. Aislamiento por distancia.....	- 20 -
Resultados .....	- 20 -
1. Muestreo en campo .....	- 20 -
2. Depuración de las muestras.....	- 21 -
3. Relaciones Genealógicas .....	- 21 -
4. Estructura genética .....	- 22 -
5. Diversidad Genética .....	- 23 -

6. Demografía histórica .....	- 24 -
7. Aislamiento por distancia.....	- 25 -
Discusión .....	- 35 -
1. Relaciones genealógicas.....	- 35 -
2. Diversidad y diferenciación genética .....	- 36 -
3. Demografía histórica.....	- 41 -
4. Consideraciones para la conservación. ....	- 42 -
Conclusiones .....	- 47 -
Literatura citada.....	- 49 -
Anexos.....	- 57 -

## Índice de figuras

Figura 1 Redes de haplotipos (Tomado y modificado de Schal y Olsen 2000 y Lanteri y Confalonieri 2009) .....	- 5 -
Figura 2 Genealogías neutrales y cambios demográficos de la D de Tajima (Tomado y modificado de Hamilton 2009).....	- 8 -
Figura 3 Distribuciones mismatch (Tomado y modificado de Rogers 2005 y Hamilton 2009) .....	- 9 -
Figura 4 Bayesian skyline plot (Tomado y modificado de Emerson et al. 2001).....	- 11 -
Figura 5 Sitios de muestro dentro de la APFFNT.....	- 15 -
Figura 6 Genealogía del cyt b .....	- 26 -
Figura 7 Red Median-joining de haplotipos .....	- 27 -
Figura 8 Red Neighbor-net de individuos.....	- 28 -
Figura 9 Análisis de estructura genética de BAPS y STRUCTURE .....	- 29 -
Figura 10 Distribciones mismtch y BSP para cada linaje genealógico.....	- 33 -
Figura 11 Prueba de Mantel de distancia genética vs distancia geográfca .....	- 34 -
Figura 12 Polígonos de subzonificación de dos planes de manejo para la APFFNT.....	- 46 -

## Índice de tablas

Tabla 1. Sitios de muestro y sus abreviaturas usadas en los análisis.....	- 16 -
Tabla 2. Sitios muestreados con el uso de suelo predominante encontrado, el número de individuos encontrados y mostrados con el gradiente altitudinal.....	- 21 -
Tabla 3. Diversidad genética de las secuencias de mtDNA para los 11 sitios de muestreo.....	- 24 -
Tabla 4. Sumarios estadísticos e índice raggedness para cada grupo genealógico y para todos los individuos en general .....	- 31 -

## Resumen

En este estudio se secuenció el gen Citocromo b de 71 individuos de *Pseudoeurycea robertsi*, de 11 sitios dentro de su área de distribución, el Área de Protección de Flora y Fauna del Nevado de Toluca (APFFNT). Se emplearon análisis de inferencia bayesiana y de redes para reconstruir la genealogía del gen y elucidar la historia evolutiva de los linajes matrilineales, así como el grado de divergencia entre sus distintos haplotipos a través de una historia mutacional. También se emplearon análisis de estructura para determinar la existencia de clusters genéticos así como la admixión entre ellos. Por otro lado, se analizaron las fluctuaciones demográficas para conocer si han influido históricamente en el grado de polimorfismo y divergencia observable.

Se encontraron 2 linajes genealógicos, uno regionalizado en la ladera al sur del cráter del volcán y el otro regionalizado en la ladera al norte del mismo. A su vez, el linaje al norte está formado por dos subgrupos genealógicos, uno regionalizado en la porción latitudinalmente céntrica del APFFNT y más cercana al cráter y el segundo regionalizado en la parte más alejada al norte del APFFNT, dentro de la localidad de Amanalco. Los análisis de estructura muestran la existencia de 3 grupos genéticos, con una admixión intermedia entre los dos clusters genéticos ubicados al norte, y con poca o nula relación con el cluster del sur. El patrón de los cambios mutacionales indica que los haplotipos mutaron progresivamente en un patrón “stepping-stone” como en la especie cercana *Pseudoeurycea leprosa*. El único haplotipo compartido entre las dos laderas del volcán sugiere que se ha estado llevando a cabo un flujo secundario o reciente de haplotipos dentro de toda la ladera Norte y del Sur al Centro del APFFNT al mismo tiempo que se ha ocurrido una diferenciación histórica continua. Por otra parte, los análisis demográficos mostraron evidencia de un ligero evento de expansión poblacional.

Los niveles de diversidad y divergencia haplotípica encontrados en *P. robertsi* fueron altos, similares a las poblaciones más antiguas de *P. leprosa*, la cual es una especie que presenta una distribución geográfica más amplia y de surgimiento más antiguo. La fragmentación de las poblaciones más antiguas de *P. leprosa* se dio aproximadamente al mismo tiempo que el surgimiento de *P. robertsi* como especie (~900 Ka). Esto sugiere, por un lado, que algunos factores como un periodo de tiempo comparativamente similar de fragmentación de las poblaciones, puede promover efectos de diferenciación en poblaciones microendémicas equiparables a aquellos mostrados por poblaciones filogenéticamente más antiguas de otras especies cercanas. Sin embargo, la diferenciación observada en *P. robertsi* fue más alta que aquella de las poblaciones más recientes de *P. leprosa*, por lo que inferimos que los factores geológicos-climáticos históricos del paisaje durante el Pleistoceno o aspectos de la historia de vida propias de *P. robertsi* como la alta filopatría de las salamandras o el microendemismo, pueden promover efectos de diferenciación más profunda en especies de distribución restringida respecto a aquellas de distribución más amplia en ventanas de tiempos similares en estas especies cercanas pero con historia de vida y evolutiva distintas.

## Introducción

Las fuerzas evolutivas como la selección natural, la deriva genética, el flujo genético, la mutación y la recombinación actúan continuamente sobre las poblaciones de los individuos (Avice et al. 1987) y dependiendo de las características de cada especie, el efecto de alguna de las fuerzas evolutivas se puede acentuar por sobre las demás y desencadenar procesos que tienen un patrón único y detectable en el pool genético de las poblaciones (Emerson et al. 2001; Hey y Machado 2003). En el caso de las especies con distribución geográfica restringida o con poca capacidad de dispersión, su trayectoria evolutiva se asemeja a la de poblaciones pequeñas (Castellanos-Morales et al. 2015; Sunny et al. 2014). Estas especies pueden mostrar evidencia de flujo genético restringido, aislamiento histórico o deriva génica, generando un patrón de divergencia filogenética reducida, baja diversidad genética y tamaño efectivo poblacional pequeño, producto de eventos continuos de colonización seguidos de un efecto fundador (Parra-Olea et al. 2012; Sunny et al. 2015). Sin embargo, se sabe que incluso especies con estas características han mostrado niveles de diversidad y divergencia equiparables a otras especies con mayor capacidad de dispersión o con poblaciones más continuas (Moritz 1999), de manera que no existe un consenso sobre la tendencia de la diferenciación genética de estas especies (Castellanos-Morales et al. 2015; Heredia-Bobadilla et al. 2016).

Estudiar la diferenciación genética de una especie tiene por objeto reconstruir sus linajes genealógicos, la historia de cambio mutacional o divergencia y hallar los relictos o puntos geográficos donde se encuentran los linajes genéticos principales, así como la mayor cantidad de variación genética (Domínguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez 2009), e inferir si acontecieron sucesos demográficos que ayudaron a incrementar o reducir la interacción genética de las poblaciones (Avice 2000; Avice 2009). Una vez realizados estos análisis se pueden inferir, de acuerdo al contexto propio de cada especie, cuales son los factores que determinaron la estructura y diferenciación en sus poblaciones, así como identificar si dichos factores son comparables con los documentados para otras especies, con lo cual se pueden detectar procesos generales que operen a un nivel taxonómico mayor que en nuestro caso particular de interés (Castañeda-Rico et al. 2014). En este caso, nos enfocamos en una salamandra pletodóntida *Pseudoeurycea robertsi*, cuya distribución es microendémica y cuyo origen filogenético se ha datado recientemente, durante el Pleistoceno tardío (Rovito et al. 2015).



## Marco teórico

### 1. DNA mitocondrial y relaciones genealógicas

La molécula de DNA mitocondrial (mtDNA), al igual que en otros marcadores moleculares, ofrece un polimorfismo detectable para los análisis genéticos (Awise 2000). Las variantes de mtDNA se diferencian unas de otras por las mutaciones o cambios en la secuencia de nucleótidos que presentan, es decir, cuando dos o más secuencias presentan más de un estado nucleotídico en un sitio homólogo, se dice que hay polimorfismo y a cada variante de le denomina haplotipo (Awise et al 1987). Cuando esto ocurre, las mutaciones puntuales suelen reconocerse como las más frecuentes, ya que en el mtDNA no ocurre recombinación, de manera que otro tipo de mutaciones como los “indels”, ya sea de un solo nucleótido o de un segmento completo, son infrecuentes o nulas (Awise 2009). Este es uno de los factores que favorecen la acumulación de mutaciones en las secuencias de mtDNA y que justifican su empleo como marcador a escala microevolutiva (Awise 2009). Las causas de su elevada tasa de mutación se deben a factores como la carencia de histonas asociadas a dicha molécula (Lanteri y Confalonieri 2003), lo cual implica que las secuencias de mtDNA se encuentran expuestas a la actividad nucleasa de las enzimas y que su reproducción sea asincrónica con la división celular (Garrido et al. 2006). Esto aporta variación que se acumula durante una activa proliferación de la molécula dentro de una misma célula, ya sea germinal o somática (Brown et al. 1979; Awise 2009). Otro rasgo importante del mtDNA es su herencia uniparental en casi todas las especies animales, que se hereda de la madre a su descendencia de ambos sexos, pero de nuevo solo las hijas lo transmiten a su descendencia (Awise 2000).

Estas características permiten al mtDNA inferir o reconstruir el cambio evolutivo de un conjunto de individuos como una historia lineal de mutaciones que se van acumulando una tras otra entre las variantes haplotípicas a través de las generaciones (Awise et al. 1987), donde unos pocos pasos mutacionales significan una diferenciación incipiente y una divergencia reciente, mientras que una acumulación numerosa de mutaciones entre dos haplotipos implica una divergencia profunda temporalmente (Fig. 1; Awise 1995). El grado de diferenciación puede estar correlacionada con una mayor distancia geográfica o con algún otro tipo de aislamiento (geográfico, ecológico o etológico) de largo plazo (Awise 1995; Awise 2000; Awise 2009) y si se identifica un haplotipo en más de una población entonces podemos inferir que esas poblaciones tienen cierto grado de flujo genético reciente (Fig 1b; Awise et al. 1987).

Ahora bien, dado que en ocasiones es impráctico o no rentable la secuenciación completa del genoma mitocondrial, los estudios que requieren el uso de mtDNA se enfocan en uno o varios genes que codifican para proteínas (Domíguez-Domínguez y Vázquez-Domínguez 2009), como el gen que codifica para el citocromo B (cyt b), que se ha usado extensivamente en otros estudios, no solo de anfibios y reptiles sino virtualmente en casi todos las clases del reino animal (Awise 1986; Arif y Khan 2009). Sin embargo, una vez

determinado el número de genes de mtDNA implicados en el análisis, el objetivo es reconstruir las relaciones haplotípicas (Posada y Crandall 2001a; Hey y Machado 2003; Avise 2009).

No obstante, adaptar los métodos tradicionales de reconstrucción filogenética a los haplotipos de mtDNA presenta ciertas limitaciones (Yang y Rannala 2012) impuestas por las características que distinguen a las relaciones entre especies, es decir, la escala macroevolutiva o filogenética, de las relaciones entre poblaciones, o bien, la escala microevolutiva o toco genética (Posada y Crandall 2001a; Lanteri y Confalonieri 2009). Por ejemplo, un proceso destacable a nivel filogenético, que no ocurre a nivel toco genético son las relaciones de carácter jerárquico (Swofford et al. 1996; Futuyma 2005; Yang y Rannala 2012). Al aplicar los métodos tradicionales dicotómicos a un conjunto de genes o secuencias de distintas especies, estos reconstruyen su historia evolutiva. Pero al ser de distintas especies asumimos que los genes ancestrales y los genes en estudio pertenecen a acervos genéticos distintos, ya que las mutaciones, combinados con procesos demográficos y poblacionales separan los alelos en grupos genéticos discretos que no tienen flujo entre ellos, ya sea por barreras temporales (extinción del ancestro) o por barreras reproductivas (Hudson 1991; Yang y Rannala 2013), lo que define un proceso jerárquico de ancestría-descendencia (Lanteri y Confalonieri 2009). En contraste con esto, las relaciones entre genes muestreados de individuos pertenecientes a una misma especie no son jerárquicas debido a que las variantes de los genes si pueden intercambiarse entre grupos genéticos debido a la reproducción sexual de los individuos (Posada y Crandall 2001a). Además, los ancestros frecuentemente conviven con los descendientes, por lo que en las relaciones genealógicas, el ancestro se transmite o se hereda a la par que lo hacen los descendientes (Posada y Crandall 2001a).

Por otro lado, la variación entre individuos de la misma especie suele ser menos que la de los análisis filogenéticos, por lo que los análisis genéticos arborescentes tradicionales podrían disminuir su poder de resolución y devolver un cladograma con un gran número de politomías (Yang y Rannala 2012). Además, la variante ancestral puede dar lugar a varios descendientes o multifurcación, y no solo a dos (lo que en las genealogías se conoce como bifurcación o dicotomía), por lo que la ramificación dicotómica tradicional no sería suficiente (Posada y Crandall 2001a). Por último, a nivel intraespecífico pueden ocurrir fenómenos de homoplasia y mutación reversa, por lo que los análisis genéticos matriciales de bifurcación reducen el número de homoplasias sin mostrar donde ocurrieron estas, y generar un número elevado de politomías (Futuyma 2005; Vázquez-Domínguez et al. 2009). Otro inconveniente es que si existe un haplotipo ancestral, bajo un modelo bifurcante tradicional, el ancestro estaría representado por una rama de longitud cero en el nodo basal de un cluster o grupo genético (Posada y Crandall 2001a).

Debido a estas diferencias entre relaciones de especies y poblaciones, se desarrollaron métodos gráficos que toman en cuenta fenómenos de multifurcación, ancestros

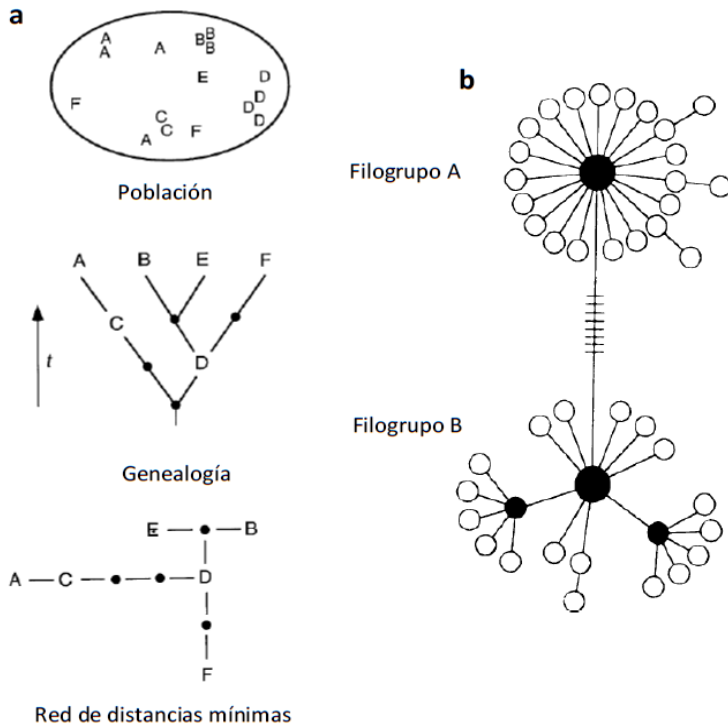


Figura 1. **a)** Se muestra una población de 6 haplotipos (A-F) con la genealogía verdadera (desconocida) y la red de distancias mínimas (inferida). **b)** Red de haplotipos hipotética de una especie. Cada círculo representa un haplotipo. Se observan dos filogrupos (haplogrupos) claramente separados por ocho pasos mutacionales. Dentro de cada uno de ellos, los distintos haplotipos periféricos (derivados) se encuentran conectados por los haplotipos ancestrales (en negro) y separados entre ellos por un solo paso mutacional. (Tomado y modificado de Schaal y Olsen 2000 y Lanteri y Confalonieri 2003).

persistentes o incluso la recombinación, y los representan de una forma legible (Lanteri y Confalonieri 2009). Estos se conocen como “redes” (Fig. 1) y emplean la información disponible en las secuencias para representar sus relaciones (Posada y Crandall 2001a). En estas redes, los haplotipos centrales se consideran ancestrales o intermedios, puesto que la mayoría de estas redes pretenden minimizar la distancia en pasos mutacionales entre los haplotipos que conducen a toda la gama observada en las poblaciones (evento de multifurcación) y debido a esto es por lo que las variantes de haplotipos no se encuentran ordenadas de una forma temporal sino por un criterio que disminuye las distancias entre ellas (Fig. 1a) (Vázquez-Domínguez et al. 2009; Schaal y Olsen 2001). Las redes también permiten apreciar eventos de homoplasia o recombinación, que se representan como “anillos” y ver cuáles son los “caminos” o pasos mutacionales que llevan a los diferentes haplotipos y dichos caminos pueden ser más de uno para cada haplotipo (Schaal y Olsen 2000; Vázquez-Domínguez et al. 2009). Para aquellas secuencias o haplotipos existentes (de la muestra) que están conectados por más de un paso mutacional, la red puede contener haplotipos intermedios inferidos los cuales pueden no haber sido muestreados, estar extintos o tal vez nunca existieron (Schaal y Olsen 2000; Lanteri y Confalonieri 2009). Adicionalmente, las redes de haplotipos presentan las variantes iguales, aunque provengan de regiones diferentes, en un solo círculo del diagrama codificando su origen geográfico con una clave gráfica (Piñero et al. 2008).

## 2. Teoría de coalescencia y demografía histórica

La coalescencia es la aproximación más poderosa para interpretar la variación observada del DNA (Hamilton 2009). Es un modelo retrospectivo, inverso a la divergencia del mtDNA basado en la premisa de que los alelos de un gen de una población se derivan de un solo alelo ancestral que existió en algún punto del pasado (Schaal y Olsen 2000; Piñero et al. 2008). El concepto de linaje genealógico se aborda entonces desde una perspectiva coalescente, donde cada uno de las variantes haplotípicas actuales es el descendiente último de una serie de haplotipos que se modificaron históricamente, y que aumentan su divergencia entre sí con el tiempo. (Avice 2000; Hamilton 2009). La conexión genealógica es necesaria porque en las poblaciones naturales, las hembras contribuyen con un número diferente de hijas a la progenie de la generación siguiente, así que cuando se heredan los haplotipos en las generaciones siguientes, en el árbol matrilineal algunas ramas proliferan y otras mueren (Avice 2009). La coalescencia matrilineal no implica que solo una hembra existió en la generación coalescente, sino que los linajes de otras hembras de la misma generación no sobrevivieron a través de sus descendientes (Vázquez-Domínguez et al. 2009). Esto no sería posible si, por ejemplo, una madre tuviese exactamente una hija en cada generación que la sustituyera, pues en ese caso no habría relaciones genealógicas y, por tanto, no habría coalescencia. Por lo tanto, en la reproducción diferencial se fundamenta el concepto coalescente (Avice 2009).

El objetivo de los métodos coalescentes es reconocer el impacto que tienen las fluctuaciones en el tamaño efectivo poblacional histórico ( $N_e$ ) en la topología de una genealogía, puesto que hay una relación estrecha entre el polimorfismo observado dentro de las secuencias haplotípicas y el tiempo de coalescencia (Hudson 1991; Emerson et al. 2001; Hamilton 2009), de manera que en aquellas poblaciones donde los haplotipos son mutacionalmente más distantes, se infiere un  $N_e$  grande debido a que el tiempo de coalescencia se alarga respecto al tiempo de coalescencia de poblaciones más pequeñas, donde dichos tiempos de coalescencia se acortan debido al poco polimorfismo de las secuencias (Emerson et al. 2001). Primeramente, para medir los efectos de una fuerza sobre la diversidad genética de una población, se necesita un modelo neutral contra el cual comparar los datos empíricos, para ello usamos un modelo de Wright-Fisher de evolución neutral de los genes, lo que provee un marco de trabajo para el desarrollo de distintas pruebas y métodos que permiten inferir diferentes escenarios demográficos históricos de manera estadísticamente confiable extrayendo información de la topología de las genealogías o filogramas (Emerson et al. 2001). Algunos métodos coalescentes incluyen otros procesos como patrones de mutación, migración o recombinación (Piñero et al. 2008).

Las propiedades de las genealogías dependen de ciertos factores como el tamaño poblacional, la estructura geográfica y la presencia de alelos mantenidos por selección (Hudson 1991). Esto es importante ya que las genealogías se moldean según el número de

crías que dejan las generaciones presentes, si existe migración o si hay alelos mantenidos por ser selectivamente ventajosos (Hudson 1991).

Los estadísticos colascentes son métodos que nos permiten inferir cambios demográficos históricos y se fundamentan en: a) genealogías con mutaciones neutrales, con una tasa de mutación constante bajo el modelo de sitios infinitos. De esa forma las mutaciones se acumulan en la genealogía y podemos estudiar sus propiedades sin alterar su topología; b) un modelo sin selección ni recombinación (Hey y Machado 2003); c) que todos los individuos de la generación previa ( $t+1$ ) tienen la misma probabilidad de ser el ancestro de alguno de los individuos ( $n$ ) de la siguiente generación ( $t$ ) (Hudson 1991; Emerson et al. 2001; Hey y Machado 2003; Hamilton 2009); d) la probabilidad de que más de dos individuos coalescan en la generación inmediata anterior es tan baja que puede ser ignorada (Hudson 1991).

La D de Tajima es un sumario estadístico que requiere de la comparación de dos medidas del polimorfismo. Una de ellas se calcula a partir de los supuestos anteriormente mencionados, tomando el número de sitios segregantes ( $S$ ), para obtener el valor de  $\theta$  que es un índice de polimorfismo bajo un modelo de evolución neutral (Tajima 1989; Hamilton 2009). En este tipo de modelos se considera que el número de sitios segregantes bajo un modelo neutral es una función del índice de mutación dentro de una población de  $N_e$  linajes matrilineales, a través de la expresión:  $\theta=2N_e\mu$  (Rogers y Harpending 1992; Schneider y Excoffier 1999; Parra-Olea et al. 2012). Bajo los supuestos anteriores se obtiene la siguiente expresión que relaciona  $S$ , el número de  $k$  secuencias en la muestra y el índice  $\theta$  (Hey y Machado 2003; Hamilton 2009).

$$\theta = \frac{S}{\sum_{k=1}^{n-1} \frac{1}{k}}$$

La otra medida de polimorfismo es  $\pi$  (o también  $\theta_\pi$ ), se conoce como diversidad nucleotídica y es un índice del polimorfismo observado en las  $k$  secuencias que considera la proporción de diferencias nucleotídicas entre dos secuencias respecto al total de sitios ( $d_{ij}$ ) y pondera esta proporción en función de la frecuencia de las secuencias comparadas ( $p_i$  y  $p_j$ ) (Hamilton 2009).

$$\pi = \frac{k}{k-1} \sum_{i=1}^k \sum_{j>i}^k p_i p_j d_{ij}$$

La expresión final de la D de Tajima es como sigue:

$$D = \frac{\theta_\pi - \theta_S}{\sqrt{\text{var}(\theta_\pi - \theta_S)}}$$

Los cambios en el tamaño efectivo poblacional y la selección natural alteran la probabilidad de coalescencia esperada y por lo tanto la longitud de las ramas en una genealogía (Hey y Machado 2003; Hamilton 2009). La  $D$  de Tajima relaciona los valores de  $\theta_S$  y  $\theta_\pi$  para evaluar un modelo que asume alelos neutros y un tamaño poblacional constante contra un modelo alternativo que mide la acumulación de las mutaciones en las  $k$  secuencias y si estas se encuentran en baja o alta frecuencia (Fu y Li 1993; Hamilton 2009). El modelo neutro que constituye la hipótesis nula se obtiene cuando la genealogía tiene las ramas internas y externas aproximadamente de la misma longitud, con una  $D$  de Tajima igual a cero (Fig. 2), lo cual implica que el número de mutaciones esperadas en las ramas internas y externas es igual al que se observa, por lo que el tiempo de coalescencia en las ramas internas y externas es el mismo y se infiere un tamaño poblacional constante a través del tiempo y alelos que son selectivamente neutrales.

Cuando se alteran la probabilidad de coalescencia hacia el presente o hacia el pasado, es decir, cambian la longitud de las ramas internas en relación con la longitud de las ramas externas, la  $D$  de Tajima adquiere valores diferentes de cero, y esto implica que las secuencias se desvían de un modelo selectivamente neutral o que han experimentado cambios poblacionales (Fig. 2) (Hamilton 2009). El crecimiento poblacional o la selección balanceadora ocasiona que las probabilidades de coalescencia de las ramas externas incrementen respecto a las de las internas y por lo tanto su tiempo de coalescencia de las primeras es más largo (aumenta su tiempo de coalescencia respecto a las internas) debido a la acumulación de mutaciones de baja frecuencia. Debido a esto, toma más tiempo llegar a las mutaciones compartidas, es decir, a las ramas internas (disminuye el varo de  $\pi$ , con una  $D < 0$ ). Por otro lado, el decremento poblacional dado por un cuello de botella o un evento de selección direccional, disminuye la probabilidad de coalescencia de las ramas internas, haciendo que se elonguen cada vez más (aumenta su tiempo de coalescencia respecto a las externas) y esto permite la acumulación de mutaciones de alta ocurrencia.

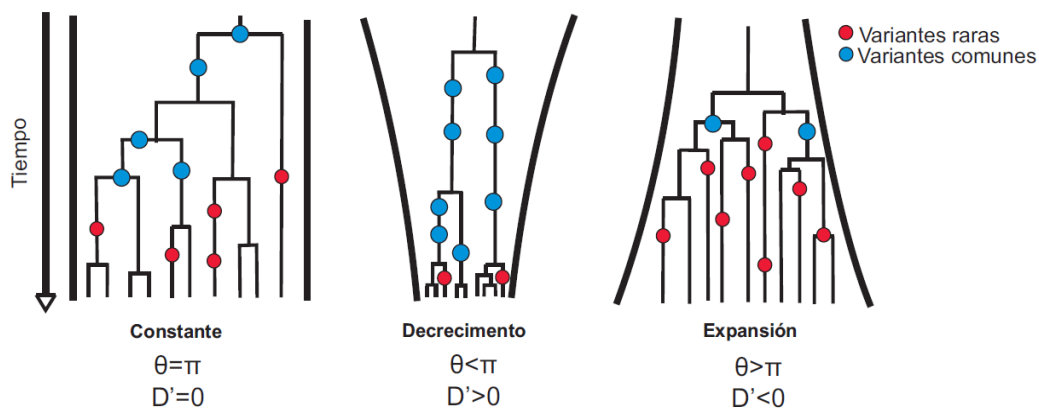


Figura 2. Los cambios demográficos o la selección pueden moldear las genealogías de forma distintiva. Estos cambios pueden ser inferidos mediante la evaluación con sumarios estadísticos (ver texto). (Tomado y modificado de Hamilton 2009).

El hecho de que se presenten en las ramas internas permitirá que estén presentes en mayor frecuencia dentro de las comparaciones de secuencias pareadas que existan (incrementa el valor de  $\pi$ , con una  $D < 0$ ) (Hamilton 2009).

Las distribuciones mismatch son otro método para inferir cambios demográficos (Fig. 3) (Rogers y Harpending 1992). Se definen como la distribución de frecuencias del número de sitios nucleotídicos que difieren entre cada uno de los pares únicos de secuencias en muestras de una misma especie. En una perspectiva del presente hacia el pasado, cuando hay mutación neutral y se puede asumir un modelo de sitios infinitos, los dos linajes anteriores al último evento de coalescencia en una población también difieren por el mayor número de mutaciones ya que el número esperado de mutaciones también es proporcional al tiempo que un linaje persiste (Fig. 3a). Estos dos linajes experimentarán el mayor grado de mismatch (Fig. 3b, c). En contraste, los linajes cercanos al presente tienden a tener un tiempo de coalescencia más corto con una correspondiente acumulación de pocas mutaciones. Sin embargo, estos linajes recientes también heredan todas las mutaciones que ocurrieron en los linajes progenitores.

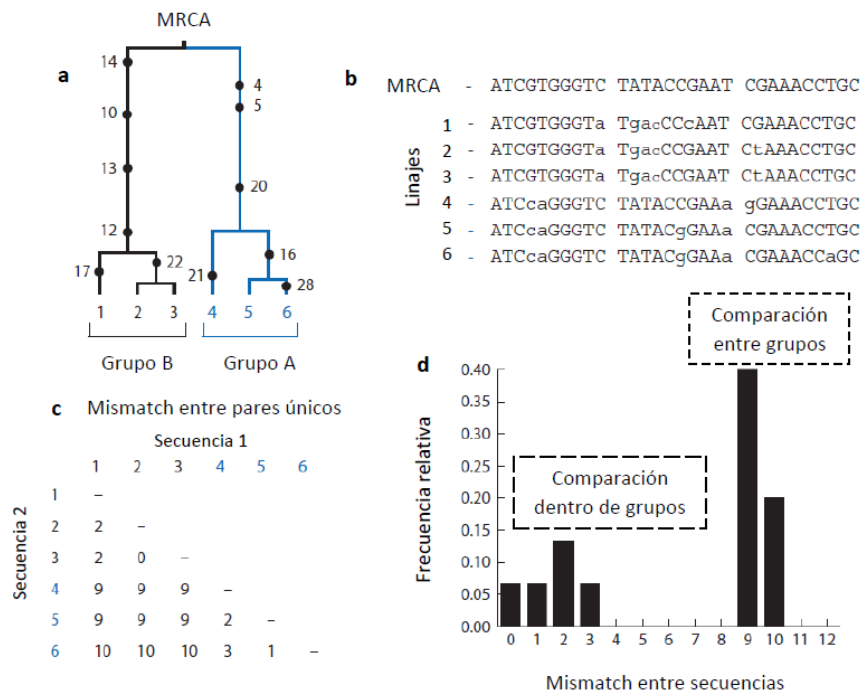


Figura 3. **a**) Una genealogía carga múltiples mutaciones en sus linajes. Los dos linajes más antiguos se distinguen como grupo A y grupo B. **b**) Sus descendientes (1, 2 y 3 del grupo A y 4, 5 y 6 del grupo B) heredan las mutaciones de sus respectivos linajes ancestrales desde el MRCA. **c**) Cuando se comparan los pares posibles de secuencias se observa que aquellos pares formados por secuencias pertenecientes al mismo linaje ancestral difieren en menor medida que en los pares donde pertenecen a un linaje distinto. **d**) Si una población ha experimentado un  $N_e$  constante, al poner los valores de mismatch en una gráfica de distribución de frecuencias se observarán dos valores modales uno de bajo mismatch y otro de alto mismatch. (Tomado y modificado de Hamilton 2009).

Cuando los linajes presentes que se comparan son de ancestros lejanamente relacionados ocurre un valor alto de mismatch, y cuando los linajes presentes comparados son de ancestros recientemente relacionados, ocurre un valor bajo de mismatch.

Las distribuciones de poblaciones que han experimentado un  $N_e$  constante tienden a tener dos grupos modales (uno del valor menor y otro del valor mayor de mismatch) en la distribución de frecuencias, esto es a causa de un valor equiparable de tiempos de coalescencia tanto de las ramas internas como de las ramas externas de una genealogía (Fig. 3d). En contraste, las poblaciones que han experimentado un incremento pronunciado del  $N_e$  la mayoría de los eventos coalescentes tienen lugar en las ramas internas puesto que las probabilidades de coalescencia decrecen hacia el presente, por lo que se acumularán una gran cantidad de mutaciones únicas en los linajes presentes dado que divergieron en un tiempo mayor hacia el pasado que lo esperado bajo el modelo neutral de  $N_e$  constante. Por lo anterior, la moda en la distribución de los valores bajos de mismatch se pierde quedando solo la de los valores altos. Por el contrario, cuando una población ha experimentado un continuo descenso del  $N_e$  las probabilidades de coalescencia son más altas hacia el presente, por lo que hay poca acumulación de mutaciones privadas o únicas y una alta acumulación de mutaciones compartidas (debido a que hay un exceso de mutaciones en las ramas internas respecto a aquellas de las ramas externas), haciendo que el valor modal alto de mismatch de la distribución se pierda y solo se conserve el valor modal bajo. En cualquiera de los dos casos de fluctuación poblacional, la distribución bimodal es reemplazada por una de carácter unimodal.

Un método más novedoso es el *Bayesian Skyline Plot* (BSP) que es una aproximación bayesiana basada en coalescencia de los eventos demográficos y está basado en la reconstrucción de una genealogía ultramétrica (con la misma distancia de la raíz a la punta para cada rama) que mide el tamaño de los intervalos de los internodos en eventos mutacionales (es decir, asume un reloj molecular estricto o relajado con un determinado modelo de sustitución nucleotídica). El orden de estos basado en la genealogía permite la estimación de la media armónica del tamaño efectivo poblacional para cada intervalo entre los eventos de coalescencia (Pybus et al. 2000; Emerson et al. 2001; Drummond et al. 2005).

Si se considera un conjunto de  $n$  secuencias muestreadas al azar, la genealogía de las muestras contendrá  $n-1$  intervalos de internodos ordenados. Para cada uno de ellos se puede determinar un tamaño temporal del intervalo y después escalar el tiempo en pasos mutacionales, empleando una tasa  $\mu$  de número de sustituciones por sitio por generación. Luego, se puede hacer un estimado del  $N_e$  ( $M_i$ ) en escala logarítmica para cada intervalo y lo graficarlo contra el tiempo, por lo que un incremento de forma lineal representa un incremento del  $N_e$  de forma exponencial.



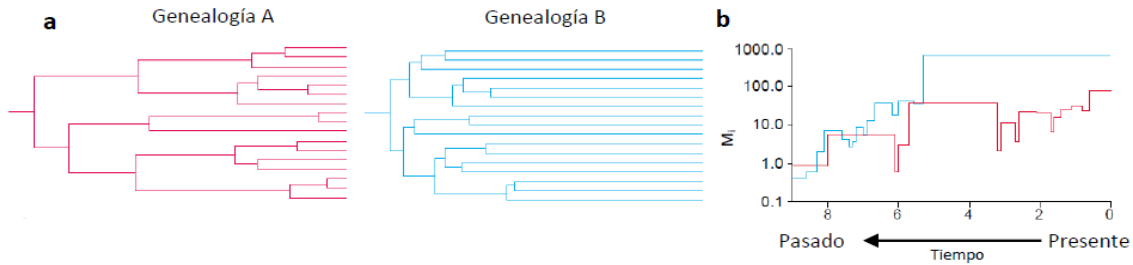


Figura 4. a) Dos genealogías que miden el tamaño de los internodos en función de los pasos mutacionales. b) La gráfica BSP indica un crecimiento exponencial del  $N_e$  en el pasado reciente para la genealogía A, que se refleja con un mayor número de linajes hacia el presente con solo ligeros incrementos en el pasado más remoto. En el caso de la genealogía B el crecimiento exponencial del  $N_e$  con una proliferación de nodos y linajes ocurrió en el pasado remoto y después de eso se ha mostrado constante (Tomado y modificado de Emerson et al. 2001).

## Antecedentes

De las 708 especies de salamandras reportadas dentro del Orden Caudata, la familia Plethodontidae está conformada por 466 especies, que representan el 65.8% del total (AmphibiaWeb 2017). Esta familia es conocida por ser la familia más grande y por ser la única que se ha diversificado extensivamente en México y Centroamérica (Rovito et al. 2015). Dentro de la familia Plethodontidae, existe dos subfamilias: Plethodontinae con 97 especies y Hemidactyliinae 369 especies (AmphibiaWeb 2017). Esta última subfamilia contiene a su vez a la tribu Bolitoglossini, el único taxón que incluye a los pletodóntidos tropicales (Rovito y Parra-Olea 2016). Los Bolitoglossini incluyen 295 especies, contribuyendo con dos terceras partes del total de especies de la familia (Rovito et al. 2015). Están clasificados en 12 géneros de los cuales *Bolitoglossa* y *Pseudoeurycea* son los más diversos con 132 y 39 especies, respectivamente (Segovia-Ramírez 2015; AmphibiaWeb 2017).

Al ser el taxón más diverso de Caudados, se ha tratado de resolver la historia biogeográfica de la tribu Bolitoglossini, y se encontró que ha sido altamente influenciada por los procesos orogénicos y climáticos de centro y sur de América durante las últimas decenas de millones de años, cuando surgió el ancestro común de esta tribu, cuyo origen es neártico (Rovito y Parra-Olea 2016). Específicamente, las altas montañas de México han sido consideradas como “hotspots” para la formación de biotas completas (Bryson et al. 2011b), donde la Faja Volcánica Transmexicana (FVTM) y las montañas del Sur de México que incluye a la Sierra Madre del Sur (SMS) junto con la Sierra de Oaxaca (SO), han jugado un papel de mayor importancia para las salamandras tropicales puesto que se han resuelto como escenarios ancestrales que dieron origen a la mayor diversidad de géneros de pletodóntidos en toda Mesoamérica (Rovito et al. 2015; Rovito y Parra-Olea 2016). El segundo género más diverso de estos es *Pseudoeurycea*, que ha alcanzado la mayor diversidad de especies en las

montañas de sur de México (SMS+SO) con 26 especies, mientras que el segundo lugar de diversidad de este género ocurre en la FVTM con 20 especies (Rovito et al. 2015).

Poco se sabe acerca del patrón de dispersión que siguió el género *Pseudoeurycea* en la FVTM y solo una aproximación filogeográfica realizada con *P. leprosa* es la que mejor ha ayudado a entender cómo la formación y evolución de la FVTM afectó la dispersión del género *Pseudoeurycea* (Parra-Olea et al. 2012; Rovito y Parra-Olea 2016). Esta salamandra se distribuye entre los 2000-3200 msnm, y su rango de distribución es uno de los más extensos reportados, que abarca desde la zona más Noreste de la FVTM en los sistemas volcánicos de Cofre de Perote-Pico de Orizaba, el volcán la Malinche, la Sierra Nevada (sistema Popocatepetl-Iztaccihuatl), la Sierra de las Cruces, hasta el volcán Nevado de Toluca, en la porción central de la FVTM (Parra-Olea et al. 2012). Se reconoce que el surgimiento y evolución de esta especie (hace 3-3.8Ma) concuerda con la ausencia de vulcanismo en la porción este de la FVTM (hace 5-3Ma). Así mismo, la fragmentación de su linaje ancestral concuerda con la formación del volcán Cofre de Perote (hace aprox. 1.3 Ma) y el avance de esta especie desde el noreste hacia su porción central más reciente en la FVTM concuerdan con el tiempo del Último Máximo Glaciar (UMG) del Pleistoceno hace 700 Ka (Parra-Olea et al. 2012; Rovito y Parra-Olea 2016).

A partir de este análisis se puso de manifiesto la importancia de la afinidad entre las salamandras de alta montaña y las condiciones climáticas templadas-frías que imperan en los bosques de *Pinus-Quercus* (Pino-Encino) y *Pinus-Abies* (Pino-Oyamel) de los sistemas volcánicos de la FVTM, así como su importancia para la diversificación de este género (Velo-Antón et al 2013). Más enfáticamente, se esperaría que para la diversificación del género *Pseudoeurycea*, la especiación de las salamandras microendémicas tuvieran relación con el descenso-ascenso de la cobertura vegetal de las altas montañas durante los ciclos glaciario-interglaciares de esta época (Aguirre-Planter et al. 2000; Caballero et al. 2010; Ortiz-Medrano et al. 2008; Moreno-Letelier y Piñero 2009). Por ejemplo, se encuentra que *P. robertsi* (endémica del Nevado de Toluca) y *P. altamontana* (endémica del complejo volcánico del Chichinautzin) divergieron hace aprox. 900 Ka. Por su parte, *P. melanomolga*, microendémica del Cofre de Perote, cuya especie hermana es *P. gadovii*, microendémica del Pico de Orizaba, especieron hace aprox. 800 Ka como lo indican las dataciones moleculares (Rovito y Parra-Olea 2016). Todos estos procesos tuvieron lugar en la FVTM, en un periodo donde el paisaje orográfico no tuvo cambios mayores, es decir, que las fluctuaciones climáticas por si solas pudieron haber guiado los procesos de especiación dentro de este género.

El patrón general para explicar la diversificación de las biotas de alta montaña durante los ciclos glaciario-interglaciario del Pleistoceno es el de “*sky islands*” (Mastretta-Yanes et al. 2015) y propone que cada montaña, estuviese en formación o ya existente, serviría como refugio para las poblaciones de una especie donde quedarían aisladas en los periodos interglaciares, mientras que en los periodos glaciares se daría un descenso de la vegetación

alpina con la consiguiente extensión de corredores donde podría ocurrir el flujo génico (Caballero et al. 2010; Mastretta-Yanes et al. 2015). De esta forma se puede explicar el surgimiento por medio de procesos de especiación por vicarianza y efectos fundadores en cada uno de los sistemas volcánicos (Segovia-Sánchez 2015). Sin embargo, solo un estudio ha abordado la cuestión de los modelos de especiación más probables para *P. gadovii* y *P. melanomolga*, y ninguno que evalúe el patrón filogeográfico general de *Pseudoeurycea*.

Por otra parte, la diferenciación genética interespecífica que permite conocer la estructuración existe en el género *Pseudoeurycea* solo se ha abordado con un tamaño de muestras pequeño y por medio de isoenzimas, el cual se considera hoy en día como marcador molecular de baja resolución (Lynch et al 1983; Castellanos-Morales et al. 2015). Así mismo, la diferenciación genética entre poblaciones que permite conocer el grado de divergencia entre los linajes genealógicos de una especie, solo ha sido evaluada para *P. leprosa*, es decir, que solo se conoce la diferenciación poblacional que se ha presentado en una especie de amplia distribución y aquella diferenciación de las especies microendémicas de la FVTM es desconocida (Segovia-Sánchez 2015).

Lo anterior supone existe una brecha muy grande de información acerca de los procesos inter e intrapoblacionales que ocurrieron y que ocurren en el género *Pseudoeurycea*. Aunque evaluar la diferenciación genética de una especie de amplia distribución puede ser un indicador general para inferir la diversificación del género en la FVTM, no se puede saber nada acerca de los procesos de diferenciación ulteriores que ocurren en las especies microendémicas. Esto es importante ya que al tratarse de especies microendémicas podemos esperar poblaciones pequeñas, con poca diversidad genética, y posiblemente no continuas o fragmentadas (Aguilar-Miguel 2005; Sunny et al. 2015). Así mismo, las especies con distribución restringida suelen presentar bajos niveles de estructuración genética y tamaños efectivos poblacionales pequeños (Sunny et al. 2014). Además, todas las salamandras microendémicas de la FVTM se encuentran en una categoría de riesgo de la IUCN, ya sea como vulnerables, en peligro o críticamente amenazadas (Wake et al. 2016).

Esto las convierte por un lado, como un modelo biológico interesante para describir el grado de estructuración que puede alcanzar una especie de salamandra de distribución restringida y cuyo origen se calcula reciente. Inclusive, conocer la rapidez con la que los linajes genealógicos puede diferenciarse hasta alcanzar un estado de monofilia recíproca, con lo que se infiere un aislamiento geográfico a largo plazo para dar lugar al surgimiento de poblaciones independientes o incluso, subespecies (Avice 2000; Moritz 2002). También se puede comparar esta información con la documentada para una especie de distribución amplia dentro de la FVTM, como *P. leprosa* (la única documentada hasta la fecha), y saber si existe o no una tendencia general en los factores de diferenciación entre las salamandras de este género. Por otro lado, es necesaria una evaluación que genere información sobre los niveles de diversidad genética alcanzados por dichas especies y contextualizar dicha

información con las condiciones de conservación preponderantes en la zona donde habita (Taylor y Dizon 1999; Mastretta-Yanes et al. 2014).

### **Hipótesis**

Debido a que *P. robertsi* es una especie de origen reciente y de distribución restringida se espera que sus poblaciones presenten baja diversidad haplotípica y baja divergencia genealógica entre linajes además de fluctuaciones en su tamaño efectivo poblacional a través del tiempo.

### **Objetivos**

**Describir** la diferenciación genética y reconstruir la historia demográfica de las poblaciones de *P. robertsi* utilizando el gen *cyt b*.

#### 1. Objetivos Particulares

- Obtener la diversidad genética y reconocer si existen grupos genéticos para los individuos de esta especie.
- Reconstruir las relaciones genealógicas de las variantes genéticas presentes en las poblaciones.
- Reconstruir la demografía histórica que se han presentado en dichas poblaciones a lo largo del tiempo.
- Con base en la información obtenida, hacer un reconocimiento de las medidas de conservación que deben ser tomadas dentro del APFFNT.

## Materiales y métodos

### 1. Zona de Estudio

El APFFNT (Fig. 5) se localiza en los municipios de Almoloya de Juárez, Amanalco, Calimaya, Coatepec, Harinas, Temascaltepec, Tenango del Valle, Toluca, Villa Guerrero, Villa Victoria y Zinacantepec en el Estado de México, cubriendo un área de cincuenta y tres mil quinientas noventa hectáreas (53,590 ha; DOF, 2013) y comprendida entre los 3000 y los 4680 msnm (Bille, 2009).

El Nevado de Toluca fue declarado Parque Nacional en 1936 (DOF 1936) pero actualmente se ha derogado esta categoría y se ha establecido una de rango inferior, a saber, Área de Protección de Flora y Fauna (DOF 2013).

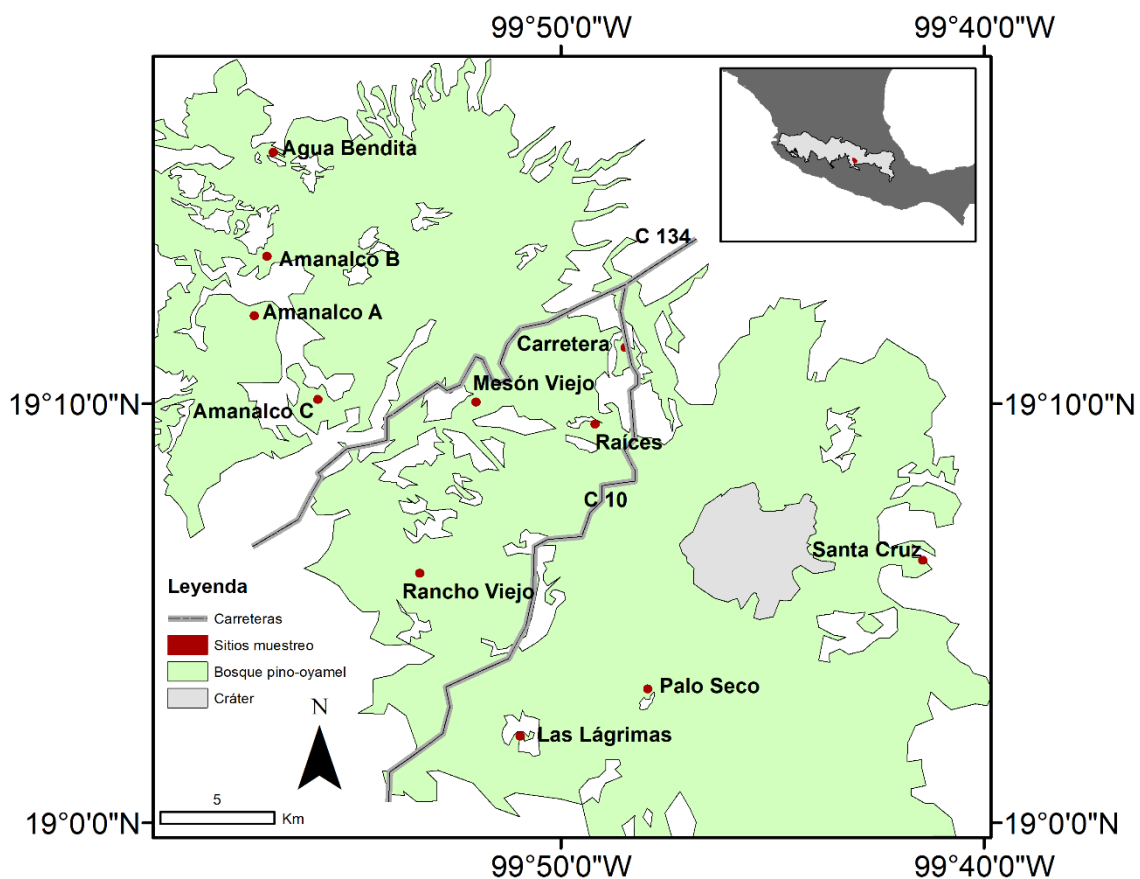


Figura 5. El APFFNT con los 11 sitios de muestreo señalados con puntos rojos y el cráter del volcán sombreado en gris. También se observan las carreteras 10 y 134 que atraviesan el APFFNT y el área de bosque mixto dentro de la misma.

## 2. Muestreo en Campo

Se muestrearon 11 sitios dentro del APFFNT para cubrir todo el rango latitudinal de norte a sur (Fig. 5; Tabla 1), registrando el uso de suelo (que mostraron distintos grados de perturbación) así como el número de individuos observados y muestreando máximo 9 individuos por sitio o los que se pudieran encontrar con el fin de homogenizar nuestro tamaño de muestra en cada sitio. Se realizó el mismo esfuerzo de muestreo con 3 personas por 2 hrs. efectivas/sitio. El muestreo se realizó durante las temporadas de lluvias que comprende de mayo a noviembre de 2016 con el permiso de colecta número 09/K6-1275/05/16.

Tabla 1. Sitios de muestro y las abreviaturas usadas en los análisis.

<b>Sitio/Localidad</b>	<b>Abreviaturas</b>
Agua bendita	AG; G
Amanalco A	AMA; A
Amanalco B	AMAB; B
Amanalco C	AMAC; a
Carretera	CAR; C
Mesón Viejo	MV; M
Raíces	RAZ; Z
Rancho Viejo	RAN; R
Santa Cruz	STC; S
Palo Seco	PAL;P
Las Lágrimas	LAG; L

Se colectaron muestras de tejido por ectomización de 2mm<sup>2</sup> de tejido de la cola y se preservaron en etanol al 90% en tubos eppendorf®. Posteriormente se almacenaron en congelación a -20°C hasta ser procesadas. Esta metodología ha demostrado ser de bajo impacto porque no afecta la supervivencia y crecimiento de las salamandras (Arntzen et al. 1999; Polich et al. 2013).

## 3. Extracción de DNA

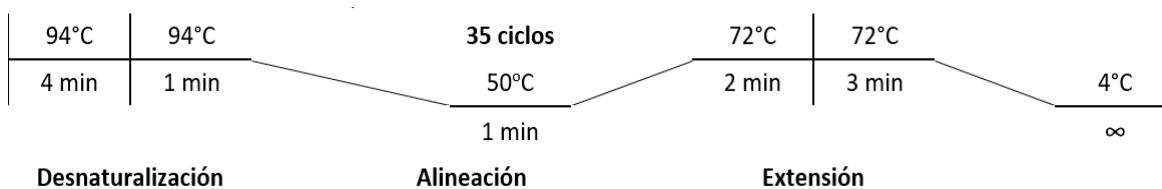
El DNA se extrajo mediante el kit comercial DNeasy Blood and Tissue Kit (QUIAGEN®). La integridad del DNA se observó mediante electroforesis con geles de agarosa al 1.5% y se corrieron a 120V y 500mA, usando RedGel como agente intercalante para permitir la visualización del DNA al exponerse a luz UV. Se utilizó un marcador molecular de DNA con fragmentos de tamaño conocido (100-1000 pb) para corroborar la integridad y el tamaño del DNA.

#### 4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la secuenciación de DNA mitocondrial se utilizaron los siguientes oligonucleótidos empleados anteriormente por Parra-Olea 2002 para pletodóntidos y desarrollados por Moritz et al. 1992:

INICIADOR	SECUENCIA
<b>MVZ 15</b>	GAACTAATGGCCCACACQQTACGNAA
<b>MVZ 16</b>	AAATAGGAARTATCAYTCTGGTTTRAT

Los oligonucleótidos se estandarizaron utilizando un volumen de reacción de 15 (ver ANEXO 3). Una vez hecho esto, se procedió a amplificar todas las muestras bajo las siguientes condiciones:



#### 5. Electroforesis del producto de PCR

El producto de PCR se somete a una electroforesis para corroborar que el tamaño del fragmento obtenido coincidiera con el tamaño de producto esperado según la literatura (700-800 bp). Para ello, se cargaron 3 $\mu$ L de producto de PCR con 5 $\mu$ L de Buffer de carga y un marcador de DNA de 100-1000 pb para correr en gel de agarosa al 1.5% (ver ANEXO 2) a 120Volts, 500MA, 12 W por 30 minutos. Se tiñó con bromuro de etidio al 5% durante 10min. con agitación a 50 rpm. Finalmente, se colocó el gel en agua bidestilada durante 2 a 3 minutos y se tomó la lectura de las bandas en el gel bajo una lámpara de luz ultravioleta (480nm).

#### 6. Secuenciación de las muestras

Las secuencias se enviaron al laboratorio de servicios genómicos, LANGEBIO (CINVESTAV, unidad Irapuato) para ser secuenciadas.

#### 7. Búsqueda BLAST

Para confirmar la identidad del fragmento amplificado y secuenciado se realizó una búsqueda de secuencias mediante la herramienta Nucleotide BLAST del NCBI y empleando la optimización megablast para buscar en toda la base de datos y cotejar secuencias altamente similares. Esto ayuda a evitar que un fragmento de tamaño similar, pero de

procedencia diferente al de nuestro gen y especie de interés se considere dentro del análisis y produzcan una interpretación errónea de los datos.

#### 8. Edición y alineamiento de secuencias

Las secuencias se visualizaron por medio del software FINCHTV 1.4.0 (Geospiza 2004-2006) y los extremos donde la lectura del electroferograma tenía baja resolución fueron recortados y aquellos de mala calidad fueron desechados. Posteriormente, las secuencias se alinearon con el software MEGA 6 (Tamura et al. 2013) mediante el algoritmo MUSCLE usando los parámetros por default. Los extremos se recortaron después del alineamiento para tener una misma longitud en todas las secuencias. Esto resulto en una longitud final de 783 pb.

#### 9. Análisis de diversidad genética

Con el programa DNASP 5.10.01 (Librado y Rozas 2009) se calculó la diversidad haplotípica ( $H_d$ ), el número de haplotipos ( $h$ ), la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), el número de sitios segregantes ( $S$ ) y los singletons ( $U$ , mutaciones que se encuentran en una sola secuencia de la muestra).

#### 10. Relaciones genealógicas

Se determinó el modelo de mutación que mejor se ajusta a nuestras secuencias, se utilizó el programa JMODELTEST 2.1.10 (Posada y Crandall 2001b; Darriba et al. 2011) con base en la corrección de Akaike (AIC).

Se realizó un análisis de inferencia Bayesiana para reconstruir la genealogía del gen *cyt b* empleando el programa MRBAYES 3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck 2003). Como grupo externo se utilizó *P. logicauda*. Se realizaron 2 corridas independientes, cada una con  $1 \times 10^6$  generaciones, muestreando un árbol cada 200 iteraciones. Se usaron cuatro cadenas calientes con el esquema de calentamiento por default. Como burnin se eliminaron el 20% de los primeros árboles. Con el modelo de mutación obtenido se utilizaron cuatro categorías gamma. Finalmente se obtuvo un árbol consenso de mayoría del 50%. El árbol resultante se editó con FIGTREE 1.3.1 (Rambaut 2006-2014).

Se construyeron dos redes de haplotipos, la primera se realizó con el programa NETWORK 3.5.1.2 (disponible en <http://www.fluxus-engineering.com/>) que utiliza un algoritmo de Median-Joining (MJ). La segunda red se construyó utilizando el programa SPLITSTREE 4.14.5 (Huson y Bryant 2006), el cual utiliza un algoritmo de Neighbor-Net (NN) que permite utilizar las frecuencias empíricas de las bases nucleotídicas, las tasas de transición/transversión además del factor Gamma y la proporción de sitios invariables proporcionados por el modelo mutacional seleccionado.



## 11. Estructura genética

Para estimar la estructura poblacional en el espacio se emplearon dos aproximaciones, una mediante STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2014) y otra mediante BAPS 5.3 (Corander et al. 2009). STRUCTURE permite definir el número de K grupos genéticos que existen en nuestro set de datos asignando a los individuos a cada grupo según su genotipo y también proporcionando la probabilidad de pertenencia de cada individuo a uno o varios grupos genéticos (admixia) (Brandt et al. 2014; Rius y Darling 2014), mientras que en BAPS, un modelo de no admixia asigna a cada individuo a una sola población sin tomar en cuenta la probabilidad de pertenecer a otras. Las condiciones especificadas para BAPS fueron una K=10 y 20 repeticiones usando el algoritmo de “clustering for linked loci”, mientras que las condiciones de STRUCTURE fueron un modelo de frecuencias alélicas correlacionadas implementando el modelo de admixia. Para STRUCTURE se usó una corrida de MCMC con una longitud de  $10^5$  y un burn-in de  $5 \times 10^4$ , con 10 repeticiones para cada K para encontrar el agrupamiento más adecuado, con un intervalo de valores para K de 2 a 20 grupos. Posteriormente se empleó STRUCTURE HARVESTER (Earl y vonHoldt 2012) para evaluar el número más probable de clusters genéticos en los datos por medio de dos métodos *ad hoc*: el valor de  $\Delta K$  de la prueba de Evanno (Evanno et al. 2005) y mediante el valor máximo de probabilidad posterior  $\ln(K)$  (Pritchard et al. 2000).

Además, utilizando los porcentajes de representatividad de los K grupos genéticos resultantes en cada uno de los sitios, se realizó un diagrama de pastel donde se muestra la porción que aporta cada cluster en la composición genética para cada sitio de muestreo y luego estos se sobreponen sobre el mapa de muestreo de cada sitio para observar el patrón de la divergencia genética entre sitios.

## 12. Estadísticos de resumen

Con el software DNASP se determinaron los estadísticos D de Tajima (Tajima 1989) y  $F_s$  de Fu (Fu 1997) para detectar eventos de cambios demográficos históricos. El índice Ruggedness de Harpending se usó para evaluar el ajuste a las distribuciones mismatch observadas a las distribuciones esperadas bajo un modelo de expansión poblacional (Sánchez-Sánchez et al. 2012). Un valor significativo de este valor indica que podemos rechazar un modelo de expansión poblacional. Todos estos valores fueron calculados y evaluados estadísticamente mediante las simulaciones coalescentes del software con  $2 \times 10^4$  réplicas para un nivel de significancia del 95% y 99%.

## 13. Distribuciones mismatch

Mediante el software DNASP se realizaron distribuciones de frecuencias de comparaciones pareadas de secuencias (mismatch) para cada uno de los grupos de secuencias de los grupos genealógicos encontrados comparándolas con un modelo de tamaño poblacional constante y un modelo de expansión demográfica. Mediante el índice ruggedness de Harpending implementado en el mismo software se evaluó el ajuste de la distribución observada con

aquella esperada bajo el modelo de expansión. Se realizó la simulación coalescente del software con  $2 \times 10^4$  réplicas para un nivel de significancia (CI) del 95% y 99%.

#### 14. Bayesian Skyline Plots (BSP's)

Un método bayesiano para examinar la evidencia de cambios históricos demográficos en cada linaje mitocondrial encontrado y para todas las secuencias obtenidas fue implementado con la paquetería de BEAST 1.8.4 (Drummond et al. 2007). Con el software BEAUTI (Drummond y Rambaut 2007) se especificó un reloj Lognormal relajado no correlacionado junto con el modelo de mutación determinado anteriormente (TN93+G+I) y un modelo coalescente de skyline bayesiano como Treeprior. Como prior para la tasa media de las ramas se especificó una distribución normal con una media de 0.0075 (Número de sustituciones por sitio/100 millones de años) y una desviación estándar de 0.0025 (Mueller 2006; Parra-Olea et al. 2012). Se usó una búsqueda por medio de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) con una longitud de cadena de  $7 \times 10^7$  generaciones muestreando un árbol cada 1000 generaciones y removiendo el 10% de muestras como burn-in. Para cada análisis se realizaron y se combinaron dos corridas independientes, verificando el estado estacionario de la probabilidad posterior con el software TRACER v1.5 (Drummond y Rambaut 2007). Se combinaron los archivos .log de las corridas con el software LOGCOMBINER v1.8.4 (Drummond y Rambaut 2007) y se visualizó la gráfica mediante la opción de reconstrucción bayesiana de skyline del software TRACER.

#### 15. Aislamiento por distancia

Para examinar el aislamiento por distancia se realizó la prueba de Mantel (Mantel 1967) en el software GENEALX 6.5 (Peakal y Smouse 2012) entre las distancias genéticas (Dxy: número promedio de sustituciones nucleotídicas por sitio entre poblaciones; y número promedio de diferencias nucleotídicas entre poblaciones) contra la distancia recta Euclidiana (ED).

## Resultados

### 1. Muestreo en campo

Encontramos que en los sitios ubicados más al norte del APFFNT como las localidades de Amanalco y Agua bendita predominaba una cobertura de bosque de *Abies* y hay evidencia de perturbación solo en AG. Por su parte, los sitios más al sur como LAG, PAL y STC presentan una cobertura de bosque mixto de *Pinus-Abies* con indicios de perturbación por actividades de tala (Tabla 2). Sin embargo, la porción latitudinalmente más céntrica del APFFNT presento la mayor perturbación de todas, al encontrar tanto actividades de tala, como agricultura, asentamientos humanos y el paso de dos carreteras que atraviesan toda el APFFNT, con presencia de manchones boscosos de bosque de *Oyamel* y *Pinus*.

Tabla 2. Sitios muestreados con el uso de suelo predominante encontrado, el número de individuos encontrados y mostrados así como el gradiente altitudinal para cada uno.

Sitio	Uso de Suelo (predominante)	#encontrados	#muestreados	msnm
AMA	Bosque oyamel.	46	9	2970-3000
RAN	Tala/campo de golf.	26	9	2880-2900
AMAB	Bosque oyamel.	22	9	2890-2950
MV	Bosque oyamel/carretera.	20	9	2960-2990
LAG	Bosque mixto fragmentado.	19	9	2982
PAL	Bosque mixto fragmentado/tala.	15	9	3230-3240
AMAC	Bosque oyamel.	11	9	2930
STC	Bosque mixto fragmentado.	9	9	3200-3220
CAR	Tala/agricultura/asentamientos.	9	9	3300-3325
AG	Tala.	7	7	2800-2890
RAZ	Bosque mixto fragmentado.	4	4	3235-3287

## 2. Depuración de las muestras

La muestra final incluyó un total de 71 secuencias (Tabla 2), se descartaron 21 por lecturas de mala calidad en el electroferograma o debido a que la búsqueda BLAST arrojó una baja similitud con nuestra especie de interés. Después del alineamiento de las secuencias, la longitud total final del alineamiento fue de 783 pb.

## 3. Relaciones Genealógicas

El modelo mutacional que mejor se ajustó a nuestros datos fue TN93+G+I (con  $p_{inv}=0.73$ ;  $\gamma$  shape=0.7280) y las frecuencias nucleotídicas estimadas fueron de A=29.88%, C=20.43%, G=0.1468% y T=35.01%, este modelo usado en los análisis subsecuentes. La genealogía del gen *cyt b* (Fig. 6) arrojó un árbol consenso con una topología que permite identificar dos linajes principales: el linaje Sur (linaje S, sombreado en verde en la Fig. 6) que comprende a las localidades de la ladera Sur del volcán e incluye los sitios PAL, LAG, STC y dos individuos de CAR, mientras que el linaje Norte-Oeste (linaje NO) comprende a todas las localidades de la ladera Norte y el resto de individuos de CAR. Dentro de este último se identifican a su vez dos subgrupos genealógicos, el primero es el subgrupo Inter-Carretera

(Sub IC, sombreado en azul en la Fig. 6) que es más basal y contiene a todos los individuos de los sitios MV y RAN, así como a dos individuos del sitio RAZ, tres del sitio CAR (todos dentro de la zona entre la carretera 134 y 10) y uno de la AMAC; mientras el segundo es el subgrupo Norte (sub N, sombreado en rojo en la Fig. 6) que contiene el resto de individuos de los sitios AMAC, RAZ, CAR y a todos los de los sitios AMA, AMAB y AG, que encuentran en la parte más noreste. De los dos linajes, el que presenta el valor de soporte de probabilidad posterior más bajo es el linaje S, con valor de 0.9955, mientras el linaje NO presenta un valor de 0.57. Se puede observar también que los individuos del sitio CAR se encuentran en ambos linajes y en ambos subgrupos de la genealogía. Los sitios RAZ y AMAC también se encontraron presentes en ambos subgrupos del linaje NO. Estas fueron los únicos cuyos individuos se hallan en más de un linaje. La red de haplotipos MJ muestra los 54 haplotipos de los 11 sitios (Fig. 7). Esta red muestra los haplotipos que se comparten entre los sitios, la distancia en pasos mutacionales para cada haplotipo y el tamaño del círculo de cada haplotipo es proporcional al número de individuos que lo posee. Se observa que hay una correspondencia entre las redes de haplotipos y los linajes de la genealogía ya que los haplotipos correspondientes a aquellas secuencias más estrechamente relacionadas en la genealogía se separan por menos pasos mutacionales dentro de la red, lo que permite identificar haplogrupos que corresponden a los linajes de la genealogía, donde aquellos haplotipos que pertenecen a distintos linajes se separan por un número mayor de pasos mutacionales. La mayor diversidad de haplotipos está contenida dentro del sub N con un 44.5% de todos los haplotipos muestreados, la menor diversidad podemos encontrarla en el sub IC con 20.37% y el linaje S contiene una tercera parte de la diversidad con 35.1%. La topología de la red MJ muestra pocos haplotipos compartidos y un gran número de haplotipos únicos (Fig. 7). Los sitios STC, MV y RAZ comparten haplotipos respectivamente con el sitio CAR, lo que sugiere una mezcla de haplotipos reciente entre estos sitios, colocando al haplotipo 3 que es compartido por MV (con  $n=4$ ) y CAR (con  $n=2$ ) como haplotipo intermedio, lo que a su vez indica una reciente separación genealógica. Otros sitios como LAG y PAL también comparten un haplotipo. Estos son los únicos haplotipos compartidos dentro de esta red.

La red de haplotipos NN (Fig. 8) muestra 2 linajes separados con uno en cada extremo y un tercero que es intermedio. El agrupamiento de esta red es a nivel de individuo, de tal forma que se puede reconocer que la agrupación de los individuos en los linajes de esta red es consistente con la agrupación que se da por los linajes en la genealogía y también concuerda con el agrupamiento de la red MJ.

#### 4. Estructura genética

El análisis de agrupamiento bayesiano de mtDNA para los 11 sitios determinado por BAPS (Fig. 9a) arrojó una  $K=3$  de grupos genéticos con  $\text{Log (Marginal Likelihood)} = -3639.5117$ . Este software consideró el modelo de no admixia, por lo que se asume que el origen de cada individuo puede ser a partir de solo una población. Un cluster (azul) incluye a los sitios

PAL, STC, LAG y 2 individuos de CAR; el segundo cluster (verde) incluye a los sitios RAN, MV, AG, RAZ, 5 individuos de AMA, 8 de AMAC y 4 de AMAB; el tercer cluster (rojo) comprende únicamente a los sitios AMA, AMAC (1 individuo de cada una) y AMAB (2 individuos). El software STRUCTURE también determinó la existencia de  $K=3$  (Fig. 9b) grupos genéticos o clusters con  $\text{Ln}(K)=-2788.240$  y  $\text{Delta } K=551.2777$ , mediante la prueba de Evanno (Fig. 9c).

La partición de las poblaciones en  $K=3$  componentes según el modelo de admixia de STRUCTURE nos permite distinguir cuales clusters están mayor representados en las secuencias de un sitio determinado (Fig. 9d). Esto facilita la interpretación de los patrones de distribución de la variación genética sobre su contexto geográfico y permite sugerir donde se originó geográficamente cada cluster. Los diagramas de partición de BAPS y STRUCTURE no deben ser comparados por los colores de sus barras sino por los sitios que agrupan cada uno. Sin embargo, en los grupos genéticos dados por STRUCTURE se emplearon los mismos colores que en los grupos genealógicos de las genealogías para resaltar la similitud del agrupamiento de ambos métodos, así como también el agrupamiento que se da por las redes MJ y NN.

De las 71 secuencias de mtDNA incluidas en el análisis, se asignó un 43.66% a un grupo genético que incluye a los sitios de AG, MV, RAN, RAZ y también a 4 individuos de AMA, 4 de AMAB, 7 de AMAC y 6 de CAR (cluster 1; azul, fig. 9b, d) que se llamó "Rancho-Agua". El segundo cluster, que incluye un 8.45% fue el más privado de todos, llamado cluster "Amanalco", con 2 individuos tanto de AMA, AMAB y de AMAC (cluster 2; rojo, fig. 9b, d), Finalmente, un 33.8% fueron asignados a un tercer cluster, provenientes de los sitios LAG, PAL, STC, 2 individuos de CAR y 1 de AMAB (cluster 3; verde, fig. 9b, d). Debido al gradiente longitudinal de sus sitios lo llamamos cluster "Carretera-Lágrimas". STRUCTURE asigna un grado de admixia entre los  $K$  grupos para cada individuo (representado por una barra vertical, fig. 9b) donde se puede observar la probabilidad de relación con un cluster genético para cada secuencia como una barra de uno o más colores y un eje vertical que va de 0 a 1. De esta forma, aunque los haplotipos sean distintos, se puede inferir cuales poblaciones tienen mayor relación genealógica (o menor separación histórica entre sus variantes genéticas) al mostrar el nivel en que se encuentran representados los clusters en la composición genética de los haplotipos (Brandt et al. 2014; Rius et al. 2014).

## 5. Diversidad Genética

Las secuencias mostraron un total de 72 sitios variables, con 54 sitios parsimoniosamente informativos y 18 singletons. Se encontraron valores de diversidad haplotípica alta para todos los sitios (Tabla 3) y para todos los linajes y subgrupos identificados (0.989-0.97). Sin embargo, la diversidad nucleotídica presentó los valores más altos para los sitios de Amanalco (0.0236-0.0217), los valores intermedios los presentaron los sitios al centro y sur de la APFFNT como CAR, RAZ, PAL, LAG, mientras que algunos sitios centrales como RAN y MV, presentan los más bajos junto con dos sitios del norte y sur (AG y STC). Para los sitios segregantes (S), de nuevo los sitios AMA, AMAC y AMAB presentaron la mayor cantidad

(S=52-35) y el sitio AG presento un valor bajo (S=8). En cuanto a los grupos genealógicos identificados, los linajes NO y S contienen valores similares de diversidad nucleotídica (0.0132-0.012), y la menor diversidad nucleotídica la posee el sub IC con 0.008, mientras el sub N tiene un valor de 0.0154.

Tabla 3. Diversidad genética de las secuencias de mtDNA de 11 sitios de muestra de *P. robertsi* y los grupos genealógicos identificados. Se muestra la localidad, el número de individuos (N), los sitios segregantes (S), la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), la diversidad haplotípica (Hd) y el número de haplotipos (h) para cada sitio.

<b>Diversidad Genética</b>					
<i>LOCALIDAD</i>	N	S	$\pi$	Hd	h
AG	3	8	0.0076	1	2
AMA	6	41	0.0236	1	6
AMAB	6	35	0.0217	1	5
AMAC	9	52	0.0218	1	8
RAN	6	17	0.0087	0.933	4
MV	7	17	0.0095	1	4
CAR	8	34	0.0172	0.954	7
RAZ	4	15	0.0113	1	3
PAL	9	30	0.0118	0.972	8
LAG	6	19	0.0122	1	5
STC	7	19	0.0087	1	6
<b>GRUPO</b>					
Linaje NO	47	61	0.0132	0.980	35
Sub N	28	58	0.0154	0.997	24
Sub IC	19	29	0.008	0.97	11
Linaje S	24	47	0.012	0.989	19
Total	71	72	0.0154	0.989	54

## 6. Demografía histórica

Los estadísticos de resumen de la D de Tajima y la Fs de Fu se muestran en la tabla 4. Los valores de D de Tajima, aunque resultaron negativos y elevados, ninguno de ellos fue significativo para algún linaje o sus subgrupos. En contraste, todos los valores de la Fs de Fu resultaron significativos para todos los grupos genealógicos. Las distribuciones mismatch realizadas se muestran en la fig. 10 para todos los grupos genealógicos. Aunque la distribución de frecuencias de diferencias entre pares de secuencias observada se

asemeja más a la distribución esperada bajo un modelo de expansión poblacional, el índice de raggedness de Harpending resultó significativo para todas ellas, lo que indica que el modelo de expansión poblacional se rechaza (Sánchez-Sánchez et al. 2012). Los BSP indican escenarios similares para todos los grupos genealógicos ya que ninguno de ellos muestra un incremento poblacional repentino (denotado por un cambio de pendiente abrupto en la línea de la gráfica), tan solo una tendencia lineal con una ligera pendiente positiva hacia el presente, lo que denota un incremento constante hacia el presente aunque muy tenue (Fig. 10 a-d).

Los valores de sumarios estadísticos generales para el total de las secuencias se muestran en la tabla 4. Se observa de nuevo el mismo patrón que para los linajes y subgrupos. Aunque la D de Tajima resulta negativa, no es significativa; el índice raggedness de Harpending también resultó significativo, rechazando el modelo de expansión poblacional como también lo muestra su BSP. En contraste, la Fs de Fu si resultó significativa como anteriormente ocurre para los otros subgrupos.

#### 7. Aislamiento por distancia

La prueba de Mantel realizada indicó que ambas correlaciones entre la distancia geográfica y la distancia genética son significativas ( $P < 0.05$ ), sin embargo la  $R^2$  de la recta del mejor ajuste explican apenas poco más del 10% de los datos, por lo que una tendencia lineal no es suficiente para explicar la relación entre la distancia genética y la distancia geográfica (Fig. 11).

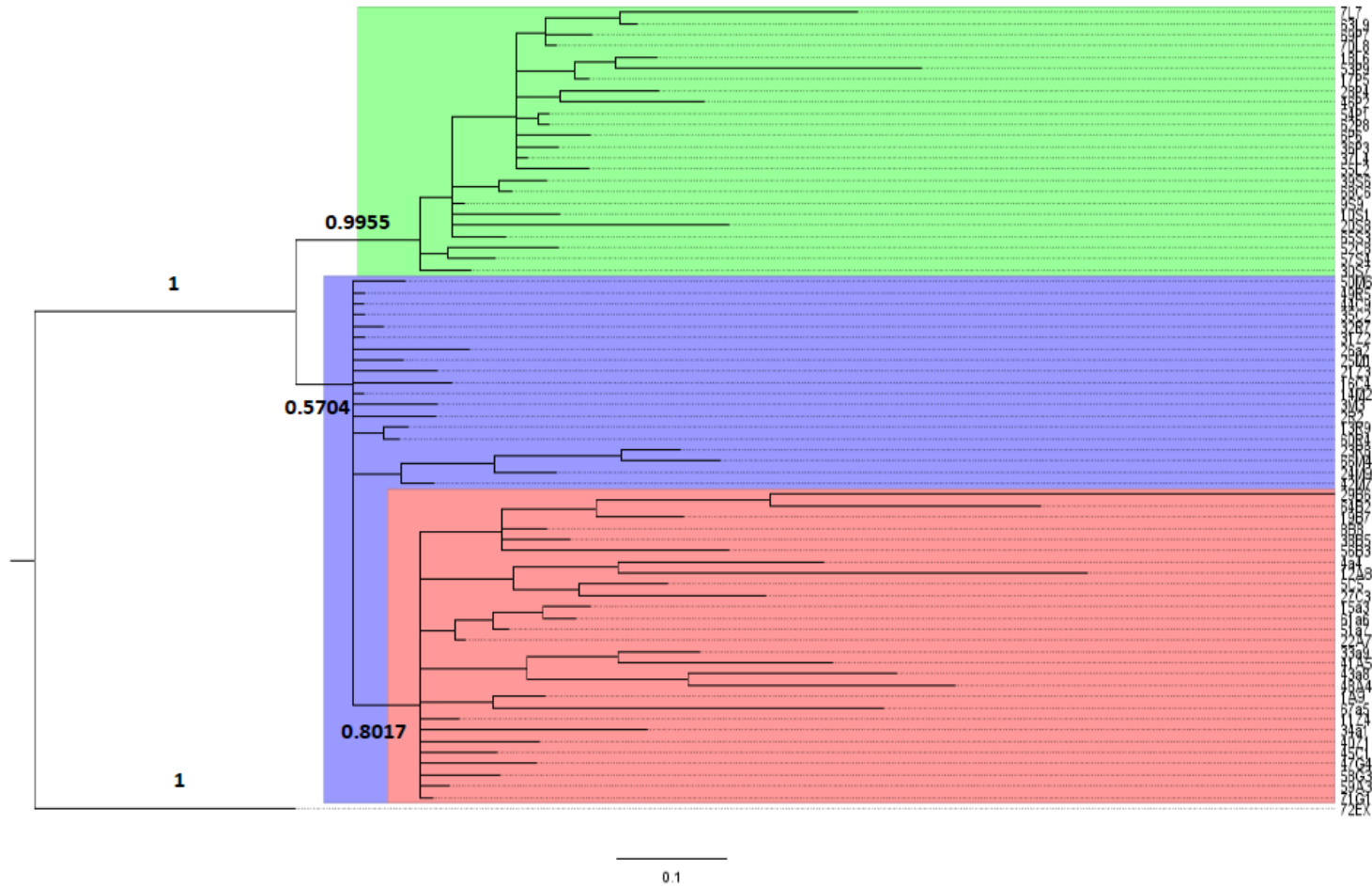


Figura 6. Genealogía del gen *cyt b* para *P. robertsi* reconstruida con MrBayes para 71 individuos. En cada rama se muestran los valores de soporte de probabilidad posterior para las ramas genealógicas principales. Se definen dos linajes, el linaje Sur (linaje S) de los sitios de las laderas al Sur del cráter del volcán (verde), y el linaje Norte (linaje NO), que se divide en dos subgrupos genealógicos, el primero se denomina Inter-Carretera (Sub IC) de los sitios en las laderas al Noreste del cráter del volcán (azul) y el subgrupo Norte (Sub N) de los sitios más alejadas al Norte de las colinas del cráter del volcán (rosa).



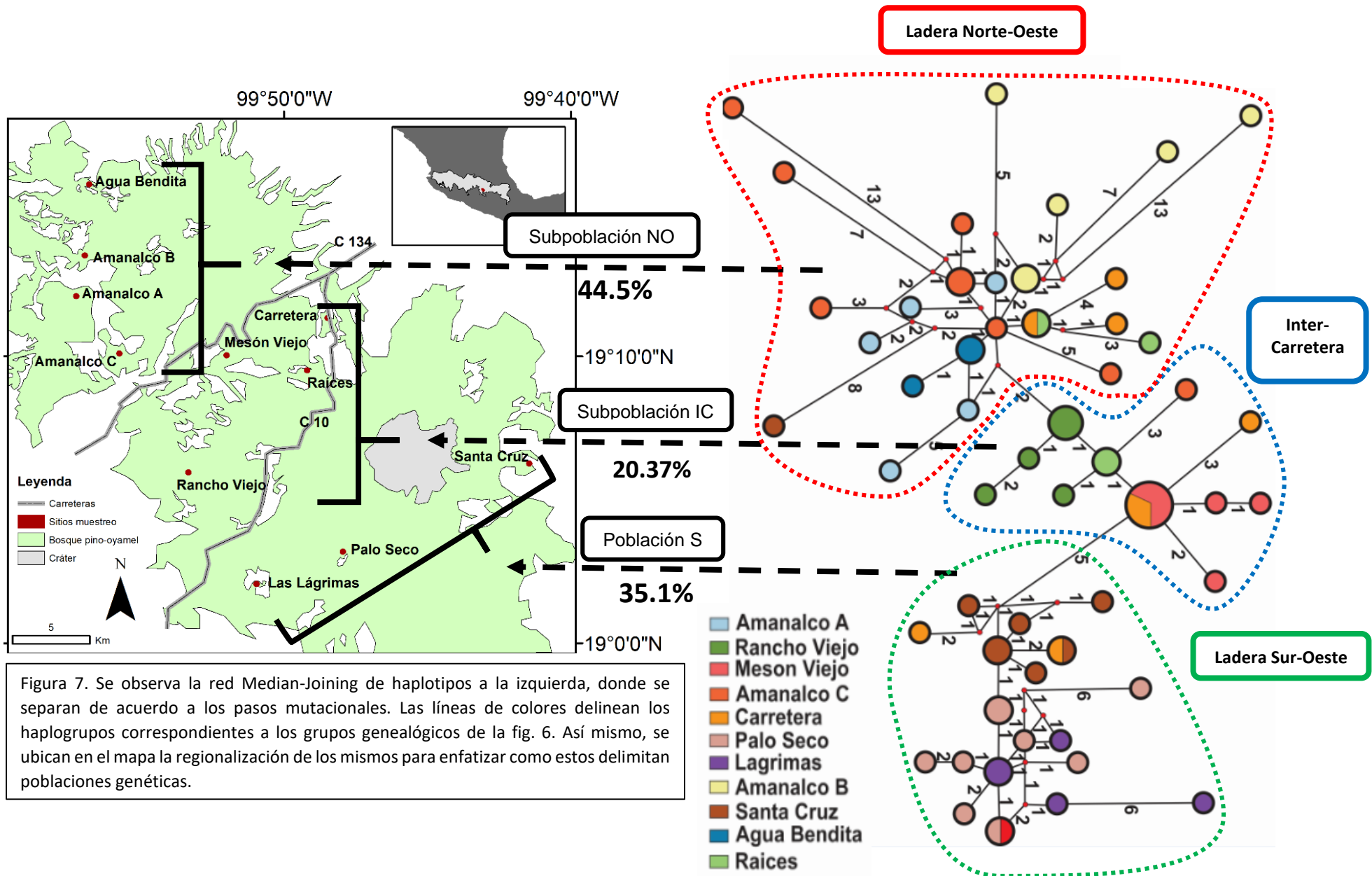


Figura 7. Se observa la red Median-Joining de haplotipos a la izquierda, donde se separan de acuerdo a los pasos mutacionales. Las líneas de colores delimitan los haplogrupos correspondientes a los grupos genealógicos de la fig. 6. Así mismo, se ubican en el mapa la regionalización de los mismos para enfatizar como estos delimitan poblaciones genéticas.

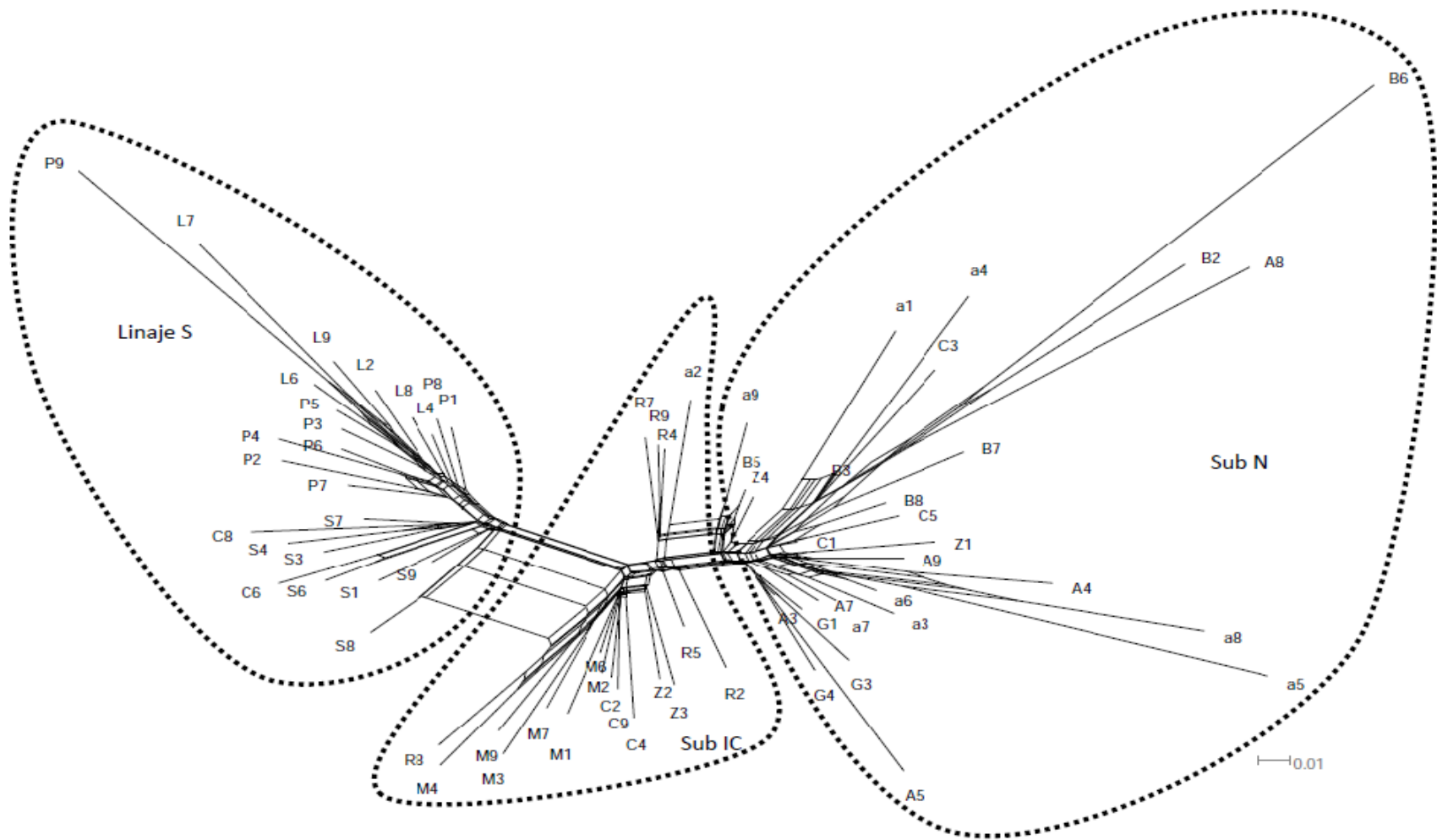


Figura 8. Se muestra la red mínima Neighbor-Net de 54 haplotipos construida con los parámetros estimados por el modelo mutacional determinado con jModelTest. Los haplotipos muestran una distribución similar a la observada en la red de haplotipos por median-joining. Los haplogrupos o linajes principales que se pueden identificar en la genealogía y la red MJ también se pueden reconocer en esta red como las ramas que se aglomeran en racimos y que representan a los individuos. El nombre de cada individuo está compuesta por el sitio y número de individuo de ese sitio (las abreviaturas en letras van de acuerdo a la tabla 1).

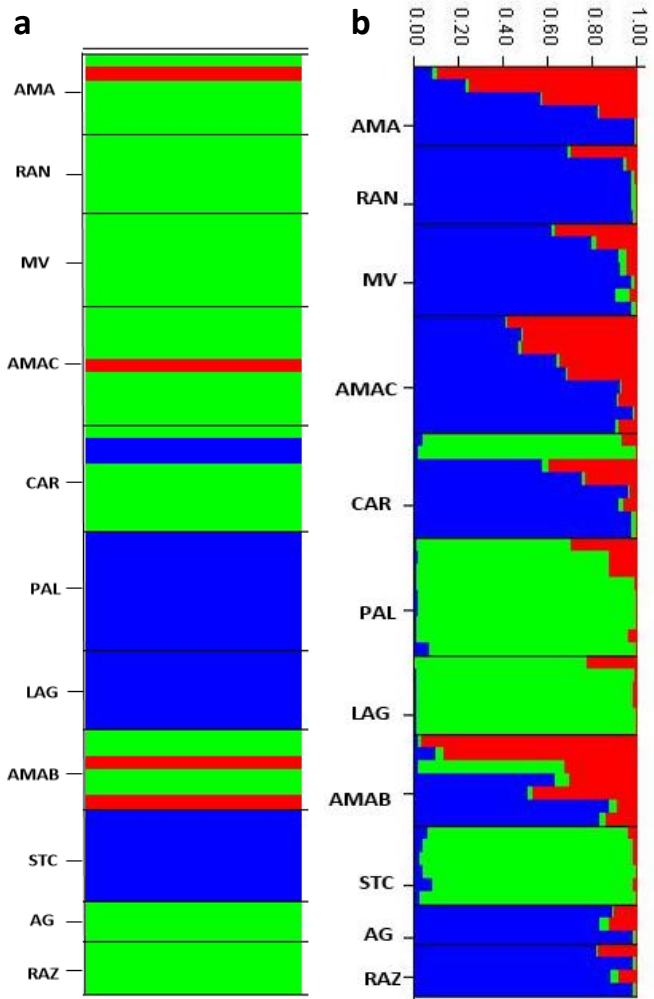


Figura 9 (Continúa en la página siguiente). Análisis de agrupamiento bayesiano para los individuos de los 11 sitios en los que se observan los clusters o grupos genéticos representados por colores. BAPS **a**) particionó en K=3 clusters a todos los sitios. Cada barra es un individuo y en este análisis son de un solo color, indicando la pertenencia de cada individuo a un solo grupo o cluster genético asumiendo modelo de no admixia. STRUCTURE **b**) presento una partición en K=3 clusters donde cada barra es un individuo y aquellas que tienen uno o más colores, representan el grado de admixia de los individuos de cada sitio, es decir, la probabilidad de cada individuo de pertenecer a un grupo genético u otro. Los grupos genéticos entre los diagramas no son comparables por el color sino por las poblaciones que agrupan. **c**) Gráficas obtenidas de las 20 corridas independientes de STRUCTURE para determinar el valor de K que mejor se ajusta a nuestros datos, **c1**) mediante la prueba de delta K (Evanno et al. 2005) y **c2**) la prueba LnP(K).

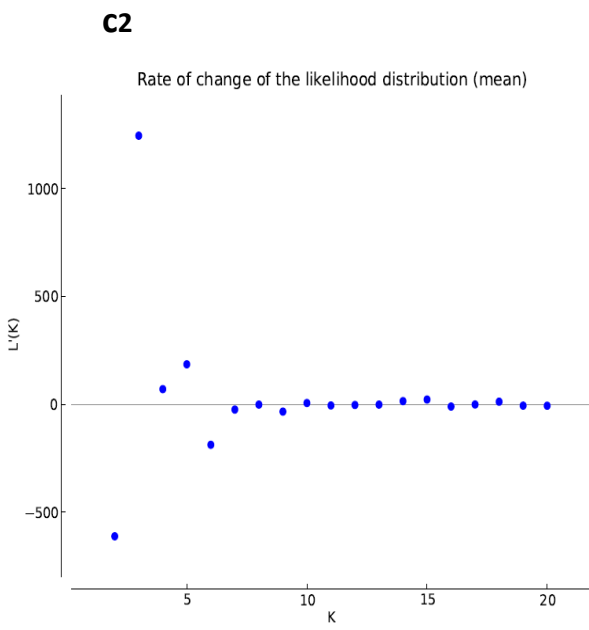
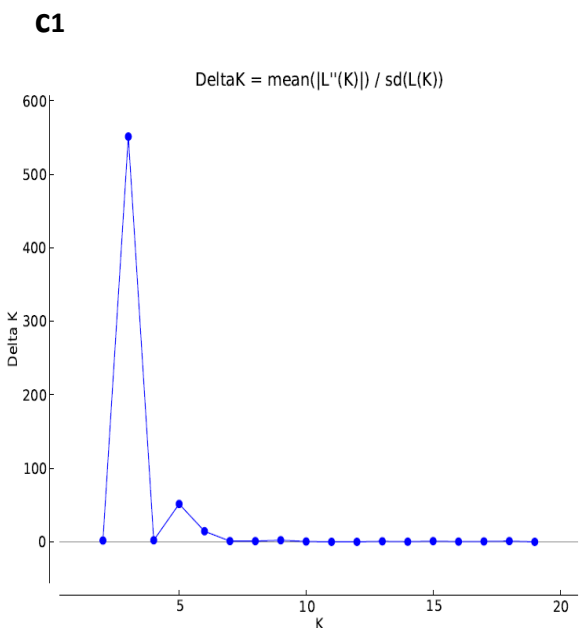


Figura 9 (Continuación). **d**) Se representan diagramas de pastel con el porcentaje de composición genética acumulado por todos los individuos de cada sitio que aporta cada cluster de acuerdo con STRUCTURE (gráfica de pastel), esto pone de manifiesto la fracción con la que cada cluster está representado en la composición genética colectiva de los haplotipos para cada sitio, lo que indica el grado de divergencia genealógica entre los clusters. Se localizan los diagramas de pastel sobre el mapa de la APFFNT (C134: carretera 134; C10: carretera 10).

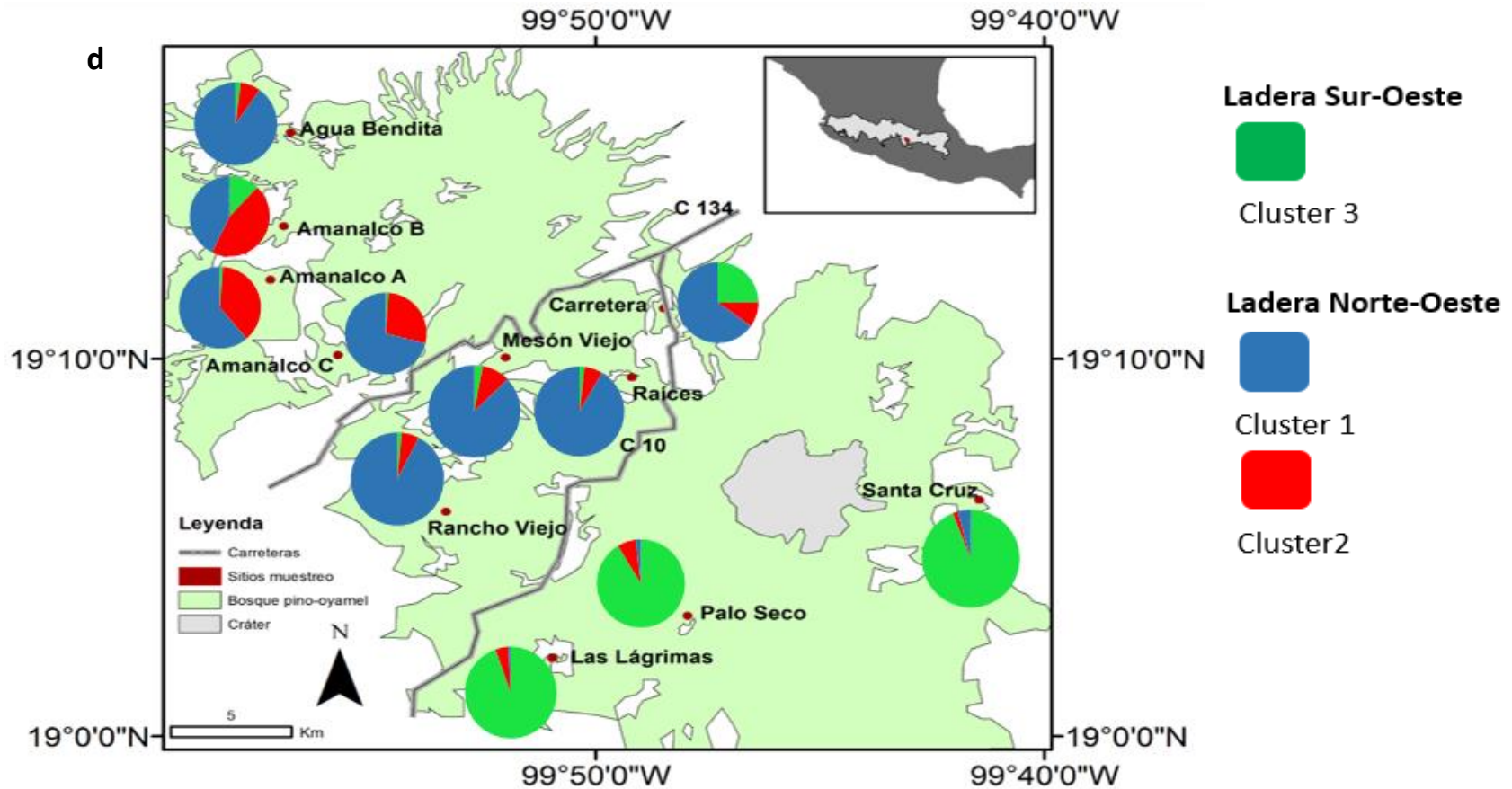
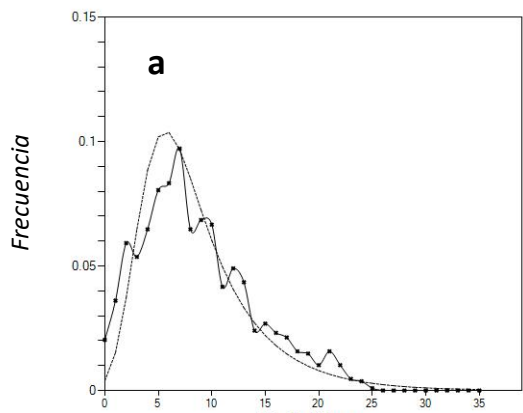


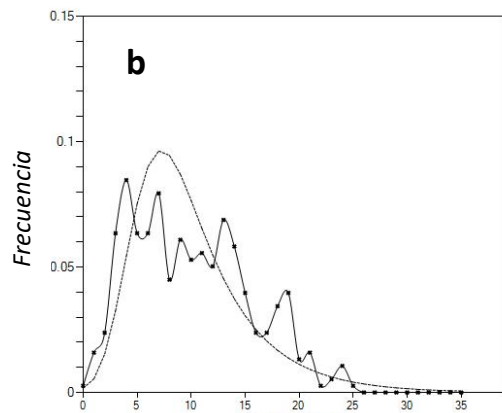
Tabla 4. Valores de los estadísticos D de Tajima y Fs de Fu para cada uno de los grupos genealógicos y los estadísticos generales para todas las secuencias muestreadas. Cada valor fue probado para un nivel de significancia del 95% (\*) y 99% (\*\*). También se muestra la P observada para cada linaje. Los valores resaltados en negrita son aquellos que resultaron significativos.

<b>Sumarios estadísticos por grupo</b>						
<i>Grupo</i>	<i>D de Tajima</i>	<i>CI 95%</i>		<i>CI 99%</i>		<i>P obs.</i>
Linaje NO	-1.678	-1.69	1.814	-2.013	2.408	0.254
Sub N	-1.621	-1.704	1.7624	-2.0919	2.2803	0.33
Sub IC	-1.6713	-1.7717	1.7773	-2.1029	2.2686	0.0342
Linaje S	-1.6312	-1.7025	1.7579	-2.088	2.2725	0.0316
<i>Grupo</i>	<i>Fs de Fu</i>	<i>CI 95%</i>		<i>CI 99%</i>		<i>P obs.</i>
Linaje NO	<b>-21.8**</b>	-7.083	7.134	-10.402	11.617	0
Sub N	<b>-18.32**</b>	-5.8306	5.9794	-8.5802	9.502	0
Sub IC	<b>-6.5883**</b>	-4.39	5.265	-5.895	8.0394	0.002525
Linaje S	<b>-9.9299**</b>	-5.4731	5.9094	-7.6532	9.1355	0.0009
<i>Grupo</i>	<i>raggedness</i>	<i>CI 95%</i>		<i>CI 99%</i>		<i>P obs.</i>
Linaje NO	<b>0.0037**</b>	0.0091	0.1068	0.006	0.169	0
Sub N	<b>0.00667**</b>	0.0104	0.122	0.059	0.2036	0.003
Sub IC	<b>0.0083*</b>	0.019	0.2809	0.0129	0.4334	0.00835
Linaje S	<b>0.012*</b>	0.0126	0.153	0.009	0.234	0.0205
<b>Sumarios estadísticos generales (Todas los sitios)</b>						
		<i>CI 95%</i>		<i>CI 99%</i>		<i>P obs.</i>
<i>D de Tajima</i>	-1.4593	-1.6272	1.8517	-1.99	2.471	0.0456
<i>Fs de Fu</i>	<b>-40.272**</b>	-8.5635	8.5474	-12.48	14.149	0
<i>raggedness</i>	<b>0.0017**</b>	0.00717	0.0767	0.007	0.079	0

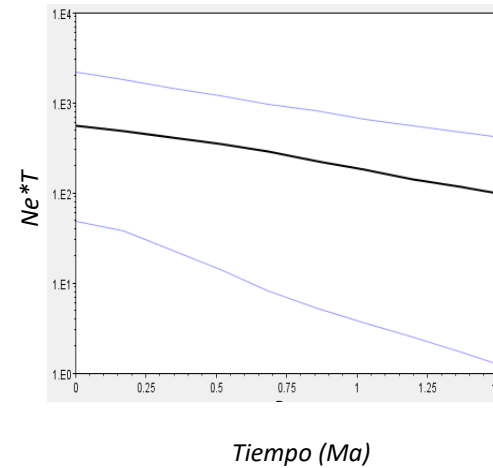
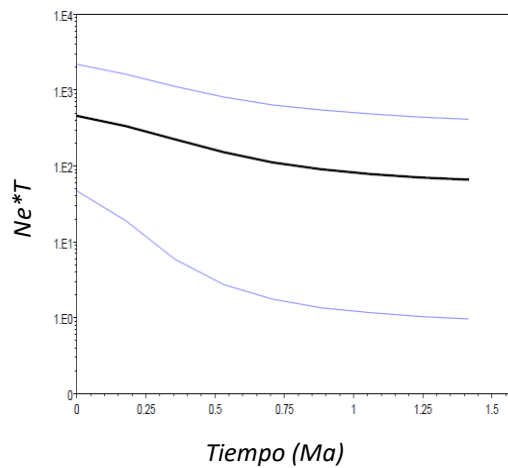
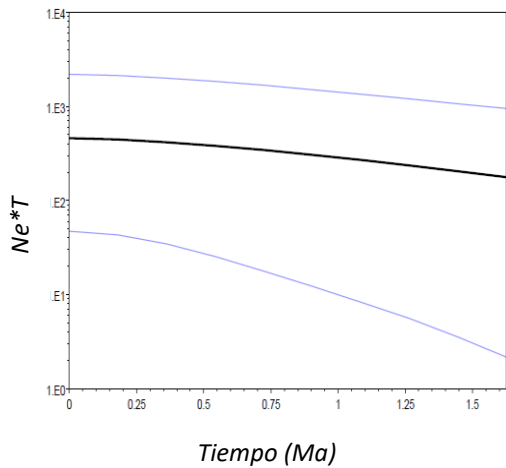
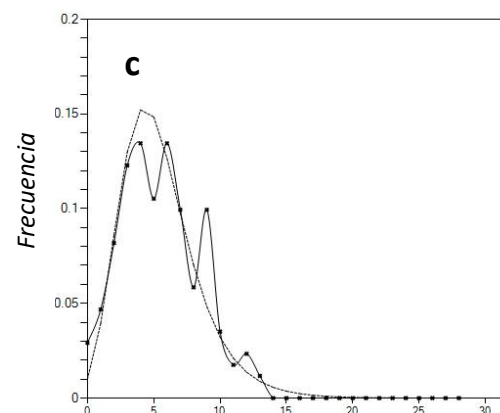
**Linaje Norte-Oeste**



**Subgrupo Norte**



**Subgrupo Inter-Carretera**



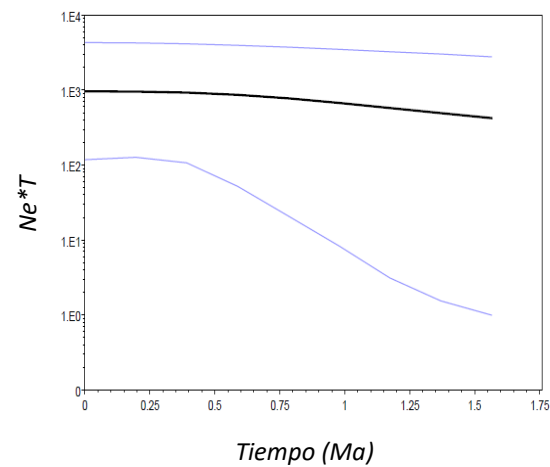
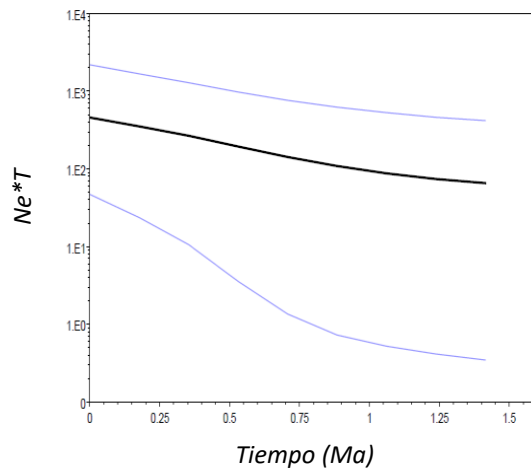
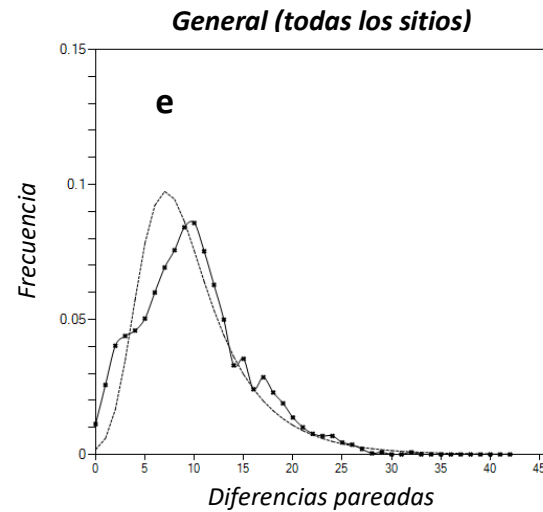
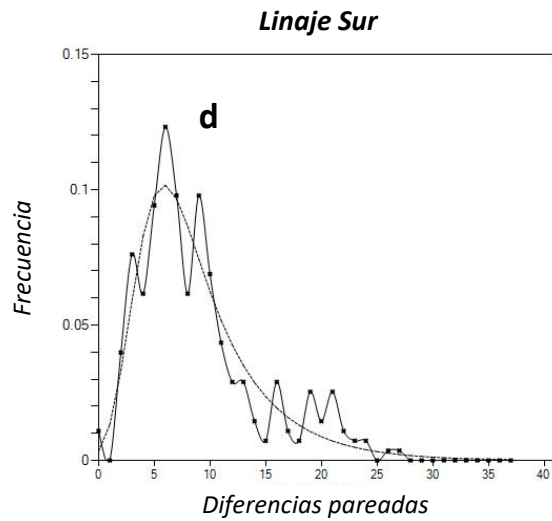


Figura 10. BSPs y distribuciones mismatch para cada uno de los linajes principales: el linaje NO **a**), el sub N **b**), el sub IC **c**), el linaje S **d**) y un general que incluye las muestras de todas los sitios **e**). Los BSP del sub IC muestran una ligera tendencia de incremento poblacional reciente constante, mientras que el BSP del sub N muestra un cambio de pendiente en la línea recta de su gráfica aunque muy suave. Sin embargo el BSP general indica que los sitios como un todo no han mostrado ningún incremento reciente ya que su gráfica es casi totalmente horizontal. En las distribuciones mismatch se muestra la distribución observada como una línea continua y la esperada como una punteada. Aunque las gráficas parecen ajustarse mejor a un modelo de expansión poblacional que a un modelo estacionario, el índice de raggedness ( $r$ ) de Harpending (1992) es significativo para cada una de las distribuciones, indicando que se rechaza el modelo de expansión demográfica.

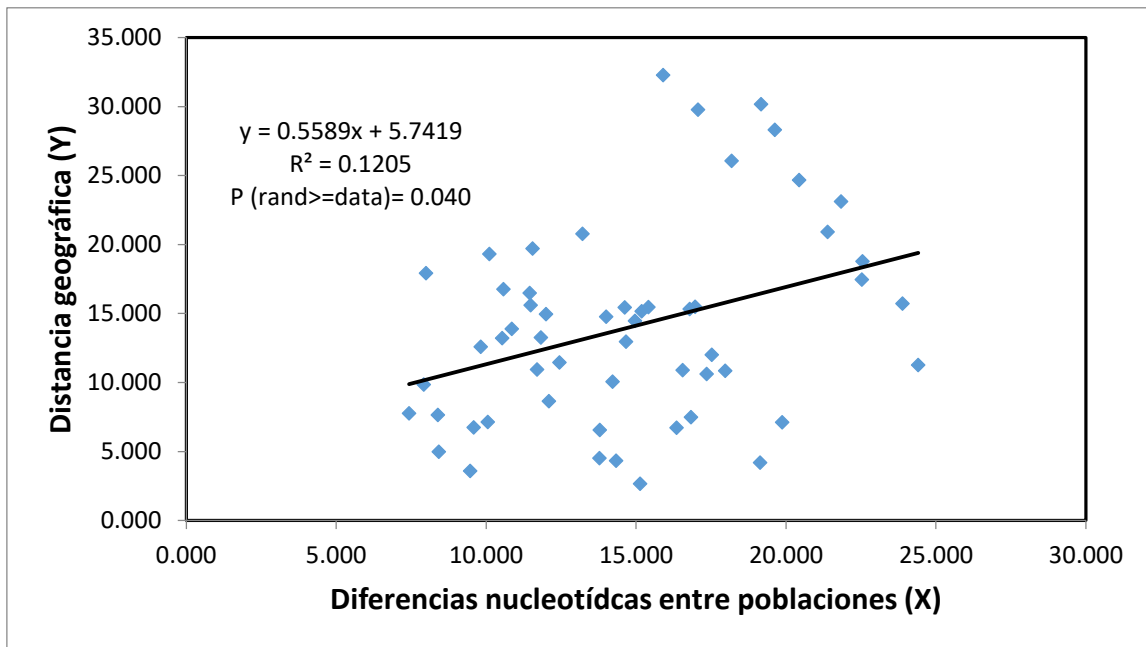
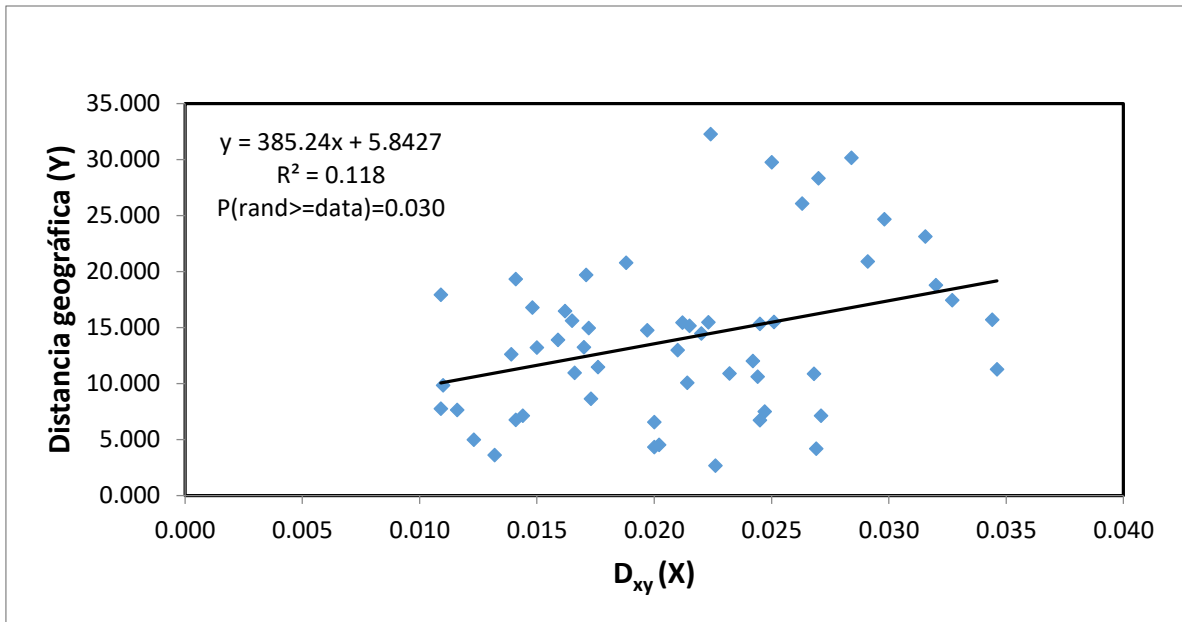


Figura 11. Prueba de Mantel para la correlación lineal entre la distancia geográfica recta Euclidiana (eje Y: Distancia geográfica) y la distancia genética (eje X: **a**)  $D_{xy}$ , número promedio de sustituciones nucleotídicas por sitio entre poblaciones o **b**) número promedio de diferencias nucleotídicas entre poblaciones). Cada gráfica muestra la ecuación de la línea del mejor ajuste, el valor de  $R^2$  que representa el porcentaje de los datos que se pueden explicar por medio de la línea y el valor de P de significancia para la correlación de los datos en X e Y con un nivel de confianza del 95%.



## Discusión

### 1. Relaciones genealógicas

La genealogía muestra que existen dos linajes principales. Estos se nombran como linaje Norte (linaje NO) y el linaje Sur (linaje S) ya que cada uno de ellos está compuesto por los individuos de los sitios ubicados al Norte y al Sur del cráter del volcán. La topología del árbol nos muestra que el linaje S contiene a todos los individuos de los sitios de STC, PAL y LAG; siendo un grupo monofilético o clado (Fig. 7). El linaje NO por su parte, no contiene totalmente a todos los individuos de los sitios de la ladera Norte, dado que algunos individuos del sitio CAR se encuentran más estrechamente relacionados con algunos del sitio STC, por lo cual, el linaje NO es parafilético respecto al Clado S, es decir, no integra genealógicamente a todos aquellos individuos geográficamente situados en los sitios al norte.

La existencia de laderas Norte y Sur está definida por el cráter, cuya presencia constituye a su vez una barrera geográfica que puede ser un factor que favorezca la divergencia entre los individuos de ambas laderas y por la cual se pueden considerar como poblaciones separadas tempranamente. Respecto al linaje NO, podemos ver que este incluye una rama genealógica que contiene y separa a los individuos de los sitios AMA, AMAB, AG, y algunos de AMAC y RAZ del resto de los individuos de la ladera Norte. Esa separación, que conecta a aquellos individuos regionalizados en la porción más al Norte de la APFFNT (localidad de Amanalco) a través de un ancestro común más reciente lo define como un subgrupo genealógico (sub N). El resto de los individuos del linaje NO, cuya relación genealógica se encuentra en su mayoría no resuelta ya que se observan un gran número de politomias en la porción azul de la genealogía la nombramos subgrupo genealógico IC (sub IC) dado que se encuentra regionalizado latitudinalmente en el centro del APFFNT y contiene a los individuos de MV, RAN y algunos de RAZ y AMAC (Fig. 7). Esta última separación genealógica permite definir dos subpoblaciones en el linaje NO pero es, sin embargo, más difícil de explicar en un contexto geográfico ya que no hay una barrera física o indicios de ella que haya impedido históricamente flujo genético entre el sub N y el sub IC. Una posible explicación puede ser debido a un cambio en las condiciones ambientales, ya que en el Pleistoceno tardío la vegetación arbórea se encontraba muy abierta, y ocurrió un descenso de la cota de los 3000 msnm (Caballero et al. 2010), lo que pudo generar un aislamiento entre los sitios que representan a estos grupos genealógicos. Por otra parte, los registros actuales que va de los años 1972-2000 muestran que la mayoría de los sitios que conforman al sub N se encuentran dentro de un bosque de *Abies religiosa*, mientras que los del sub IC se encontrarían dentro de bosque de *Pinus* mixto (Franco et al. 2013), por lo que es posible que este cambio de condiciones ambientales propiciaran una diferenciación regional. Por otro lado, aunque existe una divergencia genealógica en la ladera Norte, esta no es completa, ya que como podemos ver los sitios como AMAC, CAR y RAZ presentan haplotipos tanto dentro del sub IC como del sub N (Fig. 9), indicando que la regionalización no es completa y que hay flujo de haplotipos entre la región centro y norte del APFFNT. Por otro

lado, el sitio AMAC presenta un haplotipo genealógicamente más cercano al sub IC y un haplotipo compartido con el sitio RAZ. El sitio CAR presenta haplotipos compartidos entre el sitio MV y RAZ (Fig. 7), además de presentar un haplotipo compartido y otro genealógicamente más cercano con el sitio STC (Fig. 7), lo que sugiere un flujo génico reciente del linaje Sur hacia el sitio CAR. Lo anterior sugiere una relación reciente de flujo génico histórico, aunque de forma reducida, que permitió la divergencia. La existencia de relaciones genealógicas estrechas entre haplotipos que pueden ser genéticamente distantes puede influir en la relación lineal entre la distancia genética y geográfica, donde la prueba de Mantel muestra un bajo porcentaje de valores que se ajustan a este modelo, sin embargo, las distancias genéticas si están relacionadas con la distancia geográfica (Fig. 11).

Los análisis de STRUCTURE y BAPS (Fig. 9) muestran cómo se asignan los haplotipos a grupos genéticos así como el grado de admixión entre ellos que se representa en la composición genética de haplotipos (Fig. 9b, d). Los Cluster 1 y 2 en la ladera norte presentan un nivel de admixión alto. Por otra parte, se observa el mayor nivel de admixión en los sitios como AMA, AMAB y AMAC, mientras que la mayor representación del cluster 1 se encuentra en los sitios latitudinalmente céntricos. Debido a esto, es posible que el cluster 1 sea haya originado del linaje correspondiente al sub IC, mientras que el origen del cluster 2 se haya dado dentro del linaje correspondiente al sub N. Sin embargo, su estrecha relación de admixión sugiere que dichos clusters son cercanamente relacionados y que la diferenciación en dos linajes genealógicos en la ladera norte ocurre al mismo tiempo que continúan con relaciones de intercambio de haplotipos lo cual se evidencia por el haplotipo compartido entre CAR y RAZ el cual es genealógicamente más cercano a los individuos del sub N y recíprocamente, a los individuos de AMAC que son genealógicamente más cercanos con los de RAN. Por su parte, el clado S que conforma el cluster 3 presenta poco o nulo grado de admixión con el cluster 1 y ligeramente con el cluster 2, lo que se corresponde con una relación genealógica menos reciente, indicando de forma análoga, que la ladera Sur y Norte se colonizaron y comenzaron su divergencia temprana distribuyéndose independientemente, pudiendo continuar con flujo reciente o secundariamente del Sur al Centro.

## 2. Diversidad y diferenciación genética

Los sitios como AMA, AMAB y AMAC tienen el valor de  $\pi$  más alto encontrado entre todos los sitios ( $\pi = 0.0236-0.0217$ ), indicando una acumulación de cambios entre sus haplotipos (Tabla 3). Los haplotipos de los sitios PAL y LAG poseen también una divergencia sustancial ( $\pi = 0.0118-0.012$ ). El sitio de CAR mostró una divergencia considerable entre haplotipos ( $\pi = 0.017$ ), pero los sitios como MV, RAN y STC mostraron los valores de divergencia más baja ( $\pi = 0.0087-0.0095$ ). En cuanto a los grupos genealógicos identificados, los linajes NO y el clado S contienen valores similares de diversidad nucleotídica ( $\pi = 0.0132-0.012$ ), y la menor diversidad nucleotídica la posee el sub IC con  $\pi = 0.008$ , mientras el sub N tiene un

valor de  $\pi = 0.0154$ . Estos valores indican que la mayor divergencia entre haplotipos se encuentra dentro de los sitios más al norte y al sur, mientras que en los sitios latitudinalmente más céntricos predomina una divergencia baja entre los haplotipos.

Aunque dilucidar la ruta o historia de colonización se encuentra fuera de los alcances de este trabajo, nuestra evidencia muestra que ha existido diferenciación genética histórica preponderante en el Nevado de Toluca y que aún pueden encontrarse huellas de admixta reciente y flujo de individuos, tanto del sur al centro, como del centro al norte de la APFFNT y viceversa. Hemos probado que no ha habido un aislamiento completo en la historia de sus poblaciones dado que no existe monofilia recíproca entre los linajes encontrados. La importancia de que nuestros linajes S y NO no hayan alcanzado este estado radica en el hecho de que continúan interactuando sus variantes genéticas, es decir, no se han aislado y sus poblaciones no han alcanzado una historia evolutiva independiente, por lo que el flujo de variantes entre las dos laderas puede tener un efecto sobre su diversidad y permanencia general de todos los individuos.

Dada la topología de las redes de haplotipos existe similitud con algunos estudios en herpetofauna donde se ha reportado el surgimiento *in situ* de variantes haplotípicas, es decir, que una vez que se coloniza un sitio, comienza el surgimiento y divergencia dentro del mismo, a través de una colonización por pasos donde las variantes avanzan y se diferencian progresivamente en un proceso llamado “*stepping-stone*”. En un estudio realizado por Parra-Olea et al. 2012 con mtDNA para *P. leprosa*, revela que la colonización desde la porción este de la FVTM que comprende el Cofre de Perote y el Pico de Orizaba hacia los sistemas montañosos de la porción central de la FVTM como el Nevado de Toluca, la Sierra de las cruces y la Sierra Nevada se dio por medio de una serie de eventos de expansión poblacional seguidos de cuellos de botella a través de un proceso de migración por “*stepping-stone*”. En dicho estudio, el pequeño número de pasos mutacionales que separan el haplotipo ancestral acarreado desde la porción este de la FVTM y aquellos pertenecientes al clado central de la FVTM evidencia una vez que las poblaciones ancestrales se establecieron en los nuevos sistemas montañosos, comenzaron a surgir progresivamente nuevos haplotipos y a divergir entre cada complejo montañoso separándose en pasos mutacionales conforme avanzaban en el territorio geográfico (Parra-Olea et al. 2012). En dicho estudio, dentro de tres de los sitios muestreados, algunos haplotipos mostraban diferenciación profunda puesto que eran posicionados en clados que divergían tempranamente dentro de la genealogía de haplotipos, lo que da cuenta de que aún dentro del mismo complejo montañoso se puede dar una estructura filogenética entre los haplotipos (Parra-Olea et al. 2012) como la obtenida en el presente estudio dentro del Nevado de Toluca para *P. robertsi*.

Nuestros resultados de diversidad genética revelan un total de 54 haplotipos en los 71 individuos con una Hd total de 0.989 y  $\pi$  de 0.0154 (Tabla 3). Estos valores son contrastantes con aquellos encontrados para *P. leprosa* en el Nevado de Toluca, donde solo

se detectaron 3 haplotipos, con una  $H_d$  de 0.4643 y una  $\pi$  de 0.0022 (Parra-Olea et al. 2012). Sin embargo, el número de individuos muestreado dentro de esta área fue mucho menor, con solo 8 individuos. Por otra parte, los mismos autores encontraron 52 haplotipos en 205 individuos y valores de  $H_d$  de 0.952 y  $\pi$  de 0.004 para el clado central de *P. leprosa*, el más reciente y que es el más numeroso y diverso e incluye el Nevado de Toluca, Popocatepetl-Iztaccihuatl, la Malinche, y la Sierra de las Cruces. Estos valores de  $H_d$  son similares a los que encontramos para *P. robertsi* dentro del Nevado de Toluca, sin embargo los valores de  $\pi$  son distintos entre los linajes de ambas especies, esto podría deberse a que la diferenciación entre los haplotipos ha sido mucho menor para *P. leprosa* que para *P. robertsi* en la porción central de la FVTM. Este patrón es importante dado que el área geográfica de distribución es mucho mayor para *P. leprosa* y por tanto, sus haplotipos se han encontrado aislados en distancias mucho mayores dado que abarcan distintos sistemas volcánicos, además de que, dado su origen filogenético anterior (datado hace aprox. 3.8 Ma), se espera que sus haplotipos hayan estado diferenciándose durante más tiempo. Sin embargo, los valores de  $\pi$  encontrados en los linajes NO y S ( $\pi=0.0132$  y  $0.012$ , respectivamente) del APPFNT solo se asemejan a los valores para *P. leprosa* en el Cofre de Perote ( $\pi=0.0184$ ) que es donde se dio el surgimiento de las poblaciones ancestrales.

Esta información podría indicar que en *P. leprosa* han operado distintos procesos histórico-poblacionales que la hayan inducido a reducir su diferenciación en sus clados más recientes, de tal forma que la divergencia haplotípica observada actualmente es diferente comparado con los valores de diversidad y divergencia de *P. robertsi*. Esta es una especie más reciente, pero *P. leprosa* es una especie más ampliamente distribuida, por lo que la importancia de esta comparación radica en definir si el tiempo o el rango de distribución geográfica de las especies son lo más relevante para la diferenciación. La evidencia filogeográfica muestra que *P. leprosa* se dispersó en la porción central de la FVTM siguiendo un patrón de colonización este-oeste desde los complejos Perote-Orizaba y otros, ingresando por el sistema de la Malinche durante los últimos 700 Ka, que entra en el mismo marco temporal cuando *P. robertsi* divergió de *P. altamontana* (hace aprox. 900 Ka; Rovito y Parra-Olea 2016), sin embargo, durante las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno se pudieron propiciar la existencia de corredores boscosos a menores altitudes (Caballero et al. 2010; Mastretta-Yanes et al. 2015), lo que puede explicar el bajo grado de diferenciación en la porción central de la FVTM para *P. leprosa* dado que su rango altitudinal es menor, de 2500-3000 msnm (Wake et al. 2016). Así mismo, dado el número de haplotipos compartidos entre los sistemas volcánicos de la FVTM para *P. leprosa*, existe la posibilidad de que las poblaciones de *P. leprosa* pudieron continuar con flujo génico secundario a través de corredores de bosques de coníferas persistentes después del Pleistoceno y que el periodo de aislamiento comenzó solo después de que los asentamientos humanos comenzaron a deforestar el bosque hace aprox. 500 años (Lynch 1983). Por el contrario, *P. robertsi*, pudo quedar restringida solamente a su rango altitudinal mayor durante dichos

procesos, posiblemente porque a altitudes menores entraría en competencia con *P. leprosa* (Bille 2009).

En contraste con lo anterior, las poblaciones ancestrales de *P. leprosa* del este, donde no se han detectado eventos de expansión poblacional, tanto la Hd como la  $\pi$  son elevadas, y de hecho similares en magnitud a las encontradas para los linajes S, NO y el sub N. Es decir, tanto la diversidad de haplotipos de *P. robertsi* como el grado de divergencia entre los mismos, sugieren que debieron haber ocurrido aproximadamente en el mismo tiempo que la diferenciación entre las poblaciones más ancestrales de *P. leprosa*. Esto concuerda con la explicación filogeográfica que indica que aunque los asentamientos de *P. leprosa* en la sección este de la FVTM son comparablemente más antiguos respecto al origen datado para *P. robertsi*, la diferenciación de las poblaciones de *P. leprosa* en estos relictos ancestrales tuvo lugar dentro del último periodo de aprox. 1 Ma a la fecha, es decir, poco después de la formación del volcán Cofre de Perote, hace aprox. 1.3Ma. El aislamiento de las poblaciones de *P. leprosa* del sistema del Cofre Perote de otros sistemas montañosos al oeste pudo ser promovido a causa del gradiente altitudinal en dirección Oeste-Este que fue establecido durante la formación de la FVTM (Parra-Ole et al. 2012). Por tanto, la divergencia en esta porción de su distribución pudo comenzar de forma tardía respecto al establecimiento de las poblaciones ancestrales en esa zona, lo que implicaría que el tiempo en el que comenzó la diferenciación poblacional de ambas especies ha sido aproximadamente el mismo.

Considerando el grado de divergencia y diversidad de los haplotipos que encontramos en los linajes principales en *P. robertsi*, la evidencia sugiere que la divergencia entre sus linajes debió comenzar de forma temprana después de su aparición y a lo largo de ese tiempo hasta el presente. Lo anterior muestra como los distintos procesos climático-geológicos han moldeado la diversidad y diferenciación de *P. robertsi* de distribución restringida, y de *P. leprosa* de distribución más amplia. La dinámica geológica-climática de la FVTM ha influido en la diferenciación de la población ancestral de *P. leprosa*, con el surgimiento del Cofre de Perote, mientras que ha fomentado la expansión y baja diferenciación de sus clado central más reciente por medio de continuos de bosque que propiciaron el flujo y la expansión demográfica durante la colonización de la parte central de la FVTM. Al comparar el clado más reciente de *P. leprosa* con cualquiera de los linajes de *P. robertsi*, vemos que dentro de una misma ventana de tiempo, se pueden alcanzar valores distintos de diferenciación, posiblemente porque las poblaciones de *P. leprosa* nunca quedaron aisladas totalmente durante el Pleistoceno tardío. Sin embargo, al observar el grado de divergencia haplotípica de la población de Cofre de Perote de *P. leprosa* y aquellos linajes de *P. robertsi*, vemos que se pueden alcanzar una diferenciación comparable en un periodo de tiempo similar, una vez que comienza el aislamiento.

Parte de la diversidad elevada que encontramos en nuestras poblaciones coinciden con la expansión y aumento de la diversidad genética dentro de otras especies de herpetofauna

durante el periodo del Pleistoceno tardío (Bryson et al. 2011a,b; Bryson et al. 2012) debido a los ciclos glaciares-interglaciares donde los bosques de pino-encino y oyamel ampliaron la distribución y facilitaron su dispersión dentro de la porción central del EVT para aquellas especies con estrecha relación a los bosques de alta montaña (Caballero et al. 2010) incluyendo a las salamandras del género *Pseudoeurycea* (Velo-Antón et al. 2013; Mastretta-Yanes et al. 2015).

Contrario a nuestras expectativas, observamos una alta diversidad en *P. robertsi*, así como la evidencia de diferenciación genética histórica. Así mismo, se ha documentado en otros estudios de salamandras con microsatélites como *Ambystoma rivulare*, que incluso después de la metamorfosis los individuos permanecen en el mismo cuerpo de agua, lo que puede fomentar la prevalencia de diferentes variantes haplotípicas dentro de cuerpos de agua incluso en distancias pequeñas e incrementa la estructura poblacional (Heredia-Bobadilla et al. 2016). Factores de la historia de vida de las salamandras como el mantenimiento de la diversidad debido a la alta filopatría de las hembras y la poca habilidad de dispersión ha sido comúnmente la explicación a este tipo de patrones genéticos. De forma similar, en el ajolote *A. leorae* se han encontrado niveles altos de diversidad genética, altos niveles de heterocigocidad y una baja estructura genética estudiando 9 loci de microsatélite en la única población remanente de su distribución histórica en el volcán Tláloc de la Sierra Nevada en el complejo montañoso del Iztaccihuatl-Popocateptl (Sunny et al. 2014). Esto puede deberse a que en las 3 subpoblaciones identificadas en los sustratos de roca, arena y fango existe flujo génico restringido, que permite la existencia de una ligera aunque significativa estructura (Sunny et al. 2014). La explicación a esto es que en ocasiones cuando el conjunto de individuos se reduce a un rango de distribución limitada, estos pueden comportarse como una metapoblación y que en algunos casos, presenten mecanismos de reconocimiento de parientes cercanos como en *Plethodon cinereus* (Waldman 1988). Por otra parte, al igual que en nuestro estudio, en *A. leorae* no existe relación de aislamiento por distancia lo que indica que su alta diversidad puede deberse a un equilibrio deriva-flujo génico debido a una variación alélica ancestral. Esto a su vez indicaría que la población actual es el relicto de una población ancestral, lo cual pudo ocurrir tras un cuello de botella donde esta población se separó de la ancestral (o porque la gente dejó de consumir ajolotes para alimentación debido a su escasez) lo que a su vez implica que su variación alélica actual no se debe al flujo génico (Sunny et al. 2014). Por último, en otros estudios realizados en mamíferos como el perrito de las praderas, *C. mexicanus* de distribución restringida, donde se estudió a esta especie dentro de su área de distribución restringida de 477 Km<sup>2</sup>, se encontró un valor de Hd de 0.77 y una  $\pi=0.0016$ , se explica que la alta diversidad encontrada fuera de lo esperado pudo haberse producido por la subdivisión en grupos genéticos y explicarse por factores como la retención de la variación asociada con la subestructura dentro de los sitios de hábitat, promovidos por la filopatría de las hembras (Castellanos-Morales et al. 2015; Heredia-Bobadilla et al. 2016).

### 3. Demografía histórica.

Los sumarios estadísticos de  $D$  de Tajima indican que ninguno de los grupos genealógicos encontrados se aparta del modelo de evolución neutral, sin embargo, todos los valores fueron negativos (Tabla 4). En contraste, todas las  $F_s$  de  $F_u$  resultaron negativas y significativas, esto puede deberse a que este último estadístico es más sensible a los cambios demográficos (Ramos-Onzís y Rozas et al. 2002). En este caso, cuando dos hipótesis de crecimiento poblacional son encontradas, se deben optar por métodos alternos para discriminar entre tales hipótesis. Los BSP de todos los grupos genealógicos (Fig. 10) mostraron una línea con una ligera pendiente, esto es indicativo de que el tamaño poblacional puede mostrar un crecimiento constante aunque muy ligero (Emerson et al. 2001). Por otra parte, el índice raggedness de Harpending resultó significativo, por lo que en las distribuciones mismatch se rechaza el modelo de expansión poblacional (Fig. 10).

Con estos escenarios demográfico podemos apoyar la divergencia temprana de *P. robertsi*, dado que, como se ha mencionado, la  $H_d$  y  $\pi$  de cada grupo genealógico es elevada. Al observar el patrón de diferenciación genética y demografía histórica en otras poblaciones que han experimentado una expansión poblacional reciente dentro de los últimos 700 Ka como las de *P. leprosa* en la FVTM, podemos observar como la expansión demográfica influyo para obtener un valor alto de  $H_d$ , mientras que los cuellos de botella debido al efecto fundador que tendrían lugar después de asentarse en un nuevo hábitat influyeran en valor de  $\pi$  bajo (Parra-Olea 2012). En contraste, nuestros resultados indican que *P. robertsi* no ha sufrido eventos de expansión demográfica elevados que hayan provocado fluctuaciones en su  $H_d$  o  $\pi$ , permitiendo conservar relativamente integra la diversidad generada hasta ahora solamente por los procesos de aislamiento histórico (Moritz 1999).

También podemos considerar que un factor como el rango altitudinal de *P. leprosa*, que es menor al de otras salamandras (2500-3000 msnm), pudo facilitar su dispersión. Por otra parte, *P. robertsi* y *P. altamontana* se encuentran restringidas a altitudes mayores, de los 3000-3500 msnm. Bille 2009 menciona que es posible la existencia de una relación excluyente de hábitat entre *P. leprosa* y *P. robertsi* en la franja de los 2900-3000msnm restringiendo mutuamente el avance de estas especies por encima o por debajo de este límite altitudinal. En cualquier caso, el hábitat hasta ahora registrado para *P. robertsi* solo incluye bosque de *Pinus-Abies* por encima de los 2900-3000msnm, este hábitat limitado pudo haber afectado la subsecuente dispersión de *P. robertsi* en periodos posteriores a su establecimiento en el Nevado de Toluca, generando un número pequeño de variantes haplotípicas que haría difícil detectar eventos demográficos o solamente eventos de expansión de manera local y moderadas.

En cuanto a los subgrupos N e IC podemos ver que ofrecen información contrastante en los valores de  $H_d$  y  $\pi$ . El sub N se define claramente como una rama genealógica distinta dentro de las demás en el linaje NO. La alta  $H_d$  y  $\pi$  mostradas por el sub N puede deberse a que divergió de forma igualmente temprana del resto de las ramas de la genealogía, y

posiblemente un ligero incremento de población reciente como lo indica de su gráfica del BSP, generó el incremento del número de variantes haplotípicas, predominantemente en los sitios de AMA, AMAB y AMAC. Por su parte, el sub IC muestra una alta  $H_d$  pero una baja  $\pi$ , que demuestra una baja divergencia entre sus haplotipos (y las ramas cortas de la genealogía también implican pocos cambios entre sus secuencias). Por tanto, es posible que en los sitios RAN y MV (que predominan en este grupo) se haya dado un efecto fundador donde los haplotipos pertenecen a un linaje muy reciente y poco diferenciado, o bien, que hayan experimentado una reducción demográfica muy reciente para ser detectada.

Distintas hipótesis demográficas van acompañadas de un patrón genealógico distintivo (Emerson et al. 2001). De esta forma podemos relacionar los eventos demográficos con la dispersión genealógica. Se ha propuesto que las especies microendémicas como *P. robertsi* se originaron a partir de un evento fundador producto de un cuello de botella muy severo (Segovia-Sánchez 2015). Aunque nuestros análisis no conciernen al origen de nuestra especie en sí, sino a su diferenciación intraespecífica, un evento de reducción del tamaño efectivo poblacional seguido de una expansión poblacional daría como resultado patrón de migración tal que de un solo haplotipo ancestral radiaron todas las variantes observadas generando una genealogía de tipo estrella (Crespo et al. 2017). En contraste, la poca fluctuación demográfica de nuestros datos se refleja en una red donde las variantes haplotípicas se dispersaron y colonizaron en sitios aledaños gradualmente un haplotipo ancestral aparente.

Finalmente, es importante recalcar la reciente aunque notable influencia de los factores extrínsecos a la especie como lo es la actividad antropogénica dentro del APFFNT ya que esto pudo ya provocar la pérdida de los reservorios genéticos como son las zonas norte, sur pero sobre todo en la zona centro de la APFFNT donde la perturbación del bosque es más acentuada por asentamientos humanos y también el borde norte de la APFFNT en el sitio AG donde se da una fuerte actividad de tala. Esto puede afectar la resolución o el resultado de nuestros análisis de demografía histórica puesto que algunos métodos como los sumarios estadísticos son sensibles a la frecuencia y polimorfismo de los haplotipos, así como a nuestro tamaño de muestra, por lo que estas variables pueden ser una limitante al tratar de detectar los cambios demográficos, ya sea porque no representamos la frecuencia real de algún haplotipo o haber omitido algunos haplotipos en el muestreo.

#### 4. Consideraciones para la conservación.

Como parte de los resultados de los análisis genéticos, se deben hacer ciertas consideraciones del riesgo que afrontan las poblaciones y las opciones de manejo dadas las condiciones preponderantes respecto a las políticas de conservación de la especie en cuestión (Taylor y Dizon 1999). En la conservación de especies se ha remarcado la importancia que tiene la genética como un nivel de diversidad que se debe resguardar (Moritz 2002). La diversidad genética se puede dividir en dos componentes: el primero es



el que surge de la variación adaptativa, que se mide por medio de la variación fenotípica (y heredable) que produce adaptación diferencial de acuerdo a las condiciones ambientales que retienen esas características; el segundo es el que surge a partir del aislamiento histórico que se evidencia por la estructura filogenética con marcadores moleculares neutrales (Crandall et al. 2000; Moritz 2002). En función a estos dos componentes se ha circunscrito el concepto de unidad evolutivamente significativa o ESU, que alude a la unidad poblacional que requiere un manejo separado o independiente y prioridad para su conservación (Ryder 1986).

Por una parte, el criterio de ESU basado en la divergencia filogeográfica requiere que exista una monofilia recíproca entre linajes para que cada uno de estos pueda ser declarado una ESU y así conservar los linajes históricos de una especie (Moritz 1994).

En contraste, otros autores consideran que ningún tipo de aislamiento genético, ya sea histórico o reciente amerita una categorización de las poblaciones en unidades independiente si no se ha dado divergencia adaptativa entre ellas (Crandall et al. 2000).

De acuerdo con la genealogía obtenida sabemos que aunque *P. robertsi* si presenta diferenciación genética y aislamiento histórico que permite definir grupos genéticos distintos, los linajes no cumplen con la característica de monofilia recíproca y no calificarían como ESU bajo el criterio de Moritz (1994). Por otra parte, dado que el alcance del estudio presente no abarca marcadores de rasgos cuantitativos, el criterio de Crandall et al. 2000 se encuentra fuera de nuestro alcance.

Sin embargo, dado el continuo debate que se ha dado respecto a cuál de los componentes de diversidad genética tiene mayor relevancia en su definición (Vázquez-Domínguez y Domínguez-Domínguez 2009) se han destacado tres pautas que deben seguir las acciones de conservación orientadas a la conservación de especies (Moritz 2002): La primera es identificar las áreas que maximicen la representación de las variantes genéticas o que representen segmentos aisladas históricamente; la segunda alude a las áreas que resguarden presumiblemente los procesos evolutivos específicos que ayuden a la diversificación adaptativa o que sean sitios de admixión o conexión entre aquellos que estén aislados; y finalmente, asegurar continuos de extensión suficiente entre los gradientes ambientales más contrastantes.

Con las pautas anteriores y nuestros datos podemos hacer algunos comentarios respecto a las características de los sitios que abarca nuestra especie y la necesidad de conservación que se han manifestado anteriormente para el APPFNT.

En primer lugar, tanto en la ladera al Norte como al Sur del volcán existen linajes históricos de *P. robertsi*, sin embargo, son el Clado S (representado por PAL, LAG y STC, latitudinalmente más al Sur) y el sub N (representado principalmente por AMA, AMAB y AMAC, latitudinalmente más al Norte) los que presentan la mayor divergencia entre sus haplotipos y la mayor distancia en pasos mutacionales entre haplogrupos (como lo

muestran las redes de haplotipos), lo que los convierte en los linajes genealógicos más distantes, además de que poseen el mayor porcentaje de variantes haplotípicas. Estos dos grupos genealógicos se encuentran en zonas donde predomina el bosque de *Pinus* (Clado S) y el bosque de *Abies* (sub N) lo que puede ser un indicador de condiciones ambientales que guíen procesos evolutivos distintos (Crandall et al. 2000). Por otra parte, los sitios como CAR, que presentaron la mayor diversidad filogenética entre sus haplotipos se encuentra ubicado en la zona inter-carretera y existe evidencia de que hay admixión entre dos grupos genéticos al Norte y al Sur en este sitio. Estas características genealógicas cumplen con las condiciones prioritarias de conservación que se deben tomar según Moritz 2002.

Mastretta-Yanes et al. (2014) llevaron a cabo una propuesta de un plan alternativo de manejo dentro del APFFNT después del cambio de categoría donde se pretende preservar el bosque de *Abies religiosa* (oyamel), *Quercus laurina* (encino) y el bosque mixto de predominantemente *Pinus* (predominantemente *Pinus hartwegii*) y una considerable extensión del bosque de pino los cuales han sido sometidos a usos extractivos con diferentes intensidades (Franco et al. 2006) y que requieren de cierta extensión de área y densidad de población para sostener la diversidad de sus comunidades. En esta propuesta, se amplía el área de preservación destinada a aquellas áreas de mayor extensión boscosa (Fig. 12).

Uno de los aspectos más importantes a considerar en el cambio de categoría de una ANP es lo que se estipula en un programa de manejo como zonificación y subzonificación de una zona núcleo o “cráter” y una zona de amortiguamiento, que delimita las actividades que se permiten realizar en determinados sitios. En la propuesta de subzonificación presentada en el resumen del programa de manejo que la SEMARNAT realiza a través de la CONANP (CONANP, 2016) se especifican 6 polígonos para actividades de preservación de especies arbóreas como oyamel, pino y encino. Dos de ellos, ubicados al norte, suman un área de aprox. 3900 ha. y comprenden en su totalidad bosques de *A. religiosa* (Fig. 12), donde el área que abarcan corresponde a los municipios de Almoloya, Temascaltepec, Amanalco y Zinacantepec. El tercer polígono se encuentra ubicado al Sur, es el más grande de todos, rodea la zona núcleo y abarca un área de aprox. 7029 ha. en el que se encuentran bosque de *Abies-Pinus* y de *Pinus*. El resto de los polígonos se encuentran ubicados al Sur-Este y suman un área de aprox. 325 ha. y comprenden los bosques de *Q. laurina*.

Por otro lado y aunque no se cuenta con cifras exactas para la extensión de la zona destinada a la preservación, el plan de manejo alternativo desarrollado por Mastretta-Yanes et al. (2014) comprende una extensión notablemente más amplia para los bosques de *Abies* al norte y los bosques de *Abies-Pinus*, de *Pinus* y de *Quercus* al Sur y Sur-Este del (Fig. 12), lo cual abarcando una mayor cobertura en los sitios de la localidad de Amanalco. Por otro lado, pretende declarar como zona de preservación una extensión mayor de bosque mixto de Pino en la porción sur de la ladera del volcán. Por último, la zona Inter-

Carretera, se encuentra en una zona destinada al aprovechamiento sustentable de recursos forestales y otros recursos naturales.

Al contrastar las propuestas de plan de manejo podemos ver que si bien ambas presentan polígonos de preservación en las zonas donde ocurre la mayor extensión de bosque de *Abies* y *Pinus*, la última propuesta comprende una mayor extensión de área en la porción Norte, donde se encuentra el hábitat de uno de grupos genealógicos mayormente diferenciados y más diversos de *P. robertsi* sobre todo en la localidad de Amanalco. Una razón más del porque la propuesta alternativa puede considerarse la más adecuada es debido a que se preservan la extensión de bosque necesaria para mantener la variabilidad genética de sus poblaciones, además de sostener las interacciones ecológicas de las cuales dependen los ecosistemas (Mastretta et al. 2014). Sin embargo, ambas propuestas presentan aproximadamente la misma extensión de área para preservación en la porción Sur, que es la zona donde se distribuye otro de los linajes mayormente diferenciados de *P. robertsi*. Finalmente, en la ladera Norte, dentro de la zona Inter-Carretera donde se encuentra el linaje menos diverso, aunque posiblemente más antiguo de *P. robertsi*, ambas propuestas presentan una extensión idéntica del área destinada al aprovechamiento sostenible de ecosistemas y recursos naturales donde, al menos en nuestro sitio CAR, se puede considerar como un punto de flujo genético reciente, como lo muestran las redes, y es necesario considerar la conservación/generación de un corredor boscoso para mantener la diversidad y la interacción genética para evitar la fragmentación de las poblaciones naturales, puesto que es aquí donde las variantes haplotípicas pueden verse en mayor riesgo de desaparecer por las actividades agrícolas y de aprovechamiento forestal si no se aprovecha estratégicamente esta porción del bosque donde habita *P. robertsi*.

La necesidad de a) ampliar tanto el área destinada a la preservación del bosque de *Abies* al Norte, b) de mantener la densidad y extensión del bosque mixto al Sur y c) de permitir la existencia de un corredor boscoso continuo y no fragmentado pese a las actividades de manejo y uso de suelo en la zona de Inter-Carretera que conecta a las extensiones de bosque anteriores, es necesario para preservar la funcionalidad de la biota del Nevado de Toluca (Mastretta-Yanes et al. 2014) y es especialmente importante para mantener la existencia de los linajes principales de *P. robertsi*, puesto que si estos desaparecen, su recuperación no sería posible sin que ocurriera un proceso de diferenciación genética histórico similar al que ha tenido lugar, lo cual está claramente fuera de todo escenario realista de conservación (Moritz 2002).

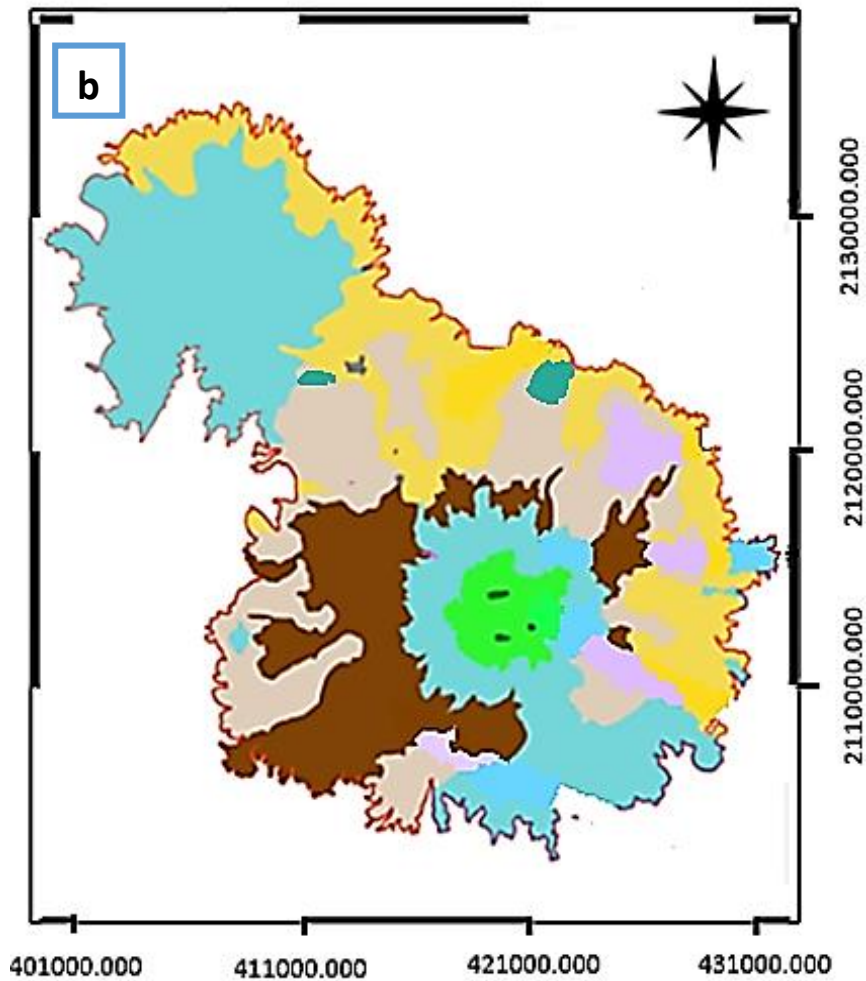
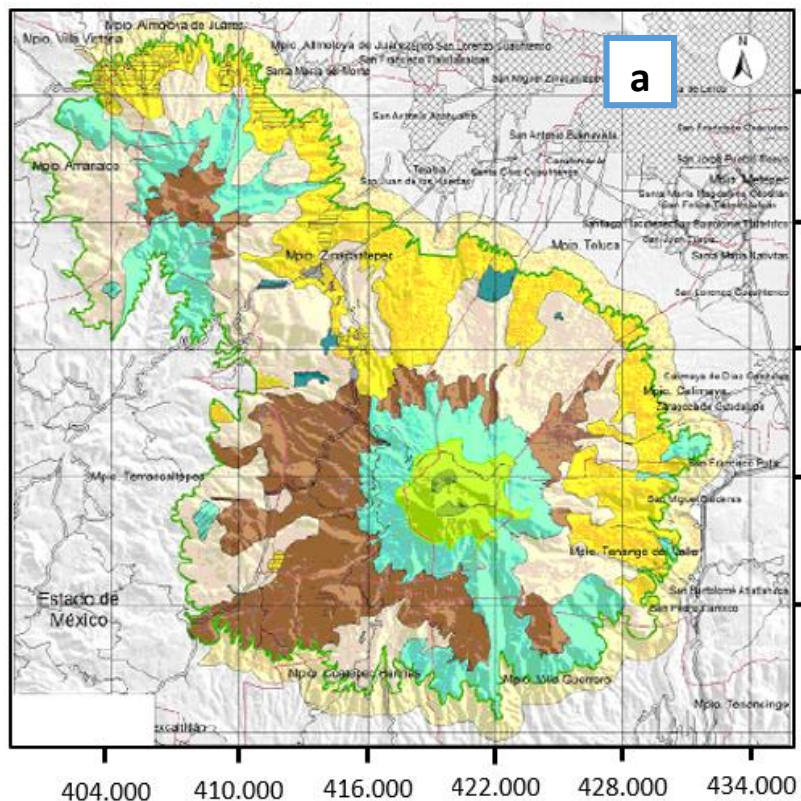
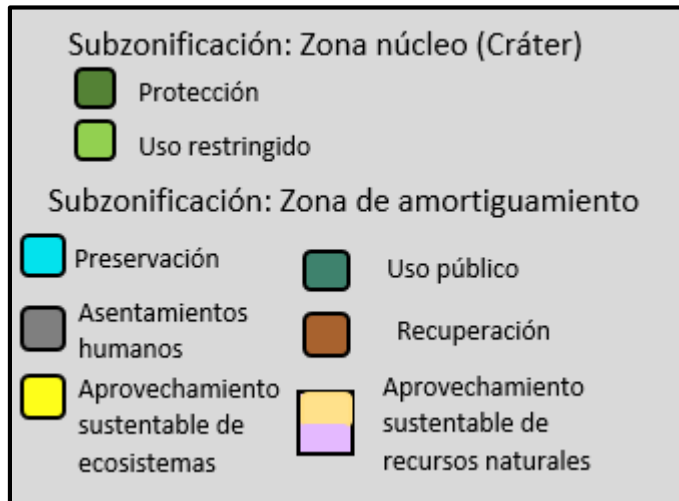


Figura 12. a) Polígonos de subzonificación del APFFNT contenida en el resumen del plan de manejo emitido por la CONANP en 2016, después del cambio de categoría de ANP del Nevado de Toluca en 2013. b) Polígonos de subzonificación del plan de manejo alternativo propuesto por Mastretta-Yanes et al. 2014 para la misma área.

## Conclusiones

*P. robertsi* muestra estructura filogenética, lo que ha llevado al surgimiento de linajes genealógicos que han estado diferenciándose. Existen dos linajes principales, uno en la ladera Sur del cráter del volcán y otro en su ladera Norte, estos son aquellos que muestran poco grado de admixión, debido probablemente a que divergieron y quedaron aislados más tempranamente en la historia evolutiva de la especie. Por otro lado, se han encontrado subgrupos genealógicos que presentan niveles de admixión intermedios y que, debido a la ausencia de barreras geográficas entre ellos, han estado en constante flujo e intercambio de haplotipos que se traduce en una relación genealógica más cercana. Sin embargo, es posible que su divergencia haya comenzado favorecida por un cambio en las condiciones ambientales impuestas, ya que uno de ellos se haya regionalizado en bosque de *Abies* y el otro en bosque de *Pinus*.

Entre los linajes encontrados no existe monofilia recíproca, lo que significa que no han estado aislados el tiempo suficiente como para tener una historia evolutiva independiente, lo que se debe al flujo secundario de individuos que ha ocurrido una vez que se ha dado la diferenciación. Esto puede tener implicaciones para la permanencia de las poblaciones al Norte y Sur, puesto que el aislamiento entre ellas podría comprometer la diversidad actual de los individuos en general.

Por otra parte, no se detectaron eventos de expansión demográfica para *P. robertsi*, por lo que se infiere que en este caso, el tiempo y la distancia geográfica han sido los factores determinantes para mostrar los niveles de divergencia y diversidad alcanzados, donde han influido ampliamente la filopatría y la poca vagilidad detectada en otras salamandras microendémicas.

Por tanto, es necesario conservar las regiones de bosque donde residen o se regionalizan estos linajes genéticos (Norte, Centro y Sur del APFFNT), dado que el contexto actual de conservación del APFFNT ha abierto esta zona para la extracción de recursos. Para lo cual, hemos analizado las propuestas de varios autores hechas al plan de manejo de la misma, enfatizando que se requiere un corredor de bosque entre la parte más al Norte en el sitio de Amanalco, que se caracteriza por bosque de *Abies*, y la parte alrededor del cráter, tanto en la ladera Norte en la región latitudinalmente céntrica del APFFNT en la zona de Inter-Carreteras, como en la ladera Sur en los sitios de Santa Cruz a Las lágrimas, que se caracteriza predominantemente por bosque de *Pinus* y *Quercus*.

Los niveles de divergencia haplotípica mostrados por *P. robertsi*, una especie microendémica, son similares a los mostrados por los linajes más ancestrales de una especie filogenéticamente más antigua y de distribución amplia, a saber, *P. leprosa*. Sin embargo, la evidencia filogeográfica muestra que los linajes de esta última, comenzaron a diferenciarse en el último millón de años, que es el tiempo aproximado del surgimiento de *P. robertsi* (900 Ka).

Esto da cuenta de que a pesar de la diferencia en la amplitud de la distribución geográfica entre ambas especies, han ocurrido procesos geológicos, como el aislamiento de las poblaciones de *P. leprosa* en el cofre de Perote y de *P. robertsi* en el Nevado de Toluca, que han llevado a mostrar valores similares de diferenciación en un mismo periodo de tiempo de fragmentación de sus poblaciones. Por otra parte, se tienen los valores mayores de diferenciación que se observan en *P. robertsi* respecto a los valores observados en linajes recientes de *P. leprosa*, que tuvieron surgimientos similares en tiempo (~700 Ka). Es decir, que no solo el tiempo de surgimiento de las especies o la distancia geográfica entre sus respectivas poblaciones son los únicos factores determinantes para aumentar la diferenciación genética, sino que los procesos climático-geológicos, así como las posibles diferencias en la historia de vida (como el rango de distribución geográfica) de estas especies jugaron un papel importante para aumentar o disminuir la estructuración y diferenciación. Más enfáticamente, la importancia de esto radica en que especies microendémicas de *Pseudoeurycea* que surgieron recientemente como *P. robertsi*, *P. longicauda*, *P. altamontana* o *P. gadovii* y que se hayan circunscritas a un solo sistema volcánico, donde el ambiente puede proporcionar condiciones relativamente homogéneas y por tanto pocas fluctuaciones demográficas, son aquellas en las que los procesos de aislamiento geográfico pueden ser los más determinantes en la diferenciación aún en periodos de tiempo relativamente cortos, o al menos, en mayor medida que en aquellas especies de distribución amplia.

Es importante mencionar que aunque nuestro tamaño global de muestra es alto, es posible que no hayamos representado la frecuencia real de algún haplotipo dentro de algún sitio, por lo que las interpretaciones demográficas aquí presentadas deben tomarse con cautela. Un estudio con una N mayor y un número más amplio de genes ayudaría a reforzar la información extraída y las inferencias hechas aquí.

Se necesitan realizar trabajos de genética que aborden los diferentes aspectos de la diversidad tanto neutral (como microsatélites) como fenotípica o de caracteres bajo selección (QTL's) que reflejen la estructura poblacional reciente y los factores ambientales que pueden estar influyendo en la diferenciación genética de la especie. Así mismo, es necesario ampliar en tamaño de muestra, así como el área muestreada pues esta información ayudaría a tomar mejores decisiones acerca de las zonas donde existe la mayor cantidad tanto de diversidad como de individuos para mantener la viabilidad de la especie a largo plazo.

## Literatura citada

- Aguilar-Miguel, X (2005) *Pseudoeurycea robertsi*. Algunas especies de anfibios y reptiles contenidos en el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-ECOL-2000. Facultad de Ciencias, CIRB-UAEMex. Bases de datos SNIB-CONABIO. Proyecto W035. México, D.F.
- Aguirre-Planter E, Furnier GR, Eguiarte LE (2000) Low levels of genetic variation within and high levels of genetic differentiation among populations of species of *Abies* from southern Mexico and Guatemala. *American journal of botany*, 87, 362-371.
- Alonso S y Armour J (2001) A highly variable segment of human subterminal 16p reveals a history of population growth for modern humans outside Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (3), 864-869.
- Arif I, Khan H (2009) Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32, 9-17.
- Avise J (1989) Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution*, 43, 1192-1208.
- Avise J (1995) Mitochondrial DNA polymorphism and connection between genetics and demography of relevance to conservation. *Conservation biology*, 9, 686-690.
- Avise J (2000) *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts. London, England.
- Avise J (2004) *Molecular Markers, Natural history, and evolution*. Massachusetts, U.S.A.: Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Avise J (2009) *Phylogeography: retrospect and prospect*. *Journal of Biogeography*, 36, 3-15.
- Avise J, Arnold J, Ball M, Bermingham E, Lamb T, Neigel J, Reeb C, Saunders N (1987) Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 489-522.
- Avise J, Ball MR, Arnold J (1988) Current versus historical population sizes in vertebrate species with high gene flow: A comparison based on mitochondrial DNA lineages and inbreeding theory for neutral mutations. *Molecular Biology and Evolution*, 5(4), 331-344.
- Avise J, Ellis D (1986) Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals (and discussion). *Philosophical transactions of the royal society of London. Biological Sciences*, 312, 325-342.

- Bille T (2009) Field observations on the salamanders (Caudata: Abystomatidae, Plethodontidae) of Nevado de Toluca, Mexico. *Raices*, 1, 155-164.
- Brandt J, Brandt AL, Ammer FK, Roca AL, Serfass TL (2014) Impact of population expansion on genetic diversity and structure of river otters (*Lontra canadensis*) in central north America. *Journal of Heredity*, 105(1), 39-47.
- Bryson J RW, García-Vázquez UO, Riddle BR (2011a) Phylogeography of middle american gophersnakes: mixed responses to biogeographical barriers across the Mexican Transition Zone. *Journal of Biogeography*, 38, 1570-1584.
- Bryson J RW, Murphy RW, Graham MR, Lathrop A, Lazcano D (2011b) Ephemeral Pleistocene woodlands connect the dots for Highland rattlesnakes of the *Crotalus intermedius* group. *Journal of Biogeography*, 38, 2299-2310.
- Bryson J RW, Riddle BR (2012) Tracing the origins of widespread highland species: a case of Neogene diversification across the Mexican sierras in an endemic lizard. *Biological Journal of the Linnean Society*, 105(2), 382-394.
- Caballero M, Lozano-García Socorro, Vázquez Selem L, Ortega B (2010) Evidencias de cambio climático y ambiental en registros lacustres y cuencas lacustres del centro de México durante el último máximo glaciario. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 62, 359-377.
- Castañeda-Rico S, León-Paniagua L, Vázquez-Domínguez E, Navarro-Singuenza AG (2014) Evolutionary diversification and speciation in rodents of the Mexican lowlands: The *Peromyscus melanophrys* species group. *Molecular phylogenetics and evolution*, 70, 454-463.
- Castellanos-Morales G, Ortega J, Castillo-Gómez R, Sackett L, Eguiarte L (2015). Genetic variation and structure in contrasting geographic distributions: Widespread Versus Restricted Black-tailed prairie dogs (Subgenus *Cynomys*). *Journal of Heredity*, 106, 478-490.
- Castillo-Cerón JM, Goyenechea I (2007) Conceptos básicos en sistemática filogenética: los deuterostomados como ejemplo. En: Contreras-Ramos A, Cuevas C, Goyenechea I, Iturbe U, ed. *La Sistemática: Base del conocimiento de la biodiversidad*, 1ra. ed. México, Hidalgo: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 145-158.
- Crandall KA, Bininda-Emonds RP, Mace GM, Wayne RK (2000) Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15, 290-295.
- Crespo CM, Russo MG, Hajduk A, Lanata JL, Dejean CB (2017) Variabilidad mitocondrial en muestras pre-colombinas de la Patagonia Argentina. *Hacia una visión de su poblamiento desde el ADN antiguo. Revista Argentina de Antropología Biológica*, 19, 1-21.



- Darriba D, Toboada GL, Doallo R, Posada D (2011) *jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing* 9(8), 722.
- Diario Oficial de la Federación (2013) Decreto que reforma, deroga y adiciona diversas disposiciones del diverso publicado el 25 de enero de 1936, por el que se declaró Parque Nacional la montaña denominada “Nevado de Toluca” que fue modificado por el diverso publicado el 19 de Febrero de 1937. Citado el 20 de junio de 2017. Extraído de la página *Secretaría de Gobernación*, en la liga: [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5315889&fecha=01/10/2013](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5315889&fecha=01/10/2013)
- Diario Oficial de la Federación (2016) Acuerdo por el que se da a conocer el Resumen de Manejo del Área Natural Protegida con categoría de Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca. Citado el 20 de diciembre de 2017. Extraído de la página [gob.mx](http://www.gob.mx) en la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas en la liga: [http://www.conanp.gob.mx/que\\_hacemos/pdf/programas\\_manejo/RESUMEN\\_NEVADO\\_TOLUCA.pdf](http://www.conanp.gob.mx/que_hacemos/pdf/programas_manejo/RESUMEN_NEVADO_TOLUCA.pdf)
- Domínguez-Domínguez O, Vázquez-Domínguez E (2009) Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32.1, 59-70.
- Drummond A, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 214.
- Drummond AJ, Rambaut B, Shapiro B, Pybus OG (2005) Bayesian Coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 22, 1185-1192.
- Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetic Resources*, 4(2), 359-361. Disponible en: <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>
- Emerson BC, Paradis E, Thébaud C (2001) Revealing the demographic histories of species using DNA sequences. *Trends in ecology and evolution*, 16(12), 707-716.
- Ferrari L, Orozco-Esquivel T, Manea V, Manea M (2012) The dynamic history of the Trans-Mexican Volcanic Belt and the Mexican subduction zone. *Tectonophysics*, 522-523, 122-149.
- Fluxus Technology Ltd (2004-2017). NETWORK 5.0.0.1 (citado el 8 de agosto del 2017). Disponible en: <http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>
- Franco Mass S, Regil García HH, González Esquivel C, Nava Bernal G (2006) Cambio de uso de suelo y vegetación en el Parque Nacional Nevado de Toluca, México, en el periodo 1972-2000. *Boletín del Instituto de Geografía, UNAM*, núm 61, 38-57.

- Freeman S, Herron J (2007) *Evolutionary Analysis*. 4° ed. United States of America: Pearson.
- Fu YX y Li WH (1993) Statistical test of neutrality of mutations. *Genetic society of America*, 133, 693-709.
- Fu, YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147, 915-925.
- Futuyma D (2005) *Evolution*. United States of America: Sinauer Associates Inc.
- Geospiza Inc. (2004-2006) Finch TV Version 1.4.0 (citado el 8 de agosto del 2017). Disponible en: [http://descargar.cnet.com/FinchTV/3000-2054\\_4-10289087.html](http://descargar.cnet.com/FinchTV/3000-2054_4-10289087.html)
- Gómez-Tuena A, Orozco-Esquivel M, Ferrari L (2006) Petrogénesis ígnea de la Faja Volcánica Transmexicana. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*. Tomo LVII, no. 3, 227-283.
- Hamilton M (2009) *Population genetics*. Reino Unido: Wiley-Blackwell.
- Heredia-Bobadilla R, Monroy-Vilchis O, Zarco-González M, Martínez-Gómez D, Mendoza-Martínez D, García Aguilar A (2016) Genetic structure and diversity in an isolated population of an endemic mole salamander (*Ambystoma rivulare* Taylor, 1940) of Central Mexico. *Genetica*, 144(6), 689-698.
- Hey J y Machado C (2003) The study of structured populations- new hope for a difficult and divided science. *Nature reviews*, 4, 535-543.
- Hudson R (1991) Gene genealogies and the coalescent process. En: Futuyma D y Janis A, ed. *Oxford surveys in Evolutionary Biology*, 7, 1-44.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics applications note*, 17, 754-755.
- Huson DH y Bryant (2006) Application of phylogenetics networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23(2), 254-267.
- Jiménez P, Collada C (2000) Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en estrategias de conservación. Universidad Politécnica de Madrid.
- Lanteri AA y Confalonieri VA (2003) Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. En: Morrone JJ y Llorente J, ed. *Una perspectiva Latinoamericana de la biogeografía*, 1ra ed. México, D.F.: Las prensas de ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM, 185-193.
- Lessa E (2004) *Guía de estudio de genética de poblaciones*. Montevideo, Uruguay: Facultad de Ciencias, Laboratorio de evolución.

- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *International Society for Computational Biology*, 25, 1451-1452.
- Lynch JF, Wake DB, Yang SY (1983) Genic and morphological differentiation in mexican *Pseudoeurycea* (Caudata: Plethodontidae) with a Description of a New Species. *Copeia*, 4, 884-894.
- Martínez-Castilla L (2007) Reconstrucción de la historia de cambio de los caracteres. Pp. 87-160. En: Eguiarte L, Aguirre X, Souza V (Ed.). *Ecología Molecular*. México, D.F.: Semarnat, CONABIO.
- Mastretta-Yanes A, Cao R, Nicasio Arzeta S, Quadri P, Escalante Espinosa T, Arredondo L, Piñero D (2014) Opinión ¿Será exitosa la estrategia del cambio de categoría para mantener la biodiversidad del Nevado de Toluca?. Citado el 12 de Diciembre de 2017. Disponible en: <http://web.ecologia.unam.mx/oikos3.0/index.php/todos-los-numeros/articulos-antiores/105-sera-exitosa-la-estrategia-del-cambio-de-categoria-para-mantener-la-biodiversidad-del-nevado-de-toluca>
- Mastretta-Yanes A, Moreno-Letelier A, Piñero D, Jorgensen TH, Emerson BC (2015) Biodiversity in the Mexican highlands and the interaction of ecology, geography and climate within the Trans-Mexican Volcanic Belt. *Journal of Biogeography*, 42, 1586-1600.
- Moritz C (1999) Conservation units and translocations: Strategies for conserving evolutionary processes. *Hereditas*, 130, 217-228.
- Moritz C (2002) Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology*, 51, 238-254.
- Moritz C, Schneider C, Wake D (1992) Evolutionary relationship within the *Ensatina eschscholtzii* complex confirm the ring species interpretation. *Sist. Biol.* 41(3):273-291
- Morrone J (2010) El lenguaje de la cladística. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.: Dirección de publicaciones y fomento editorial. Facultad de Ciencias.
- Ortíz-Medrano A, Moreno-Letelier A, Piñero D (2008) Fragmentación y expansión demográfica en las poblaciones mexicanas de *Pinus ayacahuite* var. *ayacahuite*. *Boletín de la Sociedad Botánica Mexicana*, 83, 25-36.
- Parra-Olea G (2002) Molecular phylogenetic relationships of neotropical salamanders of the genus *Pseudoeurycea*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 22: 234-246.
- Parra-Olea G, Flores-Villela O, Mendoza-Almeralla C (2014) Biodiversidad de anfibios en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85: 460-466.

- Parra-Olea G, Wake J, Hanken J (2008) *Pseudoeurycea robertsi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008. Consultado el 14 de marzo de 2017. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T59393A11916577.en>.
- Parra-Olea G, Windfield JC, Velo-Antón G, Zamudio KR (2012) Isolation in hábitat refugia promotes rapid diversification in montane tropical salamander. *Journal of biogeography*, 39, 353-370.
- Peakall R y Smouse PE (2012) GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
- Peck D y Congdon B (2004) Reconciling historical processes and populaion structure in the sooty tern *Sterna fuscata*. *Journal of Avian Biology*, 35, 327-335.
- Piñero D, Barahona A, Eguiarte L, Rocha-Olivares A, Salas-Lizana R (2008) La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. En: *Capital natural de México*, vol. I: *Conocimiento actual de la biodiversidad*. CONABIO, México, pp. 415-435.
- Posada D (2008) JModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 1253-1256.
- Posada D y Crandall KA (2001a) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in ecology and evolution*, 16(1), 37-45.
- Posada D y Crandall KA (2001b) Selecting the Best-Fit Model of Nucleotide Substitution. *Systematic Biology*, 50, 580-601.
- Premoli A, Quiroga MP, Souto CP, Mathiasen P (2011) Genética de la conservación: de poblaciones a filogeografía. Pp. 31-45. En: Simonetti J y Dirzo R (Ed.). *Conservación biológica: perspectivas desde América Latina*. Editorial Universitaria.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Infering population structure using multilocus genotype data. *Genetics Society of America*, 15, 945-959.
- Pybus OG, Rambaut, Harvey PH (2000) An integrated framework of viral population history from reconstructed genealogies. *Genetics*, 155, 1429-1437.
- Quiroga MP, Premoli A (2013) El rol de las poblaciones marginales en la conservación del acervo genético de una única conífera del sur de Yungas en Argentina y Bolivia, *Podocarpus parlatorei* (Podocarpaceae). *Ecología en Bolivia*, 48. 4-16.
- Ramírez-Soriano A, Ramos-Onsis SE, Rozas J, Calafell F, Navarro A (2008) Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks. *Genetics*, 179, 555-567.

- Ramos-Onsins S y Rozas J (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular biology and evolution*, 19, 2092-2100.
- Rand D (1996) Neutrality tests of molecular markers and the connection between DNA polymorphism, demography, and conservation biology. *Conservation biology*, 10, 665-671.
- Rius M, Darling JA (2014) How important is intraspecific genetic admixture to the success of colonising populations?. *Trends in ecology and evolution*, 28, 233-242.
- Rogers A (2015) Lecture notes on gene genealogies. Datos sin publicar.
- Rogers A, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9(3), 552-569.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics applications note*, 19, 1572-1574.
- Rovito S, Parra-Olea G (2016) Neotropical Plethodontid Biogeography: Insights from Molecular Phylogenetics. *Copeia*, 104, 222-232.
- Rovito S, Parra-Olea G, Recuero E, Wake D (2015) Diversification and biogeographical history of neotropical plethodontid salamanders. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 175, 167-188.
- Sánchez-Sánchez H (2012) Filogeografía comparada de *Dendroctonus brevicomis* LeConte, *D. approximatus* Hopkins y *D. adjunctus* Blandford (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Schaal B, Olsen K (2000) Gene genealogies and population variation in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 7024-7029.
- Schneider S, Excoffier L (1999) Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 152, 1079-1089.
- Segovia-Sánchez MG (2015) Especiación de salamandras del género *Pseudoeurycea* en el Eje Neovolcánico de México. Tesis de Maestría. Centro de Investigaciones Avanzadas, Instituto Politécnico Nacional. Guanajuato, México.
- SEMARNAT (2010) Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. México: Diario Oficial de la Federación, 10 de Diciembre 2010.

- Slatkin M y Hudson R (1991) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, 129, 555-562.
- Suárez-Atilano M, Burbrink F, Vázquez-Domínguez E (2014) Phylogeographical structure within *Boa constrictor imperator* across the lowland and mountains of Central America and Mexico. *Journal of biogeography*, 41(12), 2371-2384.
- Sunny A, Monroy-Vilchis O, Fajardo V, Aguilera-Reyes U (2014) Genetic diversity and structure of an endemic and critically endangered stream river salamander (Caudata: *Ambystoma leorae*) in Mexico. *Conservation Genetics*, 15, 49-59.
- Sunny A, Monroy-Vilchis O, Zarco-González M, Mendoza Martínez GD, Martínez-Gómez D (2015) Genetic diversity and genetic structure of an endemic Mexican Dusky Rattlesnake (*Crotalus triseriatus*) in highly modified agricultural landscape: implications for conservation. *Genetica*, 143, 705-716.
- Swofford DL, Olsen GJ, Waddell PJ, Hills M (1996) Phylogenetic inference. En: Hills DM, Moritz C, Mable BK, ed. *Molecular Systematics*, Sunderland Massachusetts, Sinauer Associates.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetic society of America*, 12, 585-595.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Sudhir K (2013) MEGA6: Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729
- Taylor BL, Dizon E (1999) First policy then science: why a management unit based solely on genetic criteria cannot work. *Molecular Ecology*, 8, S11-S16.
- Tinaut A y Ruano F (2003) Biodiversidad, clasificación y filogenia. En: Cruz MS, ed. *Evolución: la base de la biología*, España: S.A.L Proyecto Sur de ediciones, 293-306.
- Vázquez-Domínguez E (2007) Filogeografía y vertebrados. Pp. 441-466. En: Eguiarte L, Aguirre X, Souza V (Ed.). *Ecología molecular*. México, D.F.: Semarnat, CONABIO.
- Vázquez-Domínguez E, Castañeda-Rico S, Garrido-Garduño T, Gutiérrez-García T (2009). Avances metodológicos para el estudio de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista Chilena de Historia Natural*, 82, 277-297.
- Velo-Antón G, Parra JL, Parra-Olea G, Zamudio KR (2013) Tracking climate change in a dispersal-limited species: reduced spatial and genetic connectivity in a montane salamander. *Molecular Ecology*, 22, 3261-3278.
- Wake D, Pineda E, Parra-Olea G (2016a) IUCN SSC Amphibian Specialist Group. *Pseudoeurycea leprosa*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016:

e.T59383A53982716. Consultado el 03 de octubre de 2017. Disponible en:  
<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T59383A53982716.en>.

Wake D, Parra-Olea G, Hanken J, Rovito S (2016b) IUCN SSC Amphibian Specialist Group. *Pseudoeurycea robertsi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T59393A53983925. Consultado el 17 de marzo de 2017. Disponible en:  
<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T59393A53983925.en>.

Waldman B (1988) The ecology of kin recognition. Annual Review of Ecology and Systematics, 19, 543-571.

Yang Z y Rannala B (2012) Molecular phylogenetics: principle and practice. Nature reviews, 14, 303-314.

## Anexos

### 1. Extracción de DNA.

Para preparar la proteinasa K a 20mg/ml

REACTIVOS:

- Proteínasa K en polvo
- Tris-HCl 50 mM
- Ca(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> 2mM (Acetato de Calcio)

#### 1.1) Para el Acetato de Calcio:

Peso molecular del Acetato de Calcio: 158.17g

$$\frac{158.17g}{1mol} = \frac{0.1587g}{1mmol}$$

Para una solución 2 mM:

$$(0.1587g/mmol)(2mmol)=0.316g$$

La anterior es la cantidad necesaria para preparar una solución de 1Lt al 2mmM. Para preparar 100ml de solución a dicha concentración, se pesa solo una décima parte del reactivo, es decir:

Peso Final= 0.0316g (disueltos en 100ml de H<sub>2</sub>O dd)

#### 1.2) Para el Tris-HCl 50mM

Empleamos la siguiente fórmula:

$$C_i V_i = C_f V_f$$

$V_i = X$   
 $V_f = 100\text{ml}$   
 $C_i = 1\text{ M} = 1000\text{ mM}$   
 $C_f = 50\text{ mM}$

$$V_i = \frac{(50\text{ mM})(100\text{ml})}{1000\text{ mM}} = 5\text{ml}$$

Se deben disolver 5 ml de Tris-HCl 1M en los mismos 100ml de la solución de Acetato de Calcio.

1.3) Para disolver la proteinasa K:

Se pesan y se disuelven 20mg por cada mililitro de solución Tris-HCl:Acetato de Calcio que se requiera.

2. Electrofóresis

2.1 Para preparar gel de agarosa al 1.0%

REACTIVOS:

- Agarosa en polvo
- TBE (Tris-Borato-EDTA) al 1X

Se añaden 0.75g de agarosa en 75ml de TBE al 1X pH 8.0 en un matraz Erlenmeyer y se coloca una película de polietileno al matraz con pequeños orificios. Se pone a calentar hasta casi el hervor, agitando y cuidando que el volumen de la disolución no ascienda para evitar que el reactivo no disuelto se quede en las paredes del matraz. Cada vez que borboten burbujas de vapor en la superficie del líquido se debe alejar de la fuente de calor y agitar levemente para disipar el calor, y se continúa calentando hasta que se observe la disolución transparente.

En la cámara de electroforesis horizontal previamente nivelada se coloca los peines y se agrega la solución de agarosa al 1%. Se deja solidificar y se retiran los peines.

3. PCR.

3.1 Para desliofilizar los primers.

Se realizan diluciones del primer para obtener la cantidad deseada a emplear en la reacción.

<i>Primer Forward/Reverse (100mM)</i>	<i>Alícuota (10mM)</i>
	10µL de primer
	90µL de H <sub>2</sub> O dd

3.2 Para la solución de DNTP's



*Solución stock de dNTP's (10mM)*

*Alícuota (2mM)*

20µL de la solución stock de DNTP's  
80µL de H<sub>2</sub>O

### 3.3 Fórmula para realizar los cálculos del PCR.

$$C_i V_i = C_f V_f$$

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración inicial (C<sub>i</sub>)</i>	<i>Concentración final (C<sub>f</sub>)</i>	<i>Volumen en el tubo (V<sub>i</sub>)</i>
<i>H<sub>2</sub>O</i>			8.45µL
<i>MgCl<sub>2</sub></i>	25 mM	2.5mM	0.75 µL
<i>Pf</i>	10 mM	0.3 mM	0.45 µL
<i>Pr</i>	10 mM	0.3 mM	0.45 µL
<i>Buffer</i>	10X	1X	1.5 µL
<i>dNTP's</i>	2mM	0.3 mM	2.25 µL
<i>Taq</i>	5U/ µL	0.05U/ µL	0.15 µL
<i>DNA</i>	Variable		*
	<i>Volumen final de la reacción (V<sub>f</sub>)</i>		**15 µL

\*La concentración de DNA del templado se cuantificó con un equipo NANODROP y resultó ser variable, por lo que el volumen empleado en cada reacción fue estandarizado de acuerdo a la concentración de un control positivo del cual se empleó siempre 1 µL.

\*\*El volumen final varía alrededor de ±0.5 µL, aunque en algunas muestras alcanzó hasta los 16 µL debido al volumen de DNA.