

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

FILOGEOGRAFÍA DE *Bursera microphylla* A. Gray (BURSERACEAE), UNA
ESPECIE ARBÓREA ENDÉMICA DEL DESIERTO SONORENSE



ANDREA MONSERRATH LÓPEZ MARTÍNEZ

Hermosillo, Sonora

Mayo 2015

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



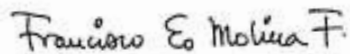
"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis de Andrea Monserrath López Martínez la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de Licenciado en Biología con Opción en Recursos Naturales Terrestres.



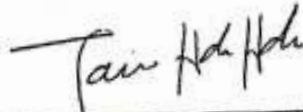
Dr. Francisco Molina Freaner
Director de Tesis



Dra. María Cristina Peñalba Garmendia
Sinodal Secretario



Dra. Reyna Amanda Castillo Gámez
Sinodal



Dra. Tania Hernández Hernández
Suplente

*A mis padres
A mi amor, Iván Absalón*

“-¿Has visto cómo crecen las plantas? Al lugar en que cae la semilla acude el agua: es el agua la que germina, sube al sol. Por el tronco, por las ramas, el agua asciende al aire, como cuando te quedas viendo el cielo de medio- día y tus ojos empiezan a evaporarse. Las plantas crecen de un día a otro... .-Yo quiero sembrar una semilla en el río, a ver si crece un árbol flotante para treparme a jugar. En su follaje se enredarían los peces, y sería un árbol de agua que iría a todas partes sin caerse nunca”

Jaime Sabines

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora y a mis profesores del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas por proporcionarme todo lo necesario para mi formación académica.

Al Laboratorio de Ecología Molecular y Funcional del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por permitirme el acceso a las instalaciones y ofrecerme todo el material y equipo necesario para el llevar a cabo el proyecto de tesis.

A mi director de tesis **Dr. Francisco Molina Frenner**, por su dedicación, disponibilidad, paciencia y su apoyo incondicional a lo largo del desarrollo de mi tesis, pero también por todas sus enseñanzas como maestro y persona, sin duda, es el mejor de mis maestros y uno de mis ejemplos a seguir.

A los miembros de mi comité de tesis **Dra. Cristina Peñalba, Dra. Reyna Castillo y Dra. Tania Hernández**, por orientarme con sus críticas, consejos, revisiones y enseñanzas, muchas gracias.

A **José Martínez Rodríguez**, técnico del Laboratorio de Ecología Molecular y Funcional de la UNAM, por su gran apoyo en el trabajo de laboratorio.

A mis padres: **Carlos Ernesto López Velasco y María Monserrato Martínez Ruiz** por brindarme todo su amor, paciencia, apoyo y su motivación para crecer cada vez más y alcanzar todos mis sueños, siempre han confiado en mí, muchas gracias papis, sin ustedes no hubiera sido posible todo lo que he logrado, los amo.

A mis hermanos **Gabriela y Carlos** y a toda mi familia en especial a mi abuelo **Ernesto López Celaya**, quien es mi segundo padre, también a mi nina y quien me cuidó desde una

niña, **Rosaura Bueno**, por todo su cariño y por los buenos momentos que he compartido con ustedes, los quiero mucho.

A mis amigos **Neto, Kini, Andrés, Susana, Lechu, Olga, Itzel, Mache, Crisna y Mathilde**, por estar ahí en las caídas y su ayuda incondicional para levantarme, por sus consejos, por escucharme en todo momento que los necesité, sé que siempre podré contar con ustedes, muchas gracias, saben de más que los quiero.

A mis compañeros del Z15, y amigos “los biólogos biólogos verdaderos”:, **Diana, Fabby, Irma, Nacho, Parra, Zayas, Thelma, Sama, Chris y Diana Gallego** Por acompañarme en toda la carrera, por todas las prácticas de laboratorio y grandes aventuras en el campo, por las risas, a la bestia chamacos, gracias, siempre estarán en mí.

A mis compañeros del laboratorio: **Emiliano, Ruth, Alina, Laura, Arturo y Dulce**. Por la compañía, los consejos y las buenas platicas, gracias.

A mi amor, y mi compañero de vida **Iván Absalón Pérez Herrera**, por nunca soltar mi mano y motivarme para seguir creciendo como persona y bióloga, Te amo.

CONTENIDO

	Página
FORMATO DE APROBACIÓN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
CONTENIDO	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
II. 1. Fuerzas Evolutivas	5
II. 1. 1. Mutación	5
II. 1. 2. Deriva génica	5
II. 1. 3. Migración	6
II. 1. 4. Selección natural	6
II. 2. Teoría Neutra	7
II. 2. 1. Teoría de la coalescencia	8
II. 3. Filogeografía	9
II. 3. 1. Generalidades	9
II. 3. 2. Marcadores moleculares en estudios filogeográficos	11
II. 4. Área de Estudio	12
II. 4. 1. El Desierto Sonorense	12
II. 4. 2. Estudios filogeográficos con especies de plantas del Desierto Sonorense	14
II. 4. 3. Estudios de genética de poblaciones con especies del género <i>Bursera</i>	15
II. 5. Modelo de Estudio	15
II. 5. 1. La familia Burseraceae	15

II. 5. 2. El género <i>Bursera</i>	16
II. 5. 3. <i>Bursera microphylla</i>	17
II. 5. 4. Distribución y origen de <i>Bursera microphylla</i>	20
III. JUSTIFICACIÓN	22
IV. HIPÓTESIS	23
V. OBJETIVOS	24
V. 1. Objetivo General	24
V. 2. Objetivos Específicos	24
VI. METODOLOGÍA	25
VI. 1. Muestreo	25
VI. 2. Extracción de ADN	27
VI. 3. Amplificación y Secuenciación de ADN de Cloroplasto (ADNcp)	27
VI. 4. Edición de Secuencias	29
VI. 5. Análisis de la Variabilidad	30
VI. 6. Red de Haplotipos	31
VII. RESULTADOS	32
VII. 1. Amplificación y Secuenciación de ADNcp	32
VII. 2. Análisis de la Variabilidad	33
VII. 3. Red de Haplotipos	34
VII. 4. Distribución de los Haplotipos	35
VIII. DISCUSIÓN	37
VIII. 1. Análisis de la Variabilidad	37
VIII. 2. Origen de <i>Bursera microphylla</i>	40
VIII. 3. Reconstrucción filogeográfica	43
IX. CONCLUSIONES	46
X. RECOMENDACIONES	47
XI. LITERATURA CITADA	48
Apéndice 1. Protocolo de Extracción de ADN total en Plantas	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.	Localidades de colecta de <i>Bursera microphylla</i> .	25
Tabla II.	Regiones de ADN de cloroplasto utilizadas en pruebas de amplificación y evaluación de la variación genética.	28
Tabla III.	Valores de diversidad haplotípica y nucleotídica de <i>Bursera microphylla</i> calculados a partir de las secuencias de la región de ADNcp <i>trnL-ndhj</i> . h = número de haplotipos, Hd = diversidad haplotípica sin considerar indeles, hi = número de haplotipos considerando indeles, Hdi = diversidad haplotípica sin considerar indeles, π = diversidad nucleotídica.	33
Tabla IV.	Cuadro comparativo de diversidad haplotípica y nucleotídica de <i>Bursera microphylla</i> con diversas especies del Desierto Sonorense utilizando secuencias de diferentes regiones de ADNcp; n = número de poblaciones, h = número de haplotipos, Hd = diversidad haplotípica, π = diversidad nucleotídica, * Datos no incluidos en el artículo.	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	La filogeografía como punto de unión entre disciplinas micro y macroevolutivas, así como las principales áreas que la componen y definen (modificado de Avise, 2000).	10
Figura 2.	Individuo de <i>Bursera microphylla</i> en el Cañón de Nacapule, Guaymas, Sonora.	19
Figura 3.	Mapa de distribución geográfica de <i>Bursera microphylla</i> (Modificado de Turner et al., 1995).	21
Figura 4.	Mapa que muestra los sitios de muestreo de <i>Bursera microphylla</i> en el Desierto Sonorense.	26
Figura 5.	Las flechas muestran los sitios de sustitución e índices encontrados en la región de ADNcp <i>trnL – ndhj</i> de <i>Bursera microphylla</i> . Para fines ilustrativos se presenta un individuo de cada población muestreada y <i>Bursera fagaroides</i> y <i>Bursera laxiflora</i> como grupos externos.	32
Figura 6.	Red de haplotipos construida bajo el criterio de parsimonia de la región de ADNcp <i>trnL-ndhj</i> de las poblaciones muestreadas de <i>Bursera microphylla</i> , obtenida mediante el software TCS 1.21. El haplotipo ubicado dentro de un cuadro indica el reconocido como ancestral y en círculos los haplotipos derivados, los círculos rojos representan el número de mutaciones.	35
Figura 7.	Distribución geográfica de los haplotipos de la región de ADNcp <i>trnL- ndhj</i> en las ocho localidades de muestreo de <i>Bursera microphylla</i> .	36
Figura 8.	Tiempo de diversificación del género <i>Bursera</i> . El cladograma se calibró con un fósil de <i>Bursericarpum aldwickense</i> . Se indica	41

subrayado en rojo, la especie de estudio *Bursera microphylla* y en un círculo rojo el tiempo de diversificación en este caso: 7.72 millones de años (De Nova et al., 2012).

Figura 9. Reconstrucción de hábitat ancestral del género *Bursera*. Se realizó a partir del modelo SDFT que sugiere a la selva baja caducifolia o bosque tropical seco como el hábitat ancestral. Se indica subrayado con rojo la especie de estudio *Bursera microphylla* (De Nova et al., 2012). 42

RESUMEN

La filogeografía estudia los procesos y principios que gobiernan la distribución espacial de los linajes, estableciendo una relación entre la genealogía y la geografía. *Bursera microphylla* es una especie arbórea que se distribuye casi en su totalidad en la extensión del Desierto Sonorense. Estudios de tipo reloj molecular indican que esta especie se originó antes de la formación del Golfo de California y las oscilaciones climáticas del Cuaternario (De Nova et al., 2012); por lo que el presente estudio tiene como objetivo describir la filogeografía de *B. microphylla* en el Desierto Sonorense, partiendo de la hipótesis de que las secuencias generadas de una región de ADNcp de *B. microphylla*, aportarán información sobre el origen y posibles eventos de fragmentación o expansión de la especie. Se analizaron 40 secuencias de ADNcp de la región intergénica *trnL - ndhj* (670 pb) de *B. microphylla*, pertenecientes a cuatro poblaciones de la Península de Baja California, tres poblaciones de Sonora y una población de las Islas del Golfo. Se estimaron los niveles de diversidad nucleotídica ($\pi=0.00208\pm 0.00046$) y haplotípica ($Hd=0.375\pm 0.080$), los cuales caen dentro del rango encontrado para otras especies del Desierto Sonorense. La red de haplotipos construida detectó tres haplotipos en *B. microphylla* e identificó el haplotipo A como ancestral, el cual está presente en seis poblaciones (Baja California, Sonora y la Isla San Esteban). La ubicación geográfica de los haplotipos y el patrón de variabilidad sugieren que la especie se originó en Sonora y posteriormente migró hacia la península. Los bajos niveles de variación genética y la presencia de un haplotipo en seis de las ocho poblaciones pueden sugerir expansiones postglaciales en el rango de distribución de la especie hacia el norte y a lo largo de la península de Baja California a partir de refugios localizados en Sonora.

I. INTRODUCCIÓN

La biogeografía es un campo interdisciplinario que explora el papel que juegan la geografía e historia para explicar la distribución de las especies en un espacio geográfico y un tiempo (Zimmer y Emlen, 2012). Darwin y Wallace propusieron que los procesos de vicarianza y dispersión son los factores más importantes que rigen la distribución de las especies en la naturaleza. La dispersión consiste en el movimiento de los individuos de una región geográfica a otra, mientras que la vicarianza es un proceso que restringe o impide la dispersión o flujo génico entre los individuos y por lo tanto resulta en la separación de las poblaciones por barreras geográficas (Futuyma, 2013). Para conocer más acerca de la influencia de estos procesos en las poblaciones y cómo éstos pueden influir en la variación genética entre y dentro de las poblaciones, John Avise propuso una disciplina llamada “filogeografía” (Avise et al., 1987).

La filogeografía es una rama que logra conciliar las disciplinas microevolutivas (etología y genética de poblaciones) y macroevolutivas (paleontología, geografía histórica y sistemática filogenética) mediante una herramienta muy útil en la actualidad, como lo es la biología molecular. El objetivo principal de la filogeografía es estudiar los principios y procesos que gobiernan la distribución actual de los linajes con base en su genealogía, principalmente a nivel intraespecífico o de un conjunto de especies relacionadas filogenéticamente (Avise, 2000).

Se ha propuesto que el cambio climático es el principal responsable de los cambios en la distribución de las especies y comunidades (Comes y Kadereit, 1998). Muchos de los estudios filogeográficos en plantas se han llevado a cabo bajo un contexto de las oscilaciones climáticas del Cuaternario, en el que se incluyen contracciones del rango de distribución, fragmentación de las poblaciones, así como expansión del rango de distribución y migraciones postglaciales a partir de refugios. Lamentablemente, existen pocos estudios filogeográficos sobre la influencia de las últimas glaciaciones del Pleistoceno en la estructura genética de especies de plantas del Desierto Sonorense (Fehlberg y Ranker 2009).

El Desierto Sonorense se localiza en el noroeste de México y suroeste de Estados Unidos; cuenta con aproximadamente 2600 especies de plantas (Shreve y Wiggins, 1975) y se ha propuesto que la distribución histórica de su flora ha sido influenciada por periodos de cambio climático. Varios estudios sobre microfósiles de plantas encontrados en nidos de roedores del género *Neotoma*, han proporcionado evidencia de los cambios en la vegetación en los desiertos de Norteamérica. El Desierto Sonorense es el resultado de fuertes cambios climáticos y una tendencia general hacia un ambiente cada vez más árido, lo cual inició a finales del Mioceno, cuando los bordes de las selvas secas se convirtieron en matorrales espinosos (Scarborough, 2000). En este desierto, gran parte de la flora es de origen tropical y es muy sensible a cambios ambientales como las temperaturas bajas (Shreve y Wiggins, 1975). Durante los periodos cálidos de las oscilaciones climáticas del Pleistoceno, los bosques o comunidades vegetales con más requerimientos de agua sufrieron consecuentes reducciones de su distribución por una tendencia a la sequía y por lo tanto, estos lugares fueron ocupados por comunidades desérticas, proceso que alcanzó su más grande expansión durante el Holoceno tardío (Van Devender, 1987; 1990).

Además de estos cambios ambientales, se han propuesto eventos geológicos que pueden explicar la diversificación de la biota en el Desierto Sonorense en esta región geológicamente activa, tales como la formación del Golfo de California (hace 5-6 millones de años), la formación del istmo de La Paz (hace tres millones de años) (Riddle et al., 2000; 2008) y por último, una transgresión marina hacia la mitad de la península (hace un millón de años) (Upton y Murphy, 1997).

Bursera microphylla, conocida comúnmente como “torote”, es una especie de árbol dioica que restringe su distribución casi en su totalidad a la extensión del Desierto Sonorense. Las principales características de esta planta son la presencia de hojas y tallos aromáticos debido a la resina que secretan, además de un tronco principal de corteza exfoliante (Turner et al., 1995). Los datos obtenidos mediante métodos de reloj molecular proponen que la especie se originó durante el Mioceno tardío (hace aproximadamente 7.72 millones de años) (De Nova et al., 2012) en ambientes de tipo matorral xerófilo, lo cual sugiere que posiblemente la especie ya se encontraba establecida en la región del Desierto Sonorense cuando iniciaron los fuertes cambios climáticos y geológicos en la región.

Este trabajo tiene como objetivo principal describir la filogeografía de *Bursera microphylla* en el Desierto Sonorense, con base en secuencias de nucleótidos de una región de ADN del cloroplasto, y de esta manera contribuir a la historia evolutiva de esta especie.

II. ANTECEDENTES

La gran diversidad biológica es producto de la evolución (Dobzhansky, 1964). El concepto de evolución en términos biológicos ha tenido diversas modificaciones a lo largo de la historia. Actualmente, la evolución se puede definir como un cambio acumulativo en la composición genética de grupos de organismos (poblaciones) a través de las generaciones. Este proceso de constante cambio por largos periodos de tiempo, ha producido la divergencia de especies y originado muchas formas de vida, las cuales han descendido de un ancestro común universal (Futuyma, 2013).

Para que las especies evolucionen, es necesario que exista variación genética. Así pues, se ha descrito que la variabilidad genética es el nivel más básico de diversidad, pues todos los procesos evolutivos se derivan de estas variaciones en la información genética de los individuos dentro de una población (Piñero et al., 2008). La expresión de la variación genética depende básicamente de las condiciones ambientales presentes, la expresión de genes nucleares, el grado de endogamia, los genes de herencia citoplasmática y la composición genética de individuos con los que interactúa la especie (Mazer y Damuth, 2001).

La variación genética de una población está determinada por diversos factores. Sin embargo, se sabe que las fuerzas evolutivas juegan un papel muy importante. Las fuerzas evolutivas son procesos que modifican la composición genética de las poblaciones al cambiar las frecuencias de los alelos, provocando el rompimiento del equilibrio de Hardy – Weinberg y, por lo tanto, causando evolución. Estos cambios en las frecuencias alélicas son producidos básicamente por cuatro fuerzas evolutivas que son: la mutación, deriva génica, migración y selección natural (Hedrick, 2005).

II. 1. Fuerzas Evolutivas

II. 1. 1. Mutación

La mutación es un proceso particularmente importante en genética de poblaciones y evolución; esto se debe a que es la fuente original de variación genética a distintos niveles como: población, especie o ecosistema. La mutación consiste en cambios en un nucleótido, varios nucleótidos, partes de un gen, partes de un cromosoma o hasta varios cromosomas. (Hedrick, 2005). Los procesos de mutación pueden ser determinados por errores durante la replicación del ADN, inserciones de elementos transponibles, rompimiento físico de un cromosoma o errores en la meiosis (Hedrick, 2005).

Existen tres tipos de mutaciones en el ADN: sustitución, que consiste en cambiar un nucleótido por otro, inserción o delección de nucleótidos (indeles) e inversión de nucleótidos (Nei, 1987). Aunque las mutaciones ocurren de manera azarosa, diferentes regiones del ADN están expuestas a distintas tasas de mutación, siendo las inserciones o delecciones las que ocurren de manera más frecuente en regiones no codificantes del ADN o intrones. Además durante el proceso de replicación del ADN, la polimerasa presenta un mecanismo de corrección de errores que intenta disminuir la tasa de mutación, así como eliminar las mutaciones deletéreas (Aris y Excoffier, 1996).

II. 1. 2. Deriva génica

La deriva génica consiste en cambios aleatorios en las frecuencias alélicas causados principalmente por el tamaño pequeño de las poblaciones, y a su vez es producto de un muestreo aleatorio de gametos, que permite a una porción de los genotipos presentes en la población pasar de generación a generación (Hedrick, 2005). Como resultado de este proceso, el cambio de las frecuencias alélicas en el tiempo se da de manera azarosa. Cuando el flujo

génico entre las poblaciones es bajo y las poblaciones son pequeñas, es probable que la deriva génica sea la principal fuerza que modifique la variabilidad en la población (Hedrick, 2005).

La deriva génica tiene efectos en todos los loci del genoma y afecta tanto a las poblaciones pequeñas como grandes. En poblaciones grandes solo una pequeña parte del cambio en las frecuencias alélicas puede ser originada por la deriva génica; por otro lado, cuando las poblaciones son pequeñas, las frecuencias alélicas pueden presentar grandes fluctuaciones en diferentes generaciones y por lo tanto, pueden resultar en la fijación o pérdida de un alelo (Hedrick, 2005).

II. 1. 3. Migración

Dentro de una población o una especie pueden existir pequeñas subpoblaciones que se encuentran divididas por varios factores, ya sea geográficos, ecológicos o conductuales. Además, cuando una población está dividida en pequeñas “unidades”, las conexiones genéticas entre los individuos difieren. La migración o flujo génico consiste en el movimiento de individuos o grupos dentro y entre las poblaciones, lo cual origina que haya intercambio genético entre ellos y por lo tanto exista un cambio en las frecuencias alélicas y en la dinámica de las poblaciones (Hedrick, 2005). Cuando la migración entre las poblaciones es alta, las poblaciones tienden a homogeneizarse genéticamente, mientras que cuando la migración es baja, las poblaciones pueden diferenciarse genéticamente.

II. 1. 4. Selección natural

Darwin y Wallace de manera independiente llegaron a la idea de la selección natural. Se define como un mecanismo que puede cambiar las frecuencias alélicas debido a diferencias en la habilidad de los genotipos para sobrevivir y reproducirse (Zimmer y Emlen, 2012). A su vez, la selección natural es conocida como el único mecanismo que produce adaptaciones, las cuales, son características heredables que le confieren a un individuo ventajas de competencia, en relación a aspectos de sobrevivencia y reproducción, respecto a otros miembros de su

población (Futuyma, 2013). Es decir, los fenotipos que confieren a las especies mayor capacidad de sobrevivencia y reproducción incrementarán su frecuencia a través de las generaciones, dejando más descendientes, siempre y cuando tengan una base genética (Hamilton, 2009).

Aunque diferentes partes del genoma evolucionan de manera diferente o presentan distinta variabilidad genética, en general, existen tres modos de selección fenotípica que cambian la frecuencia de genotipos dentro de las poblaciones: selección diversificadora, direccional y estabilizadora (Futuyma, 2013). Respecto a la selección genotípica, existen tres casos posibles para el caso de un locus con dos alelos. El primer caso se presenta cuando los heterocigotos tienen mayor adecuación que los dos homocigotos. En este caso, los heterocigotos mantienen a los dos alelos y por tanto sus frecuencias son estables a lo largo de sucesivas generaciones. La superioridad del heterocigoto o sobredominancia suele ser uno de los mecanismos que mantiene los polimorfismos en poblaciones naturales (Hartl y Clark, 2007). Sin embargo, cuando la adecuación de los heterocigotos es menor que cualquiera de los dos homocigotos (ya sean recesivos o dominantes), la frecuencia alélica es inestable y dependerá de la frecuencia inicial (si se encuentra por arriba o debajo de los valores de equilibrio). El tercer caso se presenta cuando los homocigotos tienen mayor adecuación que los heterocigotos, es decir, que el genotipo seleccionado será el que permanecerá a lo largo de sucesivas generaciones, mientras que los restantes tendrán una tendencia a la desaparición (Hartl y Clark, 2007).

II. 2. Teoría Neutra

En los años 50s y 60s se pensaba que la mayor parte de la variación genética era mantenida por selección natural. En 1968, Motoo Kimura propuso la teoría neutra, la cual establece que la mutación y la deriva génica son las principales fuerzas responsables de los patrones de variación y evolución de las secuencias de ADN en poblaciones biológicas. Actualmente esta teoría forma la base del modelo nulo más utilizado en evolución molecular donde establece

que la gran mayoría de los cambios evolutivos a nivel molecular son causados por la deriva genética de mutantes selectivamente neutros (Hamilton, 2009).

El modelo neutro postula que la tasa de reemplazo de un nucleótido dentro de una población es igual a la tasa de mutación, sin importar el tamaño de la población. El modelo neutro hace predicciones acerca de los patrones de polimorfismo esperados dentro de las secuencias de las mismas especies. Es decir, utiliza un modelo matemático para calcular la probabilidad de que dos poblaciones tomadas al azar difieran en una posición dentro del genoma completo, siendo las poblaciones más grandes las que muestren mayor diversidad genética (Eguiarte et al. 2007).

II. 2. 1. Teoría de la coalescencia

En una población y a lo largo de sucesivas generaciones surgen nuevos alelos por mutación, mientras que otros se pierden por deriva génica o por otras causas. De esta manera y en un sentido retrospectivo, los alelos de un gen coalescen hacia un alelo ancestral. Mediante el ADN no recombinante, como de cloroplasto en plantas o mitocondrial en animales, se puede “ver” hacia atrás en el tiempo y de esta manera establecer conexiones filogenéticas entre los alelos de una especie. El ‘tiempo de coalescencia’ (tiempo en el que dos individuos se unen en un ancestro común) puede verse afectado por diversos procesos que operan a nivel poblacional, como por ejemplo fluctuaciones en el tamaño de las poblaciones, existencia de selección natural o variaciones en el flujo génico (Harding, 1996).

La teoría de la coalescencia, la cual está basada en la teoría matemática de Kingman (1982), se usa para describir la genealogía de genes neutrales y se realiza identificando secuencias de múltiples alelos y el punto en que estos alelos se “unen retrospectivamente” o coalescen. Actualmente, los métodos matemáticos y estadísticos con base en la teoría de la coalescencia son amplios y capaces de adaptarse a numerosos parámetros evolutivos, demográficos y ecológicos. Esos modelos se han utilizado para analizar diferentes aspectos de evolución y genética de poblaciones como el tamaño efectivo de la población, cuellos de botella, procesos de selección, tiempos de divergencia entre las poblaciones o especies, tasas de migración y mutación (Freeland, 2011).

III. 3. Filogeografía

II. 3. 1. Generalidades

La filogeografía consiste en el estudio de los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes con base en su historia evolutiva y se encuentra dentro de un área más amplia denominada biogeografía. Así pues, el estudio de las relaciones entre la genealogía y geografía constituye una disciplina conocida como “filogeografía” (Avice et al., 1987). La filogeografía se puede entender como un punto de unión entre los procesos microevolutivos y macroevolutivos (Figura 1). El análisis e interpretación de la distribución espacial de los linajes requiere de un estudio multidisciplinario en que intervienen varios campos como la genética de poblaciones, demografía, etología, filogenia, paleontología, geología, geografía histórica, siendo la genética molecular la herramienta base para este tipo de estudios.

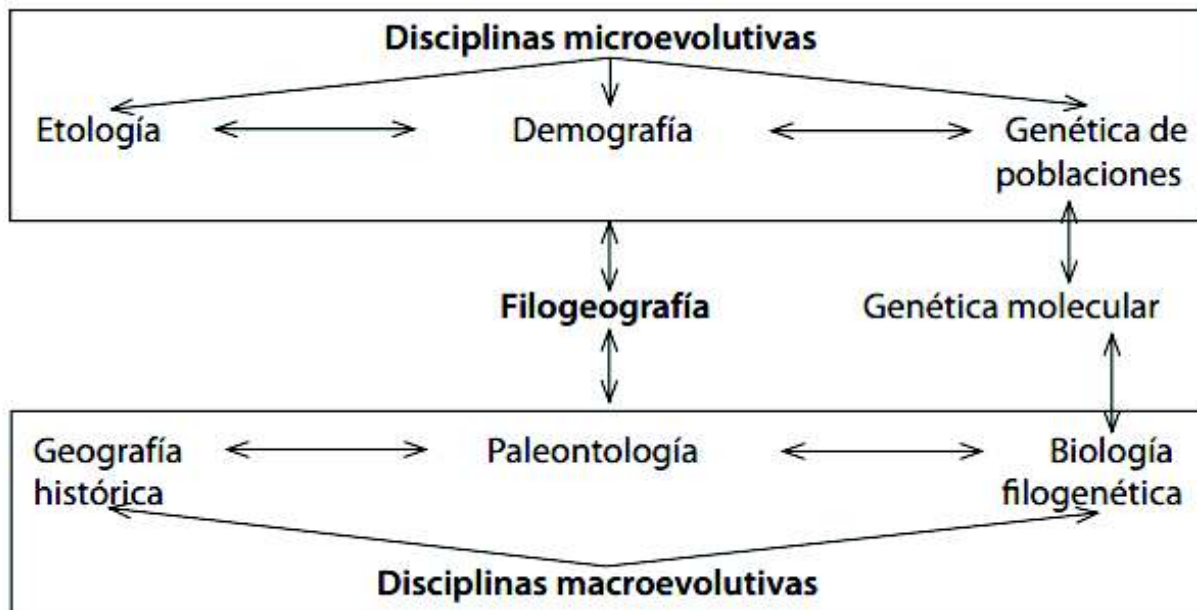


Figura 1. Diagrama que muestra la filogeografía como punto de unión entre disciplinas micro y macroevolutivas, así como las principales áreas que la componen y definen (Modificado de Avise, 2000)

La filogeografía ha hecho posible comprender cómo se distribuyen y estructuran las especies actualmente, y puede ser explicada mediante procesos de vicarianza o dispersión a través del tiempo y espacio. Estos estudios se realizan mediante el análisis de información obtenida a partir de moléculas de ADN, es decir, tratan de interpretar la extensión y el modo en que los procesos demográficos históricos han dejado marcas evolutivas en la distribución geográfica actual de la variación genética de las especies (Avise, 2000).

Los conocimientos obtenidos sobre estudios de filogeografía tienen diversas aplicaciones tanto en sistemática como en conservación. Actualmente, se combina la taxonomía tradicional con estudios filogeográficos para determinar los límites entre las especies o poblaciones, y ha sido tan desarrollado este campo que existe un concepto filogenético de especie, donde se agrupan individuos que presentan caracteres similares y un marcado patrón de ancestría – descendencia. En relación a la biología de la conservación, gracias a la filogeografía se han podido establecer áreas que reflejen importancia evolutiva para las especies, y de esta manera proponer políticas de conservación (Dominguez y

Domínguez, 2009). Debido a la dificultad para estimar áreas de protección a un nivel intraespecífico, la filogeografía nos proporciona información para delinear unidades de conservación a nivel de poblaciones dentro de un contexto evolutivo. Además, los estudios filogeográficos son importantes para evaluar la capacidad de respuesta de las especies frente a los diferentes cambios que se puedan dar en el ambiente natural, ya sean provocados por factores naturales o antropogénicos, y así planear estrategias para el aprovechamiento y conservación tanto de las poblaciones, como de sus recursos genéticos (Piñero et al., 2008).

II. 3. 2. Marcadores moleculares en estudios filogeográficos

Los marcadores moleculares son una herramienta importante en diversos campos de la biología. Los diferentes tipos de marcadores son utilizados básicamente para detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o co-dominante. Actualmente los marcadores más utilizados son las secuencias de ADN, pues el análisis de las sustituciones de las secuencias permite hacer inferencias sobre el orden histórico de los cambios y por lo tanto se pueden hacer inferencias filogenéticas (Eguiarte et al., 2007).

Las secuencias de ADN constituyen la información heredable del núcleo celular, plásmidos, mitocondrias o cloroplastos. Las plantas son organismos que poseen ADN nuclear, y, además, ADN de cloroplasto (ADNcp) y mitocondria (ADNmt). Sin embargo, el ADN nuclear no se emplea porque está sujeto a recombinación y esto dificulta su uso en filogeografía. Tampoco se usa ADNmt de las plantas, ya que tiene una tasa de mutación de nucleótidos muy baja; además de que el genoma es muy grande, varía mucho entre las especies de este reino y está sujeto a rearrreglos que dificultan su uso para hacer inferencias filogeográficas (Palmer y Herbon, 1988). En cambio, el genoma del cloroplasto tiene un tamaño aproximado de 135 kilobases y se encuentran muchas copias en cada cloroplasto, tiene una herencia uniparental, y una organización muy conservada que lo hace más informativo para estudios filogeográficos (Hartl y Clark, 2007).

II. 4. Área de Estudio

II. 4. 1. El Desierto Sonorense

El Desierto Sonorense es uno de los cuatro principales desiertos más extensos y áridos de Norte América, actualmente se extiende por aproximadamente 320,000 km² y se localiza en el sur de Arizona y sureste de California, en EUA y una sección de la península de Baja California, las islas del Golfo de California y gran parte del Estado de Sonora en México (Nabhan, 2000).

El Desierto Sonorense es reciente en términos de tiempo geológico; reconstrucciones paleoambientales obtenidas a través de estudios de restos fósiles, encontrados en nidos de especies de roedores del género *Neotoma* (conocidos como packrat middens), han evidenciado cambios en la vegetación durante el Cuaternario. Sin embargo, las adaptaciones de las plantas y animales a ambientes cada vez más áridos iniciaron en el Mioceno tardío, aproximadamente ocho millones de años atrás. Durante el Mioceno tardío en los bordes de las selvas secas caducifolias se desarrollaron los matorrales espinosos como un estado de transición entre la selva seca caducifolia y el desierto, por lo tanto las comunidades vegetales del Desierto Sonorense como tales, se produjeron durante una tendencia a la sequía (entre 15 – 8 millones de años) (Van Devender, 2000).

El proceso de formación del Desierto Sonorense como lo conocemos actualmente inició durante el Pleistoceno (hace 2 millones de años aproximadamente); este periodo es conocido por las oscilaciones climáticas y glaciaciones en todo el mundo y estos cambios climáticos han dejado huellas en el Desierto Sonorense, a pesar de que los hielos no cubrieron esta región. Los glaciares que se encontraban confinados a altitudes superiores a 2700 msnm, comenzaron a descongelarse ocasionando fuerte escorrentía y erosión, lo que originó la formación de las grandes planicies modernas.

Por otra parte, los patrones de circulación atmosférica también juegan un papel muy importante en la determinación de las condiciones climáticas de una región. Este proceso, de

circulación atmosférica es impulsado por el calentamiento desigual entre el ecuador y los polos; y consiste en el movimiento de aire atmosférico a gran escala y el mecanismo por el cual se distribuye el calor en el mundo. La radiación solar es mayor cerca del ecuador, lo que induce a la formación de una vaguada térmica que se conoce como Zona Intertropical de Convergencia (ZITC) y ésta se mueve continuamente hacia el norte o el sur en función de los cambios angulares del sol. El aire atmosférico se eleva desde la ZITC hacia los polos alcanzando una altitud de 20,000 m, posteriormente desciende como aire seco a los 30° latitud aproximadamente, lo que forma un sistema de alta presión. Es por eso que las principales regiones áridas del mundo se encuentran confinadas aproximadamente a 30° de latitud norte y sur (Brito-Castillo et al., 2010). Actualmente, el Desierto Sonorense se encuentra bajo la influencia de dos sistemas de alta presión: Pacífico Oriental y de las Bermudas (Schmidt, 1989). Sin embargo, durante el Pleistoceno, estos sistemas de alta presión se desplazaron hacia el sur, lo que originó un cambio climático en todo el mundo, siendo el Desierto Sonorense una región con un clima más templado y húmedo y posteriormente la región comenzó a ser más seca hace 12,000 años; este último cambio climático marca el desarrollo del ecosistema moderno del Desierto Sonorense (Scarborough, 2000).

Actualmente, este desierto cuenta con aproximadamente 2600 especies de plantas (Shreve y Wiggins, 1975), de las cuales se pueden distinguir dos formas de vida predominantes: los árboles de la familia Fabaceae y las cactáceas columnares. En relación a las características climáticas, este presenta un patrón de lluvias biestacional: de diciembre a marzo ocurren tormentas provenientes del norte del Océano Pacífico, mientras que de julio a septiembre el monzón de verano ocasiona oleadas de aire húmedo y tormentas frecuentes pero localizadas. Los inviernos en este desierto son más suaves en comparación con otros desiertos de Norte América, pues rara vez se presentan heladas, por lo tanto, la mayor parte de la biota presente tiene un origen tropical. Las plantas perenes adaptaron su ciclo de vida en sintonía con las lluvias intensas de verano y las lluvias de invierno mantienen grandes poblaciones de plantas anuales, es decir, muchas de las plantas son oportunistas pues aprovechan la lluvia en cualquier estación para crecer y reproducirse (Dimmitt, 2000).

Se han propuesto tres eventos geológicos que explican los posibles eventos de diversificación biótica en la región. El primero fue la separación de la península de Baja California y la formación de Golfo de California hace aproximadamente 5-6 millones de años.

El segundo evento fue la formación del Istmo de La Paz, provocando el aislamiento de las poblaciones del sur de la península, debido a la inundación oceánica por el Istmo hace tres millones de años (Riddle et al., 2000; 2008). Finalmente, el último evento consistió en la transgresión marina hacia la mitad de la península hace un millón de años (Upton y Murphy, 1997).

II. 4. 2. Estudios filogeográficos con especies de plantas del Desierto Sonorense

Actualmente existen pocos estudios sobre filogeografía de plantas del Desierto Sonorense. Los trabajos más importantes en esta área de estudio se han realizado para determinar el efecto de vicarianza y eventos de expansión o colonización postglacial en la estructura genética, básicamente de tres especies de plantas. Nason et al. (2002) publicaron un estudio sobre la cinita *Lophocereus schottii* utilizando aloenzimas, en el cual encontraron una correlación entre el aumento de la latitud y la disminución de la variabilidad genética. Garrick et al. (2009) utilizaron secuencias de dos regiones de cloroplasto (*matK* y *ndhF*) de la candelilla *Euphorbia lomelii* para determinar la influencia de los cambios climáticos y geológicos pasados en el Desierto Sonorense y en el de Mojave. Además se ha estudiado la filogeografía de la rama blanca *Encelia farinosa*, una especie muy común del Desierto Sonorense, utilizando la región intergénica *psbA-trnH* (Fehlberg y Ranker, 2009), donde se encontró evidencia de que los cambios en la variabilidad genética de esta especie, fueron producto de las oscilaciones climáticas del Cuaternario, y expansiones postglaciales a partir de refugios ubicados al sur en el centro de la península de Baja California y sur del Estado de Sonora.

II. 4. 3. Estudios de genética de poblaciones en especies del género *Bursera*

En México se han llevado a cabo estudios de diversidad genética de 97 plantas de las 23,522 estimadas y de esas 97 plantas dos estudios son en relación al género *Bursera* utilizando isoenzimas como marcador molecular (Piñero et al., 2008). Uno de ellos es sobre el impacto de la formación de la Península de Baja California sobre la estructura genética de *Bursera*

hindsiana (Vargas-García, 2000), donde encontraron poca diferenciación genética entre las poblaciones debido a flujo genético alto y complejo, con lo que proponen que *Bursera hindsiana* ha experimentado expansiones recientes en su distribución por efectos del último período glacial. El segundo trabajo fue sobre las consecuencias genéticas y evolutivas del surgimiento del Golfo de California en las poblaciones de *Bursera microphylla* (Burseraceae) en el Desierto Sonorense (Hernández-López, 1999), con lo cual encontraron niveles de variación genética similares a otras plantas del Desierto Sonorense, además de que no existe un patrón de aislamiento por distancia, por lo que sugieren un patrón de colonización de Sonora hacia la península de Baja California muy complejo.

II. 5. Modelo de estudio

II. 5. 1. Familia Burseraceae

La familia Burseraceae cuenta con aproximadamente 540 especies distribuidas en 18 géneros, de los cuales tres están presentes en México: *Beiselia*, *Bursera* y *Protium* (Rzedowski et al., 2006). Burseraceae se compone de árboles y arbustos típicos de la selva baja caducifolia donde hay una marcada estacionalidad de lluvias, lo que ocasiona que las plantas pierdan sus hojas durante un periodo de su ciclo vital. La mayoría de estas plantas habita en laderas montañosas y a una altitud menor de 1700 msnm. Además, una de las principales características de esta familia es la secreción de resina que les proporciona un olor característico; estas resinas están compuestas principalmente por triterpenoides que se encuentran en el tejido de la planta o conductos de la corteza (Harley et al., 2005).

La calibración de la filogenia molecular y la evidencia fósil disponible indican que los orígenes de esta familia Burseraceae se remontan al Paleoceno (~65 millones de años) con la divergencia de *Beiselia mexicana*, lo cual fue localizado en Norte América, México y el Caribe. Posteriormente la familia continuó su diversificación, seguido de un evento de dispersión hacia el este de Laurasia (Europa) y hacia los continentes del hemisferio sur durante

el Eoceno (~53 millones de años) (Weeks et al., 2005). Actualmente es conocida por tener un amplio rango de distribución geográfica, ya que es nativa de regiones tropicales de África, América y Asia (Rzedowski, 1978; Rzedowski et. al., 2006).

II. 5. 2. Género *Bursera*

El género *Bursera* es uno de los más diversos y abundantes grupos de plantas de los bosques secos mexicanos, pues este se encuentra representado por aproximadamente 105 especies, de las cuales cerca del 85% son endémicas en México. Las plantas del género *Bursera* se distribuyen principalmente en las zonas tropicales y subtropicales desde al extremo sur de los Estados Unidos hasta Perú y el sur de Brasil, incluyendo las Islas del Caribe (Rzedowski, 1978; Rzedowski et al., 2006). Las podemos encontrar en un intervalo altitudinal entre 0 y 1800 metros sobre el nivel del mar, preferentemente en selvas bajas caducifolias y matorrales xerófilos. Sin embargo, *Bursera simaruba* se puede encontrar en bosques de coníferas o selvas altas perennifolias, por lo que su rango de distribución altitudinal alcanza los 2400 metros sobre el nivel del mar. Dadas estas afinidades ecológicas, la mayor diversidad de las especies mexicanas de *Bursera* se establece en la vertiente pacífica de la República, con su máxima concentración en la cuenca del río Balsas (Rzedowski y Kruse, 1979).

Estas plantas se encuentran como arbustos y árboles que pueden llegar a medir hasta 30 metros de altura, presenta hojas alternas, simples a bi-pinnadas, deciduas la mayor parte del año, variables en tamaño y forma aun en la misma planta. La floración aparece generalmente al inicio de la época de lluvias; la mayor parte de las especies son dioicas, otras polígamo-dioicas y rara vez hermafroditas (Medina, 2008). El tronco también es muy característico en este género, ya que se pueden distinguir dos secciones dentro del género debido a esta característica: la sección *Bullockia* de corteza no exfoliante y la sección *Bursera* de corteza exfoliante de coloración rojiza a amarillenta y en algunos casos grisácea. Estas plantas son muy generalistas en cuanto a su polinización, sus frutos son dispersados por aves y generalmente se encuentra una semilla por fruto (Turner et al., 1995).

El género *Bursera* se considera como un grupo de origen monofilético y estrechamente relacionado con el género *Commiphora* (Becerra, 2003). En esta propuesta de reconstrucción

filogenética se pueden identificar dos secciones o subgéneros: *Bursera* y *Bullockia*. Dentro de la sección *Bursera*, existen cuatro grupos morfológicamente bien definidos: Simaruba, Microphylla, Fragilis y Fagaroides.

Se ha propuesto que la distribución de *Bursera* en el pasado se extendía a lo largo del centro de Norte América, pues se han encontrado abundantes granos de polen fósiles de *Bursera* y hojas de *B. serrulata* en estratos del Oligoceno temprano en Colorado, Estados Unidos (Rzedowski, 1979), lo que sugiere que el género se ha diversificado durante al menos 45 millones de años.

Bursera ha sido objeto de un gran número de estudios sobre evolución, ecología y química y, debido a la gran importancia fisiográfica y las adaptaciones a ambientes secos, el género ha sido muy útil para estudiar la evolución, diversificación y expansión histórica de la flora de los bosques secos (Becerra et al., 2012).

II. 5. 3. *Bursera microphylla*

Bursera microphylla es un arbusto o árbol pequeño que en ocasiones alcanza hasta los 10 metros de altura; una de las principales características de esta planta es que tiene hojas y ramas aromáticas, debido a la resina que secreta. Otra característica distintiva de *B. microphylla* es que la corteza del tronco principal (generalmente de color blanquecino a marrón) se desprende en láminas delgadas, es decir, tiene corteza exfoliante. Sus hojas son imparipinadas, miden 3-8 cm de largo y presentan un peciolo de 0.5 – 2 cm. Tienen 7- 35 foliolos lineales (aunque en ocasiones dentados) de 6 - 12 mm de largo y 1 - 2.5 mm de ancho, el folíolo terminal generalmente es orbicular igual o más corto que los foliolos laterales (Turner et al., 1995) (Figura 2).

La mayor parte de las poblaciones son dioicas, es decir hay hembras y machos. Sin embargo, en algunas poblaciones del extremo norte de su distribución se han detectado solo individuos hembras (Molina-Freaner, com. pers.). Las inflorescencias aparecen antes que las hojas, generalmente en julio y están conformadas por panículas que miden 0.8-2 cm de largo con flores pequeñas, sépalos de color verde a levemente rojizo triangulares, y los pétalos miden 1-2 mm de largo, de color blanco a crema. Las flores presentan pistilos de 1 mm de

largo y anteras de 1.5-2 mm de largo (Turner et al., 1995). No se sabe mucho acerca de la polinización en esta planta, pero se ha observado que las flores son visitadas principalmente por avispas, abejas y pequeñas moscas; los visitantes no presentan preferencia por el sexo, ya que visitan de igual manera a hembras, machos y hermafroditas (Gerst et al., manuscrito no publicado).

Los frutos presentan un arilo por carpelo de color púrpura a verde que mide entre 5 y 7 mm de largo y 5.6 mm de ancho. Las semillas en la madurez miden 5 – 6 mm de largo, son de color anaranjado a rojo, y germinan aproximadamente en dos semanas (Newland, 1980). Los frutos permanecen en la planta y son dispersados por unas aves del orden Passeriformes llamadas vireos grises (*Vireo vicinior*) que se alimentan casi exclusivamente de estos frutos durante los meses de invierno (Bates, 1992). Se ha propuesto que existe una relación mutualista entre los vireos grises y *B. microphylla*, lo cual puede explicar la sobreposición entre la distribución invernal de esta ave y la distribución geográfica de la planta (Bates, 1992).

Becerra et al. (2012) realizaron un estudio sobre la filogenia del género *Bursera* basado en herramientas moleculares, en el que utilizaron varias regiones nucleares: ITS1, ITS2 y la región 5.8S, con lo cual se confirmó la monofilia del género. Las filogenias reconstruidas bajo los criterios de Parsimonia, Máxima Verosimilitud e inferencia Bayesiana indican que *Bursera microphylla* se encuentra dentro de la subgénero *Bursera*, subtribu Burserinae, además de estar estrechamente relacionada con *Bursera moralensis*.



Figura 2. Individuo de *Bursera microphylla* en el Cañón de Nacapule, Guaymas, Sonora

II. 5. 4. Distribución y origen de *Bursera microphylla*

El género *Bursera* generalmente se encuentra en los trópicos o subtropicos, particularmente en selvas secas. *Bursera microphylla* es una de las especies que se encuentra en ambientes áridos, encontrándose generalmente en sustrato rocoso compuesto principalmente de grava o calizas o en laderas de montañas. Su distribución geográfica se limita al noroeste de México y Sur de California y Arizona (Figura 3). Se encuentra a lo largo de toda la península de Baja California, incluyendo las islas del Golfo de California, excepto las regiones montañosas. En Sonora, su distribución es desde el extremo noroeste y sus límites con Arizona hasta su límite sur en el municipio de Guaymas. El extremo norte de su distribución se encuentra restringido a cañones, pendientes, y grietas aprovechando las condiciones de microclima (ambientes más cálidos) que les proporciona. El extremo este de su rango de distribución está determinado por la competencia con *B. fagaroides* y *B. laxiflora* (Turner et al., 1995). Benson y Darrow (1981) reportaron *B. microphylla* en los estados de Zacatecas, Morelos y Puebla pero trabajos de Rzedowski han confirmado que esas plantas pertenecen a las especies *B. morelensis* y *B. multiflora*. Datos de Van Devender (1987) obtenidos a través de nidos de roedores del género *Neotoma* fósiles, sugieren que los granos de polen que se han encontrado de *B. microphylla* indican que la planta apareció hace aproximadamente 5, 800 años en Arizona, tras su ausencia en el último período glacial, mientras que Holmgren et al. (2014) registran polen de la misma especie hace 14,680 años y microfósiles hace 9, 450 años al pie de la Sierra Juárez, en el noreste de Baja California.

De Nova et al. (2012) estimaron el origen y diversificación del género *Bursera*, utilizando secuencias de las regiones de ADN de las regiones del cloroplasto, *rbcL* y *atpB*, y la datación de los linajes se realizó con métodos de tipo reloj molecular mediante una calibración con fósiles de granos de polen de *Bursericarpum aldwicense*. El árbol filogenético arrojado en el estudio indica que *Bursera microphylla* se originó y comenzó su diversificación en el Mioceno tardío hace 7.72 millones de años aproximadamente. En el mismo estudio se realizó una reconstrucción de hábitat, la cual indica que *B. microphylla* se originó en ambientes de tipo matorral xerófilo con una tendencia de hábitat ancestral a la selva seca.

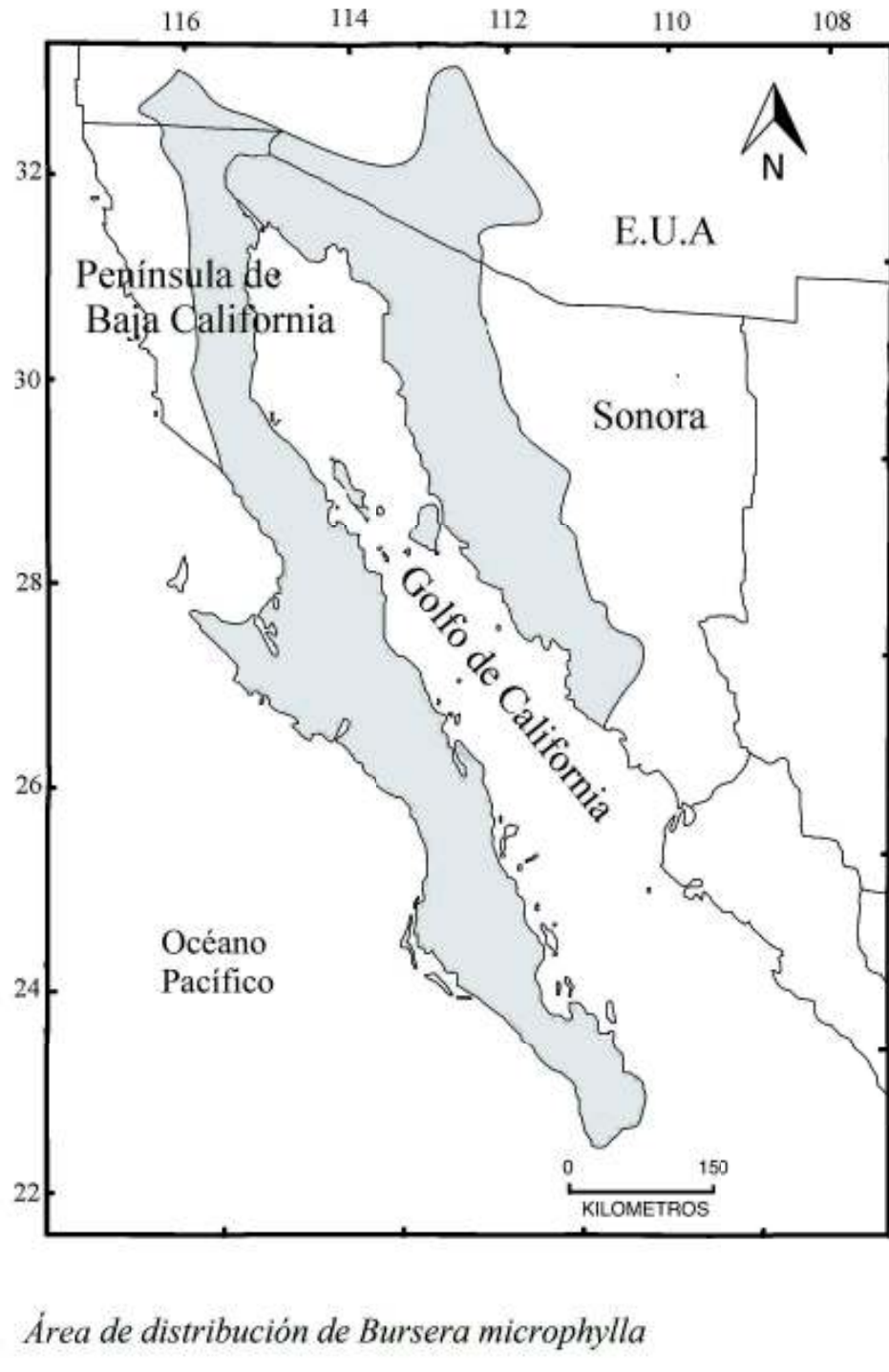


Figura 3. Mapa de la distribución geográfica de *Bursera microphylla* (Modificado de Turner et al., 1995)

III. JUSTIFICACIÓN

Inferir los procesos históricos o demográficos que contribuyeron a la distribución actual de las especies a partir de evidencia ambiental, geológica o morfológica tiene limitaciones serias. El complementar estos estudios con un enfoque filogeográfico usando secuencias de nucleótidos permite abordar hipótesis sobre los eventos que influyeron en la distribución de los seres vivos de una región. Existen varios estudios recientes que han explorado hipótesis biogeográficas en vertebrados del Desierto Sonorense (Riddle et al., 2000; Upton and Murphy, 1997; Pfeiler et al., 2008). Sin embargo, son muy pocos con estudios filogeográficos sobre plantas de la región.

Bursera microphylla es una especie que posee un rango de distribución que casi coincide en su totalidad con la extensión del Desierto Sonorense; por lo cual, es un buen modelo de estudio para conocer más acerca de los posibles eventos de vicarianza o expansión que influyeron en la distribución de esta especie.

IV. HIPÓTESIS

Las secuencias de nucleótidos generadas de una región de ADNcp de *Bursera microphylla* obtenidas a partir de poblaciones distribuidas a lo largo del Desierto Sonorense, aportarán información sobre el origen y posibles eventos de fragmentación o expansión de la especie. Se espera encontrar que la distribución de *Bursera microphylla*, estuvo mayormente influenciada por eventos de cambio climático y secundariamente por vicarianza. Además, se esperan mayores niveles de variación genética en poblaciones ubicadas hacia el sur, donde la especie se pudo haber resguardado en refugios ante condiciones ambientales menos frías; y bajos niveles de variación genética en poblaciones hacia el norte, asociadas a eventos de cuellos de botella durante la expansión postglacial.

V. OBJETIVOS

V. 1. Objetivo General

Describir la filogeografía de *Bursera microphylla* (Burseraceae) en el Desierto Sonorense

V. 2. Objetivos Específicos

Identificar fragmentos del genoma de ADN del cloroplasto que muestren variabilidad en *B. microphylla*.

Estimar los niveles de variación de los marcadores de cloroplastos usados.

Construir una red de haplotipos para el fragmento de ADN de cloroplasto utilizado y establecer su historia evolutiva.

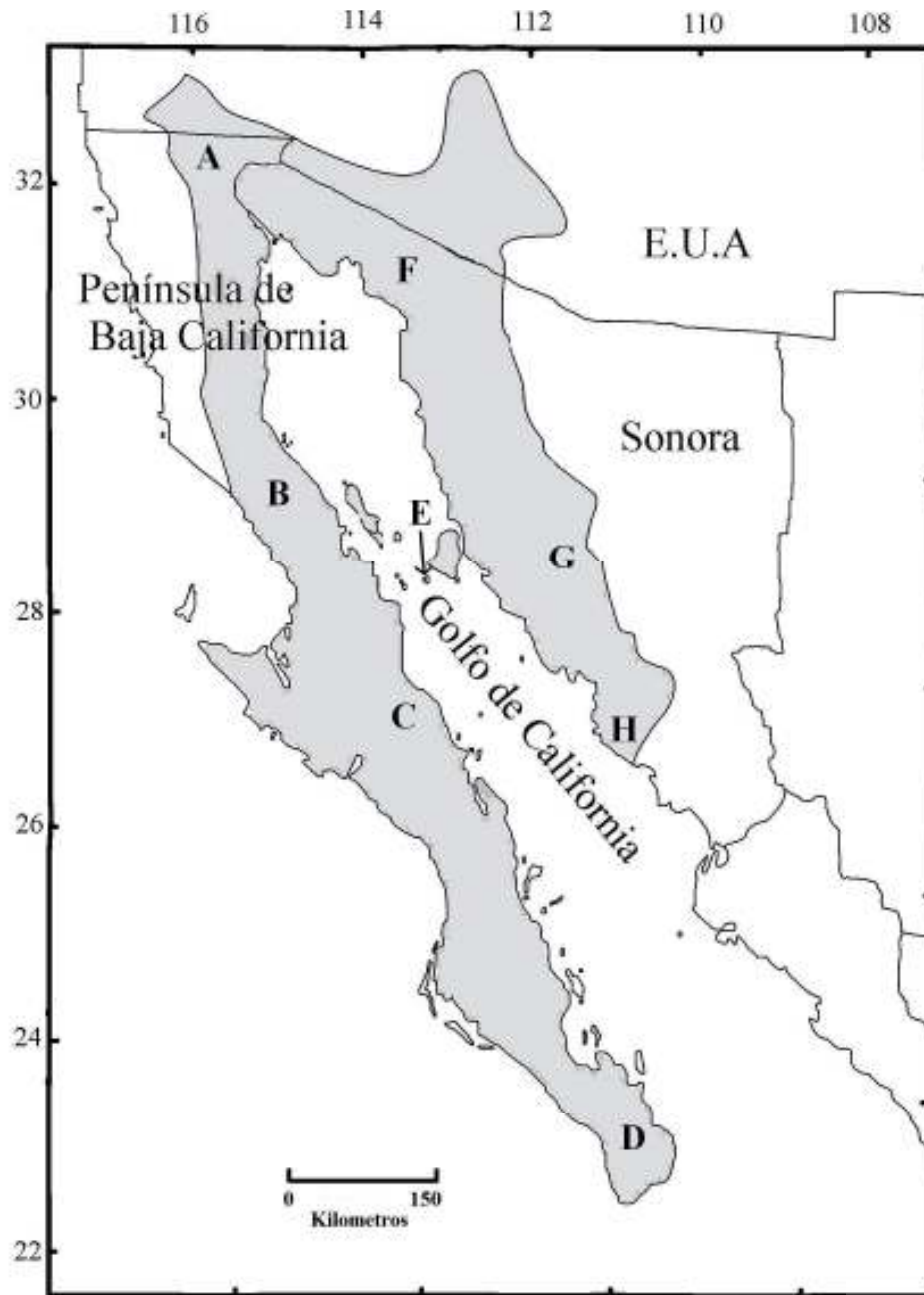
VI. METODOLOGÍA

VI. 1. Muestreo

Se colectó tejido foliar de cinco individuos de ocho poblaciones diferentes para un total de 40 individuos repartidos en todo el área de distribución de esta especie (Figura 4). La colecta incluyó cuatro poblaciones de la península de Baja California, tres poblaciones de Sonora y una población de las Islas del Golfo de California (Isla San Esteban) (Tabla I). Las hojas se guardaron en bolsas de plástico y fueron congeladas en nitrógeno líquido para conservar el tejido. El material fue guardado en un ultracongelador a -80°C hasta su utilización para el proceso de extracción de ADN, en el Laboratorio de Ecología, ubicado en la Estación Regional Noroeste del Instituto de Ecología de la UNAM, en Hermosillo, Sonora, México.

Tabla I. Poblaciones muestreadas *de Bursera microphylla* en el Desierto Sonorense.

Localidad/Población	Latitud (°N)	Longitud (°W)	Altitud (msnm)
A- La Rumorosa, BC	32°32'06"	116°03'00"	1278
B- Bahía de los Angeles, BC	29°09'15"	113°58'22"	8
C- El Abulón, BCS	27°17'34"	113°01'54"	216
D- San Bartolo, BCS	23°43'13"	109°46'39"	380
E- Isla San Esteban, Son	28°40'34"	112°35'50"	200
F- Quitovac, Son	31°30'59"	112°45'06"	420
G- Hermosillo, Son	29°05'44"	110°57'03"	210
H- San Carlos, Guaymas, Son	27°57'37"	111°02'23"	40



*Área de distribución de *Bursera microphylla**

Figura 4. Mapa que muestra los sitios de muestreo de *Bursera microphylla* en el Desierto Sonorense. A.- La Rumorosa, BC, B.- Bahía de los Ángeles, BC, C.- Abulón, BCS, D.- San Bartolo, BCS, E.- Isla San Esteban, Son, F.- Quitovac, Son, G.- Hermosillo, Son, H.- San Carlos, Guaymas, Son.

VI. 2. Extracción de ADN

Se extrajo ADN total de los individuos colectados siguiendo el protocolo de extracción miniprep (Doyle y Doyle, 1987) modificado por Gutiérrez-Ozuna (2006) (Apéndice I), utilizando los buffers de extracción según Scheinvar-Gottdiener (2008). El producto de extracción se guardó en un tubo eppendorf y se conservó en una ultrancongeladora a -20°C para su posterior amplificación.

VI. 3. Amplificación y secuenciación de ADNcp

Se amplificaron nueve regiones de ADN de cloroplasto (ADNcp), las cuales se encuentran representadas en la Tabla II. Se utilizaron los primers propuestos por Taberlet et al. (1991) para los espacios intergénicos *trnT-L*, *trnL-F* y el intrón *trnL*. Se probó el espacio intergénico *psbA – trnH*, el cual ha sido utilizado en estudios sobre filogenia y diversificación del género *Bursera* (De Nova et al., 2012); además esta región ha sido exitosa en estudios filogeográficos con otras especies del género (Poelchau y Hamrick, 2013). También se utilizaron los primers *atpB – rbcL* (Chiang et al., 1998), *trnh – psba* (Tate y Simpson, 2003 y Sang et al., 1997), *rpl20 – rps12*, *psbB – psbH*, *psbB – psbF* (Hamilton, 1999) y *ndhj – trnF* (Shaw et al., 2007 y Taberlet et al., 1991), los cuales están disponibles en el laboratorio, esto para verificar si mostraban variación y viabilidad para un estudio filogeográfico.

Tabla II. Regiones de ADN de cloroplasto utilizadas en pruebas de amplificación y evaluación de la variación genética

Región de ADNcp	Primers (forward-reverse) y Secuencia 5'- 3'	Referencia
<i>trnT-L</i>	TabA: CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT TabB: TCT ACC GAT TTC GCC ATA TC	Taberlet et al., 1991
<i>Intrón TrnL</i>	TabC: CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG TabD: GGG GAT AGA GGG ACT TGA AC	Taberlet et al., 1991
<i>trnL-F</i>	TabE: GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC TabF: ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	Taberlet et al., 1991
<i>trnh-psba</i>	trnh: CGC GCA TGG TGG ATT CAC ATT CC psba: GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C	Tate y Simpson 2003 y Sang et al., 1997
<i>atpB-rbcL</i>	atpB: ACA TCK ART ACK GGA CCA ATA A rbcL: AAC ACC AGC TTT RAA TCC AA	Chiang et al., 1998
<i>rpl20-rps12</i>	rpl20: CGY YAY CGA GCT ATA TAT CC rps12: ATT AGA AAN RCA AGA CAG CCA AT	Hamilton, 1999
<i>psbB-psbH</i>	psbB: TCC AAA AAN KKG GAG ATC CAA C psbH: TCA AYR GTY TGT GTA GCC AT	Hamilton, 1999
<i>psbB-psbF</i>	psbB: GTT TAC TTT TGG GCA TGC TTC G psbF: CGC AGT TCG TCT TGG ACC AG	Hamilton, 1999
<i>ndhj-trnF</i>	ndhj: ATG CCY GAA AGT TGG GG TabE: GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC	Shaw, 2007 y Taberlet, 1991

La amplificación de las nueve regiones de cloroplasto se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Trewick et al. (2002). La reacción de PCR para cada muestra se realizó de la siguiente manera: a un tubo eppendorf se agregaron 2.5 μL de buffer PCR 10X, 1.5 μL de MgCl_2 , 1 μL de BSA (albúmina de suero bovino), 2.5 μL cada primer (forward y reverse), 2.5 μL de la solución de ADN total, 0.2 μL de la solución de dNTPs, 0.2 μL de *Taq* polimerasa y 12.1 μL de agua ultrapura, obteniendo un volumen final de 25 μL para cada reacción. Los tubos se colocaron en un termociclador bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 80 grados centígrados por 5 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 grados centígrados por 1 minuto, alineación a 52 grados centígrados por 1 minuto y extensión a 65 grados centígrados por 4 minutos, finalmente una extensión final a 65 grados centígrados por 5 minutos.

Se corroboró la amplificación de los fragmentos mediante una electroforesis con gel de agarosa (1mg de agarosa/ 1mL de buffer TAE 1X) con 0.3 μL de bromuro de etidio (1mg/ 1mL de agua). Se agregaron a cada pozo 3 μL de buffer de carga y 5 μL del producto de PCR. En un pozo del gel se agregaron 3 μL de buffer de carga y 3 μL de Low Mass DNA Ladder, esto se realizó para identificar el tamaño de las bandas. Se verificó la amplificación de los fragmentos de ADN mediante la observación de las bandas en el gel en un transiluminador ultravioleta.

La purificación del producto de PCR y secuenciación se llevó a cabo en Universidad de Arizona (University of Arizona Genetics Core; <http://uagc.arl.arizona.edu>) en Tucson, Arizona, Estados Unidos. La secuenciación se realizó en ambos sentidos, 5' – 3' y 3' – 5', utilizando los primers que se utilizaron para la amplificación.

VI. 4. Edición de secuencias

Una vez obtenidos los cromatogramas de secuenciación para cada uno de los amplificados de ADNcp, se creó una secuencia consenso de los fragmentos tomando en cuenta la secuencia forward y reverse para cada individuo. También se acotaron los extremos para evitar sitios variables como producto del proceso de secuenciación, pues suelen presentar variabilidad

poco confiable en los extremos. Las secuencias fueron agrupadas y alineadas automáticamente con ClustalW multiple alignment con el software Bioedit v.7.2.5 (Hall, 1999).

VI. 5. Análisis de variabilidad

El análisis de variabilidad de las secuencias se llevó a cabo usando el programa DnaSP v.5.10.1 (Rozas, 2010), con el cual se calcularon: el índice de diversidad nucleotídica (π) y el índice de diversidad haplotípica (Hd).

Para calcular el índice de diversidad nucleotídica (π), el cual estima el promedio del número de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias tomadas al azar, se siguió la siguiente fórmula (Nei, 1987):

$$\pi = \frac{n}{n-1} \sum x_i x_j \pi_{ij}$$

en donde n es el número total de alelos, x_i y x_j son la frecuencia del alelo i y j en la población, respectivamente, y π_{ij} es la proporción de la diferencia nucleotídica entre las secuencias i y j .

Para calcular el índice de diversidad haplotípica (Hd) se utilizó la siguiente ecuación (Nei, 1987):

$$Hd = 2n (1 - \sum x_i^2) / (2n - 1)$$

Donde n es el número de individuos muestreados adaptado a organismos haploides y x_i es la frecuencia del haplotipo dado.

VI. 6. Red de haplotipos

Se construyó una red de haplotipos usando el programa TCS 1.21 (Clement et al., 2000). Este programa utiliza el criterio de parsimonia estadística para crear una red o filograma que indique todos los pasos mutacionales que diferencian entre cada uno de los haplotipos de las diferentes poblaciones. El análisis se realizó con la opción de indeles como quinto estado del carácter y una probabilidad de parsimonia de 0.95, es decir, que establece conexiones entre los haplotipos cuya probabilidad supere el límite establecido. Los haplotipos obtenidos se ubicaron geográficamente en un mapa de distribución de *Bursera microphylla*.

VII. RESULTADOS

VII.1. Amplificación y secuenciación de ADNcp

Para el análisis preliminar se amplificaron y secuenciaron nueve regiones de ADNcp con nueve individuos de toda la distribución de *B. microphylla*; del total de secuencias analizadas se detectó que la región *trnL-ndhj* (670 pb) presentó polimorfismos en varios sitios (Figura 5), por lo que se secuenciaron todas las muestras por localidad para este fragmento.

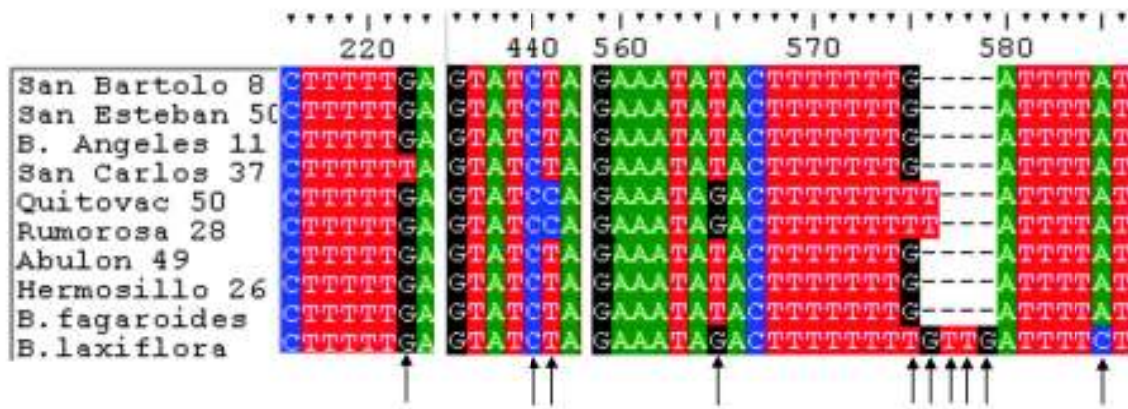


Figura 5. Puntos críticos de la secuencia de la región del ADNcp *trnL-ndhj*. Las flechas muestran los sitios de sustitución e indeles encontrados en la región de ADNcp *trnL-ndhj* de *Bursera microphylla*. Para fines ilustrativos se presenta un individuo de cada población muestreada y *Bursera fagaroides* y *Bursera laxiflora* como grupos externos.

VII. 2. Análisis de la variabilidad

Después de alinear y analizar las secuencias del fragmento amplificado, se encontraron un total de tres haplotipos para la región de ADNcp *trnL – ndhj* en las ocho localidades de *Bursera micropylla* muestreadas. Todas las localidades analizadas resultaron ser monomórficas (es decir, con un haplotipo), a excepción de las poblaciones de San Carlos y Quitovac, ambas en el Estado de Sonora, pues presentaron dos haplotipos, es decir, son polimórficas. Todas las poblaciones mostraron bajos niveles de variación genética, siendo Quitovac, Sonora, la localidad que presentó la mayor diversidad genética. La diversidad haplotípica (*Hd*) de la mayoría de las poblaciones fue 0, excepto San Carlos con 0.4 y Quitovac con 0.6; la diversidad haplotípica total sin considerar indeles (*Hd*) fue de 0.375 ± 0.080 , mientras que la diversidad haplotípica total considerando indeles (*Hdi*) fue de 0.335. La diversidad nucleotídica (π) total fue de 0.00208 ± 0.00046 (Tabla III).

Tabla III. Valores de diversidad haplotípica y nucleotídica de *Bursera micropylla* calculados a partir de las secuencias de la región de ADNcp *trnL-ndhj*. *h*= número de haplotipos, *Hd*= diversidad haplotípica sin considerar indeles, *hi*= número de haplotipos considerando indeles, *Hdi*= diversidad haplotípica considerando indeles, π = diversidad nucleotídica.

Localidad	<i>h</i>	<i>Hd</i>	<i>hi</i>	<i>Hdi</i>	π
San Bartolo, BCS	1	0	1	0	0
El Abulón, BCS	1	0	1	0	0
Bahía de los Ángeles, BC	1	0	1	0	0
San Carlos, Son	2	0.4	2	0	0.00060
Hermosillo, Son	1	0	1	0	0
Quitovac, Son	2	0.6	2	0	0.00354
La Rumorosa, BC	1	0	1	0	0
Isla San Esteban	1	0	1	0	0
Total	3	0.375 ± 0.080	3	0.335	0.00208 ± 0.00046

VII. 3. Red de haplotipos

Los tres haplotipos identificados para la región de ADNcp *trnL-ndhj* de *Bursera microphylla*, fueron conectados en una red mediante el criterio de máxima parsimonia (Figura 6). El haplotipo A que se encuentra representado en un cuadro fue el más frecuente y resultó ser el haplotipo ancestral, mientras que los haplotipos B y C separados por líneas, como los haplotipos derivados. El haplotipo B difiere del ancestral por cuatro pasos mutacionales, mientras que el haplotipo C difirió en un único paso. En relación al grupo externo, para este caso: *Bursera laxiflora*. *B. fagaroides* se agrupó dentro del haplotipo A ya que presentó la secuencia idéntica a *B. microphylla*.

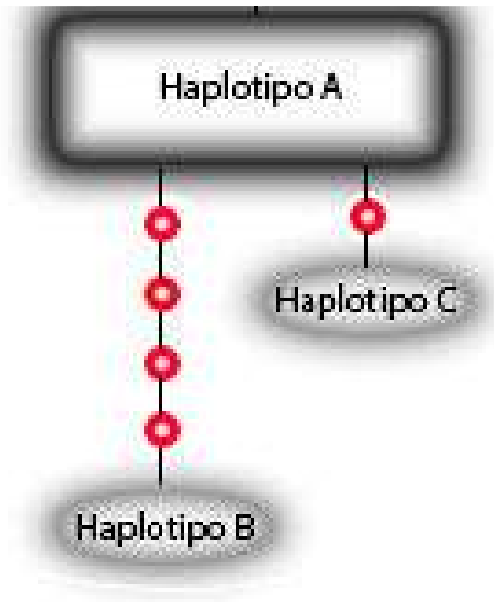


Figura 6. Red de haplotipos construida bajo el criterio de parsimonia de la región de ADNcp *trnL-ndhj* de las poblaciones muestreadas de *Bursera microphylla*, obtenida mediante el software TCS 1.21. El haplotipo ubicado dentro de un cuadro indica el reconocido como ancestral y en círculos están los haplotipos derivados, los círculos rojos representan el número de mutaciones.

VII. 4. Distribución de los haplotipos

La distribución geográfica de los tres haplotipos de la región de ADNcp *trnL-ndhj* en las ocho localidades muestreadas se presenta en la figura 7. En Sonora se detectaron tres haplotipos (A, B y C), mientras que en el sur de la península de Baja California únicamente se encontró el haplotipo A.

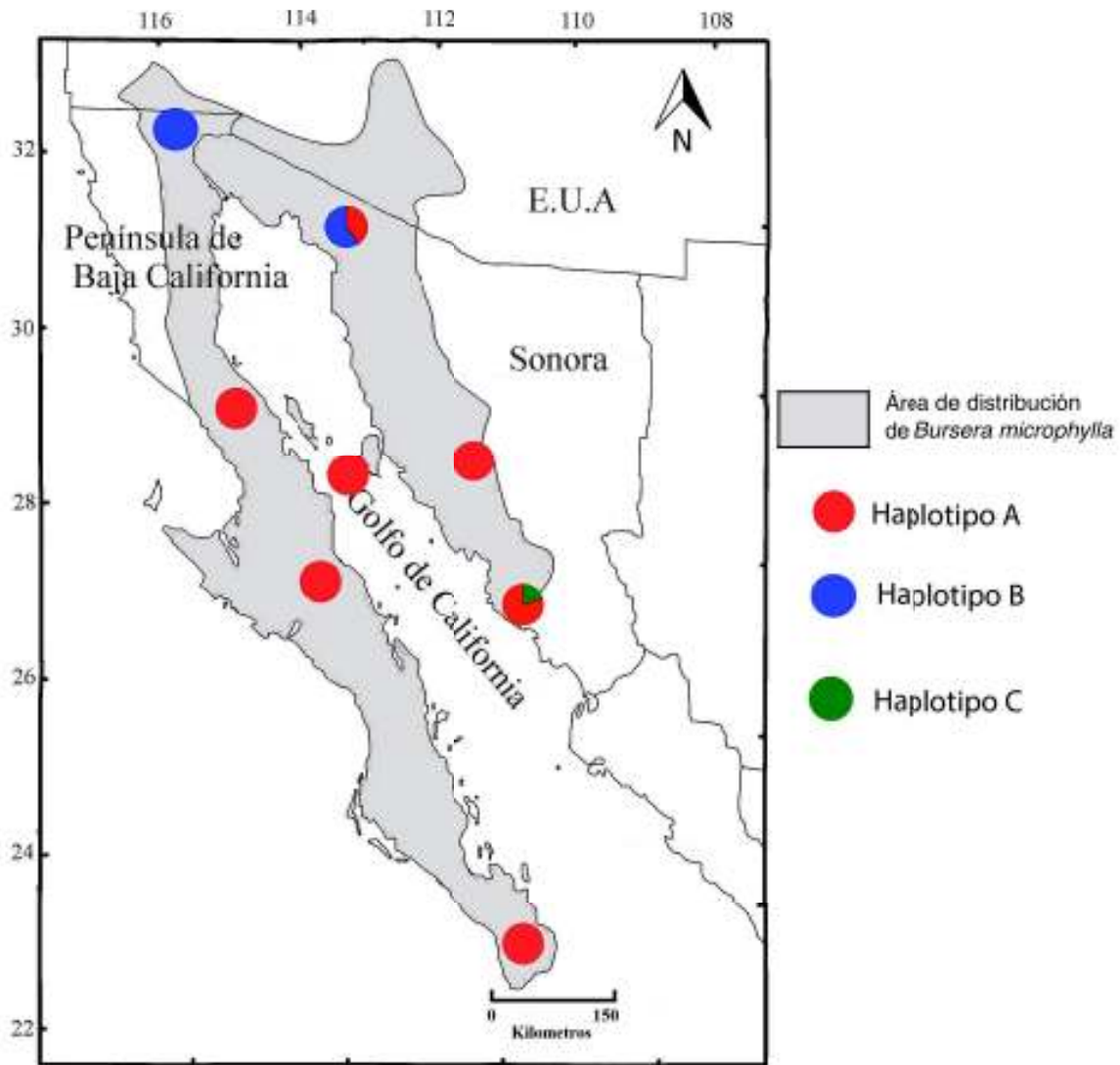


Figura 7. Distribución geográfica de los haplotipos de la región de ADNcp *trnL-ndhj* en las ocho localidades de muestreo de *Bursera microphylla*.

VIII. DISCUSIÓN

VIII. 1. Análisis de la variabilidad

Al realizar un análisis comparativo de los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica de *Bursera microphylla*, respecto a otros estudios con especies de plantas del Desierto Sonorense, en los cuales utilizaron secuencias de distintas regiones de ADNcp, se encontró que los valores obtenidos para la especie a partir del fragmento de ADNcp *trnL-ndhj*, se encuentran dentro del rango promedio de diversidad tanto haplotípica como nucleotídica (por ejemplo: Felghberg y Ranker, 2009 y Gutiérrez et al., en prensa ver Tabla IV).

El número de haplotipos encontrados en este estudio es relativamente bajo, comparado con otros estudios con especies de plantas del Desierto Sonorense (Garrick et al., 2009; Felghberg y Ranker, 2009). Cabe destacar, que los valores pueden variar dependiendo del número de individuos y/o poblaciones que se tomaron en cuenta para realizar el estudio, lo cual pudo haber influido en el número de haplotipos y por lo tanto, en los índices de diversidad mencionados.

Tabla IV. Cuadro comparativo de la diversidad haplotípica y nucleotídica de *Bursera microphylla* con diversas especies del Desierto Sonorense utilizando secuencias de diferentes regiones de ADNcp; n= número de poblaciones, h= número de haplotipos, Hd= diversidad haplotípica, π = diversidad nucleotídica, * Datos no incluidos en el artículo

Especie	n	h	Hd	π	Referencia
<i>Encelia farinosa</i>	21	10	0.6885 \pm 0.0190	0.00625 \pm 0.00365	Fehlberg y Ranker, 2009
<i>Euphorbia lomelii</i>	40	30	*	*	Garrick et al., 2009
<i>Dioon sonorensis</i>	9	2	0.363 \pm 0.052	0.00077 \pm 0.00011	Gutiérrez et al., en prensa
<i>Bursera microphylla</i>	8	3	0.375 \pm 0.080	0.00208 \pm 0.00046	Este estudio

Los valores de diversidad nucleotídica se ven afectados por la frecuencia de haplotipos comunes en las poblaciones, ya que el 75% de las poblaciones presentó el haplotipo ancestral (A), lo que resulta en un valor muy bajo de diversidad (π). Los índices bajos de diversidad haplotípica y nucleotídica pueden deberse a eventos demográficos históricos que pudieron influir en su filogeografía, tales como: cuellos de botella debido a las oscilaciones climáticas o un efecto fundador a partir de poblaciones ancestrales de bajo tamaño efectivo (Avise, 2000).

En poblaciones cuyos tamaños efectivos son bajos, usualmente la variabilidad genética es baja, debido a que los tiempos de coalescencia de linajes maternos (en este caso ADN de cloroplasto), son muy recientes para permitir que se acumulen mutaciones detectables en su ADN (Avise, 2000). Además, un bajo tamaño efectivo de la población se debe a que los individuos experimentan contracciones demográficas que pueden deberse a cambios climáticos u otros cambios en las condiciones del medio ambiente en el que se desarrollan (O'Brien y Evermann, 1988).

Aunque en este estudio no se calculó la diferenciación genética y flujo génico utilizando secuencias, un estudio previo que utilizó isoenzimas, detectó bajos niveles de diferenciación entre poblaciones para esta especie (Hernández - López, 1999). El cloroplasto se hereda vía materna (Corriveau y Coleman, 1988) y los datos sobre la distribución de

haplotipos en *B. microphylla* sugieren flujo genético vía dispersión de semillas. Existe evidencia de que las semillas de *B. microphylla* son dispersadas por vireos grises (*Vireo vicinor*), un ave migratoria que se alimenta casi exclusivamente de sus frutos durante el invierno, los cuales pueden dispersar sus semillas a largas distancias (Bates, 1992). La amplia distribución del haplotipo A pudiera deberse a la dispersión de semillas debida a la movilidad de esta ave. En contraste con la movilidad del dispersor de semillas, el flujo génico vía polen en *B. microphylla* parece ser más limitado. Los polinizadores que se han documentado en esta especie son abejas pequeñas y moscas, las cuales tienen menor movilidad (Gerst et al. Manuscrito no publicado). Bajo este escenario, se espera encontrar menor diferenciación genética en genes del citoplasma que en el núcleo debido a la movilidad del dispersor de semillas.

VIII. 2. Origen de *Bursera microphylla*

Aunque el uso de herramientas moleculares para estimar tiempos de divergencia está sujeto a errores debido a problemas de sobreestimación, actualmente este enfoque ha llegado a proporcionar información aproximada sobre los tiempo de divergencia ente especies y ubicarlas dentro de un contexto biogeográfico (Hillis, 1991; Riddle et al. 2000).

La reconstrucción de hábitat y el tiempo de diversificación que se ha estimado para *Bursera microphylla*, mediante estudios de tipo reloj molecular, concuerda con la historia de la vegetación del Desierto Sonorense que se ha realizado mediante evidencia obtenida a partir de restos de nidos de la rata *Neotoma* spp. (packrat middens). Los datos moleculares indican que la especie *Bursera microphylla* se diversificó junto con *Bursera multifolia* durante el Mioceno tardío hace aproximadamente 7.72 millones de años (Figura 8). Respecto a la reconstrucción de su hábitat, la estimación sugiere que la especie presenta un hábitat ancestral de tipo selva baja caducifolia o bosque seco (Figura 9) y posteriormente se adaptó y diversificó en ambientes más áridos de tipo matorral xerófilo (De Nova et al., 2012). Este dato concuerda con estudios paleoambientales que han propuesto que la formación de las comunidades bióticas del Desierto Sonorense como lo conocemos actualmente, inició por una tendencia a la aridez en las regiones periféricas de selva baja caducifolia durante el Mioceno (Van Devender, 2000). Ambos estudios proporcionan información para establecer una hipótesis más clara acerca del origen de la especie, por lo que es probable que *Bursera microphylla* se haya originado bajo ese escenario durante ese periodo geológico.

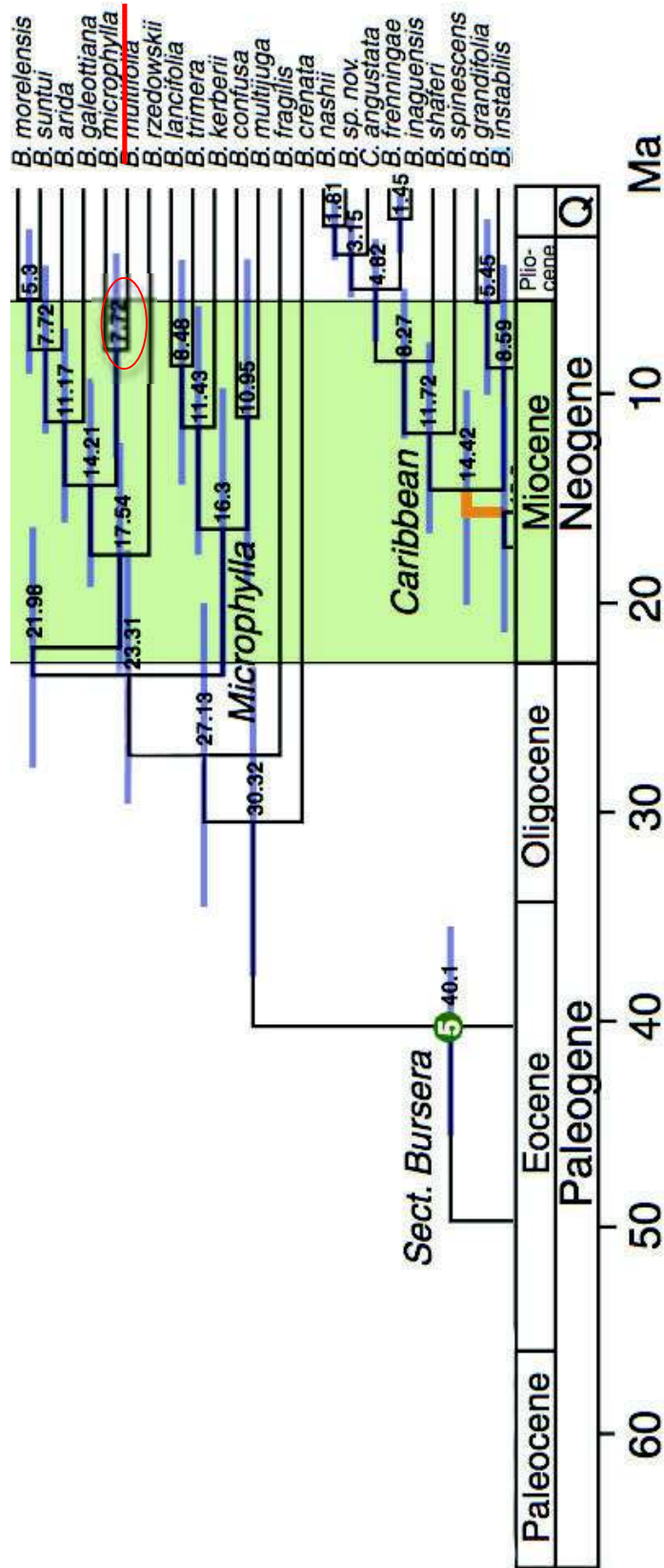


Figura 8. Tiempo de diversificación del género *Bursera*. El cladograma se calibró con un fósil de *Bursericarpum aldwickense*. Se indica subrayado en rojo, la especie de estudio *Bursera microphylla* y en un círculo rojo el tiempo de diversificación en este caso: 7.72 millones de años (De Nova et al., 2012).

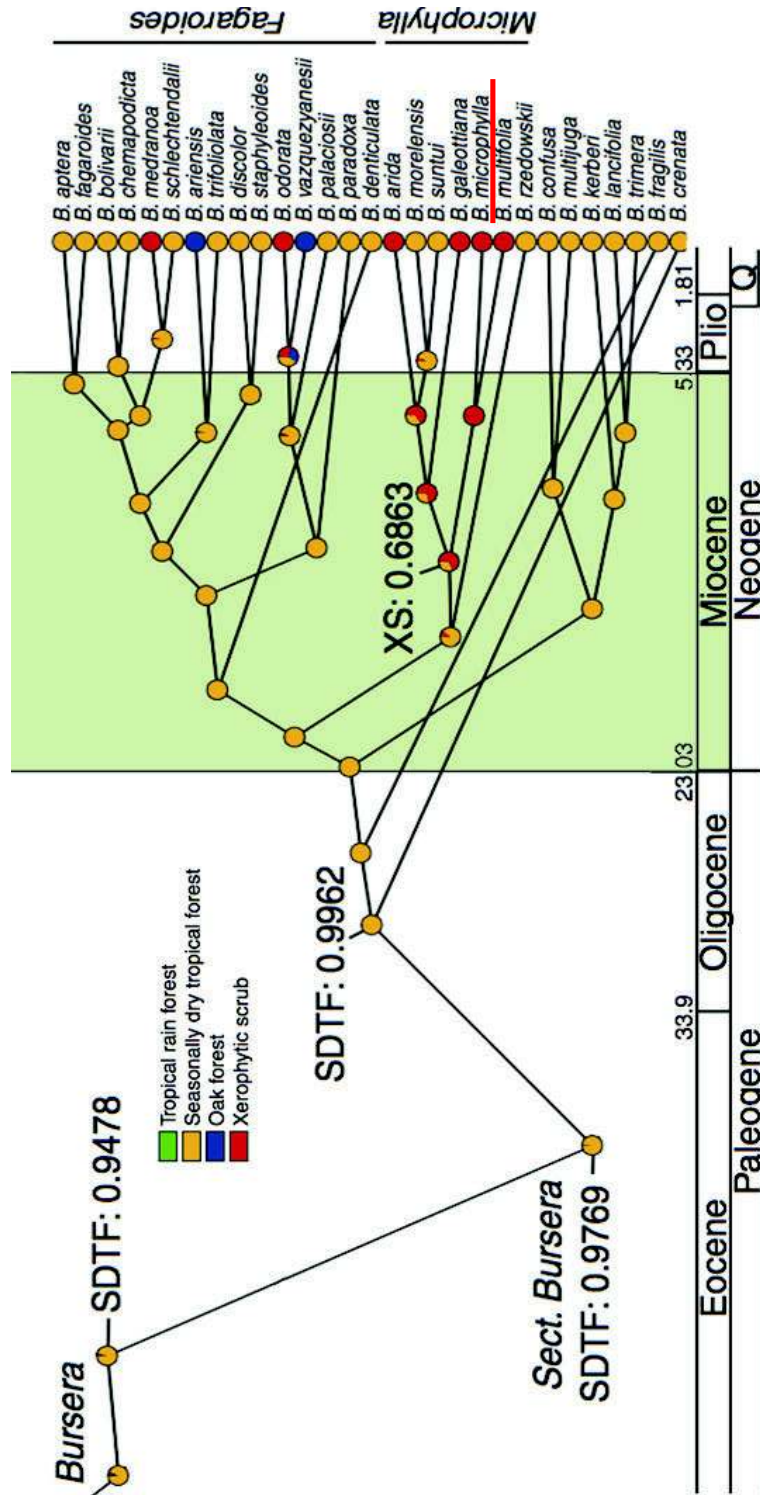


Figura 9. Reconstrucción de hábitat ancestral del género *Bursera*. Se realizó a partir del modelo SDFT que sugiere a la selva baja caducifolia o bosque tropical seco como el hábitat ancestral. Se indica subrayado con rojo la especie de estudio *Bursera microphylla* (De Nova et al., 2012).

Mooney y Emboden (1968) realizaron un estudio sobre la composición de terpenos y la morfología foliar a lo largo de la distribución de *Bursera microphylla*. En el estudio incluyeron siete poblaciones que abarcan la distribución de la especie. Estos autores encontraron que la localidad de Guaymas, Sonora presentó la mayor variabilidad de compuestos, mientras que en La Paz, Baja California Sur, tenía una composición más uniforme. La distribución de la composición de terpenos mostró mayor conexión espacial en sentido norte – sur que este –oeste, lo que los llevó a postular que no había conexiones entre las poblaciones de la península de Baja California y Sonora, debido a un largo periodo de aislamiento de estas poblaciones debido a la formación del Golfo de California.

Estos autores también propusieron que la especie probablemente se había originado en Sonora y después había migrado hacia la península por la conexión continental de la península al continente. Esta hipótesis de Mooney y Emboden (1968), es consistente con los datos obtenidos en este estudio. La red de haplotipos y la ubicación de los mismos en el mapa de distribución de la especie, sugieren que la especie se pudo haber originado en Sonora y posteriormente extendió su rango de distribución hacia la península. El hecho de que la diversidad de haplotipos sea mayor en Sonora que en Baja California es congruente con esa hipótesis. Las poblaciones de Quitovac, Sonora y San Carlos, Sonora, son polimórficas, presentaron un mayor número de haplotipos y por lo tanto mayor diversidad haplotípica, mientras que todas las poblaciones de la península fueron monomórficas.

VIII. 3. Reconstrucción filogeográfica

La mayoría de los estudios filogeográficos de especies del Desierto Sonorense son explicados en términos de procesos de vicarianza o cambios climáticos durante el Cuaternario (i. e. Riddle et al, 2000; Nason et al., 2002; Garrick et al., 2009). En el caso de fauna se han realizado estudios con pequeños mamíferos y lagartijas, con lo cual se han propuesto al menos dos eventos de vicarianza que han influido en la estructura genética de las poblaciones. Tal es el caso de la inundación del Istmo de La Paz hace tres millones de años y la transgresión marina hacia la mitad de la península hace un millón de años. Estos procesos de vicarianza

han sido muy importantes y se ha propuesto que han influido fuertemente en la diversificación de la biota de este Desierto de Norte América (Riddle et al., 2002; Upton y Murphy, 1997).

En contraste con las hipótesis filogeográficas que se han propuesto para la fauna del Desierto Sonorense, las cuales muestran evidencia de vicarianza, las características de la historia de vida de las especies de flora del Desierto Sonorense y los patrones geográficos de estructura genética de las poblaciones nos permiten predecir que las especies y comunidades de plantas están más influenciadas por cambio climático más que por vicarianza (Nason et al., 2002). Los resultados de la distribución espacial de los haplotipos de *Bursera microphylla* utilizando la región de ADNcp *trnL – ndhj* sugieren que su distribución está mayormente influenciada por las oscilaciones climáticas del Cuaternario. Este patrón se ha detectado previamente en otros trabajos con plantas bajo este contexto (Felghberg y Ranker, 2009; Garrick et al., 2009).

Las poblaciones peninsulares de Bahía de Ángeles, Abulón, San Bartolo e Isla San Esteban, comparten el haplotipo ancestral (haplotipo A) con todas las poblaciones de Sonora. El compartir este haplotipo ancestral entre regiones indica que posiblemente existe una conexión entre las poblaciones de la península y Sonora, por lo que probablemente el proceso de vicarianza asociado a la separación peninsular no haya influido en la filogeografía de la especie y por lo tanto, el Golfo de California no represente una barrera geográfica para el flujo génico de la especie.

Por otra parte, durante el Pleistoceno la Tierra sufrió sucesivos periodos glaciares e interglaciares que afectaron a distintos continentes (Van Devender, 2000). En el último máximo glacial llamado “Wisconsin” en Norte América, los bosques boreales dominados por pinos y encinos se desplazaron hacia el sur de tal manera que algunas especies pudieron haber cohabitado con especies de selvas bajas caducifolias. La evidencia de plantas en nidos de la rata *Neotoma* ha documentado una expansión de los árboles y arbustos de bosques en áreas que habían sido desérticas, así como la presencia contemporánea de especies de zonas templadas y tropicales. Durante este período geológico muchas especies de plantas tropicales restringieron su distribución a valles ubicados al sur en los desiertos Sonorense y Chihuahuense y posteriormente, durante el Holoceno en los últimos 11, 000 años, ampliaron su rango de distribución colonizando áreas ocupadas previamente por bosques de pino – encino (Van Devender, 2000).

Independientemente de las diferentes historias de vida de diversas especies de Norte América y Europa, la mayoría indican una contracción en su rango de distribución hacia el sur durante el último periodo glacial y posteriormente una expansión en su rango de distribución hacia el norte durante el Holoceno (Nason et al., 2002). Es probable que durante los cambios climáticos del Pleistoceno *Bursera microphylla* haya restringido su distribución a zonas más bajas en sitios de refugio. Aunque la mayoría de las poblaciones analizadas no presentaron variabilidad genética entre los individuos, las poblaciones de Quitovac, Sonora y San Carlos, Guaymas, Sonora presentaron los niveles más altos de variación genética, tanto para diversidad haplotípica como nucleotídica; lo que sugiere que estos sitios pudieron haber servido como refugios para la especie durante las oscilaciones climáticas del Cuaternario (Comes y Kadereit, 1998).

Los datos paleobotánicos obtenidos a partir de microfósiles (polen) y macrofósiles (restos de hojas, ramas o frutos) en varios sitios, principalmente al norte de la península de Baja California, indican que *Bursera microphylla* aparece como un elemento abundante en el Desierto Sonorense durante al menos, los últimos 14,000 años (Holmgren et al., 2011). En la historia de la vegetación de San Pedro Mártir, Baja California los registros sugieren que durante el Pleistoceno tardío y Holoceno temprano muchas de las especies de chaparrales de California fueron reemplazadas por elementos del Desierto Sonorense como *Bursera microphylla*, *Hyptis emoryi*, *Simmondsia chinensis* y algunos cactus y pastos (Holmgren et al., 2011). Además se tienen registros de *Bursera microphylla* en la Sierra Bacha, al sur de Puerto Libertad, Sonora de hace casi 10,000 años junto con otras especies como: *Fouquieria columnaris*, *Encelia farinosa*, *Larrea divaricata*, *Cercidium microphyllum*, *Jatropha cuneata*, entre otras (Van Devender et al., 1994; Anderson y Van Devender, 1995). Los bajos niveles de variación genética y la presencia de un haplotipo (A o B) en seis de las ocho poblaciones pueden sugerir expansiones postglaciales en el rango de distribución de la especie hacia el norte y a lo largo de la península de Baja California a partir de refugios localizados en Sonora.

IX. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se puede concluir que el fragmento de ADNcp *trnL – ndhj* mostró mayor número de sitios polimórficos que otros fragmentos estudiados del cloroplasto en *Bursera microphylla*. La variabilidad nucleotídica y haplotípica fue relativamente baja ($Hd= 0.375 \pm 0.080$ y $\pi= 0.00208 \pm 0.00046$); sin embargo, los valores obtenidos se encuentran dentro del rango de variabilidad genética registrada en varias regiones de ADNcp de especies de plantas (*Encelia farinosa*, *Euphorbia lomelii* y *Lophocereous schottii*) del Desierto Sonorense.

Se detectaron un total de tres haplotipos para la región intergénica *trnL – ndhj* en *Bursera microphylla*. De acuerdo con la distribución geográfica de los haplotipos, se sugiere que el cambio climático durante el Cuaternario influyó de mayor manera en la estructura filogeográfica de la especie que posibles procesos de vicarianza asociados a la separación de la península de Baja California. Bajo este escenario, probablemente durante el último periodo glacial la especie sufrió una contracción en su rango de distribución, refugiándose en el sur de Sonora y posteriormente durante el Holoceno expandió su rango de distribución hacia el norte de Sonora y a lo largo de la península de Baja California.

X. RECOMENDACIONES

El presente estudio incluyó poblaciones que abarcan casi en su totalidad la distribución de la especie (Turner et al., 1995). Sin embargo, se han reportado poblaciones de *Bursera microphylla* que se extienden más allá del límite de distribución reportado por Turner et al. (1995). En el libro de plantas del Río Mayo se tiene registrada al menos una población de la especie, localizada hacia el sur del Estado de Sonora cerca de Huatabampito (Martin et al., 1998). Además existen varios registros de *Bursera microphylla* en el Estado de Arizona, Estados Unidos, donde se ha reportado de acuerdo a la morfología de las hojas, que la especie se encuentra en un proceso de hibridación con *Bursera fagaroides* (Van Devender y Felger, Obs. pers.) Estas poblaciones no fueron estudiadas en el presente trabajo, por lo que se recomienda colectarlas y realizar un estudio mucho más detallado sobre la filogeografía de la especie.

Es importante mencionar que en este estudio no se realizó un análisis estadístico de los datos usando el enfoque de clados anidados. En el futuro convendría realizar este tipo de análisis para inferir sobre los procesos de expansión o vicarianza que influyeron de mayor manera en las poblaciones de la especie. Además sería interesante realizar un análisis de SAMOVA con la finalidad de determinar qué poblaciones son geográficamente más homogéneas o más diferenciadas unas de otras y permitir identificar las barreras genéticas para las poblaciones de esta especie.

Debido a la falta de evidencia fósil en sitios al sur del Desierto Sonorense, no fue posible describir de manera más detallada con datos paleobotánicos, una reconstrucción de cómo fue el proceso de colonización de la especie en el Holoceno, la última fase climática del Cuaternario. Por esta razón, se recomienda realizar estudios paleontológicos en el sur del Desierto Sonorense ya que sería muy útil encontrar restos de *Bursera microphylla* en los sitios que se han propuesto como refugio en este estudio, y de esta manera conocer más sobre la historia evolutiva de la especie.

XI. LITERATURA CITADA

- Aris, S. y L. Excoffier. 1996. The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism. *Molecular Biology and Evolution*. 13: 494-504.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography, the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Estados Unidos de América.
- Avise, J.C., J. Arnold, R.M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Niegel, C.A. Reeb y N.C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:489 - 522.
- Anderson, R. S. y T. R. Van Devender. 1995. Vegetation history and paleoclimates of the coastal lowlands of Sonora, México – Pollen records of packrat middens. *Journal of Arid Enviroments* 30: 295 – 306.
- Bates, J. 1992. Frugivory on *Bursera microphylla* (Burseraceae) by wintering gray vireos (*Vireo vicinior*, Vireonidae) in the costal deserts of Sonora, México. *The Southwestern Naturalist* 37: 252-258.
- Becerra, J. X. 2003. Evolution of Mexican *Bursera* (Burseraceae) inferred from ITS, ETS, and 5S nuclear ribosomal DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26: 300-309.
- Becerra, J. X., K. Noge, S. Olivier y D. Lawrence. 2012. The monophyly of *Bursera* and its impact for divergence times of Burseraceae. *Taxon* 61: 333-343.
- Benson, L. D. y R. A. Darrow. 1981. *Trees and Shrubs of the Southwestern Deserts*. University of Arizona Press. Tucson, Arizona, Estados Unidos de América.
- Britto- Castillo, L. M. A. Crimmins y S. C. Diaz-C. 2010. Clima. Pp: 73-93. En: Van Devender, T. R. y F. Molina-Freaner (Eds). *Diversidad Biológica de Sonora*. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F, México.
- Chiang, T. Y., B. A. Schaal, y C. I. Peng. 1998. Universal primers for amplification and sequencing a noncoding spacer between *atpB* and *rbcL* genes of chloroplast DNA. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 39: 245-250
- Clement, M., D. Posada, y A. Crandall. 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1659.

- Comes, H. P. y J. W. Kadereit, 1998. The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Science*. 3: 432–438.
- Corriveau, J. L. y A. W. Coleman. 1988. Rapid screening method to detect potential biparental inheritance of plastid DNA and results for over 200 angiosperms. *American Journal of Botany* 75: 1443-1458.
- De Nova A., R. Medina, J. Moreno, A. Weeks, J. Rosell, M. Olson, L. Eguiarte y S. Magallón. 2012. Insights into the historical construction of species – rich Mesoamerican seasonally dry tropical forests: the diversification of *Bursera* (Burseraceae, Sapindales). *New Phytologist* 193: 276-287.
- Dimmitt, M. 2000. Biomes and Communities of the Sonoran Desert Region. 3-18 p. En: Phillips, S. y P. Wentworth. (Eds.). *A Natural History of the Sonoran Desert*. Arizona - Sonora Desert Museum Press. Arizona, Estados Unidos de América.
- Dobzhansky, T. 1964. *Genetics and the origin of species*. Columbia University Press. Nueva York, Estados Unidos de América.
- Domínguez, O. y E. Domínguez. 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation* 32: 59 -70.
- Doyle, J y J. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11-15.
- Eguiarte, L., V. Souza y X. Aguirre. 2007. *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT, Coyoacán, Estado de México.
- Fehlberg, S. y T. A. Ranker. 2009. Evolutionary history and phylogeography of *Encelia farinosa* (Asteraceae) from the Sonoran, Mojave, and Peninsular Deserts. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50: 326-335.
- Freeland, J. R. 2011. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons Ltd. Inglaterra.
- Futuyma, D. J. 2013. *Evolution*. Sinauer/ Freeman Publishers. Estados Unidos de América.
- Garrick, R. C., J. D. Nason, C. A. Meadows y R. J. Dyer. 2009. Not just vicariance: phylogeography of the sonoran desert euphorb indicates a major role of range expansion along the Baja peninsula. *Molecular Ecology* 18: 1916-1931.
- Gutiérrez-Ozuna, R. 2006. Estructura clonal del zacate buffel (*Pennisetum ciliare* L. Link) en el noroeste de México. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F.

- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user- friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hamilton, M. 2009. *Population genetics*. Wiley-Blackwell. Malasia.
- Hamilton, M. B. 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Mol Ecol* 8: 513–525.
- Harding, R. M. 1996. New phylogenies: an introductory look at the coalescent. En: P. H. Harey, A. J. Leigh Brown, J. Maynard Smith y S. Nee (eds.). *New uses for new phylogenies*. Oxford University Press, Nueva York, Estados Unidos de América. pp 15-22.
- Harley, M. M., U. Song y H.I. Banks. 2005. Pollen morphology and systematics of Burseraceae. *Grana*, 44: 282-299.
- Hartl, D. y A. Clark. 2007. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. Estados Unidos de América.
- Hedrick, W. 2005. *Genetics of Populations*. Jones and Bartlett Publishers, Inc. Estados Unidos de América.
- Hernández – López, A. 1999. Consecuencias genéticas y evolutivas del surgimiento del Golfo de California en poblaciones de *Bursera microphylla* (Burseraceae) en el Desierto Sonorense. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F.
- Hillis, D. M. 1991. Discriminating between phylogenetic signal and random noise in DNA sequences. *In* “Phylogenetic Analysis of DNA Sequences” (M. Miyamoto y J. Cracraft, Eds.), pp: 278–294. Oxford Univ. Press, New York, Estados Unidos de América.
- Holmgren, C. A., J. L. Betancourt y K. A. Rylander. 2011. Vegetation history along the Eastern, desert escarpment of the Sierra San Pedro Mártir, Baja California, México. *Quaternary research* 75: 647-657.
- Holmgren, C. A., J. L. Betancourt, M. C. Peñalba, J. Delgadillo, K. Zuravnsky, K. L. Hunter, K. A. Raylander y J. L. Weiss. 2014. Evidence against Pleistocene desert refugium in Lower Colorado River Basin. *Journal of Biogeography* 41: 1769-1780.
- Kingman, J. F. C. 1982. The coalescent. *Stochastic Processes and Applications* 13:235-248
- Martin, P., D. Yetman, M. Fishbein, P. Jenkins, T. Van Devender y R. K. Wilson. 1998. *Centry’s Río Mayo Plants*. The University of Arizona Press. Estados Unidos de América.

- Mazer, S. J. y J. Damuth, 2001. Evolutionary significance of variation. 16-28 p. En Fox, C., D. Fairbairn y D. Roff. *Evolutionary Ecology: Perspectives and Synthesis*, Oxford University Press, Oxford, Inglaterra.
- Medina, R. 2008. Flora del Valle Tehuacán – Cuicatlán: Burseraceae. *Universidad Nacional Autónoma de México* 66: 1-76.
- Mooney, H. A y W. A. Emboden. 1968. The Relationship of Terpene Composition, Morphology and Distribution of population of *Bursera microphylla* (Burseraceae). *Brittonia* 20: 44-51.
- Nabhan, G. 2000. Welcome to the Sonoran Desert. En: Phillips, S. y P. Wentworth. (Eds.), *A Natural History of the Sonoran Desert*. Arizona - Sonora Desert Museum Press. Arizona, Estados Unidos de América.
- Nason, J. D., J. L Hamrick y T. H. Fleming. 2002. Historical vicariance and postglacial colonization effects on the evolution of genetic structure in *Lophocereous*, a Sonoran Desert columnar cactus. *Evolution* 6: 2214-2226.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press.
- Newland, K. C. 1980. Propagation techniques for desert plants, part 1. *Desert Plants* 2: 205 – 216.
- O' Brien, S. J. y J. F. Evermann. 1988. Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations. *Trends in Ecology Evolution*. 3: 254-259.
- Palmer, J. D. y L. A. Herbon. 1988. Plant mitochondrial DNA evolves rapidly in structure, but slowly in sequence. *Journal of Molecular Evolution* 28:87-97.
- Pfeiler, E. B. G. Bitler, S. Castrezana, L. M. Matzkin y T. A. Markow. 2008. Genetic diversification and demographic history of the cactophilic pseudoscorpion *Dinocheirus arizonensis* from the Sonoran Desert. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 133-141.
- Piñero, D., J. Caballero -Mellado, D. Cabrera - Toledo, C. Canteros, A. Casas, A. Castañeda Sortibrán, A. Castillo, R. Cerritos, O. Chassin-Noria, P. Colunga-GarcíaMarín, P. Delgado, P. Díaz-Jaimes, L. E. Eguiarte, A. E. Escalante, B. Espinoza, A. Fleury, S. Flores-Ramírez, G. Fragoso, J. González-Astorga, V. Islas-Villanueva, E. Martínez, F. Martínez, J. Martínez-Castillo, A. Mastretta Yanes, R. Medellín, L. Medrano-González. F. Molina-Freaner, B. Morales Vela, A. Murguía Vega, E. Payró de la Cruz, M. R. Reyes - Montes, M. R. Robles Saavedra, G. Rodríguez-Arellanes, L. Rojas Bracho, R. Romero Martínez, J. H. Sahaza-Cardona, R. Salas Lizana, E. Sciutto, C. Schott Baker, Y. Schramm Urrutia, C. Silva, V. Souza, M. L. Taylor, J. Urbán Ramírez, M. Uribe-Alcocer, M. J. Vázquez Cuevas, E. Vázquez

- Domínguez, A. P. Vovides, A. Wegier, A. Zaldívar-Riverón y G. Zuñiga. 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. En: Capital natural de México, vol. I : Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México, 437-494.
- Poelchau, M. F. y J. L. Hamrick. 2013. Comparative phylogeography of three common Neotropical tree species. *Journal of Biogeography* 40: 618: 631.
- Riddle, B. R., D. J. Hafner, L. F. Alexander y J. R. Jaeger. 2000. Cryptic vicariance in the historical assembly of a Baja California Peninsular Desert biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 14438–14443.
- Riddle, B. R., M. N. Dawson, E. A. Hadley, D. J. Hafner, M. J. Hickerson, S. J. Mantooth y A. D. Yoder. 2008. The role of molecular genetics in sculpting the future of integrative biogeography. *Progress in Physical Geography* 32: 173–202.
- Rozas, J. 2009. DNA Sequence Polymorphism Analysis using DnaSP. 337-350 p. En: Posada, D. (ed.) *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis; Methods in Molecular Biology Series Vol. 537*. Humana Press, NJ, Estados Unidos de América.
- Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Editorial Limusa. México.
- Rzedowski, J. y H. Kruse. 1979. Algunas tendencias evolutivas en *Bursera* (Burseraceae). *Taxón* 28: 103-116
- Rzedowski, J., R. Medina y G.C. De Rzedowski. 2006. Inventario del conocimiento taxonómico, así como de la diversidad y del endemismo regionales de las especies mexicanas de *Bursera* (Burseraceae). *Acta Botánica Mexicana* 70: 85–111.
- Sang, T., D. J. Crawford y T. F. Stuessy. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* 84: 1120–1136.
- Scarborough, R. 2000. The Geologic Origin of the Sonoran Desert. 61-84 p. En: Phillips, S. y P. Wentworth. (Eds.), *A Natural History of the Sonoran Desert*. Arizona - Sonora Desert Museum Press. Tucson, Arizona, Estados Unidos de América.
- Scheinvar-Gottdiener, E. 2008. Genética de poblaciones silvestres y cultivadas de dos especies mezcaleras: *Agave cupreata* y *Agave potatorum*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F.

- Shreve, F. y I. Wiggins. 1975. *Vegetation and Flora of the Sonoran Desert*. Stanford University Press, Stanford, Estados Unidos de América.
- Shaw, J. E. Lickey, E. E. Schilling y R. Small. 2007. Comparison of the whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94: 275-288
- Schmidt JR., R.H. 1989. The Arid Zones of Mexico: Climatic Extremes and Conceptualization of the Sonoran Desert. *Journal of Arid Environment* 16: 241-256
- Taberlet, P., L. Guielly, G. Pautou y J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- Tate, J.A y B. B. Simpson. 2003. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic Botany* 28: 723–737.
- Trewick, S. A., Morgan - Richards, S. J. Russel, S. Henderson, F. J. Rumsey, I. Pinter, J. A. Barret, M. Gibby y J. C. Vogel. 2002. Polyploidy, phylogeography and Pleistocene refugia of the rockfern *Asplenium ceterach*: evidence from chloroplast DNA. *Molecular Ecology* 11: 2003-2012.
- Turner, R. M. J. E. Bowers y T. L. Burgess. 1995. *Sonoran Desert Plants*. The University of Arizona Press. Tucson, Estados Unidos de América.
- Upton D. y R. W. Murphy. 1997. Phylogeny of the side-blotched lizards (Phrynosomatidae: *Uta*) based on mtDNA sequences: support for a mid-peninsular seaway in Baja California. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8: 104–113.
- Van Devender, T. R. 1987. Holocene vegetation and climate in the Puerto Blanco Mountains, Southwestern Arizona. *Quaternary Research* 27: 51-72.
- Van Devender, T. R. 1990. Late Quaternary vegetation and climate of the Sonoran Desert, United States and Mexico. In: Betancourt, J.L., Van Devender, T.R., Martin, P.S. (Eds.), *Packrat Middens: The last 40,000 Years of Biotic Change*. University of Arizona Press, Tucson, pp. 134–163.
- Van Devender, T. R. 2000. The Deep History of Sonoran Desert. 61- 69 p. En: Phillips, S. y P. Wentworth. (Eds.), *A Natural History of the Sonoran Desert*. Arizona - Sonora Desert Museum Press. Arizona, Estados Unidos de América.

- Van Devender, T. R., T. L Burgess, J. C, Piper y R. M Turner. 1994. Paleoclimatic implications of Holocene plants remains from the Sierra Bacha, Sonora, México. *Quaternary Research* 41: 99 – 108.
- Van Devender, T. R. y F. Molina-Freaner. 2010. *Diversidad Biológica de Sonora*. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
- Vargas-García, J. 2000. Impacto de la formación de la Península de Baja California sobre la estructura genética de *Bursera hindsiana*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F.
- Weeks, A., D. C. Daly y B. B. Simpson. 2005. The phylogenetic history and biogeography of the frankincense and myrrh family (Burseraceae) based on nuclear and chloroplast sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 35: 85-101.
- Zimmer, C y D. Elmen. 2012. *Evolution: Making Sense of Life*. Roberst and Company Publishers. Estados Unidos de América.

Apéndice 1

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL EN PLANTAS

1. Moler en un mortero alrededor de 0.5g de tejido en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino.
2. Agregar 260 μL de buffer de extracción CTAB y 975 μL de buffer STE con una micropipeta. Seguir moliendo hasta eliminar los grumos. Recuperar el contenido en un tubo eppendorf de 1.5 mL.
3. Centrifugar a 12000 rpm durante 8 minutos.
4. Eliminar el sobrenadante y resuspender en vórtex con 250 μL de buffer CTAB y 750 μL de buffer STE.
5. Centrifugar a 12000 rpm durante 8 minutos.
6. Eliminar el sobrenadante y agregar 600 μL de buffer CTAB 2X.
7. Agregar 4 μL de RNAasa (solución de 7000 u/ml) e incubar por 20 minutos a 37 grados centígrados en baño maría.
8. Agregar 25 μL de proteinasa K (solución de 20 mg/ml) e incubar durante 30 minutos a 65 grados centígrados.
9. Incubar en hielo durante 15 minutos.
10. Eliminar el sobrenadante y agregar 600 μL de cloroformo:octanol 24:1. Resuspender en vórtex.
11. Centrifugar a 9000 rpm durante 12 minutos.
12. Recuperar el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo con ayuda de una micropipeta.
13. Precipitar el ADN con 600 μL de isopropanol frío.
14. Dejar reposar por 24 horas a 4 grados centígrados en un refrigerador.
15. Centrifugar a 12500 rpm durante 7 minutos y eliminar el sobrenadante.
16. Lavar el pellet con 1 mL de etanol a 70% y agitar por 5 minutos.
17. Eliminar el sobrenadante, secar el pellet y agregar 100 μL de agua ultrapura.