

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS

“ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Callitropsis guadalupensis*, UNA ESPECIE ENDÉMICA DE ISLA GUADALUPE, BAJA CALIFORNIA”

**TESIS PROFESIONAL
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO**

**PRESENTA:
PATRICIA ROSAS ESCOBAR**

Ensenada, Baja California

Agosto, 2008

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS

**“ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Callitropsis
guadalupensis*, UNA ESPECIE ENDÉMICA DE ISLA
GUADALUPE, BAJA CALIFORNIA”**

TESIS PROFESIONAL

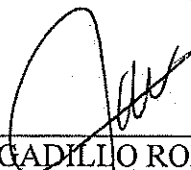
QUE PRESENTA:

PATRICIA ROSAS ESCOBAR

APROBADO POR:



DR. PEDRO PEÑA GARCILLÁN
Presidente del Jurado



DR. JOSÉ DELGADILLO RODRÍGUEZ
Secretario



DR. DAVID S. GERNANDT
1er. Vocal

*A mi **FAMILIA** por todo ese amor y cariño;
por inculcarme el deseo de aprender y
alcanzar mis metas sin desfallecer
en el intento.*

*A mis **padres**, Virginia y Bernabe
por todo el amor, y esa confianza
que han depositado en mí y que
me han hecho crecer como persona*

*A mis **hermanos**, Marbella, Marino,
Luz María y Leonardo Daniel, por ser
el ejemplo a seguir, su cariño y apoyo*

*A mis pequeños **sobrinos**, Martha,
Jesús, Karen, Mariana, Diego, Iván,
Daniela y Danna; por cada una
de sus sonrisas, su ternura y alegría*

***GRACIAS** por creer en mí...*

***GRACIAS** por ser parte de mi vida*

Agradecimientos

Al Dr. Pedro Peña Garcillán por su amistad, confianza y paciencia. Por sus consejos y el gran apoyo que siempre me brindó, pero principalmente por darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección.

Al Dr. David S. Gernandt por colaborar como codirector de esta tesis; por darme la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio de Sistemática Molecular, por su amistad y el apoyo que aun me sigue brindado.

Al Dr. José Delgadillo por haberme inculcado el gusto por la botánica. Porque desde el inicio de este trabajo me brindo su apoyo y disponibilidad. Gracias por su asesoría y su participación como sinodal.

Al Dr. Daniel Piñero por involucrarse en este trabajo, por su apoyo en el análisis de los resultados y sus comentarios.

Al Dr. José Luís S. Hornedo, Dra. Meredith Gould Chambers, Dr. Faustino Camarena y Dr. Carlos Márquez Becerra, por haber despertado en mí el interés por la Biología Molecular y la Genética, dejando claro la utilidad de ésta en diversas áreas de conocimiento.

A la Biol. Esmeralda Salgado, técnico del laboratorio de Sistemática Molecular de la UAEH por su apoyo en el trabajo de laboratorio y su valiosa amistad. Gracias a su familia por darme la oportunidad de conocerlos.

A la Dr. Susana Magallón y al Dr. Mark Olson del Instituto de Biología de la UNAM por permitirme trabajar en su laboratorio, de igual forma al Biol. Juan Carlos y a la M. en C. Laura Márquez, técnicos de los laboratorios de Biología Molecular.

A la M. en C. Alejandra Vázquez Lobo, Técnico del laboratorio de genética y evolución del Instituto de Ecología de la UNAM y al Dr. Piñero por proporcionarme los cpSSR para probarlos en mis especies.

Al Oc. Eulogio López Reyes, Biol. Francisco Casillas y Biol. Xavier López Medellín, por su apoyo en la colecta de las muestras de cipreses, por proporcionarme fotografías y

en especial a Eulogio, Pancho, Benny y Pedro por hacer divertidos los días en la casa móvil No. 8 del CICESE, gracias por su amistad.

A la Dra. Sol Ortiz García por su amistad y apoyo en el trabajo de laboratorio. Porque de alguna manera se involucró y mostró interés en este trabajo.

A la M. en C. Charlotte González Abraham por su amistad y apoyo en la elaboración de los mapas.

Al grupo de discusión del Dr. Gernandt: Alejandra Vázquez, Alejandra Moreno, Lev Jardón, Ana Wegier, Gretel Geada y Lluvia Flores por que gracias a ellos pude ampliar mi visión y conocimiento sobre algunos temas de Sistemática Molecular, Taxonomía, Genética, etc.

A los amigos que fui adquiriendo durante mi estancia fuera de casa, a todos los quienes estuvieron en momentos de tristeza y alegría, gracias por los consejos y palabras de aliento. A la familia Alcántara Zavala, que me recibió en su casa durante mi estancia en la Cd. de México y que me hizo sentir como parte de su familia, gracias por el apoyo y amistad; a Jaime M. Calderón que además de nuestra preciosa amistad siempre disfrutamos de esas largas conversaciones en un café o algún lugar extraño que recientemente habíamos conocido; a Damián Heles Rodríguez un simpático locutor, cantante y escritor, pero sobre todo un estupendo amigo; a Luís Alberto Vázquez García por la impaciencia y la espera, por los sueños compartidos y porque de una u otra forma siempre estuvo a mi lado.

A las personas que me recibieron con su amistad en el Centro de Investigaciones Biológicas de la UAEH, en especial a Marisol Hernández y Nelly M. Aspetia, gracias por soportarme y permitirme vivir con ustedes durante mi estancia en Pachuca; a Imelda Menchaca, Federico Vázquez, Sergio Hernández, Delia González, Denisse Téllez y Esmeralda Salgado, tesisistas del Dr. Gernandt y compañeros de laboratorio, les agradezco por hacer agradable y divertida de mi estancia en el laboratorio.

A todos mis amigos y compañeros en la Facultad de ciencias de la UABC, Javier Borquéz, Mercedes Pérez, Brenda Anda, Erika Tello, María de la Luz Morales (Marilú), Héctor Ceballos, Sara Palma, David Vargas, Ricardo Zúñiga, Ibeth S. Luna, Luís E. Sánchez, Abril Velásquez, Juan C. Veal, Agie Ruanova y Adrián Albino, a cada uno de ellos por su amistad, por cada una de esos recuerdos de diversión y aprendizaje durante esas salidas a campo, por permitirme aprender junto a ustedes lo que implica ser un

Biólogo; A David, no solo por su amistad, sino porque gracias a su terquedad no pude evitar que se cambiara de carrera, así que no pude dejar que lo hiciera solo y como consecuencia decidimos llegar juntos a esta facultad para convertirnos en Biólogos; Así que solo termino recordarles las palabras de Ernst Mayr, *“Ser biólogo no es un trabajo; es elegir un modo de vida”*.

A la Secretaria de Marina-Armada de México (SEMAR) por la transportación a Isla Guadalupe, al Grupo de Ecología y Conservación de Islas (GECI) por su asistencia dentro de la Isla y a la Dirección General de Vida Silvestre por haber proporcionado los permisos de colecta científica (oficio número SGPA/DGVS/04663).

A todas las personas que de alguna forma han estado involucradas directa o indirectamente en la elaboración de este proyecto de tesis,

“Muchas gracias por todo”.

La realización de esta tesis de licenciatura ha sido posible gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, y el Instituto Nacional de Ecología asociado al proyecto SEMARNAT/CONACYT-2004-C01-122 titulado "Recuperación del bosque de cipreses (*Cupressus guadalupensis* ssp. *guadalupensis*) en Isla Guadalupe, México".

Resumen de la Tesis de Patricia Rosas Escobar presentada como requisito parcial para la obtención de la Licenciatura en Biología. ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Callitropsis guadalupensis*, UNA ESPECIE ENDÉMICA DE ISLA GUADALUPE, BAJA CALIFORNIA. Ensenada, Baja California, México. Agosto 2008.

Resumen aprobado por:



DR. PEDRO PEÑA GARCILLÁN

Director



DR. DAVID S. GERNANDT

Co-director

RESUMEN

El ciprés de Guadalupe (*Callitropsis guadalupensis*), especie endémica de isla Guadalupe, México, estuvo amenazada de extinción por la presencia de cabras. Conforman la única masa boscosa de la isla y se considera especie clave por la condensación de niebla que realiza y el hábitat que crea, ya que permite la persistencia de diversas especies de aves. Tras la erradicación de las cabras se hace posible la supervivencia de la población. El objetivo del presente estudio fue analizar la diversidad genética de *C. guadalupensis* con vistas a su futura recuperación. Se analizaron muestras de 54 árboles de *C. guadalupensis* y, como patrón de comparación, 25 árboles de la especie más cercana, *C. forbesii*, provenientes de cinco poblaciones que abarcan su rango de distribución en Baja California. Después de evaluar varios marcadores de cpDNA, la región elegida fue *trnS-trnG*; en esta región de ~848 pb encontramos 21 haplotipos para *Callitropsis*. Estas diferencias incluyen un sitio con un microsatélite de dinucleótidos que varía entre 6 y 15 repeticiones, seguido de una región de *indels* y cinco sitios que presentan sustituciones. Se observa que los haplotipos son compartidos entre *C. guadalupensis* y *C. forbesii*. A partir de las secuencias del total de los individuos se determinó la diversidad genética para cada especie mediante la diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π), encontrando valores moderadamente altos para *C. guadalupensis* ($h = 0.655 \pm 0.055$; $\pi = 0.00112 \pm 0.00015$) comparado con los valores bajos en *C. forbesii* ($h = 0.220 \pm 0.00991$; $\pi = 0.00026 \pm 0.00031$). La salud genética de *C. guadalupensis* aparece como aceptable a pesar de su reducida población.

ABSTRACT

The Guadalupe cypress (*Callitropsis guadalupensis*), endemic to Guadalupe Island, Mexico, was threatened with extinction by goats. This species forms the only forest patch on the island, and plays a key ecological role because it condenses fog and provides suitable habitat for several bird species. The eradication of goats has greatly improved the prospects for survival of the cypress population. The objective of this study was to analyze the genetic diversity of *C. guadalupensis*. We analyzed samples from 54 trees of *C. guadalupensis* and from 25 trees of its close relative, *C. forbesii*; collections from the last species were taken from five populations throughout its range in Baja California. After evaluating several cpDNA markers, the *trnS-trnG* spacer was chosen; using this region of ~848 bp we distinguished 21 haplotypes for *Callitropsis*. The differences include a site with a dinucleotide microsatellite that varies between 6 and 15 repeats, followed by a region of indels and five sites with substitutions. *Callitropsis guadalupensis* and *C. forbesii* were observed to share haplotypes. Based on sequences of all individuals identified we calculated the genetic diversity for each species using haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (π). We found moderately high values for *C. guadalupensis* ($h = 0.655 \pm 0.055$; $\pi = 0.00112 \pm 0.00015$) compared to low values for *C. forbesii* ($h = 0.220 \pm 0.00991$; $\pi = 0.00026 \pm 0.00031$). The genetic diversity of *C. guadalupensis* is acceptable despite its small population size.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
ÍNDICE GENERAL.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Grupo de estudio.....	4
2.2. Descripción de la especie de interés.....	8
2.3. Relación taxonómica entre <i>Callitropsis guadalupensis</i> y <i>C. forbesii</i>	10
2.3.1. Relación taxonómica a nivel molecular.....	13
2.4. La genética en el estudio de las poblaciones.....	15
2.4.1. Diversidad genética.....	15
2.4.2. Utilidad del genoma de cloroplasto.....	16
2.4.3. Uso de microsatélites en el estudio de genética de poblaciones.....	18
3. JUSTIFICACIÓN.....	20
4. OBJETIVO GENERAL.....	21

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
6. ÁREA GEOGRÁFICA DE ESTUDIO.....	22
7. METODOLOGÍA.....	25
7.1. Colecta de material biológico.....	25
7.1.1. <i>Callitropsis guadalupensis</i>	25
7.1.2. <i>Callitropsis forbesii</i>	25
7.1.3. Colectas adicionales.....	26
7.2. Obtención de datos genéticos.....	27
7.2.1. Extracción de DNA.....	27
7.2.2. Diseño de cebadores.....	27
7.2.3. Amplificación de regiones de cpDNA.....	28
7.2.4. Purificación.....	30
7.2.5. Secuenciación.....	31
7.3. Análisis genético.....	33
7.3.1. Variación genética.....	33
7.3.2. Relaciones filogenéticas.....	34
8. RESULTADOS.....	35
8.1. Variación genética.....	36
8.1.1. <i>Callitropsis guadalupensis</i>	37
8.1.2. <i>Callitropsis forbesii</i>	37
8.2. Relaciones filogenéticas.....	41

8.2.1. Análisis de máxima parsimonia.....	41
8.2.2. Análisis de máxima verosimilitud.....	44
9. DISCUSIÓN.....	46
9.1. Diversidad genética.....	46
9.1.1. Alta diversidad genética relativa de <i>C. guadalupensis</i> vs. <i>C. forbesii</i>	46
9.1.2. Alta diversidad en especies raras.....	47
9.1.3. Patrón latitudinal en <i>C. forbesii</i>	50
9.1.4. Haplotipos compartidos.....	52
9.2. Relaciones filogenéticas.....	53
10. CONCLUSIONES.....	55
11. LITERATURA CITADA.....	57
12. ANEXOS.....	68

Índice de Figuras

Figura 1. Ubicación taxonómica de la subfamilia Cupressoideae dentro de la familia Cupressaceae <i>sensu lato</i> (Gadek <i>et al.</i> 2000, Little 2006).....	5
Figura 2. Uno de los 12 árboles más parsimoniosos de la subfamilia Cupressoideae derivado del análisis de marcadores moleculares (<i>matK</i> , <i>NEEDLY</i> intron 2, nrITS, <i>rbcL</i> y <i>trnL</i>), caracteres morfológicos y bioquímicos.....	7
Figura 3. <i>Callitropsis guadalupensis</i>	9
Figura 4. <i>Callitropsis forbesii</i>	11
Figura 5. Árbol de distancia basado en 125 bandas RAPD para los taxones de <i>Callitropsis</i> (<i>Cupressus</i>) en el Hemisferio Occidental (tomado de Bartel <i>et al.</i> 2003).....	14
Figura 6. Mapa completo del genoma del cloroplasto de <i>Pinus thunbergii</i>	17
Figura 7. Ubicación geográfica del área de estudio.....	24
Figura 8. Distribución de frecuencia de haplotipos de la región <i>trnS-trnG</i> de cpDNA para <i>Callitropsis</i>	40
Figura 9. Árbol de consenso estricto sin codificar <i>indels</i>	42
Figura 10. Árbol de consenso estricto con <i>indels</i> codificados en la región del microsatélite.....	43
Figura 11. El árbol más verosímil inferido por máxima verosimilitud.....	45

Índice de Tablas

Tabla I.	Comparación de cuatro tratamientos taxonómicos de <i>Callitropsis</i> (antes <i>Cupressus</i> del Nuevo Mundo).....	12
Tabla II.	Diferencias morfológicas entre <i>C. guadalupensis</i> y dos especies estrechamente relacionadas, <i>C. forbesii</i> y <i>C. stephensonii</i>	13
Tabla III.	Datos de la ubicación geográfica de las poblaciones de colecta de <i>C. forbesii</i> en Baja California.....	25
Tabla IV.	Datos de la ubicación geográfica de las colectas adicionales de <i>Callitropsis</i> y <i>Juniperus</i>	26
Tabla V.	Reactivos utilizados para la reacción de secuenciación (<i>BigDye terminator kit de Applied Biosystems</i>).....	31
Tabla VI.	Sitios variables de la alineación de la región <i>trnS-trnG</i> y <i>trnL-trnF</i> de cpDNA en 21 haplotipos de <i>Callitropsis</i>	39
Tabla VII.	Parámetros del análisis de máxima parsimonia de las regiones <i>trnS-trnG</i> y <i>trnL-trnF</i> del DNA del cloroplasto en <i>Callitropsis</i>	41
Tabla VIII.	Parámetros estadísticos del análisis de máxima verosimilitud de la alineación total de las regiones de cpDNA (<i>trnS-trnG</i> y <i>trnL-trnF</i>) en <i>Callitropsis</i>	44

Índice de Anexos

Anexo 1. Protocolo para aislamiento de DNA total de plantas (<i>DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen</i>).....	69
Anexo 2. Protocolo de gel de agarosa al 0.9%.....	70
Anexo 3. Cebadores utilizados para amplificar las regiones de cloroplasto en <i>Callitropsis</i>	71
Anexo 4. Protocolo de purificación de DNA a partir de una solución (<i>geneclean III kit de Q.biogene</i>).....	73
Anexo 5. Protocolo de precipitación con etanol/acetato de sodio.....	74
Anexo 6. Gráficos de la presencia de haplotipos mostrados en orden descendente según la frecuencia con la que se encontró para <i>Callitropsis</i>	75

1. INTRODUCCIÓN

Desde que a mediados del siglo XIX Charles Darwin (1859) escribió que la rareza está inseparablemente ligada a procesos de extinción, el problema de las especies raras no ha hecho sino crecer. El término “rareza” asociado a una especie hace referencia a dos aspectos de la misma: su distribución geográfica y tamaño poblacional. Resultado de la combinación de dichos aspectos podemos considerar tres posibles rarezas: (1) distribución restringida, pero tamaño poblacional grande, (2) distribución extensa y tamaño poblacional reducido, y (3) distribución y tamaño poblacional reducidos. Rabinowitz (1981), en la categorización posiblemente más extendida, propone siete tipos de rareza basados en la densidad local promedio, la extensión del rango geográfico y la especificidad de hábitat. El origen de la rareza de una especie puede ser natural o puede estar causado por los efectos de las actividades humanas, o bien, una combinación de ambas. La consecuencia fundamental relacionada con el origen es que, en principio, se esperaría mayor capacidad adaptativa a la rareza en aquellas especies raras de origen natural que en las especies raras debido a las actividades humanas (Darwin 1859).

El problema de la viabilidad poblacional es un elemento central de la biología de la conservación (Norton 1995, Groom y Pascual 1998, Beissinger y Westphal 1998, Pullin 2002). Históricamente, el análisis de este problema se inició con base en estudios de dinámica poblacional; posteriormente se le fueron sumando otros factores al análisis como la variación ambiental, la genética poblacional, el efecto de las catástrofes, la estructura metapoblacional, la fragmentación, etc. (Soulé 1987).

El mantenimiento de la variación genética es considerado fundamental para la supervivencia a largo plazo de las especies (Frankel y Soulé 1981). En principio, la viabilidad de las poblaciones pequeñas está comprometida por la estocasticidad demográfica, la deriva génica o la depresión endogámica (Soulé 1986, Caughley 1994, Frankham *et al.* 2002). Sin embargo, las especies que se desarrollan en ambientes de estrés, y que experimentan altas tasas de mortalidad de semillas y plántulas, son capaces de mantener una alta heterocigosis a pesar de que sus poblaciones sean muy reducidas (Lesica y Allendorf 1992).

De todas las especies del género *Callitropsis* (previamente *Cupressus* del Nuevo Mundo), *C. guadalupensis* es un caso paradigmático de aislamiento geográfico, tamaño poblacional reducido y problemas de conservación. Resultado de ello ha sido su categorización como “en peligro de extinción” en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 (Diario Oficial 2002) y como “en peligro crítico” por la Lista Roja de la IUCN de 1994 (Farjon y Page 1999, IUCN 2006). Es la única especie insular del género, y su distribución está restringida a una sola población en Guadalupe, isla de origen volcánico, de 250 km² y situada 260 km al oeste de la costa de la península de Baja California, México. El ciprés de Guadalupe es la única de cinco especies arbóreas presentes en Isla Guadalupe que actualmente muestra estructura boscosa y es una de las siete especies del género presentes en México: *Callitropsis arizonica*, *C. benthamii*, *C. forbesii*, *C. guadalupensis*, *C. lusitanica*, *C. montana* y *C. stephensonii* (Farjon 2005).

El bosque de cipreses de Isla Guadalupe se localiza en el norte de la isla entre 950-1,300 m de altitud (Moran 1996) en cuatro parches boscosos (8.8, 46.9, 4.3 y 87.7 ha, respectivamente), con un tamaño poblacional estimado en 2005 de 14,700 individuos adultos (Garcillán y Vega *inédito*), últimos reductos de una distribución más extensa que fue sometida a un proceso de reducción poblacional dramático debido a la presión de herbivoría por cabras ferales (Moran 1996, Oberbauer 2005). Es posible que la presencia de fuego haya afectado ocasionalmente a la población; aunque hemos observado señales recientes de fuego, no se dispone de un registro de los mismos.

La presencia del ciprés en el norte de la isla se debe posiblemente a que su mayor elevación topográfica proporciona una mayor precipitación que en el sur de la isla y especialmente por el efecto de la condensación de la niebla (Oberbauer 2005). De hecho, el papel clave de la especie dentro de la isla radica en su gran capacidad para condensar la niebla, por ser la masa boscosa más densa de la isla y al hábitat que genera, indispensable para la persistencia de diversas especies de aves (p.ej.: *Junco insularis*, especie endémica). Experimentos exploratorios han mostrado valores de condensación de niebla del orden de 18 mm durante un día de intensa niebla (Garcillán *inédito*). Estos indicios nos sugieren que la disponibilidad hídrica total en el norte insular puede ser más del doble del promedio anual de 133 mm registrado en el extremo sur (Moran 1996).

Después de más de un siglo de ausencia de reclutamiento, envejecimiento y reducción poblacional, el ciprés de Guadalupe está incorporando nuevos individuos a su población debido al éxito del programa de erradicación de cabras coordinado por el Instituto Nacional de Ecología y el Grupo de Ecología y Conservación de Islas. El comportamiento futuro de la población, única natural de la especie, va a estar determinado en gran medida por su estructura demográfica y genética.

2. ANTECEDENTES

2.1. Grupo de estudio

La subfamilia Cupressoideae Rich. ex Sweet es la más grande y diversa de las siete subfamilias pertenecientes a la familia Cupressaceae (Figura 1) y consta de 12 géneros, distribuidos principalmente en el Hemisferio Norte: *Cupressus*, *Callitropsis*, *Juniperus*, *Microbiota*, *Platycladus*, *Tetraclinis*, *Calocedrus*, *Chamaecyparis*, *Xanthocyparis*, *Fokiena*, *Thuja* y *Thujopsis*. Los árboles adultos presentan filotaxia opuesta o verticilada, principalmente con hojas adultas reducidas a escamas adpresas (Gadek *et al.* 2000).

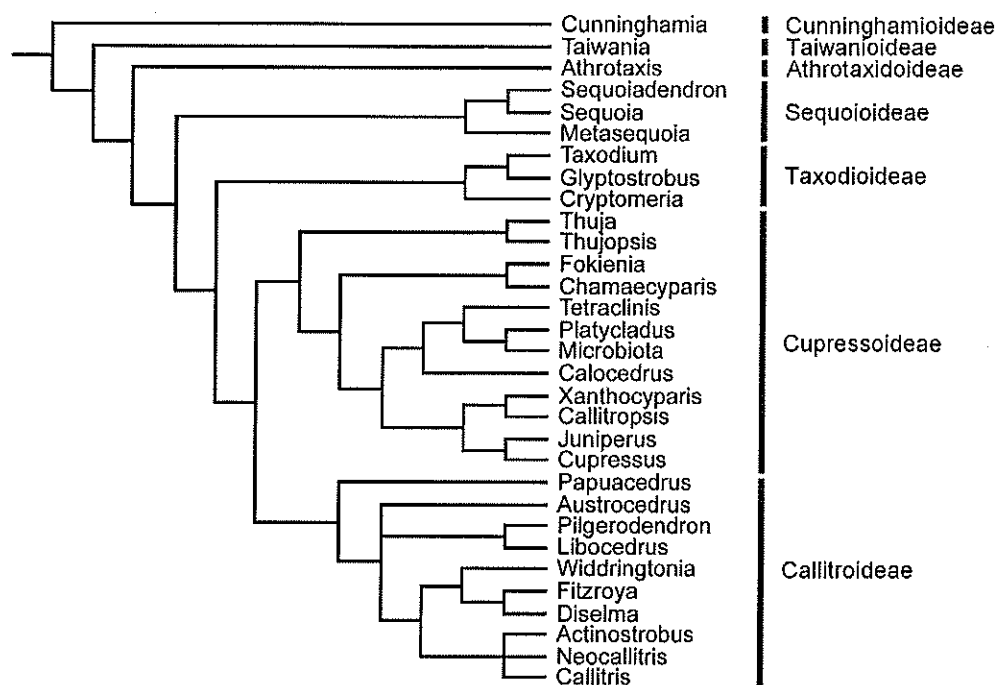


Figura 1. Ubicación taxonómica de la subfamilia Cupressoideae dentro de la familia Cupressaceae *sensu lato* (Gadek *et al.* 2000, Little 2006).

Little (2006) construyó la filogenia de la subfamilia Cupressoideae retomando la idea expuesta en trabajos anteriores de que el género *Cupressus* no es monofilético (Little *et al.* 2004, Xiang y Li 2005). Utilizó los datos relevantes sobre el género, como caracteres morfológicos (anatomía, micromorfología, desarrollo reproductivo, morfología reproductiva y morfología vegetativa), caracteres bioquímicos y secuencias de DNA (de las regiones *matK*, *rbcL* y *nrITS*); complementó esta información para todas las especies de la subfamilia y adicionó otras regiones de DNA (*trnL* y *NEEDLY* intron 2).

Como resultado de esta nueva filogenia, el nombre *Cupressus* considera a las especies del Viejo Mundo y *Callitropsis* a las especies del Nuevo Mundo, debido a que las

especies del Nuevo Mundo forman un grupo monofilético junto con las dos especies pertenecientes a este género basado en el estudio previo de Little *et al.* (2004): *Callitropsis nootkatensis* (antes *Chamaecyparis nootkatensis*) y *Callitropsis vietnamensis* (antes *Xanthocyparis vietnamensis*), que presentan distribución disyunta; la primera es nativa del occidente de Norteamérica y la segunda del norte de Vietnam. El género *Cupressus sensu stricto* se muestra como el grupo hermano de *Juniperus* (Figura 2). Little (2006) establece las diferencias entre *Callitropsis* y *Cupressus* con base en el número de cotiledones (2-6 en *Callitropsis* y 2 en *Cupressus*) y una combinación de caracteres como la corteza del tronco principal, el arreglo del penúltimo y último segmento, y la forma de la cara externa del último segmento de la hoja que contiene la glándula resinífera.

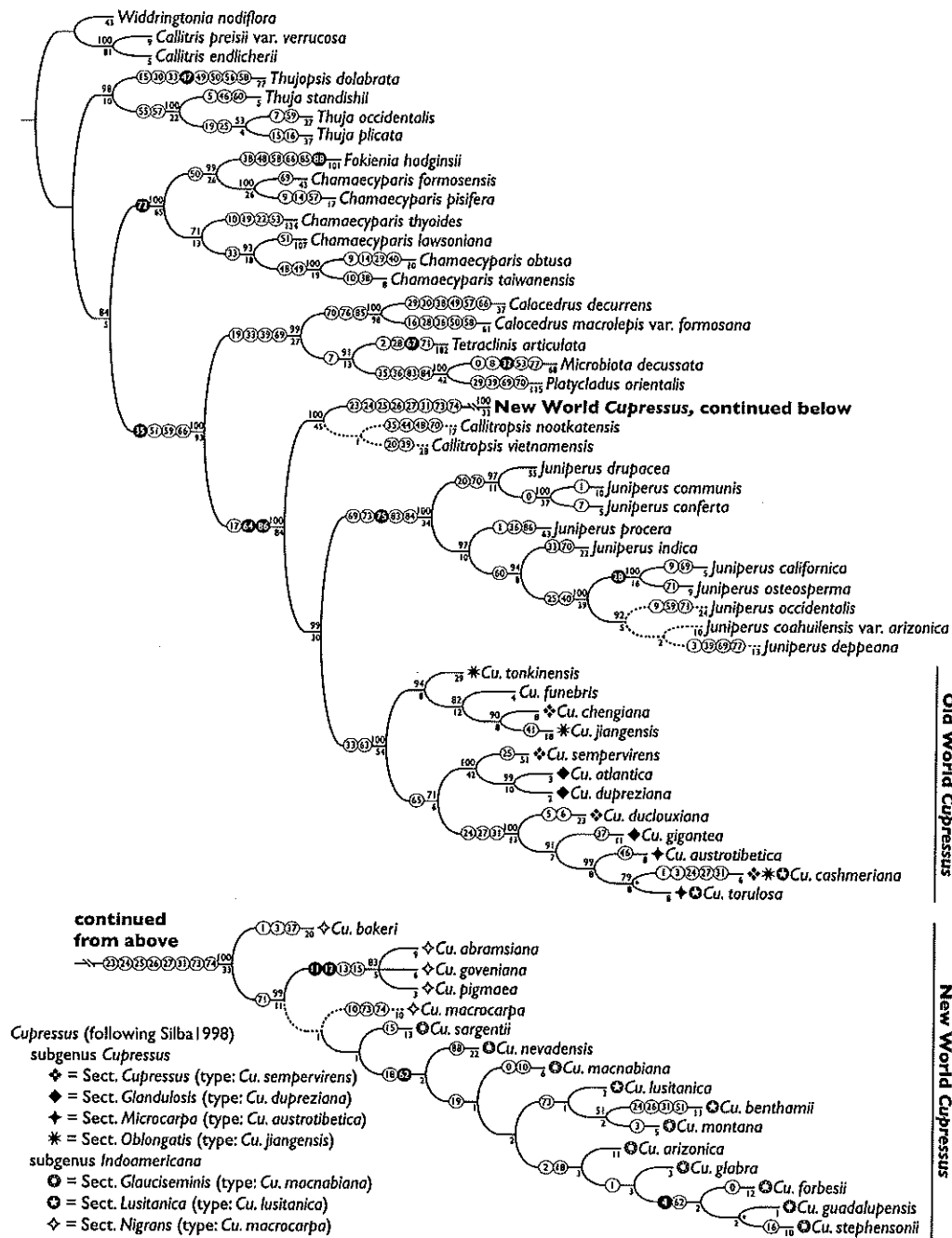


Figura 2. Uno de los 12 árboles más parsimoniosos de la subfamilia Cupressoideae derivado del análisis de marcadores moleculares (*matK*, *NEEDLY* intron 2, *nrITS*, *rbcL* y *trnL*), caracteres morfológicos y bioquímicos. Los círculos abiertos, representan cambios en caracteres de estado homoplásicos; los círculos llenos, representan cambios en caracteres de estado no-homoplásicos; la longitud de las ramas inequívocamente optimizadas para todos los caracteres, están dadas debajo de cada rama; los nodos marcados con un asterisco indican las ramas no resueltas cuando los caracteres *indels* son omitidos (tomado de Little 2006).

2.2. Descripción de la especie de interés

Callitropsis guadalupensis (S. Watson) D.P. Little

Sinonimia: *Cupressus guadalupensis* S. Watson, 1879; *Cupressus macrocarpa* Hartw. var. *guadalupensis* (S. Watson) Mast., 1895.

Nombre común: Ciprés de Guadalupe

Árbol de 10-20 m de altura; presenta corona amplia de fisonomía variable, de follaje que puede ser denso o escaso, con leve coloración verde a verde-azulado, el color glauco se presenta en árboles jóvenes; ramas numerosas y ascendentes o erectas; el tronco tiene un grosor de 1 a 3 m de diámetro; la corteza del tronco y las ramas son lisas, con exfoliación anual; hojas escamiformes, con glándulas inactivas; conos polínicos en disposición terminal, solitarios, y de una longitud de 5-7 mm, forma ovado-oblonga, con 16-18 (-20) microesporófilos por cono; conos ovulados en disposición terminal, globosos o subglobosos, hasta 45 mm de longitud, pero de tamaño altamente variable, compuestos por 8-10 escamas, con una protuberancia prominente cerca del centro de hasta 6 mm de largo y sobrecurvada o plana, de color café a gris; semillas de 100-120 por cono, color café oscuro, 2 alas laterales estrechas (Farjon 2005) (Figura 3).

La producción de conos ovulados comienza a partir de los 2 a 5 años, pero es hasta después de los 10-12 años cuando producen semillas de buena calidad (CONAFOR 2006). A partir de diversos trabajos experimentales se ha corroborado que la propagación de *C. guadalupensis* puede realizarse a partir de semillas (Mendoza y Morales 1994), estructuras vegetativas (Prieto 1992) o *in vitro* (Rojas 2001). En condiciones de invernadero se ha obtenido un 31% de germinación de semillas

(Mendoza y Morales 1994), sin embargo en experimentos realizados en campo en Isla Guadalupe la germinación promedio no fue superior al 1% (Garcillán *inédito*). En especies del género *Callitropsis* (anteriormente *Cupressus*) la apertura de conos ha sido reportado frecuentemente asociada al fuego (Armstrong 1978, Westman y Whittaker 1975, Zedler 1981), tal como ocurre con *Callitropsis forbesii* (Wolf 1948, Vogl *et al.* 1977, Dunn 1985), sin embargo en *C. guadalupensis* la apertura de conos ocurre sin necesidad de fuego, y de manera masiva tras la muerte parcial o completa del árbol (Garcillán 2008).

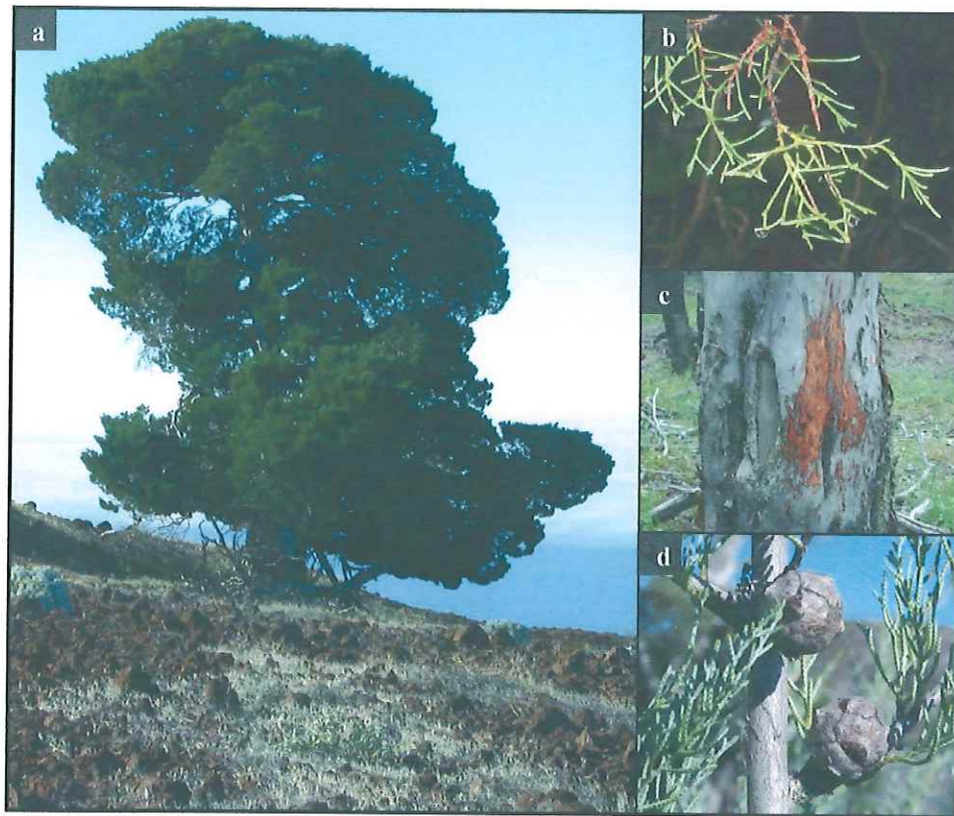


Figura 3. *Callitropsis guadalupensis*. (a) Estructura arbórea, (b) hojas, (c) exfoliación del tronco, y (d) conos ovulados.

2.3. Relación taxonómica entre *Callitropsis guadalupensis* y *C. forbesii*

En el género *Callitropsis* ha existido una larga controversia sobre el número y nivel de los elementos taxonómicos que lo conforman (Tabla I). Un ejemplo ilustrativo es el caso de *C. guadalupensis* (Figura 3) y *C. forbesii* (Figura 4). Algunos taxónomos consideran a *C. forbesii* y a *C. guadalupensis* como dos variedades de una misma especie (Farjon 2005), mientras otros postulan que ambos taxones son especies diferenciadas (Little 2006). Morfológicamente difieren en la coloración del follaje, tamaño y forma del cono polínico, número de microesporófilos y tamaño del cono ovulado (Tabla II) (Wolf 1948, Farjon 2005).

Callitropsis forbesii es una especie continental de distribución más extensa que *C. guadalupensis*, constituida por poblaciones de poca extensión, de carácter relictual, dispersas a lo largo del sur de California, EUA y el norte de Baja California, México (Dunn 1985, Minnich 1987, Minnich y Everett 2001). Se conocen 15 poblaciones, 4 de ellas situadas en California, donde está clasificada como especie en “grave peligro de extinción” (California Native Plant Society 2006); y las restantes 11 poblaciones se encuentran en Baja California, donde está catalogada como especie “sujeta a protección especial” por la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 (Diario Oficial 2002).

El ciprés de Tecate (*C. forbesii*) es una especie asociada al chaparral, preferentemente en las laderas húmedas de suelos ácidos y pobres en nutrientes (Stottlemeyer y Lathrop

1981) y altamente dependiente del fuego para su establecimiento (Vogl *et al.* 1977, Zedler 1981, Dunn 1985).

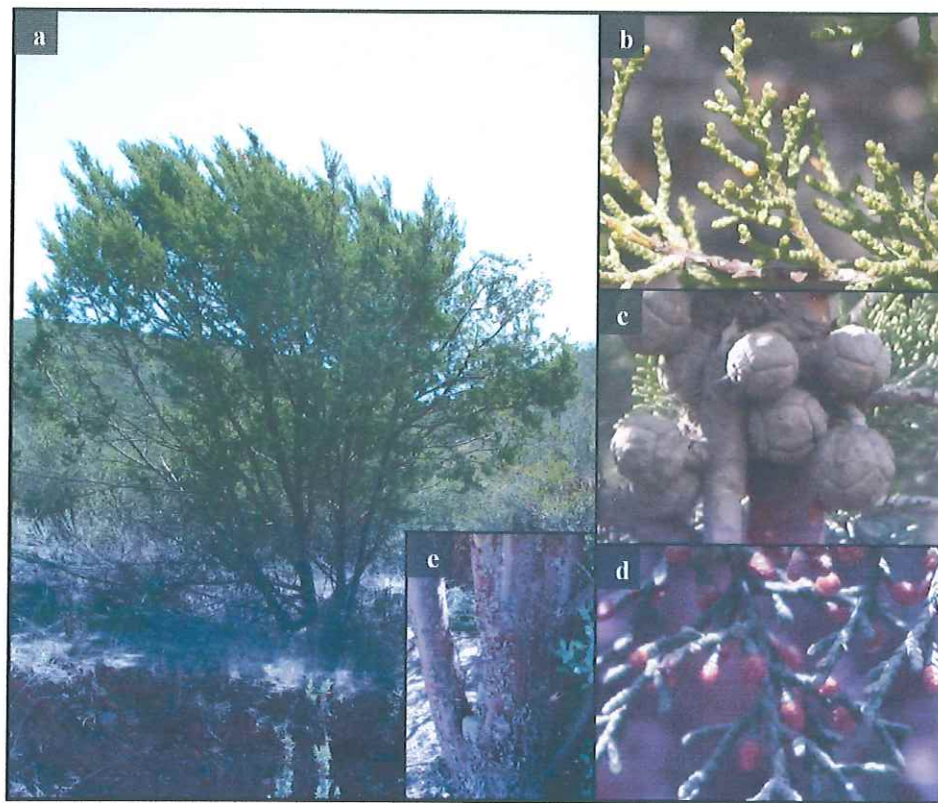


Figura 4. *Callitropsis forbesii*. (a) Estructura arbórea, (b) hojas, (c) conos ovulados, (d) conos polínicos, y (e) exfoliación del tronco.

Tabla I. Comparación de cuatro tratamientos taxonómicos de *Callitropsis* (antes *Cupressus* del Nuevo Mundo).

Epíteto específico o infraespecífico	Wolf (1948)	Little (1970)	Farjon (2005)	Little (2006)
<i>Callitropsis abramsiana</i>	<i>Cupressus abramsiana</i> C.B. Wolf	<i>Cupressus goveniana</i> var. <i>abramsiana</i> (C.B. Wolf) Little	<i>Cupressus goveniana</i> var. <i>abramsiana</i> (C.B. Wolf) Little	<i>C. abramsiana</i> (C. B. Wolf) D.P. Little
<i>Callitropsis arizonica</i>	<i>Cupressus arizonica</i> Greene	<i>Cupressus arizonica</i> Greene var. <i>arizonica</i>	<i>Cupressus arizonica</i> Greene var. <i>arizonica</i>	<i>C. arizonica</i> (Greene) D.P. Little
<i>Callitropsis bakeri</i>	<i>Cupressus bakeri</i> ssp. <i>typica</i> C.B. Wolf	<i>Cupressus bakeri</i> Jeps.	<i>Cupressus bakeri</i> Jeps.	<i>C. bakeri</i> (Jeps.) D.P. Little
<i>Callitropsis benthamii</i>	(= <i>Cupressus lusitanica</i> Mill.)	(= <i>Cupressus lusitanica</i> Mill.)	<i>Cupressus lusitanica</i> var. <i>benthamii</i> (Endl.) Carrière	<i>C. benthamii</i> (Endl.) D.P. Little
<i>Callitropsis forbesii</i>	<i>Cupressus forbesii</i> Jeps.	<i>Cupressus guadalupensis</i> var. <i>forbesii</i> (Jeps.) Little	<i>Cupressus guadalupensis</i> var. <i>forbesii</i> (Jeps.) Little	<i>C. forbesii</i> (Jeps.) D.P. Little
<i>Callitropsis glabra</i>	<i>Cupressus glabra</i> Sudw.	<i>Cupressus arizonica</i> var. <i>glabra</i> (Sudw.) Little	<i>Cupressus arizonica</i> var. <i>glabra</i> (Sudw.) Little	<i>C. glabra</i> (Sudw.) D.P. Little
<i>Callitropsis goveniana</i>	<i>Cupressus goveniana</i> Gordon	<i>Cupressus goveniana</i> Gordon var. <i>goviana</i>	<i>Cupressus goveniana</i> Gordon var. <i>goviana</i>	<i>C. goveniana</i> (Gordon) D.P. Little
<i>Callitropsis guadalupensis</i>	<i>Cupressus guadalupensis</i> S. Watson	<i>Cupressus guadalupensis</i> S. Watson var. <i>Guadalupensis</i>	<i>Cupressus guadalupensis</i> S. Watson var. <i>guadalupensis</i>	<i>C. guadalupensis</i> (S. Watson) D.P. Little
<i>Callitropsis lusitanica</i>	<i>Cupressus lusitanica</i> Mill.	<i>Cupressus lusitanica</i> Mill.	<i>Cupressus lusitanica</i> Mill. var. <i>lusitanica</i>	<i>C. lusitanica</i> (Mill.) D.P. Little
<i>Callitropsis macnabiana</i>	<i>Cupressus macnabiana</i> A. Murray	<i>Cupressus macnabiana</i> A. Murray	<i>Cupressus macnabiana</i> A. Murray	<i>C. macnabiana</i> (A. Murray) D.P. Little
<i>Callitropsis macrocarpa</i>	<i>Cupressus macrocarpa</i> Hartw.	<i>Cupressus macrocarpa</i> Hartw.	<i>Cupressus macrocarpa</i> Hartw.	<i>C. macrocarpa</i> (Hartw.) D.P. Little
<i>Callitropsis montana</i>	<i>Cupressus montana</i> Wiggins	<i>Cupressus arizonica</i> var. <i>montana</i> (Wiggins) Little	<i>Cupressus arizonica</i> var. <i>montana</i> (Wiggins) Little	<i>C. montana</i> (Wiggins) D.P. Little
<i>Callitropsis nevadensis</i>	<i>Cupressus nevadensis</i> Abrams	<i>Cupressus arizonica</i> var. <i>nevadensis</i> (Abrams) Little	<i>Cupressus arizonica</i> var. <i>nevadensis</i> (Abrams) Little	<i>C. nevadensis</i> (Abrams) D.P. Little
<i>Callitropsis nootkatensis</i>	[no incluida]	[no incluida]	<i>Xanthocyparis nootkatensis</i> (D. Don in Lambert) Farjon & D.K. Harder	<i>C. nootkatensis</i> (D. Don in Lambert) Florin
<i>Callitropsis pigmaea</i>	<i>Cupressus pigmaea</i> (Lemmon) Sarg.	<i>Cupressus goveniana</i> var. <i>pigmaea</i> Lemmon	(= <i>Cupressus goveniana</i> Gordon var. <i>goviana</i>)	<i>C. pigmaea</i> (Lemmon) D.P. Little
<i>Callitropsis sargentii</i>	<i>Cupressus sargentii</i> Jeps.	<i>Cupressus sargentii</i> Jeps.	<i>Cupressus sargentii</i> Jeps.	<i>C. sargentii</i> (Jeps.) D.P. Little
<i>Callitropsis stephensonii</i>	<i>Cupressus stephensonii</i> C.B. Wolf	<i>Cupressus arizonica</i> var. <i>stephensonii</i> (C.B. Wolf) Little	<i>Cupressus arizonica</i> var. <i>stephensonii</i> (C.B. Wolf) Little	<i>C. stephensonii</i> (C.B. Wolf) D.P. Little
<i>Callitropsis vietnamensis</i>	[no incluida]	[no incluida]	<i>Xanthocyparis vietnamensis</i> Farjon & Hiep	<i>C. vietnamensis</i> (Farjon & Hiep) D.P. Little

Tabla II. Diferencias morfológicas entre *Callitropsis guadalupensis* y dos especies estrechamente relacionadas, *C. forbesii* y *C. stephensonii*. Wolf (1948) y Farjon (2005) consideraron *C. forbesii* como especie estrechamente relacionada con *C. guadalupensis*, mientras Little (2006) encontró una relación hermana entre *C. guadalupensis* y *C. stephensonii*.

Carácter morfológico	<i>C. guadalupensis</i>	<i>C. forbesii</i>	<i>C. stephensonii</i>
1. Coloración del follaje	Verde-azulado o algo glauco	Verde claro brillante u ocasionalmente un poco verde gris	Glauco, azul grisáceo o gris verdoso
2. Ramas	Suaves y delgadas	Flexibles y delgadas	Rígidas y gruesas
3. Glándulas resiníferas (hojas)	Inactivas	Inactivas	Activas
4. Tamaño del cono polínico	5-7 mm de long.	4-5 mm de long.	2-4 mm de long.
5. Forma del cono polínico	Antes de la dehiscencia visiblemente cuadrangular en sección transversal	Generalmente terete o algunas veces levemente angular	Generalmente cilíndrico y sólo ligeramente más delgada en la punta que en la base
6. Microesporófilos por cono	16-18 (-20)	12-14	10-12
7. Tamaño del cono ovulado	Hasta 45 mm, altamente variable	13-30 mm	Casi 25 mm

2.3.1. Relación taxonómica a nivel molecular

Los estudios a nivel molecular de estas dos especies son escasos, destacando el estudio de RAPDs (DNA polimórfico amplificado al azar) realizado por Bartel *et al.* (2003), quienes analizaron la variación entre especies de *Callitropsis*, incluidas las especies mexicanas. Obtuvieron una considerable variación intra e interpoblacional para *C. forbesii*, que sugiere una posible hibridación o microdiferenciación; desde el punto de vista taxonómico sus resultados respaldaron el tratamiento de *C. forbesii* y *C. guadalupensis* como dos especies distintas (Figura 5).

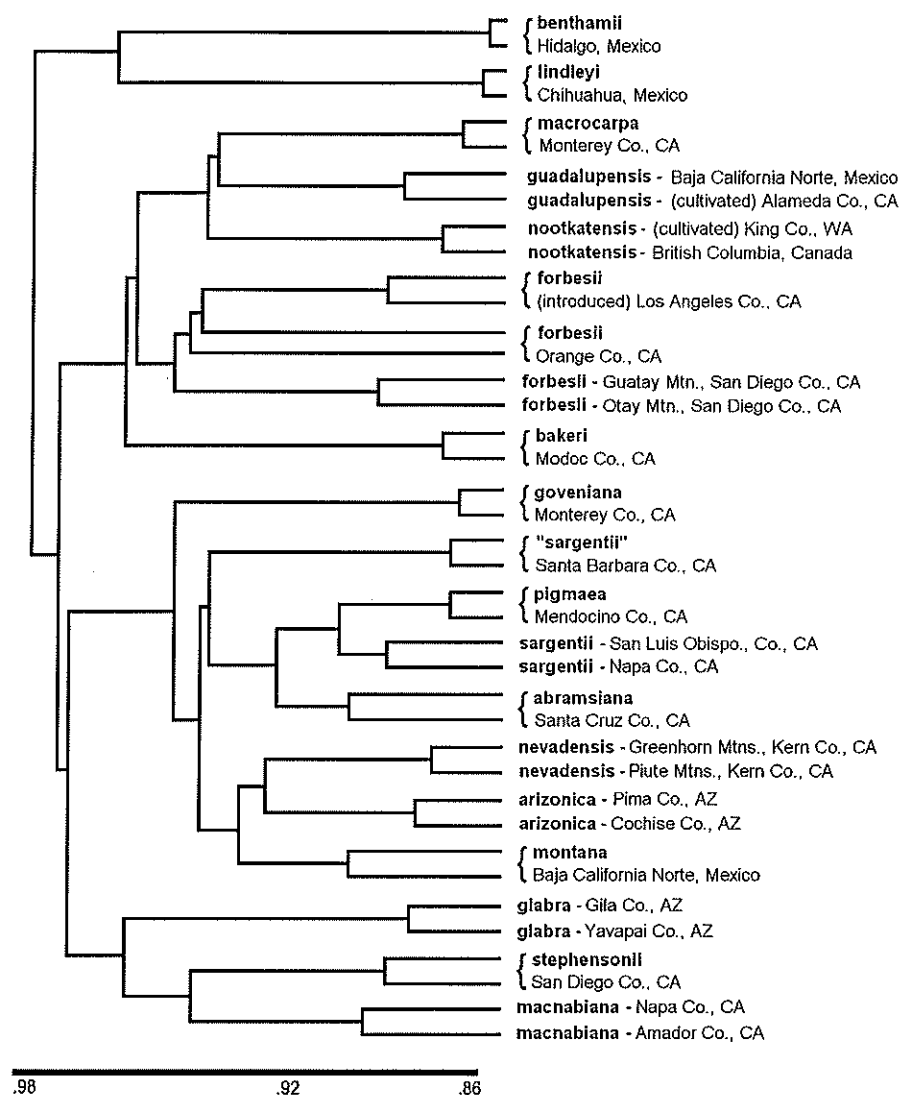


Figura 5. Árbol de distancia basado en 125 bandas RAPD para los taxones de *Callitropsis* (*Cupressus*) en el Hemisferio Occidental (tomado de Bartel *et al.* 2003).

A partir del trabajo de Little (2006) se establece más claramente su estatus de especies diferenciadas, y se reporta por primera vez la cercana relación de *C. guadalupensis* con *C. stephensonii*, esta última especie había sido considerada durante mucho tiempo una variedad de *C. arizonica*. El nodo que sugiere esta relación, está marcado con un asterisco indicando que esta rama no se resuelve al omitir los caracteres *indels*; las

especies están separadas por el carácter 16 que corresponde al compuesto químico β -tujaplicinol presente en *C. stephensonii* pero no en *C. guadalupensis*; en este caso el autor sugiere considerar a todos los miembros de *Callitropsis* únicamente a nivel de especie. Además del carácter bioquímico antes mencionado, existen dos características morfológicas principales que diferencian a estas dos especies y que las han situado a veces dentro de *C. arizonica*: la presencia de ramas fuertes y rígidas, y hojas con glándulas resiníferas activas (Tabla II). Para este trabajo se consideró a *C. forbesii* como la especie emparentada con *C. guadalupensis* porque mantiene una mayor relación morfológica (Farjon 2005).

2.4 La genética en el estudio de las poblaciones

2.4.1. Diversidad genética

Se entiende por diversidad genética la variación de genes dentro y entre poblaciones de una especie (Loo 2005). Las fuentes de variación genética en una subpoblación son la mutación, la recombinación y la migración. Por otro lado, las fuerzas evolutivas que reducen la variación en una subpoblación son la deriva génica y la selección natural (Ridley 1996).

La importancia de la diversidad genética en una especie radica en que dicha variación confiere la capacidad adaptativa para responder a los cambios ambientales a los que se puede enfrentar la especie, relacionados por ejemplo con las condiciones climáticas,

contaminación, introducción de nuevas competencias, enfermedades, plagas, parásitos, etc. (Frankham *et al.* 2002).

2.4.2. Utilidad del genoma de cloroplasto

El genoma del cloroplasto de la mayoría de las plantas terrestres es altamente conservativo en tamaño y arreglo de genes comparado con el genoma nuclear y mitocondrial. Se trata de una molécula circular de doble cadena de DNA de 120-160 kilobases (kb), que contiene típicamente una repetición invertida (IR, *Inverted Repeat*) de 10 a 76 kb de tamaño, separada por dos regiones sin repetir, una de ellas corta (SSC, *Small Single Copy*) y otra larga (LSC, *Large Single Copy*), y codifica para varios genes incluyendo los 16S y 23S de rRNA (Palmer 1985). En coníferas una de las regiones IR se ha perdido por delección (Raubeson y Jansen 1992).

El DNA del cloroplasto (cpDNA) tiene un índice relativamente lento de evolución en estructura y secuencias, poca o nula recombinación y es de herencia uniparental, principalmente vía paterna en coníferas (Neale *et al.* 1986b, 1989, 1991; Szmidt *et al.* 1987, Stine *et al.* 1989, Wagner *et al.* 1989). La variación del cpDNA puede ser detectada mediante análisis de sitios de restricción o por la secuenciación directa de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Ha sido ampliamente utilizado para inferir filogenias de plantas en diferentes niveles taxonómicos (Palmer 1987, Palmer *et al.* 1988, Clegg *et al.* 1991) y a nivel poblacional para detectar polimorfismo en diferentes especies de plantas (Mason-Gamer *et al.* 1995,

Neale *et al.* 1986a, Soltis *et al.* 1989, Soltis *et al.* 1991, Fenster y Ritland 1992, Kim *et al.* 1992, Petit *et al.* 1993, Hong *et al.* 1993, Byrne y Moran 1994, Dong y Wagner 1994, McCauley 1994). Hasta el momento, sólo se ha secuenciado de forma completa el genoma del cloroplasto de tres especies de coníferas, *Pinus thunbergii* (Wakasugi *et al.* 1994) (Figura 6), *Pinus koraiensis* (NCBI 2003) y recientemente *Cryptomeria japonica* (Hirao *et al.* 2008).

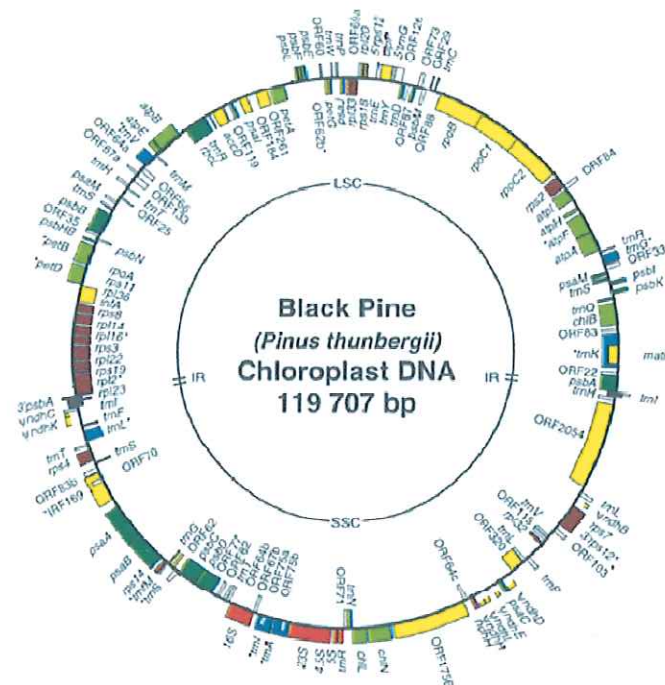


Figura 6. Mapa completo del genoma del cloroplasto de *Pinus thunbergii*. Los genes mostrados en el exterior del círculo se transcriben en dirección a la izquierda y los del interior se transcriben en dirección a la derecha. LSC, región de copia larga simple; SSC, región de copia pequeña simple; IR, repetición invertida (Powell *et al.* 1995).

El análisis de regiones no codificantes de DNA de cloroplasto ha sido ampliamente utilizado para estudios de sistemática molecular, filogeografía y genética poblacional de

plantas (Shaw *et al.* 2007), ya que estas regiones tienden a evolucionar más rápido que las regiones codificantes porque la acumulación de inserciones/deleciones ocurre a una velocidad al menos igual a la de sustituciones de nucleótidos (Curtis y Clegg 1984, Wolfe *et al.* 1987, Zurawski y Clegg 1987, Clegg y Zurawski 1991). Recientemente, Shaw *et al.* (2005) evaluaron 21 regiones no codificantes de cpDNA identificadas como útiles filogenéticamente. Estos autores encontraron que existe una apreciable variabilidad dentro de las diferentes regiones evaluadas y que regiones que se han utilizado ampliamente en investigaciones filogenéticas durante los últimos años (*trnL-trnL-trnF* y *trnK-matK-trnK*) se encuentran entre las menos variables y que las regiones más variables han sido raramente utilizadas.

Los marcadores no codificantes de cpDNA se han empleado en el estudio de especies de la familia Cupressaceae, como por ejemplo el análisis de la variación genética de *Juniperus osteosperma* (Terry *et al.* 2000), la relación filogenética entre la familia Taxodiaceae y Cupressaceae (Kusumi *et al.* 2000) o los estudios filogeográficos de *Juniperus przewalskii* (Zhang *et al.* 2005).

2.4.3. Uso de microsatélites en el estudio de genética de poblaciones

Los microsatélites o secuencias repetidas cortas (SSR por sus siglas en inglés) consisten en segmentos cortos de ADN de 1 a 6 pares de bases (pb) que se repiten en tandem. Son abundantes y presentan un alto grado de polimorfismo, por esta razón se han considerado de gran utilidad como marcadores genéticos para el estudio de poblaciones,

ya que permiten estimar los niveles de variabilidad genética dentro y entre poblaciones naturales. La variabilidad de estos marcadores los hace sensibles a los cambios en tamaños y estructuras poblacionales así como a los cambios en los eventos de dispersión (Slatkin 1995). Sin embargo, existe incertidumbre en lo que se refiere a la aplicación de microsatélites en estudios genéticos y evolutivos de las poblaciones, debido a que muestran homoplasia. Para un marcador genético, la homoplasia ocurre cuando diferentes copias de un *locus* son idénticas en estado, pero no es causado por descendencia (Estoup *et al.* 2002). Los niveles altos de homoplasia pueden originar subestimación en la cantidad total de variación entre poblaciones.

La precisión de los resultados obtenidos a partir de datos de microsatélites estará relacionada con el modelo mutacional al que se ajusta la evolución de estos marcadores. Principalmente existen dos modelos para representar el proceso mutacional de los microsatélites: el modelo de alelos infinitos, IAM (Kimura y Crow 1964) y el modelo de mutación paso a paso, SMM (Kimura y Ohta 1978). En el IAM la mayoría de las nuevas mutaciones dan lugar a nuevos alelos mutantes, distintos a los que ya existían en la población original, por lo que en este caso la homoplasia no existe o es despreciable; sin embargo en el SMM los alelos sólo pueden mutar por la ganancia o pérdida de una sola unidad de repetición, de tal manera que en este caso existirá mayor homoplasia. Estoup *et al.* (2002) sugieren que frecuentemente la gran cantidad de variabilidad en los *loci* de microsatélites compensan en gran medida su evolución homoplásica.

3. JUSTIFICACIÓN

El ciprés de Guadalupe es una especie sensible a los cambios ecológicos asociados a las actividades humanas. La única población de la especie, que durante largos siglos sobrevivió a la difícil prueba del aislamiento en tan reducido territorio, sufrió un colapso poblacional con la introducción de cabras en el siglo XIX, que suprimieron el reclutamiento de nuevos individuos. Después de infructuosos intentos, el Gobierno Mexicano, a través del Instituto Nacional de Ecología, en conjunción con el Grupo de Ecología y Conservación de Islas (GECI) coordinaron la puesta en marcha en 2004 de un exitoso programa multi-institucional para erradicar las cabras; que se consideran finalmente eliminadas de la isla (Santos del Prado y Peters 2005). Como parte de este programa se inició un estudio del comportamiento de la población del ciprés de Guadalupe ante la reducción y finalmente eliminación de la presión de herbivoría. En este escenario, la disponibilidad de información sobre la diversidad genética de la población, como condicionante fundamental de la dinámica futura de la misma, se considera de gran importancia, bien para analizar dicha dinámica futura o como información de apoyo a posibles programas de manejo y conservación. Hasta donde llega nuestro conocimiento, este es el primer estudio genético de la población natural de *Callitropsis guadalupensis*.

4. OBJETIVO GENERAL

Estimar la diversidad genética de la población de cipreses de Isla Guadalupe (*Callitropsis guadalupensis*) mediante el uso de un marcador molecular de cpDNA, utilizando como patrón de comparación al ciprés de Tecate (*C. forbesii*), con la finalidad de generar información útil para diseñar posibles estrategias de conservación y recuperación de la especie.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar marcadores moleculares de cpDNA en *C. guadalupensis*.
2. Estimar el nivel de variación genética de la población de *C. guadalupensis* en Isla Guadalupe mediante el análisis de regiones de cpDNA.
3. Estimar el nivel de variación genética de las poblaciones de *C. forbesii* en el norte de Baja California mediante el análisis de regiones de cpDNA.
4. Comparar el estado de variación genética entre *C. guadalupensis* en Isla Guadalupe respecto a las poblaciones de *C. forbesii* en B. C.
5. Inferir la relación filogenética entre los haplotipos existentes en *C. guadalupensis* y *C. forbesii*.

6. ÁREA GEOGRÁFICA DE ESTUDIO

Isla Guadalupe es una isla oceánica de origen volcánico situada a 260 km al oeste de de Baja California ($29^{\circ} 03' N$; $118^{\circ} 17' W$) con un área aproximada de 250 km^2 , orientada en sentido Norte-Sur ($37 \text{ km} \times 12 \text{ km}$) y elevación máxima de 1,300 m (Figura 7). Presenta tres pequeños islotes, Toro, Zapato y Negro. Geológicamente está constituida por dos volcanes principales de calderas colapsadas situados sobre el borde de una cresta fósil: Monte Picacho en el sur y Monte Augusta, más reciente, en el extremo norte. La roca expuesta más antigua data de hace aproximadamente 7 millones de años (Moran 1996).

El clima de la isla es de tipo mediterráneo con fuerte influencia marítima de la Corriente de California, con frecuente viento, niebla y precipitaciones en invierno-primavera. La precipitación anual promedio es de 133 mm y la temperatura mensual promedio varía entre $17\text{-}19^{\circ} \text{C}$, según datos de 20 años de registro de la estación meteorológica ubicada en el extremo sur, que corresponde a la zona más árida de la isla (Moran 1996). Los vientos dominantes son del N-NW en el 39% de los días, con una velocidad máxima de 6.34 m/s, que en invierno puede alcanzar hasta 12 m/s; en el noroeste de la isla se reduce significativamente la insolación recibida debido a la abundante nubosidad (Rico-Cerda 1983).

Isla Guadalupe está relacionada florísticamente con la vegetación de tipo mediterráneo de California y norte de Baja California (Moran 1996). Rzedowski (1978), en su estudio

de la vegetación de México, la consideró una provincia florística independiente, debido a su elevado número de endemismos. La introducción de cabras supuestamente por balleneros en el siglo XIX desencadenó una profunda perturbación sobre la vegetación de la isla. De las 218 especies de plantas registradas desde las primeras colectas en 1875 hasta el presente, se consideran localmente extintas 31 especies: 19 de ellas especies nativas de la Provincia Florística de California, dos endémicas estrictas de la isla y otras dos endémicas de Guadalupe y las Channel Islands (Moran 1996, Rebman *et al.* 2002, León de la Luz *et al.* 2003).

Otras muchas especies fueron llevadas al borde de la extinción (Moran 1996). Las cinco especies arbóreas presentes en la isla, con poblaciones reducidas por la falta de reclutamiento debido a la presión de las cabras, simbolizaban este escenario de amenaza extrema: *Brahea edulis* (endémica, población de cientos de individuos adultos), *Pinus radiata* var. *binata* (variedad endémica, 120 individuos adultos), *Quercus tomentella* (endémico insular de las Channel islands y Guadalupe, menos de 20 individuos adultos), *Juniperus californica* (11 individuos adultos) y *Callitropsis guadalupensis* (endémico, 148 ha) (Moran 1996, León de la Luz *et al.* 2003, Garcillán *com. personal*).

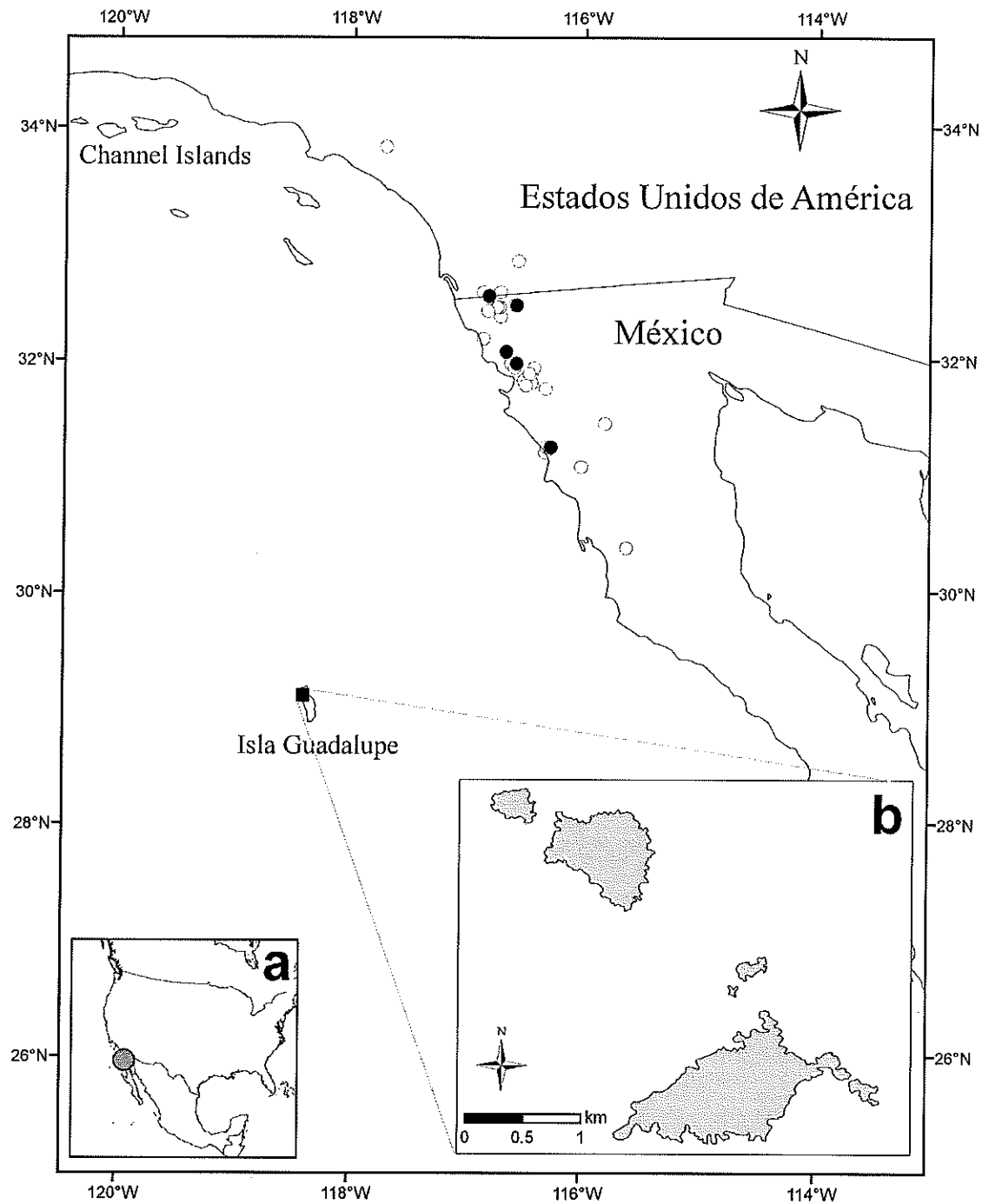


Figura 7. Ubicación geográfica del área de estudio. Los círculos situados en el noroeste de Baja California y sur de California representan las poblaciones existentes de *C. forbesii*; los círculos negros corresponden a las poblaciones muestreadas. El cuadro negro sobre Isla Guadalupe señala la ubicación de la única población de *C. guadalupensis*. (a) Ubicación general del área de estudio, y (b) distribución espacial del bosque de cipreses dentro de Isla Guadalupe.

7. METODOLOGÍA

7.1. Colecta de material biológico

7.1.1. *Callitropsis guadalupensis*

En cada uno de los dos parches mayores del bosque de cipreses (Parche Norte y Parche Sur; Figura 7) se establecieron al azar cinco transectos lineales de 200 m y se realizó colecta foliar de un individuo de *C. guadalupensis* cada 50 m, obteniéndose un total de 50 muestras. Así mismo se colectaron de manera aleatoria 4 árboles aislados ubicados entre ambos parches.

7.1.2. *Callitropsis forbesii*

Dentro del área de distribución de *C. forbesii* se eligieron cinco poblaciones, distribuidas de manera que se abarcara un amplio rango de la distribución de la especie en la península (Tabla III, Figura 7). En cada población se colectaron 15 muestras, un individuo cada 50 m, a lo largo de tres transectos aproximadamente lineales de 200 m.

Tabla III. Datos de la ubicación geográfica de las poblaciones de colecta de *C. forbesii* en Baja California.

Población	Localidad	Ubicación	Orientación	Altitud (m)	No. de muestras
RE	Rancho El Escondido	32° 33' 24'' N 116° 49' 03'' W	Norte	203	15
ED	El Dieciséis	32° 28' 06'' N 116° 34' 58'' W	Sur	734	15
VG	Valle de Guadalupe	32° 04' 08'' N 116° 40' 39'' W	Norte	558	15
SA	San Antonio de las Minas	31° 58' 13'' N 116° 34' 43'' W	Noreste	449	15
SV	San Vicente	31° 14' 54'' N 116° 17' 11'' W	Norte	242	15

7.1.3. Colectas adicionales

Como contexto comparativo se analizaron muestras de otras cinco especies del género *Callitropsis*: *C. stephensonii* y *C. montana*, que son las dos especies restantes de Baja California; *C. lusitanica* y *C. benthamii* de Hidalgo, y *C. sargentii* de California, USA; así como de *Juniperus flaccida*, también de Hidalgo (Tabla IV).

Tabla IV. Datos de la ubicación geográfica de las colectas adicionales de *Callitropsis* y *Juniperus*.

Taxón	Estado	Localidad	Ubicación
<i>Callitropsis stephensonii</i>	Baja California	Rancho El Rincón, Sierra Juárez	31° 40' 57" N 115° 46' 00" W
<i>Callitropsis montana</i>	Baja California	Sierra San Pedro Mártir	30° 55' 58" N 115° 24' 04" W
<i>Callitropsis lusitanica</i>	Hidalgo	Huasca	20° 11' 54" N 98° 38' 09" W
<i>Callitropsis benthamii</i>	Hidalgo	Parque Nacional El Chico	20° 08' 34" N 98° 41' 07" W
* <i>Callitropsis sargentii</i>	California, USA	Los Padres National Forest	35° 22' 04" N 120° 40' 11" W
<i>Juniperus flaccida</i>	Hidalgo	Zimapan	20° 48' 19" N 98° 15' 32" W

* Datos no publicados proporcionados por D.P. Little

En todos los casos se registraron las coordenadas geográficas, altitud y orientación de cada población con ayuda de un geoposicionador (GPS). Las muestras se colocaron en sobres individuales previamente etiquetados y una vez en el laboratorio se almacenaron a una temperatura de -80° C.

7.2. Obtención de datos genéticos

En el presente estudio se exploraron cebadores (oligonucleótidos) derivados del DNA del cloroplasto. La estandarización de las condiciones experimentales se realizó a partir de protocolos utilizados para especies del género *Pinus* basados en el cpDNA en el Laboratorio de Sistemática Molecular de Plantas del Instituto de Biología, Laboratorio de Genética y Evolución del Instituto de Ecología de la UNAM y otros protocolos reportados (Shaw *et al.* 2005).

7.2.1. Extracción de DNA

Se aisló el DNA total de las muestras individuales a partir de las hojas utilizando el “DNeasy Plant Mini Kit” de Qiagen. Los productos de la extracción se almacenaron a -20° C para su uso posterior (Anexo 1, Protocolo de aislamiento de DNA). La calidad del DNA extraído se confirmó mediante electroforesis de 2 µL de cada muestra en gel de agarosa al 0.9%, teñido con bromuro de etidio (Anexo 2, Protocolo de gel de agarosa).

7.2.2. Diseño de cebadores

Se diseñaron cuatro cebadores, un par *rpl2* y dos particulares *ycf6Rcup* y *psbZ* con el programa Primer 3 (Rozen y Skaletsky 2000). El diseño se realizó a partir de la secuencia de *Cryptomeria japonica* (Cupressaceae) proporcionada por Linda A. Raubeson de la Central Washington University (Ellensburg, Washington, USA).

7.2.3. Amplificación de regiones de cpDNA

Se probaron 34 pares de cebadores (Anexo 3, Lista de cebadores) en un total de cinco individuos (dos de *C. guadalupensis*, dos de *C. forbesii* y uno de *Juniperus flaccida*). En el caso de encontrar variación con algunos de los cebadores, el número de muestras secuenciadas de *C. guadalupensis* y *C. forbesii* se amplió a 12 individuos para corroborar la variación existente. La amplificación se llevó a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), en un volumen total de reacción de 50 μ L para cada muestra. La concentración final de los reactivos fueron los siguientes: 1X buffer de PCR (Invitrogen), 3 mM de $MgCl_2$ (Invitrogen), 200 μ M de cada desoxinucleótido o dNTP (Invitrogen), 1 μ M de cada cebador (Invitrogen), 2 U de *Taq* polimerasa recombinante (Invitrogen) y aproximadamente 1 ng de DNA geonómico. Para los cpSSRs se utilizó un volumen de 25 μ L de reacción de PCR por cada muestra, donde la concentración final de algunos reactivos fue modificada: 2.5 mM de $MgCl_2$, 100 μ M de cada desoxinucleótido, 0.4 μ M de cada cebador y 0.625 U de *Taq* polimerasa. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp PCR system 2400 de Applied Biosystems. Las condiciones de amplificación para cada región de cloroplasto fueron diferentes en algunos casos. A continuación se enlista cada una de ellas.

Regiones cpSSR. Se ensayaron cuatro pares de cebadores: *Pt26081*, *Pt30204*, *Pt36480* y *Pt110048*, derivados de los 20 cpSSRs que se han determinado de gran utilidad en coníferas (Anzidei *et al.* 1999). Los parámetros de PCR para esta región fueron: (1)

desnaturalización inicial a 95° C por 5 min; (2) 80° C por 5 min; (3) 33 ciclos de: 1 min de desnaturalización a 94° C, 45 s de alineación a 55° C y 1 min de extensión a 72° C; y (4) extensión final a 72° C por 8 min.

Regiones trnS-trnG-trnG. Se ensayaron dos pares de cebadores: *trnS-trnG2S* y *trnG-trnG2G*, y se aplicaron los siguientes parámetros de PCR: (1) desnaturalización inicial a 80° C por 5 min; (2) 30 ciclos de: 1 min de desnaturalización a 95° C, 4 min de alineación y extensión a 55° C en un mismo tiempo; y (3) extensión final a 66° C por 10 min.

Regiones trnT-trnL-trnF, rpl2 y 23 regiones derivadas de la alineación de Pinus thunbergii y Pinus koraiensis. Se ensayaron los cebadores *trnL-trnF* y *trnT-trnL* (Taberlet *et al.* 1991), *rpl2F* (Shaw *et al.* 2005), *rpl2Rcup* (diseñado a partir de la secuencia de *Cryptomeria japonica*) y 23 pares, *Pt12007F-Pt12581R*, *Pt12490F-Pt13146R*, *Pt27180F-Pt27760R*, *Pt27776F-Pt28348R*, *Pt28456F-Pt28893R*, *Pt28867F-Pt29341R*, *Pt39101F-Pt39714R*, *Pt49627F-Pt50161R*, *Pt50041F-Pt50539R*, *Pt51856F-Pt52341R*, *Pt54663F-Pt55216R*, *Pt67682F-Pt68215R*, *Pt73236F-Pt73684R*, *Pt79135F-Pt79939R*, *Pt82936F-Pt83475R*, *Pt95300F-Pt95767R*, *Pt95663F-Pt96059R*, *Pt96499F-Pt96867R*, *Pt96794F-Pt97365R*, *Pt97759F-Pt98212R*, *Pt98232F-Pt98661R*, *Pt98647F-Pt99121R*, *Pt117159F-Pt117723R* (diseñados por el Dr. David S. Gernandt).

Estas regiones fueron amplificadas utilizando los parámetros de: (1) desnaturalización inicial a 94° C por 3 min; (2) 30 ciclos de: 1 min de desnaturalización a 94° C, 50 s de alineación a 50° C y 1.2 min de extensión a 72° C; y (3) extensión final a 72° C por 5 min.

Región trnS-psbZ. El cebador *psbZ* fue diseñado a partir de la secuencia de *Cryptomeria japonica* y el cebador *trnS* se tomó de Shaw *et al.* (2005). Esta región se amplificó utilizando los parámetros de: (1) desnaturalización inicial a 80° C por 5 min; (2) 30 ciclos de: 30 s de desnaturalización a 94° C, 30 s de alineación a 55° C y 5 min de extensión a 72° C; y (3) extensión final a 72° C por 2 min.

Región ycf6. Este par de cebadores de la región *ycf6* fue diseñado a partir de la secuencia de *Cryptomeria japonica*. Esta región se amplificó utilizando los parámetros de: (1) desnaturalización inicial a 80° C por 5 min; (2) 30 ciclos de: 1 min de desnaturalización a 94° C, 1 min de alineación a 50° C y 3.3 min de extensión a 72° C; y (3) extensión final a 72° C por 5 min. Se corrieron 2 µL de cada reacción en un gel de agarosa al 0.9% para visualizar si los marcadores servían para amplificar cada una de las muestras.

7.2.4. Purificación

Una vez amplificados los fragmentos deseados se purificó cada una de los productos amplificados o molde de DNA con la finalidad de eliminar los reactivos sobrantes (dNTPs, cebadores, magnesio y polimerasas) utilizando el *kit* Geneclean III de

Q.biogene, siguiendo el protocolo de purificación de la casa comercial (Anexo 4, Protocolo de purificación) y diluidos en agua bidestilada. Posteriormente se evaluó la concentración y calidad del producto amplificado a partir de un gel de agarosa con el objeto de determinar la cantidad necesaria para llevar a cabo la reacción de secuenciación.

7.2.5. Secuenciación

La incorporación de los dNTPs marcados se realizó mediante una reacción de secuenciación con cada uno de los cebadores por separado y llevados a un volumen final de 10 μ L, utilizando el *kit* BigDye terminator versión 3.1 de Applied Biosystems (Tabla V). La reacción se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR system 2400 de Applied Biosystems utilizando el siguiente programa: (1) desnaturalización inicial a 94° C por 3 min; (2) 45 ciclos de: 1 min de desnaturalización a 94° C, 50 s de alineación a 50° C y 5 min de extensión a 72° C; y (3) extensión final a 72° C por 15 min.

Tabla V. Reactivos utilizados para la reacción de secuenciación (*BigDye terminator kit de Applied Biosystems*).

Reactivo	Volumen a utilizar (μ)
Molde de DNA	6
*2 μ M cebador	1
5X buffer SEQ	1
BigDye terminator. 3.1	2

* Se utiliza cada uno de los cebadores por separado.

La purificación de los productos se realizó por medio de una precipitación con etanol (Anexo 5, Protocolo de precipitación con etanol/acetato de sodio) y se guardaron a 4° C para su secuenciación posterior. La lectura se llevó a cabo en un secuenciador automatizado ABI Prism 310 de Applied Biosystems, utilizando un capilar corto de 47 cm a un tiempo de inyección de 35 s, con un tiempo de corrida de 45 min.

Las regiones *trnS-trnG-trnG* y *trnL-trnF* se mandaron a secuenciar a partir de la purificación del producto amplificado a Macrogen Inc., Corea, ya que se trataba de fragmentos largos.

Búsqueda de secuencias del GenBank. Se realizó una búsqueda de secuencias de *Callitropsis* para la región *trnS-trnG* disponibles en el GenBank por medio de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool: Altschul *et al.* 1990). Las secuencias con una identidad arriba del 98% a *C. forbesii* y *C. guadalupensis* coincidieron con otras dos especies del género (depositadas por Little en el 2006). Estas secuencias corresponden a las siguientes especies seguidas de su código de registro en GenBank: *Callitropsis benthamii* (AY988412) y *C. sargentii* (AY988411); en este caso la secuencia que utilizamos para incluirla en la filogenia fue la correspondiente a *C. sargentii*. Los secuencias obtenidas (cebador “*Forward*” y cebador “*Reverse*”) fueron editadas y alineadas manualmente por medio del programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall 1999).

7.3. Análisis genético

7.3.1. Variación genética

La variación genética se determinó únicamente con la región *trnS-trnG*, utilizando dos estimadores: diversidad haplotípica (h) y diversidad nucleotídica (π).

Diversidad haplotípica (h). Probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar sean diferentes.

$$h = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right) \quad (1),$$

donde n es el número de copias de genes en la muestra, k es el número de haplotipos, y p_i es la frecuencia del i -ésimo haplotipo en la muestra (Nei 1987).

Diversidad nucleotídica (π). Probabilidad de que dos nucleótidos con homología de posición tomados al azar sean diferentes, de tal forma que esta medida equivale a la diversidad genética a nivel de nucleótido.

$$\pi = \sum_{i=1}^k \sum_{j<i} p_i p_j \hat{d}_{ij} \quad (2),$$

donde $\hat{d}_{ij}$ es un estimado del número de mutaciones ocurridas desde la divergencia entre el i -ésimo y j -ésimo haplotipo, k es el número de haplotipos, p_i es la frecuencia del haplotipo i , y finalmente, p_j es la frecuencia del haplotipo j (Nei 1987).

Se utilizó el programa DnaSP v.4.10 DNA sequence polymorphism (Rozas *et al.* 2003) para calcular los estimadores deseados a partir de las secuencias de datos haploides de cpDNA.

7.3.2. Relaciones filogenéticas

El análisis de la relación filogenética entre los haplotipos de cpDNA de *C. guadalupensis* y *C. forbesii* fue reconstruida por máxima parsimonia y máxima verosimilitud utilizando el programa PAUP* v. 4.b10 para Windows (Swofford 2002). Se construyeron dos matrices correspondientes a la alineación total de las regiones *trnS-trnG* y *trnL-trnF*: la primera sin codificar los *indels* (inserciones/delecciones) y la segunda codificando los *indels* de la región del microsatélite utilizando caracteres multi-estado (cero al ocho), según el tamaño del microsatélite. Ambas matrices fueron analizadas mediante una búsqueda heurística con el método TBR (Tree Bisection Reconnection) y adición de taxones al azar de 10,000 réplicas, guardando un máximo de un árbol para cada replicado con el número máximo de árboles limitado a 10,000; incluyendo cuatro especies mexicanas adicionales de *Callitropsis*, *C. sargentii* y un grupo externo (*Juniperus flaccida*). Valores de bootstrap (remuestreo) fueron generados mediante una búsqueda heurística con adición de taxones al azar de 10 réplicas y 10,000 réplicas de remuestreo. El análisis de máxima verosimilitud se realizó utilizando el modelo evolutivo K81uf (Kimura 1981), elegido bajo los criterios hLRT y AIC en el programa MODELTEST (Posada y Crandall 1998). El análisis empleó una búsqueda

heurística con intercambio de ramas por el método TBR y 1000 réplicas de adición simple de taxones.

8. RESULTADOS

Obtuvimos amplificación sólo en 11 de los 34 pares de cebadores probados en las cinco muestras (dos individuos de *C. guadalupensis*, dos individuos de *C. forbesii* y un individuo de *Juniperus flaccida*). Las regiones que amplificaron fueron: *Pt28456F-Pt28893R*, *Pt54663F-Pt55216R*, *Pt79135F-Pt79939R*, *Pt82936F-Pt83475R*, *Pt97759F-Pt98212R*, *ycf6*, *trnS-psbZ*, *trnT-trnL*, *trnL-trnF*, *trnS-trnG-trnG* (Anexo 3). Cuatro de estos once pares de cebadores (*Pt54663F-Pt55216R*, *Pt82936F-Pt83475R*, *Pt97759F-Pt98212R* y *ycf6*) no dieron buenas lecturas de secuenciación a pesar de que el producto de PCR utilizado fue de buena calidad, tanto en concentración como en limpieza verificada en el gel. En los tres primeros (*Pt54663F-Pt55216R*, *Pt82936F-Pt83475R*, *Pt97759F-Pt98212R*) se utilizó un control positivo (*Pinus oaxacana*), que fue el único que proporcionó una buena lectura.

Los siete pares de cebadores restantes sí aportaron lecturas, aunque cinco de estas regiones (*Pt28456F-Pt28893R*, 384 pb; *Pt79135F-Pt79939R*, 713 pb; *trnS-psbZ*, 327 pb; *trnT-trnL*, 394 pb; y el intrón *trnG*, 790 pb), tuvieron secuencias idénticas para las dos especies de *Callitropsis* y por lo tanto no se consideraron de utilidad para el estudio genético. Finalmente, de las dos regiones restantes, *trnS-trnG* (848 pb) fue la más informativa en el análisis de la variación genética; por lo cual se amplificaron todas las

muestras de *C. guadalupensis* y *C. forbesii*. La región *trnL-trnF* (682 pb) no mostró suficiente variación como para secuenciar todas las muestras y por lo tanto sólo se utilizó para complementar junto con *trnS-trnG* la relación filogenética entre los haplotipos.

8.1. Variación genética

El espaciador *trnS-trnG*2S (región *trnS-trnG*, de 848 pb de longitud) fue el único que aportó información a nivel poblacional y entre especies. Utilizando esta región se identificaron 21 haplotipos distintos de cpDNA a partir de las secuencias obtenidas de las 54 muestras de *C. guadalupensis* y las 25 muestras de *C. forbesii*. Las diferencias entre estos haplotipos incluyen un sitio con un microsatélite de dinucleótidos (TA) que varía entre 6 y 15 repeticiones (posición 381), cinco sitios con sustituciones (posiciones 113, 301, 333, 438 y 838) y un sitio con inserción/delección (posición 411). En la tabla VI se muestra cada uno de los haplotipos ordenados considerando el tamaño del microsatélite. Cuatro haplotipos (H05, H15, H16 y H19) de los 21 identificados son compartidos por las dos especies de ciprés, *C. guadalupensis* y *C. forbesii* (Figura 8 y Anexo 6a).

De los 21 haplotipos diferentes se amplificó una muestra que representara a cada uno de estos haplotipos con la región *trnL-trnF*. No se encontraron diferencias entre especies, solamente dentro de la población de *C. guadalupensis*. En esta población las diferencias encontradas estuvieron en el haplotipo (H20) que presenta una inserción/delección de 9

nucleótidos (posición 513 a 521) y en el haplotipo (H17) que contiene una sustitución (posición 446), este último es exclusivo del parche norte de la población (Tabla VI). De tal manera que el uso únicamente de la región *trnS-trnG* podría ser suficiente para el análisis de la variación genética en *Callitropsis*. Se realizó la concatenación de las regiones *trnS-trnG* y *trnL-trnF* tal como lo realizado en el estudio de la filogeografía de *Juniperus przewalskii* (Zhang *et al.* 2005).

8.1.1. *Callitropsis guadalupensis*

Trece haplotipos de los 17 encontrados en *C. guadalupensis* (76%) son únicos para esta especie. Dos de los cuatro haplotipos compartidos por *C. guadalupensis* y *C. forbesii* están entre los de mayor frecuencia (H05: 8 individuos, H16: 6 individuos); en tanto que los dos restantes pertenecen a la clase de menor frecuencia, un solo individuo (H15 y H19) (Figura 8 y Anexo 6b). La población muestra una diversidad haplotípica (h) de 0.655 ± 0.055 y una diversidad nucleotídica (π) de 0.00112 ± 0.00015 .

8.1.2. *Callitropsis forbesii*

Cuatro de los ocho haplotipos presentes en *C. forbesii* son exclusivos de esta especie. El haplotipo H05, compartido con *C. guadalupensis*, es el haplotipo más frecuente tanto a nivel de individuos (14 de 25), como de poblaciones (100%). Entre los siete haplotipos restantes, ninguno estuvo presente en más de dos poblaciones, ni en más de un individuo por población. El patrón de la variación haplotípica entre poblaciones muestra relación con la localización latitudinal de éstas, de forma que el polimorfismo haplotípico se

reduce de norte a sur, hasta llegar a la población más sureña, San Vicente, donde los cinco ejemplares muestreados fueron monomórficos (Figura 8 y Anexo 6c). Se obtuvo una diversidad haplotípica de 0.220 ± 0.00991 y una diversidad nucleotídica de 0.00026 ± 0.00031 .

Tabla VI. Sitios variables de la alineación de la región *trnS-trnG* y *trnL-trnF* de cpDNA en 21 haplotipos de *Callitropsis*. Las secuencias están numeradas en posición 5'-3' de acuerdo a la concatenación de las regiones. El haplotipo H16, en negrita, además de estar presente en *C. guadalupensis* y *C. forbesii*, se encuentra en las otras cuatro especies mexicanas de *Callitropsis*; se incluyen los haplotipos presentes en *C. sargentii* y *Juniperus flaccida*. Los guiones (-) indican la ausencia de algún nucleótido, los asteriscos (***) representan la secuencia de nucleótidos, TGTATAAAT. La última columna representa la frecuencia en que se encontraron los haplotipos únicamente para *C. guadalupensis* y *C. forbesii*.

Posición Haplotipo	<i>trnS-trnG</i>										<i>trnL-trnF</i>			Frec.
	105	113	301	333	381-410	411 - 414	442	510	746	842	1275	1318	1385 - 1393	
H01	C	C	C	T	TATATATATATATATATATATATATATA	-- --	T	G	T	T	A	C	***	1
H02	.	A	.	.	TATATATATATATATATATATATATA	-- --	.	.	.	.	.	.	.	1
H03	.	A	.	.	TATATATATATATATATATATATATA	-- --	.	.	.	.	.	.	.	2
H04	.	A	.	.	TATATATATA - ATATATATATATA	-- --	.	.	.	.	.	.	.	1
H05	.	A	.	.	TATATATATATATATATATATATA	-- --	.	.	.	.	.	.	.	22
H06	.	A	.	.	TATATATATATATATATATATATA	-- --	.	.	.	C	.	.	.	3
H07	.	A	A	C	TATATATATATATATATATATATA	-- --	.	.	.	.	.	.	.	1
H08	.	A	.	C	TATATATATATATATATATATATA	-- --	.	.	.	.	.	.	.	2
H09	.	.	.	.	TATATATATATATATATATATATA	-- --	.	.	.	.	.	.	.	2
H10	.	.	.	.	TATATATATATATATATATATATA	-- --	C	.	.	.	.	.	.	3
H11	.	A	.	.	TATATATATATATATATATATA	-- --	.	.	.	.	.	.	.	2
H12	.	.	.	.	TATATATATATATATATATATA	-- --	.	.	.	.	.	.	.	2
H13	.	.	.	.	TATATATAT - TATATATATA	-- --	.	.	.	.	.	.	.	1
H14	.	.	.	.	TATATATATAT - TATATA	-- --	.	.	.	.	.	.	.	1
H15	.	A	.	.	TATATATATATATATATA	-- --	.	.	.	.	.	.	.	3
H16	.	.	.	.	TATATATATATATATATA	-- --	.	.	.	.	.	.	.	8
H17	.	.	.	.	TATATATATATATATATA	-- --	C	.	.	.	.	T	.	5
H18	.	.	.	.	TATATATATATATATATA	TT	.	.	.	.	.	.	.	3
H19	.	A	.	.	TATATATATATATATA	-- --	.	.	.	.	.	.	.	2
H20	.	.	.	.	TATATATATATATATA	-- --	.	.	.	.	.	.	---	8
H21	.	.	.	.	TATATATATATA	-- --	.	.	.	.	.	.	.	6
<i>C. sargentii</i>	T	.	.	.	TATATATATATATA	TTTT	.	T	G	.	G	.	.	
<i>Juniperus</i>	.	.	.	.	-- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --	-- --	.	.	G	.	G	.	.	

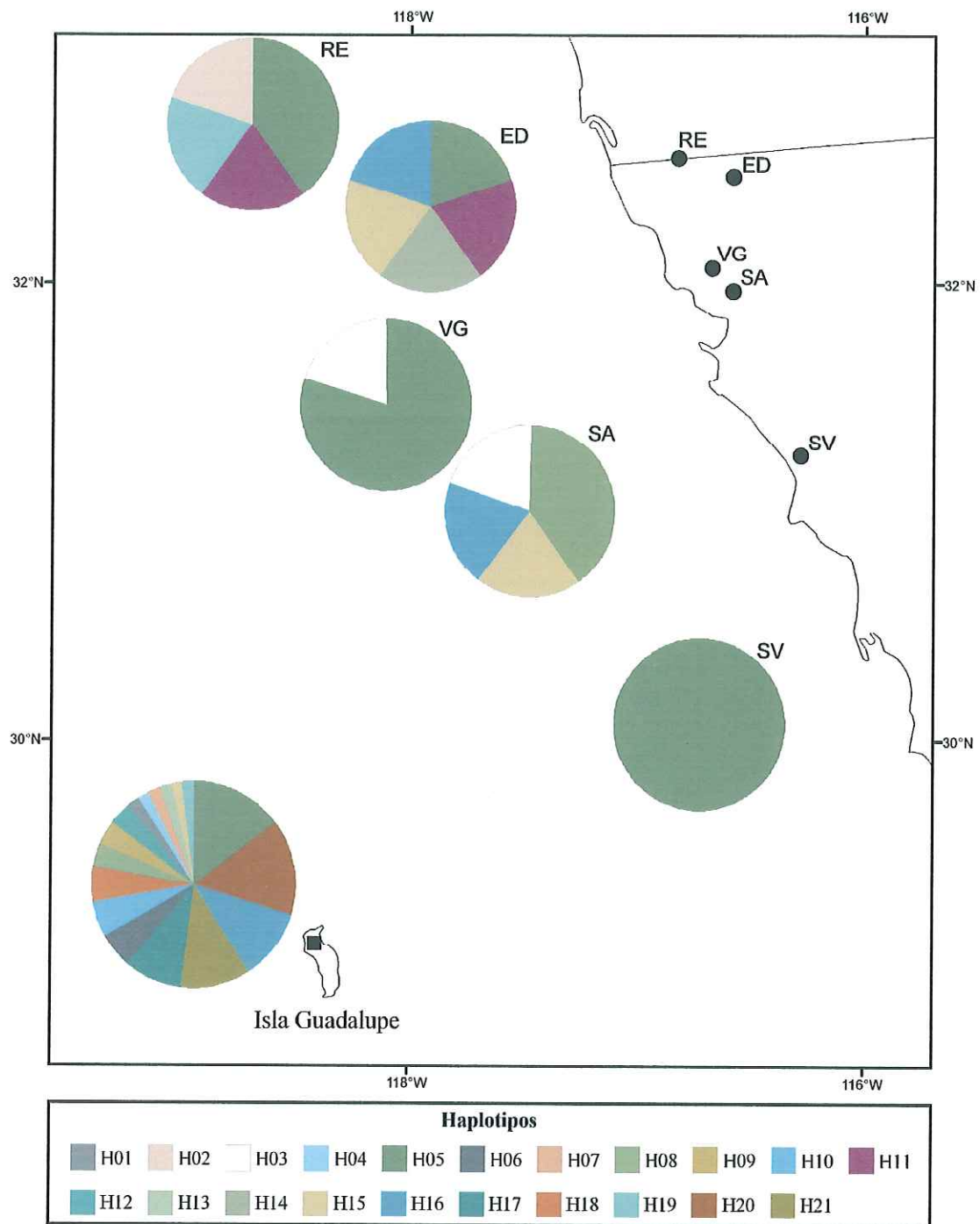


Figura 8. Distribución de frecuencia de haplotipos de la región *trnS-trnG* de cpDNA para *Callitropsis*. Dentro de Baja California se muestran los ocho haplotipos distribuidos en las cinco poblaciones de *C. forbesii* (ED, El Dieciséis; RE, Rancho El Escondido; SA, San Antonio de las Minas; SV, San Vicente; VG, Valle de Guadalupe). Para Isla Guadalupe se muestran los 17 haplotipos encontrados en la única población de *C. guadalupensis*.

8.2. Relaciones filogenéticas

8.2.1. Análisis de máxima parsimonia

La matriz completa de la región *trnS-trnG* y *trnL-trnF* de *Callitropsis* tuvo una longitud total de 1,567 pb, de los cuales 1,527 sitios fueron constantes, 35 variables no informativos y 5 informativos. En la búsqueda heurística se obtuvieron 8,007 árboles más parsimoniosos, con una longitud de 40 pasos, un índice de consistencia (CI) de 1.0, un índice de consistencia excluyendo caracteres no informativos (CI_{ex}) de 1.0 y un índice de retención (RI) de 1.0. En un segundo análisis, en el cual se codificaron los *indels* de la región del microsatélite, se obtuvieron un total de 1,568 caracteres, de los cuales 6 fueron informativos. En la búsqueda heurística se encontró 9,972 árboles más parsimoniosos, con una longitud de 53 pasos, un CI = 0.92, CI_{ex} = 0.78 y un RI = 0.81 (tabla VII; Figura 9 y 10).

Tabla VII. Parámetros del análisis de máxima parsimonia de las regiones *trnS-trnG* y *trnL-trnF* del DNA del cloroplasto en *Callitropsis*.

Parámetro	<i>trnS-trnG</i> y <i>trnL-trnF</i>	<i>trnS-trnG</i> y <i>trnL-trnF</i> (<i>indels</i> codificados)
Longitud de alineación	1,567	1,567
Rango de longitud de las secuencias	1,527-1,550	1,527-1,550
Caracteres (Total)	1,567	1,568
Caracteres variables (no informativos)	35	35
Caracteres informativos	5	6
Contenido de C+G (%)	0.31	0.31

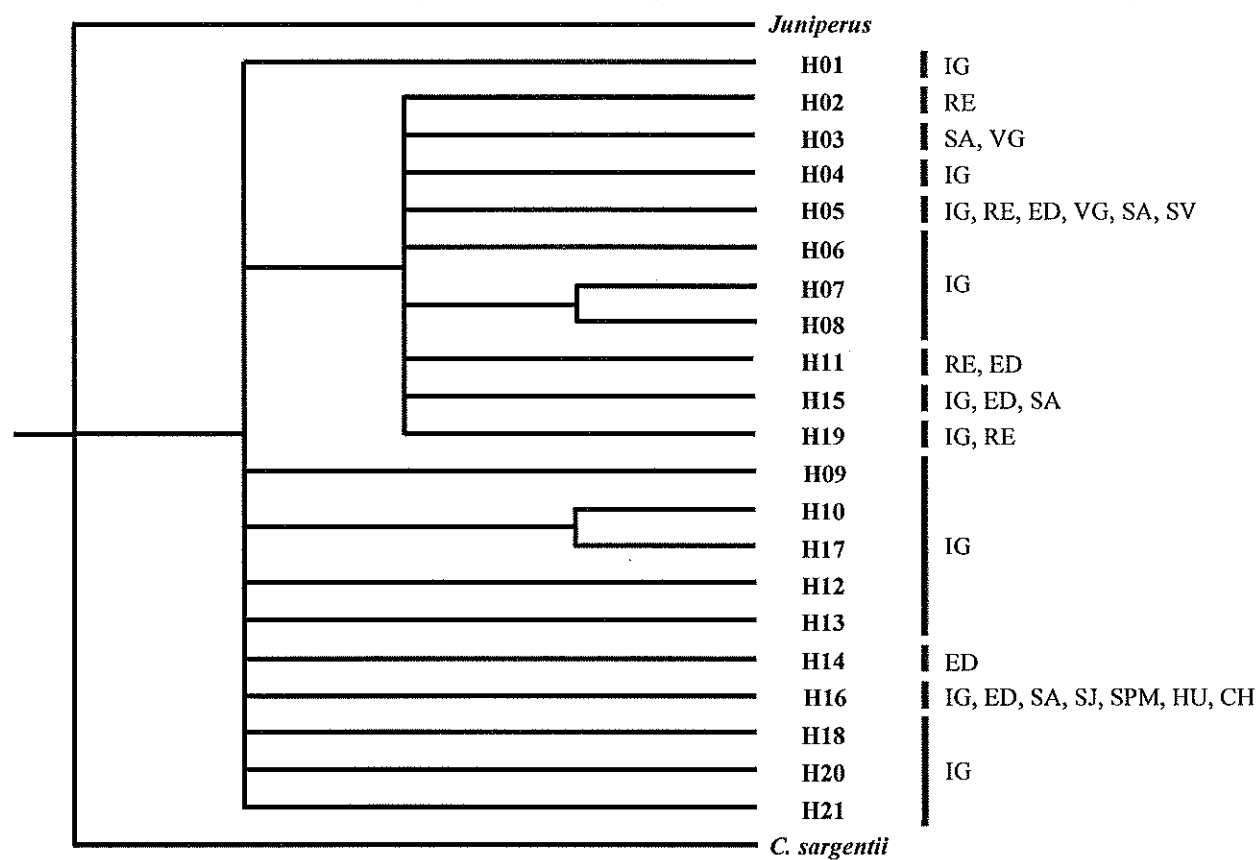


Figura 9. Árbol de consenso estricto sin codificar *indels*. Simbología: poblaciones de *C. forbesii*, *ED* - El Dieciséis, *RE* - Rancho El Escondido, *SA* - San Antonio de las Minas, *SV* - San Vicente, *VG* - Valle de Guadalupe; población de *Callitropsis guadalupensis*, *IG*, Isla Guadalupe; *C. stephensonii*, *SJ* - Sierra Juárez; *C. montana*, *SPM* - San Pedro Mártir; *C. benthamii*, *CH* - Parque Nacional El Chico; *C. lusitanica*, *HU* - Huasca.

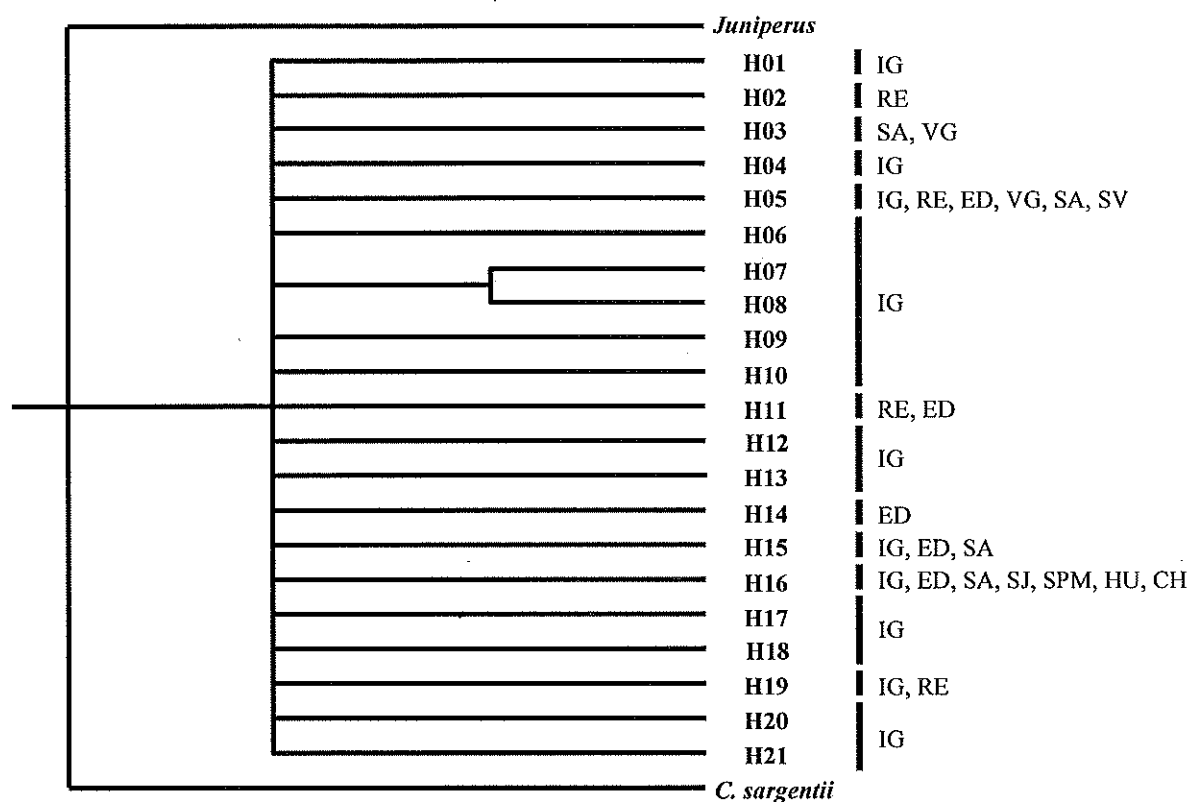


Figura 10. Árbol de consenso estricto con *indels* codificados en la región del microsatélite. Simbología: poblaciones de *C. forbesii*, *ED* - El Dieciséis, *RE* - Rancho El Escondido, *SA* - San Antonio de las Minas, *SV* - San Vicente, *VG* - Valle de Guadalupe; población de *Callitropsis guadalupensis*, *IG*, Isla Guadalupe; *C. stephensonii*, *SJ* - Sierra Juárez; *C. montana*, *SPM* - San Pedro Mártir; *C. benthamii*, *CH* - Parque Nacional El Chico; *C. lusitanica*, *HU* - Huasca.

El árbol de consenso estricto resultante del segundo análisis en que se codificaron los *indels* fue menos resuelto, ya que al codificar cada haplotipo según su longitud se introdujo homoplasia a la matriz. En este caso, para fragmentos similares los caracteres clave serían los sitios de sustitución y no la longitud de los microsatélites.

Por otra parte, se ha considerado que la lectura de un gel de agarosa o poliacrilamida también es susceptible a homoplasia, ya que sólo es sensible al tamaño del fragmento amplificado y no a la sustitución de nucleótidos; en este caso, considerando sólo el tamaño de las secuencias se podría estar subestimando el número de haplotipos. Uno de los ejemplos en este caso podría ser el tamaño (en pb) de los haplotipos H05 y H06, donde el tamaño es el mismo pero la diferencia en la lectura a partir de la secuenciación se encuentra en la posición 842 con una sustitución (Tabla VI).

8.2.2. Análisis de máxima verosimilitud

La búsqueda heurística encontró 74 patrones distintos de los datos bajo el modelo evolutivo K81uf, encontrando el árbol más verosímil a partir 100 réplicas (Tabla VIII). En este caso, el árbol de máxima verosimilitud (ML, maximum likelihood) muestra un árbol más resuelto que el de máxima parsimonia.

Tabla VIII. Parámetros estadísticos del análisis de máxima verosimilitud de la alineación total de las regiones de cpDNA (*trnS-trnG* y *trnL-trnF*) en *Callitropsis*.

Número de taxones	Modelo	-Ln de verosimilitud	Frecuencia de nucleótidos	Sustitución de nucleótidos
23	K81uf	2318.708	A= 0.336 C= 0.152 G= 0.163 T= 0.349	6

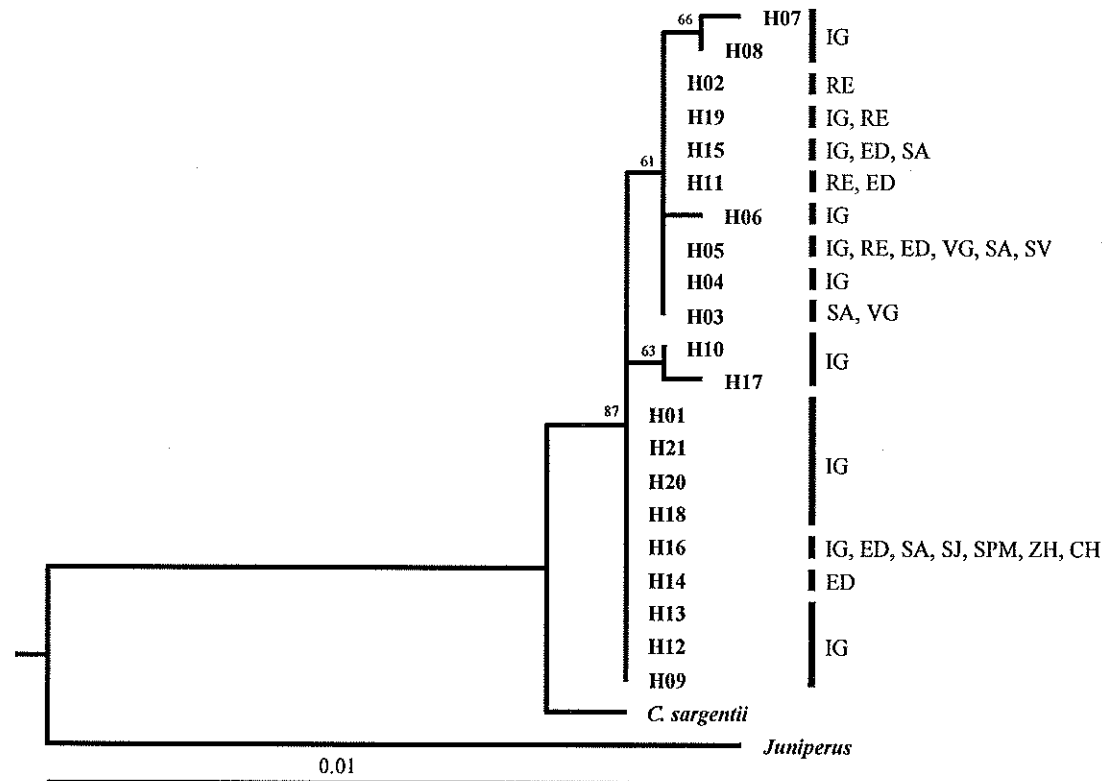


Figura 11. El árbol más verosímil inferido por máxima verosimilitud. Análisis con los 21 haplotipos encontrados en *Callitropsis benthamii*, *C. forbesii*, *C. guadalupensis*, *C. lusitanica*, *C. montana* y *C. stephensonii*, utilizando como grupo de comparación a *C. sargentii* y *Juniperus flaccida*. La barra de escala indica una base de sustitución por cada 100 nucleótidos. Simbología: poblaciones de *C. forbesii*, ED - El Dieciséis, RE - Rancho El Escondido, SA - San Antonio de las Minas, SV - San Vicente, VG - Valle de Guadalupe; población de *Callitropsis guadalupensis*, IG, Isla Guadalupe; *C. stephensonii*, SJ - Sierra Juárez; *C. montana*, SPM - San Pedro Mártir; *C. benthamii*, CH - Parque Nacional El Chico; *C. lusitanica*, HU - Huasca. Los números arriba de las ramas indican los valores de bootstrap.

9. DISCUSIÓN

Encontramos sólo dos regiones con sitios informativos. La región *trnS-trnG* fue la única, entre un total de 34 exploradas, que aportó información significativa para hacer inferencias a nivel intraespecífico. Una segunda región, *trnL-trnF*, mostró escasa variación a nivel intraespecífico, y sólo para dos individuos de *Callitropsis guadalupensis*, correspondientes al haplotipo 20 (H20) y haplotipo 17 (H17). La escasa variación encontrada en la región *trnL-trnF* podría deberse a que esta tiende a ser menos variable que la región *trnS-trnG*; según lo reportado en Gaskin y Schaal (2003) fue cinco veces menos variable que para el género *Tamarix*.

9.1. Diversidad genética

9.1.1. Alta diversidad genética relativa de *C. guadalupensis* vs. *C. forbesii*

La variación genética haplotípica encontrada en *C. guadalupensis* (17 haplotipos, $h = 0.655$), fue relativamente alta, comparada con la encontrada en *C. forbesii* (8 haplotipos, $h = 0.220$). El valor de variación genética encontrado en *C. guadalupensis* se asemeja a lo encontrado en *Cunninghamia konishii* (17 haplotipos, $h = 0.463$; Hwang *et al.* 2003), especie endémica de Taiwán de la familia Cupressaceae.

Para el caso de la diversidad nucleotídica, nuevamente *C. guadalupensis* proporcionó un valor relativamente alto ($\pi = 0.00112$), comparado con el intervalo de valores entre 0.00050 y 0.00200, encontrado para otras especies (Cheng *et al.* 2005), y superior al encontrado para *C. forbesii* ($\pi = 0.00026$), que es más bajo incluso que el límite inferior (0.00050) del intervalo de valores anteriormente citado. El valor de *C.*

guadalupensis se asemeja a los encontrados para *Fagopyrum leptopodum* y *F. statice* pertenecientes a la familia Polygonaceae ($\pi = 0.00195$ y $\pi = 0.00144$ respectivamente; Ohsako y Ohnishi 2001), y *Cunninghamia konishii* y *C. lanceolata* de la familia Cupressaceae ($\pi = 0.00176$ y $\pi = 0.00190$, respectivamente; Hwang *et al.* 2003).

Los valores encontrados en *C. forbesii* están más relacionados a otras especies arbóreas con amplia distribución en Taiwán y el Este de Asia, *Cyclobalanopsis glauca* (0.00065, Huang *et al.* 2002), *Trochodendron aralioides* ($\pi = 0.00052$, Huang *et al.* 2004), *Castanopsis carlesii* ($\pi = 0.00095$, Cheng *et al.* 2005); dentro de estas especies, las poblaciones con valores altos de diversidad genética se encuentran en Taiwán, considerado como refugio pleistocénico.

9.1.2. Alta diversidad en especies raras

En principio, esperaríamos encontrar valores más altos de diversidad genética en *C. forbesii*, por ser una especie con mayor número de poblaciones y estar más ampliamente distribuida (Hamrick y Godt 1989, 1996, Rehfeldt 1997). Una posible explicación de esta aparente paradoja, puede estar relacionada con el patrón observado en poblaciones naturales de especies endémicas, raras o con distribución restringida, que pueden mantener altos niveles de variación genética (Soltis y Soltis 1991, Cosner y Crawford 1994, Richter *et al.* 1994, Lewis y Crawford 1995, Ge *et al.* 1997, 1999). Cosner y Crawford (1994) encontraron que especies raras y/o endémicas del género *Coreopsis* mantenían valores más altos de diversidad genética que *Coreopsis rosea*, la especie más abundante y ampliamente distribuida; esto

debido a que *C. rosea* posiblemente sufrió un evento de cuello de botella seguido de una expansión en su distribución. Se ha constatado que especies que se desarrollan en ambientes estresantes y experimentan muy altas tasas de mortalidad de semillas y plántulas son capaces de retener una alta heterocigosis a pesar de que sus poblaciones sean muy reducidas (Lesica y Allendorf 1992), sin embargo no disponemos de datos para considerar que este posible escenario sea muy diferente entre ambas especies, *C. guadalupensis* y *C. forbesii*.

La predicción de reducida variedad genética en especies raras, se basa en la tácita suposición de que las especies raras tienen distribución limitadas y tamaños pequeños poblacionales, algo que no siempre ocurre (Karron 1987, Young y Brown 1996). Ellstrand y Elam (1993) defienden que especies raras con grandes poblaciones locales deberían mostrar altos niveles de variación genética. En nuestro caso, la población de *C. guadalupensis*, aunque única, es actualmente de tamaño poblacional grande (aprox. 15,000 individuos adultos; Garcillán *et al.* 2008), y su tamaño hace 150 años, previo a la introducción de cabras, se estima que fue aproximadamente cinco veces el tamaño actual (Oberbauer 2005). Aunque no existe una estimación rigurosa del tamaño de las poblaciones de Baja California, comparativamente, los tamaños de las poblaciones de *C. forbesii* parecen ser mayores al de la única población existente de *C. guadalupensis*.

Los valores de diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) nos proporcionan información referente a la demografía histórica de las poblaciones. Los elevados valores de diversidad haplotípica y nucleotídica encontrados en *C. guadalupensis*

sugieren que a pesar del aislamiento geográfico la demografía histórica de la población es relativamente estable (Avice, 2000); quizás pudo haber jugado el papel como refugio pleistocénico y dado a que las condiciones ecológicas son óptimas para el establecimiento y desarrollo de la especie se ha mantenido esa alta diversidad. Es de esperarse que con el intenso reclutamiento que está teniendo lugar en el bosque de cipreses después de la erradicación de las cabras en Isla Guadalupe (Garcillán *et al.* 2008), esa diversidad genética puede mantenerse y el tamaño poblacional se incremente.

Se ha postulado que en aquellos casos en que la variación genética y el tamaño de la población no estuvieron relacionados, factores históricos pueden haber sido más importantes que el actual tamaño de la población en la determinación de los patrones de diversidad genética (Avice, 2000), es decir que las poblaciones pueden no estar en equilibrio evolutivo (Ellstrand y Elam 1993). Los bajos valores de h y π encontrados en *C. forbesii*, nos estaría sugiriendo que las poblaciones de esta especie habrían pasado a través de un prolongado cuello de botella demográfico en los últimos tiempos o por un efecto fundador (Grant y Bowen 1998, Avice, 2000). Esta primera hipótesis de la ocurrencia de un cuello de botella se correspondería con la reciente historia de la especie, cuya amplia distribución durante los periodos glaciales se ha reducido intensamente después del Pleistoceno, al aumentar la aridez del clima, quedando reducida a un conjunto de poblaciones relictas y en gran medida aisladas entre sí (Spenger 1985, Dunn 1987), en un escenario semejante a *Calocedrus macrolepis* (Wang *et al.* 2004).

La segunda hipótesis de un efecto fundador podría ajustarse al resultado observado de que la población más sureña muestreada, (SV), que aparece como la de más reducida variación, fuera resultado de un evento de colonización durante el periodo climático más favorable del Pleistoceno, cuya expansión poblacional quedó “congelada”. O podría ser un efecto combinado de ambas hipótesis. Probablemente análisis genéticos poblacionales más detallados podrían aportar luz sobre ello.

Una causa complementaria de la historia climática reciente, podría ser el efecto del incremento de la frecuencia de fuegos sobre las poblaciones ya previamente reducidas. Aunque *C. forbesii* es una especie adaptada al fuego, que necesita para la liberación de semillas y reclutamiento (Vogl *et al.* 1977, Dunn 1987, Zedler 1981), el aumento de la frecuencia de fuegos por debajo de 30-40 años al que se encuentra adaptada, parece estar reduciendo el tamaño de algunas poblaciones en el sur de California (Dunn 1987, de Gouvenain y Ansary 2006). Aunque en Baja California el régimen de fuegos parece mantener patrones de frecuencia que son más próximos a los naturales (Minnich y Chou 1997), no se podría descartar la existencia de eventos puntuales que hayan podido producir extinciones a pequeña escala y posteriores recolonizaciones de *C. forbesii*.

9.1.3. Patrón latitudinal en C. forbesii

La distribución de haplotipos encontrada en las cinco poblaciones estudiadas de *C. forbesii* está asociada a su localización geográfica latitudinal; de tal forma que en las poblaciones más nortefías (ED y RE) muestran mayor variación de haplotipos. En concreto, en la población de El Dieciséis (ED), cada una de las cinco muestras

corresponde a un haplotipo diferente, en tanto que en la población más meridional (SV), las cinco muestras presentaron el mismo haplotipo, es decir, esta población es monomórfica para la región *trnS-trnG* de cpDNA (Figura 8).

Este patrón de menor diversidad genética en las poblaciones más sureñas pudiera ser debido a que el periodo de aislamiento de las poblaciones ha sido mayor en el sur. Esta distinta temporalidad en el aislamiento de las poblaciones pudo ser resultado del proceso de reducción del rango de la especie al cambiar las condiciones climáticas, en el sentido de reducir sus límites latitudinales. Como resultado de ello las poblaciones más al sur habrían de ser las primeras en quedar separadas. Esto también podría simplificarse a que las poblaciones del norte genéticamente más variables son ancestrales y que las poblaciones del sur pasaron a través de un ligero cuello de botella (Cosner y Crawford 1994). Por otra parte no podría descartarse la posibilidad de un evento fundador en la población del extremo sur (SV) de nuestro muestreo, aunque habría que considerar que aún existen dos poblaciones más alejadas de las poblaciones centrales. Se ha observado que la diversidad genética frecuentemente es más baja en poblaciones que se encuentran en la periferia o límites de distribución en comparación con las poblaciones centrales, causada por tamaños efectivos poblacionales pequeños, un mayor aislamiento geográfico y una alta presión sobre el medio ambiente de los márgenes de distribución en relación con las poblaciones centrales geográficamente (Lammi *et al.* 1999, Arnaud-Haond 2006, Eckert *et al.* 2008, Rasmussen y Kollmann 2008).

9.1.4. Haplotipos compartidos

De los 21 haplotipos encontrados para *Callitropsis*, el 19% (haplotipos: H5, H15, H16 y H19) es compartido entre *C. guadalupensis* y *C. forbesii*. Este resultado podría explicarse por tres hipótesis: 1) flujo génico, 2) homoplasia, y 3) polimorfismo ancestral. Las posibilidades de que haya ocurrido flujo génico son muy reducidas debido a la distancia geográfica entre las poblaciones de las dos especies (Isla Guadalupe se encuentra a más de 300 km de la población de *C. forbesii* más próxima) y a la existencia de la barrera geográfica del océano.

La hipótesis de la homoplasia explicaría la proporción de haplotipos comunes debida a una serie de cambios paralelos e independientes en las dos especies que originan los mismos haplotipos más de una vez. Es decir, durante la diversificación ocurrieron procesos de mutación que originaron haplotipos similares en una de estas especies de manera independiente heredada de una línea no relacionada. Esta hipótesis podría descartarse considerando que la tasa de sustitución nucleotídica para este marcador es notoriamente baja.

La hipótesis de existencia de retención de polimorfismo ancestral parece más factible, debido a que comparten el 19% de los haplotipos, que correspondería a la fracción de variación genética de la teórica especie ancestral que conservan aún estas dos especies. En este escenario, H5 sería un haplotipo ancestral para ambas especies, pues aparece en alta frecuencia en todas las poblaciones: *C. guadalupensis* (15%) y *C. forbesii* (56%; RE: 20%, ED: 40%, VG: 80%, SA: 40% y SV: 100%).

9.2. Relaciones filogenéticas

La relación filogenética resultante de la concatenación de las regiones *trnS-trnG* y *trnL-trnF* no obtiene una asociación de clados por especie (*C. benthamii*, *C. forbesii*, *C. guadalupensis*, *C. lusitanica*, *C. montana* y *C. stephensonii*), o sitio de colecta en el caso de *C. forbesii*, debido a que todos los haplotipos se encuentran mezclados formando una grupo parafilético para ambos análisis, máxima parsimonia y máxima verosimilitud.

Para el caso de la codificación de las matrices obtenidas a partir de las secuencias, se observó que al codificar *indels* existía un índice de homoplasia mayor ($HI = 0.0755$) que al no realizar la codificación ($HI = 0.0000$), siendo HI el valor de homoplasia de los caracteres conjuntos sobre el árbol completo ($HI = 1 - \text{número de pasos mínimos} / \text{número de pasos observados sobre el árbol}$). El Índice de Consistencia (CI) mide los valores de homoplasia, siendo $CI = 1$ cuando hay ausencia de homoplasia; por lo tanto la calidad del árbol va a ser menor conforme los valores de CI disminuyan; en este estudio el árbol de parsimonia en el que se obtuvo una mayor confiabilidad es el árbol en el que no se codificaron los *indels* debido a que hay ausencia de homoplasia. Para realizar el análisis de máxima verosimilitud sólo se obtuvo un árbol a partir de la matriz del árbol más confiable, el análisis obtenido está más resuelto que el de parsimonia y además se pueden apreciar las distancias genéticas entre los haplotipos.

Si los análisis de máxima parsimonia y máxima versimilitud no resuelven claramente esta relación filogenética en grupos monofiléticos para el caso específico de las dos especies comparadas en este análisis, en la que tenemos 13 haplotipos únicos para *C.*

guadalupensis, cuatro haplotipos para *C. forbesii* y cuatro haplotipos compartidos en ambas especies, partiendo de dos especies distintas, puede sugerirse que aún no habría transcurrido tiempo suficiente para que ambas especies hayan alcanzado la monofilia recíproca.

La incorporación de las otras cuatro especies mexicanas de *Callitropsis* (*C. montana*, *C. stephensonii*, *C. lindley* y *C. benthamii*) a este análisis se realizó para comparar la relación filogenética entre *C. guadalupensis* y *C. forbesii* con sus respectivas relaciones con el resto de las especies mexicanas consideradas en el análisis. Las secuencias de las cuatro especies adicionales corresponden al haplotipo 16 (H16), este haplotipo también se encontró en seis individuos de *C. guadalupensis* y dos individuos de *C. forbesii*, en todos los árboles filogenéticos (Figura 9-11) este haplotipo aparece como uno de los ancestrales, lo cual sugeriría que el H16 es un haplotipo ancestral en las especies mexicanas. Por lo tanto la diversificación del género *Callitropsis* en las especies mexicanas podría ser reciente.

La ubicación de *C. sargentii* aparentemente como grupo externo se debe a que la lectura de secuenciación de esta especie corresponde a un haplotipo único en el que se puede observar algunos cambios adicionales a los encontrados en *C. guadalupensis* y *C. forbesii*, que corresponde a cuatro sitios de sustitución (posiciones 105, 510, 746, 1273), un sitio de inserción/delección (posición 1383) y el tamaño del microsatélite de siete repeticiones del dinucleótido TA que no fue encontrado en ninguna de las otras especies. En la filogenia de Little (2006), *C. sargentii* es una de las especies que se encuentra distanciada de las especies

mexicanas, lo que podría explicar su ubicación en los árboles obtenidos en este estudio.

10. CONCLUSIONES

- La región *trnS-trnG* de cpDNA es una herramienta de utilidad para el estudio de la variación genética en *Callitropsis*.
- Los valores de diversidad genética para *C. guadalupensis* fueron relativamente altos tanto para los estimadores de diversidad haplotípica ($h = 0.655$) y nucleotídica ($\pi = 0.00112$), comparado con los valores obtenidos para *C. forbesii* fueron bajos ($h = 0.220$) y ($\pi = 0.00026$).
- La diversidad genética de *C. guadalupensis* es relativamente alta (para, h y π) a pesar de su reducida población.
- El H5 es el haplotipo que se encontró con una alta frecuencia, para *C. guadalupensis* (15%) y *C. forbesii* (56%), específicamente para *C. forbesii* lo encontramos en las cinco poblaciones muestreadas.
- La variación haplotípica encontrada para *C. forbesii* se encuentra relacionada con el rango latitudinal, la diversidad observada aumenta con la latitud de la población.
- *C. guadalupensis* y *C. forbesii* comparten el 19% de los haplotipos de cpDNA incluyendo los haplotipos de alta frecuencia (H05 y H16) lo que muestra que para este marcador no hay monofilia recíproca. Esto podría estar asociado a un polimorfismo ancestral.

- El H16 es el haplotipo que se encontró en las seis especies mexicanas del *Callitropsis* incluidas en el estudio.
- La relación filogenética encontrada para los haplotipos de *C. guadalupensis* y *C. forbesii* no está claramente resuelta con los análisis de máxima parsimonia y máxima verosimilitud. Incluir una mayor cantidad de secuencias del genoma de cpDNA sería de utilidad para mejorar la resolución filogenética entre los haplotipos.

11. LITERATURA CITADA

- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers y D.J. Lipman. 1990. **Basic local alignment search tool**. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- Anzidei, M., A. Madaghiele, C. Sperisen, B. Ziegenhagen y G.G. Vendramin. 1999. **Chloroplast microsatellites for analysis of the geographic distribution of diversity in conifer species (Chapter 9)**. En: Gillet, E.M. (ed.), *Which DNA Marker for Which Purpose?* Final Compendium of the Research Project Development, optimisation and validation of molecular tools for assessment of biodiversity in forest trees in the European Union DGXII Biotechnology FW IV Research Programme *Molecular Tools for Biodiversity*. <<http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/index.htm>>. Downloaded on May 2006.
- Armstrong, W.P. 1978. **Southern California's vanishing cypresses**. *Fremontia* 6: 24-29.
- Arnaud-Haond, S., S. Teixeira, I. Massa, C. Billot, P. Saenger, G.T. Coupland, C.M. Duarte y E.A. Serrao. 2006. **Genetic structure at range edge: low diversity and high inbreeding in Southeast Asian mangrove (*Avicennia marina*) populations**. *Molecular Ecology* 15: 3515-3525.
- Avice, J.C. 2000. **Phylogeography: The History and Formation of Species**. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- Bartel, J.A., R.P. Adams, S.A. James, L.E. Mumba y R.N. Pandey. 2003. **Variation among *Cupressus* species from the western hemisphere based on random amplified polymorphic DNAs**. *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 693-702.
- Beissinger, S.R. y M.I. Westphal. 1998. **On the use of demographic models of population viability in endangered species management**. *Journal of Wildlife Management* 62: 821-841.
- Byrne, M. y G.F. Moran. 1994. **Population divergence in the chloroplast genome of *Eucalyptus nitens***. *Heredity* 73: 18-28.
- California Native Plant Society (CNPS). 2006. **Inventory of Rare and Endangered Plants** (online edition, v7-06a). California Native Plant Society. Sacramento, California, USA. <<http://www.cnps.org/inventory>>. Downloaded on February 2006.
- Caughley G. 1994. **Directions in conservation biology**. *Journal of Animal Ecology* 63: 215-244.
- Cheng, Y.P., S.Y. Hwang y T.P. Lin. 2005. **Potential refugia in Taiwan revealed by the phylogeographical study of *Castanopsis carlesii* Hayata (Fagaceae)**. *Molecular Ecology* 14: 2075-2085.

- Clegg, M.T., G.H. Learn y E.M. Golenberg. 1991. **Molecular evolution of chloroplast DNA**. Pp. 135-149. En: Selander, R.K., A.G. Clark y T.S. Whittam (eds.), *Evolution at the molecular level*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Clegg, M.T. y G. Zurawski. 1991. **Chloroplast DNA and the study of plant phylogeny**. Pp. 1-13. En: Soltis, P.S., D.E. Soltis y J.J. Doyle (eds.), *Molecular systematics of plants*. Chapman and Hall, New York, New York, USA.
- CONAFOR. 2006. *Cupressus guadalupensis*. SIRE - Paquetes Tecnológicos. México. <<http://www.conafor.gob.mx/portal/index.php?s1=3&s2=3>>. Downloaded on January 2006.
- Cosner, M.E. y D.J. Crawford. 1994. **Comparisons of Isozyme Diversity in Three Rare Species of Coreopsis (Asteraceae)**. *Systematic Botany* 19: 350-358.
- Curtis, S.E. y M.T. Clegg. 1984. **Molecular evolution of chloroplast DNA sequences**. *Molecular Biology and Evolution* 1: 291-301.
- Darwin C. 1859. **On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life**. John Murray, London, UK.
- de Gouvenain, R.C. y A.M. Ansary. 2006. **Association between fire return interval and population dynamics in four California populations of Tecate cypress (*Cupressus forbesii*)**. *The Southwestern Naturalist* 51: 447-454.
- Diario Oficial de la Federación. 2002. **Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo**. Downloaded on March 2002.
- Dong, J. y D.B. Wagner. 1994. **Paternaly inherited chloroplast polymorphism in *Pinus*: estimation of diversity and population subdivision, and tests of disequilibrium with a maternally inherited mitochondrial polymorphism**. *Genetics* 136: 1187-1194.
- Dunn, A.T. 1985. **The Tecate cypress**. *Fremontia* 13: 3-7.
- Dunn A.T. 1987. **Population dynamics of the Tecate cypress**. Pp. 367-376. En: Elias T.S. y Nelson T.S. (eds.), *Conservation and management of rare and endangered plants: Proceedings of a conference on the conservation and management of rare and endangered plants*. California Native Plant Society, Sacramento, California, USA.
- Eckert, C.G., K.E. Samis y S.C. Loughheed. 2008. **Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond**. *Molecular Ecology* 17: 1170-1188.

- Ellstrand, N.C. y D.R. Elam. 1993. **Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation.** *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 217–242.
- Estoup, A., P. Jarne y J.M. Cornuet. 2002. **Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis.** *Molecular Ecology* 11: 1591–1604.
- Farjon, A. 2005. **A monograph of Cupressaceae and Sciadopitys.** Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Farjon, A. y C.N. Page. (compilers). 1999. **Conifers. Status survey and conservation action plan.** IUCN/SSC Conifer Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Fenster, C.B. y K. Ritland. 1992. **Chloroplast DNA and isozyme diversity in two *Mimulus* species (Scrophulariaceae) with contrasting mating systems.** *American Journal of Botany* 79: 1440–1447.
- Frankel, O. y M. Soulé. 1981. **Conservation and evolution.** Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Frankham, R., J.D. Ballou y D.A. Briscoe. 2002. **Introduction to Conservation Genetics.** Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Gadek, P.A., D.L. Alpers, M.M. Heslewood y C.J. Quinn. 2000. **Relationships within Cupressaceae *sensu lato*: a combined morphological and molecular approach.** *American Journal of Botany* 87: 1044–1057.
- Garcillán, P.P. 2008. **Seed release without fire in *Callitropsis guadalupensis*, an endemic cypress of a Mediterranean oceanic island.** *Plant Ecology*. (En revisión)
- Garcillán, P.P., E. Vega y E. López-Reyes. 2008. **Recruitment response of Guadalupe cypress (*Callitropsis guadalupensis*) three years after goats eradication in Guadalupe Island.** *Proceedings of the 7th California Islands Symposium*, Oxnard, California, USA. (En prensa)
- Gaskin, J.F. y B.A. Schaal. 2003. **Molecular phylogenetic investigation of U.S. Invasive *Tamarix*.** *Systematic Botany* 28: 86–95.
- Ge, S., K.Q. Wang, D.Y. Hong, W.H. Zhang y Y.G. Zu. 1999. **Comparisons of genetic diversity in the endangered *Adenophora lobophylla* and its widespread congener, *A. potaninii*.** *Conservation Biology* 13: 509–513.
- Ge, S., D.-M. Zhang, H.-Q. Wang y G.-Y. Rao. 1997. **Allozyme variation in *Ophiopogon xylorrhizus*, an extreme endemic species of Yunnan, China.** *Conservation Biology* 11: 562–565.

- Grant, W.S. y B.W. Bowen. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from the sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity* 89: 415-426.
- Groom, M.J. y M.A. Pascual. 1998. The analysis of population persistence: an outlook on the practice of viability analysis. Pp. 4-27. En: P.L. Fiedler y P.M. Kareiva (eds.). *Conservation biology for the coming decade*. Chapman and Hall, New York, New York, USA.
- 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.
- Hamrick, J.L. y M.J.W. Godt. 1989. Allozyme diversity in plant species. Pp. 43-63. En: Brown, A.D.H., M.T. Clegg, A.L. Kahler y B.S. Weir (eds.), *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Hamrick J. L. y M.J.W. Godt. 1996. Conservation genetics of endemic plant species. Pp. 281-303. En: Avise, J.C. y J.L. Hamrick (eds.), *Conservation genetics case histories from nature*. Chapman and Hall, New York, New York, USA.
- Hirao, T., A. Watanabe, M. Kurita, T. Kondo y K. Takata. 2008. Complete nucleotide sequence of the *Cryptomeria japonica* D. Don. chloroplast genome and comparative chloroplast genomics: diversified genomic structure of coniferous species. *BMC Plant Biology*. (En revisión)
- Hong, Y., V.V. Hipkins y S.H. Strauss. 1993. Chloroplast DNA diversity among trees, populations and species in the California closed-cone pines (*Pinus radiata*, *Pinus muricata* and *Pinus attenuata*). *Genetics* 135:1187-1196.
- Huang, S.S.F., S.Y. Hwang y T.P. Lin. 2002. Spatial pattern of chloroplast DNA variation of *Cyclobalanopsis glauca* in Taiwan and East Asia. *Molecular Ecology* 11, 2349-2358.
- Huang, S.F., S.Y. Hwang, J.C. Wang y T.P. Lin. 2004. Phylogeography of *Trochodendron aralioides* (Trochodendraceae) in Taiwan and its adjacent areas. *Journal of Biogeography* 31, 1291-1239.
- Hwang, S.Y., T.P. Lin, C.S. Ma, C.L. Lin, J.D. Chung y J.C. Yang. 2003. Postglacial population growth of *Cunninghamia konishii* (Cupressaceae) inferred from phylogeographical and mismatch analysis of chloroplast DNA variation. *Molecular Ecology* 12: 2689-2695.
- IUCN 2006. *2006 IUCN Red List of Threatened Species*. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on June 2007.

- Karron, J.D. 1987. A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners. *Evolutionary Ecology* 1: 47–58.
- Kim, K.-J., R.K. Jansen y B.L. Turner. 1992. Evolutionary implications of intraspecific chloroplast DNA variation in dwarf dandelions (*Krigia*; Asteraceae). *American Journal of Botany* 79: 708–715.
- Kimura, M. 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 78:454–458.
- Kimura, M. y J.F. Crow. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725–738.
- Kimura, M. y T. Ohta. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 75: 2868–2872.
- Kusumi, J., Y. Tsumura, H. Yoshimaru y H. Tachida. 2000. Phylogenetic relationships in Taxodiaceae and Cupressaceae *sensu stricto* based on *matK* gene, *chlL* gene, *trnL-trnF* IGS region, and *trnL* intron sequences. *American Journal of Botany* 87: 1480–1488.
- Lammi, A., P. Siikamäki y K. Mustajärvi. 1999. Genetic diversity, population size, and fitness in central and peripheral populations of a rare plant *Lychnis viscaria*. *Conservation Biology* 13: 1069–1078.
- León de la Luz, J.L., J. Rebman y T. Oberbauer. 2003. On the urgency of conservation on Guadalupe Island. Mexico: is it a lost paradise? *Biodiversity and Conservation* 12: 1073–1082.
- Lesica, P. y F.W. Allendorf. 1992. Are small populations worth preserving? *Conservation Biology* 6: 135–139.
- Lewis, P.O. y D.J. Crawford. 1995. Pleistocene refugium endemics exhibit greater allozyme diversity than widespread congeners in the genus *Polygonella* (Polygonaceae). *American Journal of Botany* 82: 141–149.
- Little, D.P. 2006. Evolution and circumscription of the true cypresses (Cupressaceae: *Cupressus*). *Systematic Botany* 31: 461–480.
- Little, D.P., A.E. Schwarzbach, R.P. Adams y C.-F. Hsieh. 2004. The circumscription and phylogenetic relationships of *Callitropsis* and the newly described genus *Xanthocyparis* (Cupressaceae). *American Journal of Botany* 91: 1872–1881.
- Little, E.L. 1970. Names of new world cypresses (*Cupressus*). *Phytologia* 20: 429–445.

- Loo, J. 2005. **Indicadores de diversidad genética: comparación de métodos.** Pp. 49-59. *En:* Vera C., G., J.J. Vargas H. y J. Dorantes L. (eds.), *Uso y conservación de recursos genéticos forestales.* Memorias del Simposium realizado en Jalapa, Veracruz, el 5 de noviembre de 2002. Colegio de Postgraduados - Comisión Nacional Forestal, México.
- Mason-Gamer, R.J., K.E. Holsinger y R.K. Jansen. 1995. **Chloroplast DNA haplotype variation within and among populations of *Coreopsis grandiflora* (Asteraceae).** *Molecular Biology and Evolution* 12: 371-381.
- McCauley, D.E. 1994. **Contrasting the distribution of chloroplast DNA an allozyme polymorphism among local populations of *Silene alba*: implications for studies of gene flow in plants.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91:8127-18131.
- Mendoza, I. y C. Morales. 1994. **Técnicas de producción de planta en vivero para *Cupressus lindleyi* y *Cupressus guadalupensis*, en Chapingo, México.** Tesis de Licenciatura, División de Ciencias Forestales, UACH, Chapingo, México.
- Minnich, R.A. 1987. **The distribution of forest trees in Northern Baja California, Mexico.** *Madroño* 34: 98-127.
- Minnich, R.A. y Y.H. Chou. 1997. **Wildland fire patch dynamics in the chaparral of southern California and northern Baja California.** *Internacional Journal of Wildland Fire* 7: 221-248.
- Minnich, R.A. y R.G. Everett. 2001. **Conifer tree distributions in southern California.** *Madroño* 48: 177-197.
- Moran, R. 1996. **The flora of Guadalupe Island, Mexico.** *Memoirs of the California Academy of Sciences* 19: 190.
- NCBI. 2003. **GenBank locus NC_004677: *Pinus koraiensis* chloroplast, complete genome.** Submitted by Noh, E.W., J.S. Lee, Y.I. Choi, M.S. Han, Y.S. Yi y S.U. Han. (05-Apr.-2003).
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucleotide&val=NC_004677>. Downloaded on June 2007.
- Neale, D.B., K.A. Marshall y D.E. Harry. 1991. **Inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in incense cedar (*Calocedrus decurrens*).** *Canadian Journal of Forest Research* 21: 217-220.
- Neale, D.B., K.A. Marshall y R.R. Sederoff. 1989. **Chloroplast and mitochondrial DNA are paternally inherited in *Sequoia sempervirens* D. Don Endl.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 86: 9347-9349.
- Neale, D.B., M.A. Saghai-Marooof, R.W. Allard, Q. Zhang y R.A. Jorgensen. 1986a. **Chloroplast DNA diversity in populations of wild and cultivated barley.** *Genetics* 120:1105-1110.

- Neale, D.B., N.C. Wheeler y R.W. Allard. 1986b. **Paternal inheritance of chloroplast DNA in Douglas fir.** *Canadian Journal of Forest Research* 16: 1152–1154.
- Nei, M. 1987. **Molecular evolutionary genetics.** Columbia University Press, New York, New York, USA.
- Norton, T.W. (ed.). 1995. **Special issue: applications of population viability analysis to biodiversity conservation.** *Biological Conservation* 73: 91–176.
- Oberbauer, T. 2005. **A comparison of estimated historic and current vegetation community structure on Guadalupe Island, Mexico.** Pp. 143-153. *En: Garcelon, D.K. y C.A. Schwemm (eds.), Proceedings of the Sixth California Islands Symposium, Ventura, California, December 1 – 3, 2003.* National Park Service Technical Publication CHIS-05-01, Institute for Wildlife Studies, Arcata, California, USA.
- Ohsako, T. y O. Ohnishi. 2001. **Nucleotide sequence variation of the chloroplast *trnK/matK* region in two wild *Fagopyrum* (Polygonaceae) species, *F. leptopodum* and *F. statice*.** *Genes and Genetic Systems* 76: 39-46.
- Palmer, J.D. 1985. **Comparative organization of chloroplast genomes.** *Annual Review of Genetics* 19: 325-354.
- Palmer, J.D. 1987. **Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation.** *The American Naturalist* 130: S6-S29.
- Palmer, J.D., R.K. Jansen, H.J. Michaels, M.K. Chase y J.R. Manhart. 1988. **Chloroplast DNA variation and plant phylogeny.** *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 1180-1206.
- Petit, R.J., A. Kremer y D.B. Wagner. 1993. **Geographic structure of chloroplast DNA polymorphisms in European oaks.** *Theoretical and Applied Genetics* 87: 122–128.
- Posada, D. y K.A. Crandall. 1998. **Modeltest: testing the model of DNA substitution.** *Bioinformatics* 14: 817-818.
- Powell W., M. Morgante, R. McDevitt, G.G. Vendramin y J.A. Rafalski, 1995. **Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: applications to the population genetics of pines.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92: 7759-7763.
- Prieto, J. 1992. **Estudio de algunos factores que influyen en la propagación por estaquillas de *Cupressus guadalupensis*.** Tesis de Maestría, División de Ciencias Forestales, UACh, Chapingo, México.
- Pullin, A.S. 2002. **Conservation biology.** Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Rabinowitz, D. 1981. **Seven forms of rarity**. Pp. 205-217. *En: Synge, H. (ed.), The biological aspects of rare plant conservation*. John Wiley and Sons, New York, New York, USA.
- Rasmussen, K.K. y J. Kollmann. 2008. **Low genetic diversity in small peripheral populations of a rare European tree (*Sorbus torminalis*) dominated by clonal reproduction**. *Conservation Genetics*. (En prensa)
- Raubeson, L.A. y R.K. Jansen. 1992. A rare chloroplast-DNA structural mutation is shared by all conifers. *Biochemical Systematics and Ecology* 20:17-24.
- Rebman, J., T. Oberbauer y J.L. León de la Luz. 2002. **The flora of Toro Islet and notes on Guadalupe Island, Baja California, Mexico**. *Madroño* 49: 145-149.
- Rehfeldt, G.E. 1997. **Quantitative analyses of the genetic structure of closely related conifers with disparate distributions and demographics: the *Cupressus arizonica* (Cupressaceae) complex**. *American Journal of Botany* 84: 190-200.
- Richter, T.S., P.S. Soltis y D.E. Soltis. 1994. **Genetic Variation within and Among Populations of the Narrow Endemic, *Delphinium viridescens* (Ranunculaceae)**. *American Journal of Botany* 81: 1070-1076.
- Rico-Cerda, J. 1983. **Mapa de vegetación de Isla Guadalupe**. *Revista Chapingo* 8: 46-54.
- Ridley, M. 1996. **Evolution**. Blackwell Science, Cambridge.
- Rojas, B.M. 2001. **Propagación *in vitro* de *Cupressus guadalupensis* S. Wats.** Tesis de Licenciatura, División de Ciencias Forestales, UACH, Chapingo, México.
- Rozas, J., J.C. Sanchez-DelBarrio, X. Messeguer y R. Rozas. 2003. **DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods**. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Rozen, S. y H. Skaletsky. 2000. **Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers**. Pp. 365-386. *En: Krawetz, S. y S. Misener (eds.), Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, New Jersey, <<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/>>. Downloaded on November 2006.
- Rzedowski, J. 1978. **Vegetación de México**. Editorial Limusa. México.
- Santos del Prado, K. y E. Peters (comp.). 2005. **Isla Guadalupe: Restauración y conservación**. INE-SEMARNAT, México.
- Shaw, J., E.B. Lickey, J.T. Beck, S.B. Farmer, W. Liu, J. Miller, K.C. Siripun, C.T. Winder, E.E. Schilling y R.L. Small. 2005. **The tortoise and the hare II:**

- relative utility of 21 non-coding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis.** *American Journal of Botany* 92: 142-166.
- Shaw, J., E.B. Lickey, E.E. Schilling, y R.L. Small. 2007. **The Tortoise and the Hare III. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms.** *American Journal of Botany* 94: 275-288.
- Slatkin, M. 1995. **A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequency.** *Genetics* 139: 457-462.
- Soltis, D.E., M.S. Mayer, P.S. Soltis y M. Edgerton. 1991. **Chloroplast-DNA variation in *Tellima grandiflora*.** *American Journal of Botany* 78: 1379-1390.
- Soltis, D.E., P.S. Soltis, T.A. Ranker y B.D. Ness. 1989. **Chloroplast DNA variation in a wild plant, *Tolmiea menziesii*.** *Genetics* 121: 819-826.
- Soltis, P.S. y D.E. Soltis. 1991. **Genetic variation in endemic and widespread plant species: examples from Saxifragaceae and Polystichum.** *Aliso* 13: 215-223.
- Soulé, M.E. (ed.) 1986. **Conservation biology: The science of scarcity and diversity.** Sinauer and Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Soulé, M. 1987. **Introduction.** Pp. 1-11. *En: Soulé, M. (ed.), Viable population for conservation.* Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Spenger, C. 1985. **The northernmost Tecate cypress.** *Fremontia* 13: 8-10.
- Stine, M., B. Sears y D. Keathley. 1989. **Inheritance of plastids in interspecific hybrids of blue spruce and white spruce.** *Theoretical and Applied Genetics* 78: 768-774.
- Stottlemeyer, D.E. y E.W. Lathrop. 1981. **Soil chemistry relationships of the Tecate cypress in the Santa Ana Mountains, California.** *Aliso* 10: 59-69.
- Swofford, D.L. 2002. **PAUP *: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4.0b10.** Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Szmidt, A.E., T. Alden y J.E. Hallgren. 1987. **Paternal inheritance of chloroplast DNA in *Larix*.** *Plant Molecular Biology* 9: 59-64.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou y J. Bouvet. 1991. **Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA.** *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- Terry, R.G., R.J. Tausch y R.S. Nowak. 2000. **Genetic variation in chloroplast and nuclear ribosomal DNA in Utah juniper (*Juniperus osteosperma*,**

- Cupressaceae): evidence for interspecific gene flow.** *American Journal of Botany* 87: 250-258.
- Vogl, R.J., W.P. Armstrong, D.L. White y K.L. Cole. 1977. **The closed-cone pines and cypress.** Pp. 295-358. *En: Barbour, M.G. y J. Major (eds.), Terrestrial vegetation of California.* John Wiley and Sons, New York, New York, USA.
- Wagner, D.B., D.R. Govindaraju, C.W. Yeatman y J.A. Pitel. 1989. **Paternal chloroplast DNA inheritance in a diallel cross of jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.).** *Journal of Heredity* 80: 483-485.
- Wakasugi, T., J. Tsudzuki, S. Ito, K. Nakashima, T. Tsudzuki y M. Sugiura. 1994. **Loss of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91: 9794-9798.
- Wang, D.L., Z.C. Li, G. Hao, T.Y. Chiang y X.J. Ge. 2004. **Genetic diversity of *Calocedrus macrolepis* (Cupressaceae) in southwestern China.** *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 797-807.
- Westman, W.E. y R.H. Whittaker. 1975. **The pygmy forest region of northern California: studies on biomass and primary productivity.** *Journal of Ecology* 63: 493-520.
- Wolf, C.B. 1948. **Taxonomic and distributional studies of the New World cypresses.** *Aliso* 1: 1-250.
- Wolfe, K.H., W.-H. Li y P.M. Sharp. 1987. **Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast and nuclear DNAs.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 84: 9054-9058.
- Xiang, Q. y J. Li. 2005. **Derivation of *Xanthocyparis* and *Juniperus* from within *Cupressus*: evidence from sequences of nrDNA internal transcribed spacer region.** *Harvard Papers in Botany* 9: 375-382.
- Young, A.B. y A.H.D. Brown. 1996. **Comparative population genetic structure of the rare woodland shrub *Daviesia suaveolens* and its common congener *D. mimosoides*.** *Conservation Biology* 10: 1220-1228.
- Zhang, Q., T.Y. Chiang, M. George, Q. Liu y R.J. Abbott. 2005. **Phylogeography of the Qinghai-Tibetan Plateau endemic *Juniperus przewalskii* (Cupressaceae) inferred from chloroplast DNA sequence variation.** *Molecular Ecology* 14: 3513-3524.
- Zedler, P. 1981. **Vegetation change in chaparral and desert communities in San Diego County, California.** Pp. 406-430. *En: West, D.C., H.H. Shugart y D.B. Botkin (eds.), Forest succession: concepts and applications.* Springer-Verlag, New York, New York, USA.

Zurawski, G. y M.T. Clegg. 1987. Evolution of higher plant chloroplast DNA-encoded genes: implications for structure-function and phylogenetic studies. *Annual Review of Plant Physiology* 38: 391-418.

12. ANEXOS

Anexo 1

Protocolo para aislamiento de DNA total de plantas (DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen).

1. Pulverizar suavemente 100 mg de hojas en un mortero con nitrógeno líquido. Depositar la muestra pulverizada en un tubo eppendorf de 1.5 mL y continuar de inmediato con el paso 2.
2. Agregar 400 µL de *buffer AP1* a un máximo de 100 a 200 mg de muestra y dar vortex vigorosamente.
3. Incubar la muestra por 10 min a 65° C. Mezclar el tubo por inversión de 2-3 veces durante la incubación.
4. Agregar 130 µL de *buffer AP2* a la lisis, mezclar e incubar durante 5 min en hielo. Centrifugar a 14,000 rpm por 5 min.
5. Depositar el lisado en una columna *QIAshredder Mini Spin*, colocar en un tubo colector de 2 mL y centrifugar por 2 min a 14 000 rpm.
6. Transladar el sobrenadante a un tubo nuevo sin mover el pellet.
7. Agregar 1.5 volúmenes de *buffer AP3/E* y mezclar por pipeteo.
8. Transladar 650 µL de la mezcla a la columna *DNeasy Mini Spin* colocada en un tubo colector de 2 mL. Centrifugar por 1 min a 8,150 rpm y deseche el sobrenadante.
9. Repetir el paso 8 con la muestra restante. Deseche el sobrenadante y el tubo colector.
10. Colocar la columna *DNeasy Mini Spin* en un tubo colector nuevo de 2 mL, agregar 500 µL de *buffer AW* y centrifugar por 1 min a 8,150 rpm. Eliminar el sobrenadante y reutilizar el tubo colector en el paso 11.
11. Agregar 500 µL *buffer AW* a la columna *DNeasy Mini Spin* y centrifugar por 2 min a 12,500 rpm para secar la membrana.
12. Transladar la columna *DNeasy Mini Spin* a un tubo eppendorf de 1.5 mL y agregar directamente sobre la membrana 100 µL de *buffer AE* precalentado (65° C). Incubar por 20 min a temperatura ambiente y centrifugar por 1 min a 8,150 rpm para elusión.
13. Repetir elusión (paso 12) como se describe.

Anexo 2

Protocolo de gel de agarosa al 0.9%.

1. Agregar 0.9 g de agarosa por cada 100 mL de amortiguador *TAE I X* (40 mM de tris, 20 mM ácido acético, 1.0 mM EDTA, pH 8) en un matraz.
2. Fundir la agarosa mediante calor y dejar enfriar por unos minutos ($\sim 6^{\circ}\text{C}$) e inmediatamente añadir bromuro de etidio 10 mg/mL.
3. Verter la solución de agarosa en el molde para hacer el gel, inmediatamente se coloca el peine para dejar los espacios donde se depositarán las muestras y se deja en reposo para su polimerización.
4. Posteriormente se transfiere el molde con el gel a la celda de electroforesis que contendrá amortiguador *TAE I X*.
5. Correr las muestras a 7.5 V/cm durante 15 min.
6. Para visualizar las muestras se observa el gel bajo luz UV (312 nm) en un trans-iluminador.

Anexo 3

Cebadores utilizados para amplificar las regiones de cloroplasto en *Callitropsis*.

Nombre	Ubicación	Secuencia (5'-3')	Posición en <i>P. thunbergii</i>	Referencia
*trnS-psbZ	<i>trnS</i> , <i>psbZ</i>	GAG AGA GAG GGA TTC GAA CC CGA TTG GAA CGC AAT AGT CA	7894 -	Shaw <i>et al.</i> 2005 Presente trabajo
*trnS-trnG2S	<i>trnS</i> , <i>trnG</i>	AGA TAG GGA TTC GAA CCC TCG GT TTT TAC CAC TAA ACT ATA CCC GC	7919 8845	Shaw <i>et al.</i> 2005
*trnG-trnG2G	intron <i>trnG</i>	GCG GGT ATA GTT TAG TGG TAA AA GTA GCG GGA ATC GAA CCC GCA TC	8867 9629	Shaw <i>et al.</i> 2005
Shaw	<i>atpF</i> group III	GCT GAT CGA TAG CTC CTT TAC A ATT CTT TCC ACC GCT GTG TC	12007 12581	Gernandt <i>inédito</i>
Mirov	<i>atpF</i> group III & <i>atpF</i> partial	TGG ATG GGA GAT TGG GAC TA GTG GCC CTA GCG CTT CTA TT	12490 13146	Gernandt <i>inédito</i>
Pt26081	<i>rpoB</i>	CCC GTA TCC AGA TAT ACT TCC A TGG TTT GAT TCA TTC GTT CAT	26081 26172	Vendramin <i>et al.</i> 1996
Perry	<i>orf88</i> , 44a, 58, 73a	GGA ATA GAA AGA GTC CCT GTT TT GTG CAA GCA GTG GAA GCA AT	27180 27760	Gernandt <i>inédito</i>
Loudon	<i>psbM</i> , <i>orf87</i>	TCA ATT GCT TCC ACT GCT TG TGT CAG GAT CTG GAC GGA CT	27776 28348	Gernandt <i>inédito</i>
*Martinez	<i>trnD</i> , <i>trnY</i> , <i>trnE</i>	CAG GGC GGT ACT CTA ACC AA TCT CTT TCA AGG AGG CAA CG	28456 28893	Gernandt <i>inédito</i>
Price	<i>trnE</i> , <i>orf126</i>	ACC TAA CGA ATG GAT CAT GG TTT GTC CAA CCA ACC CAT TT	28867 29341	Gernandt <i>inédito</i>
Pt30204	<i>clpP</i>	TCA TAG CGG AAG ATC CTC TTT CGG ATT GAT CCT AAC CAT ACC	30204 30328	Vendramin <i>et al.</i> 1996
Pt36480	<i>psbJ-petA</i> spacer	TTT TGG CTT ACA AAA TAA AAG AGG AAA TTC CTA AAG AAG GAA GAG CA	36480 36604	Vendramin <i>et al.</i> 1996
Strauss	<i>orf56a</i> , 49a	TCT ATT GCG TAA TTG TTT GAT CC GGG GTG TCT TTA TCC TCG AC	39101 39714	Gernandt <i>inédito</i>
Krupkin	<i>orf57a</i> , <i>rps12IR2</i> , <i>trnH</i> , <i>rps12DR2</i>	ACC GAA CCA ATC TGC AAA AC TCA TGT TTC CCA CGA AGA AA	49627 50161	Gernandt <i>inédito</i>
Liston	<i>rps12IR2</i> , <i>trnH</i> , <i>rps12DR2</i> , <i>trnT</i> , <i>orf54a</i> , <i>rps12DR3</i>	GGT TCA ATT CCC GTC GTT C GAG CCA TAC CCA ATC GAA AA	50041 50539	Gernandt <i>inédito</i>
Styles	<i>rps12IR1</i> , <i>orf57b</i> , <i>psbB</i>	ATC CCT CTC TCT CCG TTC GT TAG ACC CGG ATC ATC TCG AA	51856 52341	Gernandt <i>inédito</i>

*Douglas	<i>petB</i> partial, groupIII intron, <i>orf52</i>	GGA TGG GAT TCC GGT TAG TT TCA ATC CAA ACC TCA GAT TTC A GAT TTG ATG GTC AAA GGC AGA CAG TTT GGG AAG GGA TTT TTA	54663 55216 - 64276	Gernandt <i>inédito</i> Presente trabajo
<i>rpl2</i>		ATT TTG ATC GGG GTG TCT CC ACC GTG AGG GTT CAA GTC C ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	67682 68215 67757 68720	Gernandt <i>inédito</i> Taberlet <i>et al.</i> 1991
Little	<i>trnF</i> , <i>trnL</i>	TCT ACC GAT TTC GCC ATA TC CAT TAC AAA TGC GAT GCT CT TTG GGA AAT CGT TTT CAT TAT T CTG GAG CGA CTA TGA TAC GG	69195 73236 73684	Taberlet <i>et al.</i> 1991 Gernandt <i>inédito</i>
* <i>tabC-tabF</i>	<i>trnL</i> , <i>trnF</i>	GAT CGA ACC CGC ATC TTC T GGG ATT CGA ACC CTC GAT A TCG TCT TGA ACC TTC TGC AA TCT GGT ATT GAA ATT TGA TGG AGA	79135 79939 82936 83475	Gernandt <i>inédito</i> Gernandt <i>inédito</i>
* <i>tabA-tabB</i>	<i>trnT</i> , <i>trnL</i>	AGA TAA CTT GGA TCG GAC CAC GCT GCA TAG ATG GGC GAA TA TTG CCT TTT GGT CCC TCT AA TAG AAT ATG ACC GCC CAA CC	95300 95767 95663 96059	Gernandt <i>inédito</i> Gernandt <i>inédito</i>
Critchfield	<i>psaA</i>	GGA CCG AAG TCT CTC AAT ATT TTT AAA TCC GAA AGA TTC GAA ATG GGG GAT TCT TTT ACT GAA ATG TAT GA CGC CAA ACA CTC GAA AAG G	96499 96867 96794 97365	Gernandt <i>inédito</i> Gernandt <i>inédito</i>
*trnS-trnG	<i>trnS</i> , <i>trnG</i>	GAC GGA AAA TTA TGA TAT GGA AGA CAA GGC TTC AAA CGA AAA GG CTT TTC GTT TGA AGC CTT GG CCT TCG ATC CGG TAT GAA TC	97759 98212 98232 98661	Gernandt <i>inédito</i> Gernandt <i>inédito</i>
*Lindley	<i>orf42d</i> , 77, 42e,	GCT CTC CTA TAA CTG GAA TGT CTC TGT GGT TTT TCG TGA TCC AA TAA GGG GAC TAG AGC AGG CTA TTC GAT ATT GAA CCT TGG ACA	98647 99121 110048 110115	Gernandt <i>inédito</i> Vendramin <i>et al.</i> 1996
Lanner	<i>chlN</i> , <i>ycf1</i>	TGC CGG TCA ATT GTA TCT TTC TGA ATA GGA TAG TTG ATC TAT GGA AG ATG GAT ATA GTA AGT CTY GCT TGG GC TCT CTG GAA AAA GGA ACT TTA TGC	117159 117723 - -	Gernandt <i>inédito</i> Shaw <i>et al.</i> 2005 Presente trabajo
Lambert	<i>ycf1</i>			
Engelmann	<i>ycf1</i>			
James	<i>ycf1</i>			
*Hartweg	<i>ycf1</i>			
Roezl	<i>ycf1</i>			
Don	<i>ycf1</i>			
Pt110048	<i>rps12</i> intron			
Balfour	<i>orf2054</i>			
* <i>ycf6</i>				

* Cebadores que amplificaron para el género *Callitropsis*.

Anexo 4

Protocolo de purificación de DNA a partir de una solución (geneclean III kit de Q.biogene).

1. Cambiar de tubos de 0.2 mL a 0.6 mL.
2. Agregar 195 μ L de NaI y 2 μ L de *grassmilk*.
3. Mezclar en vortex cada 3 min durante 15 min.
4. Centrifugar 3 min a 12,000 rpm.
5. Eliminar el sobrenadante.
6. Agregar a cada tubo 250 μ L de *New Wash*.
7. Mezclar en vortex y centrifugar 1 min a 12,500 rpm.
8. Descartar el sobrenadante y se repite el paso de *New Wash* (3 veces).
9. Secar durante 20 min en el *Speed Vac*.
10. Agregar 31 μ L de agua inyectable.
11. Mezclar con vortex. Dejar reposar durante 20 min y centrifugar 1 min a 12,500 rpm.
12. El sobrenadante se pasa a un tubo nuevo de 0.2 mL, se etiqueta y se almacena a 20° C.

Anexo 5

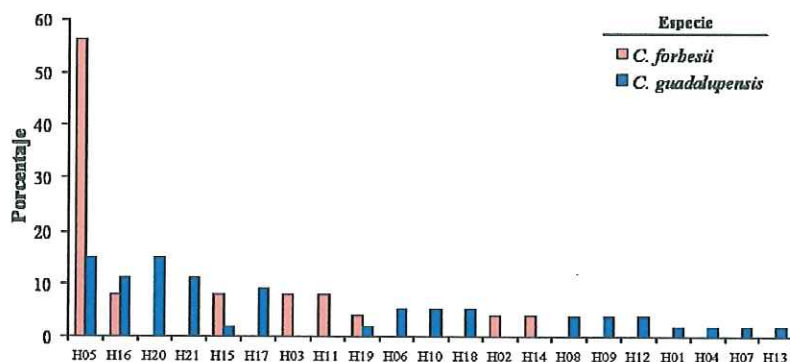
Protocolo de precipitación con etanol/acetato de sodio.

1. Por cada 10 μL de reacción de secuenciación, agregar 1 μL de acetato de sodio al 3 M (3 M NaOAc) pH 4.6 y 25 μL etanol al 95%.
2. Dar vortex y dejar reposar durante 25 min a temperatura ambiente.
3. Centrifugar a 12,000 rpm 20 min.
4. Remover el sobrenadante con una pipeta.
5. Agregar 150 μL de etanol al 70%. Mezclar con vortex.
6. Centrifugar a 12,000 rpm 5 min. Remover el sobrenadante con una pipeta. Secar en el *Speed Vac* durante 20 min.
7. Agregar 20 μL de *Mega Bace* o *Formamida* según sea el *kit* de secuenciación a utilizar. Dejar reposar 20 min.
8. Cambiar los tubos por tubos de secuenciación.

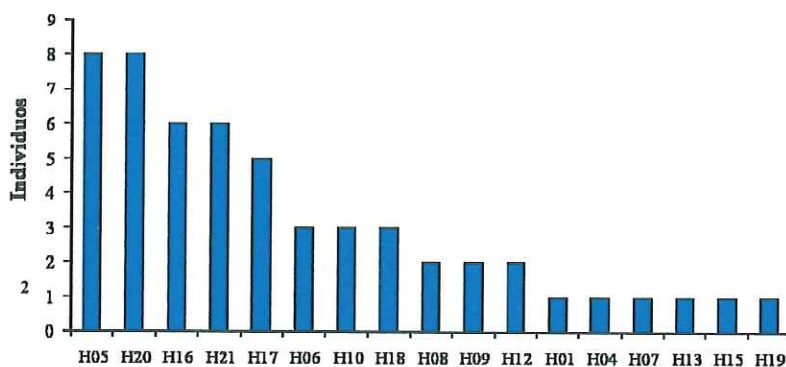
Anexo 6

Gráficos de la presencia de haplotipos mostrados en orden descendente según la frecuencia con la que se encontró para *Callitropsis*. (a) Frecuencia de los haplotipo para cada una de las especies dada en porcentaje; (b) frecuencia de haplotipos encontrados en *C. guadalupensis*; (c) frecuencia de haplotipos encontrada en las cinco poblaciones de *C. forbesii*.

a)



b)



c)

