



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
QUERÉTARO**
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

Variación genética de insectos descortezadores (*Dendroctonus mexicanus*) provenientes de tres regiones de México.

Presenta: Dioseline Girón Gutiérrez

Asesor: Dr. Víctor Hugo Cambrón Sandoval.

Dirección General de Bibliotecas UAQ



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias Biológicas

**Variación genética de insectos descortezadores (*Dendroctonus mexicanus*)
provenientes de tres regiones de México.**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta:

Dioseline Girón Gutiérrez

Dirigido por:

Dr. Víctor Hugo Cambrón Sandoval

Dr. Víctor Hugo Cambrón Sandoval
Presidente

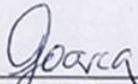
Dr. Robert Wallace Jones
Secretario

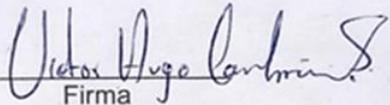
Dra. Marina Durán Aguilar
Vocal

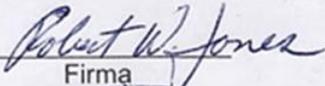
M en C. Diego J. Hernández Silva
Suplente

Dra. Gisela Fuentes Mascorro
Suplente


Dra. Juana Elizabeth Elton Puente
Directora de la Facultad de Ciencias
Naturales


Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado


Firma


Firma


Firma


Firma


Firma

RESUMEN

Los insectos descortezadores son considerados especies primarias debido a la capacidad de matar arboles sanos. El cambio climático ha agravado la situación de los bosques con respecto a estos insectos, debido a que a lo largo de un año, pueden presentar hasta 7 generaciones en donde existe evidencia de traslapes entre generaciones, encontrando organismos que no presentan las características distintivas del género, lo que complica la identificación de estas especies al momento de una infestación. En el presente estudio se evaluó la diferenciación de las poblaciones de *Dendroctonus mexicanus* de regiones del norte, centro y sur de México. Se hicieron extracciones de ADN y se amplificó un fragmento del gen COI, se secuenció el producto de la amplificación, y se analizaron mediante los programas MEGA, DNAsp y POPart. Se obtuvieron 16 haplotipos diferentes de los cuales los haplotipos del norte y sur de México presentan cierto grado de variación de acuerdo a sus distancias genéticas, mientras que los que se encuentran en el norte y centro no presentaron distancias genéticas significativas, esto se había observado anteriormente en México, sin embargo en el presente estudio todos los haplotipos evidencian un proceso de expansión por lo que en los estados muestreados no exhibieron ser una población fuente. Los valores del test D de Tajima indicaron que las poblaciones acaban de pasar por un proceso de cuello de botella muy fuerte. Aunque los resultados hacen referencia que las poblaciones del norte y sur del país son diferentes, se necesita establecer más estudios sobre este fenómeno ya que al momento de elaborar planes de contingencia para el manejo de estos insectos se deben tomar en cuenta estas diferencias genéticas de la población para que dichos planes sean más eficaces.

Palabras clave: Descortezadores, COI, Variación genética.

SUMMARY

In recent years there has been an accelerated loss of vegetation cover due to various factors such as land use change, poor management of forest resources and pests that mainly affect pine forests. Bark beetles are considered primary species because of their ability to kill healthy trees. In recent years, climate change has aggravated the situation of forests with respect to these insects because they can present up to 7 generations over the course of a year, which complicates the identification of these species at the time of an infestation. Therefore, in the present study, the differentiation of *Dendroctonus mexicanus* populations in the northern, central and southern regions of Mexico was evaluated. DNA extractions were made and a fragment of the COI gene was amplified, the amplification product sequenced, and analyzed using bioinformatics programs. We obtained 17 different haplotypes of which the haplotypes of northern and southern Mexico showed some degree of variation while those in northern and central Mexico showed no degree of variation. This had been previously observed however in the present study all haplotypes show an expansion process so that in the sampled states did not exhibit a source population, the D de Tajima test was calculated to confirm that the populations just went through a very strong bottleneck process. Although the results indicate that the populations in the north and south of the country are different, more studies on this phenomenon are needed, since when preparing contingency plans for the management of these insects, these characteristics of the population must be taken into account in order for these plans to be more effective.

Key words: barkbeetle, COI, genetic variation.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES Y HERMANAS

A MI ESPOSO E HIJO

Dirección General de Bibliotecas UAQ

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado para la realización de mis estudios de posgrado, sin su apoyo sería más difícil realizar este trabajo.

Al laboratorio de Salud Animal y Microbiología ambiental por el apoyo recibido durante el desarrollo experimental del trabajo.

A todos aquellos que hicieron más amena mi estancia en la facultad, aquellos que en cada plática aportaban algo a mi persona y a mi trabajo, para aquellas personas que lloraron (es una exageración) y rieron conmigo en laboratorio, para aquellos que en la distancia siempre me dieron palabras de aliento.

Gracias a todos (ustedes saben quiénes son), nunca olvidaré cada gesto de ayuda e indiferencia que tuvieron conmigo porque a pesar de todo, esta etapa me hizo crecer.

ÍNDICE

RESUMEN	i
SUMMARY	ii
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
Índice de cuadros	3
Índice de figuras	4
I. INTRODUCCIÓN	6
II. REVISIÓN DE LITERATURA	8
2.1. Descripción del género <i>Dendroctonus</i>	9
2.2. <i>Dendroctonus mexicanus</i> Erichson	10
2.2.1 Distribución.	10
2.2.2. Descripción.	11
2.2.3 Ciclo de vida y hábitos.	12
2.3. Herramientas y estudios genéticos.	13
2.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa PCR.	14
2.3.2. Secuenciación.....	15
2.3.3. El ADNmt como marcador	15
2.4. Análisis de secuencias.....	17
2.5. Métodos de estimación de filogenias	18
2.5.1. Métodos basados en distancias.....	19
2.5.2. Haplotipos.....	19
III OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo general	25
3.2 Objetivos específicos	25
IV. METODOLOGÍA	26
4.1. Zona de estudio	26
4.2. Identificación taxonómica de insectos.....	27
4.3. Extracción de ADN.....	28
4.4. PCR	28
4.5. Secuenciación.....	29

4.6. Análisis de secuencias.....	29
V RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
5.1. Extracción de ADN.....	33
5.2. Secuenciación.....	35
5.3. Análisis de secuencias.....	36
5.4. Análisis del modelo para construcción de filogenia.....	36
5.5. Red de haplotipos	43
5.6. Análisis comparativos	44
VI CONCLUSIONES	51
VII LITERATURA CITADA.....	52

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Índice de cuadros

Cuadro 1. Componentes de la reacción para PCR.....	28
Cuadro 2. Ciclos utilizados en termociclador.....	29
Cuadro 3. Muestras que fueron secuenciadas.	33
Cuadro 4. Modelos evaluados para el análisis evolutivo de las secuencias, resultado de MEGA7.....	37

Dirección General de Bibliotecas UAQ

Índice de figuras

Figura 1. Distribución de <i>Dendroctonus mexicanus</i> y sus hospedadores a lo largo del territorio mexicano. Modificado de Salinas-Moreno, 2010.	11
Figura 2. <i>Dendroctonus mexicanus</i> . Tomado por Dioseline Girón Gutiérrez.....	12
Figura 3. Ciclo de vida de escarabajos descortezadores. Tomado de www.rdos.bc.ca	13
Figura 4. Esquema del genoma mitocondrial en humanos. Modificado de Fernández-Domínguez, 2005.....	16
Figura 5. Mapa de la ubicación de los sitios de muestreo. Dioseline Girón Gutiérrez.....	26
Figura 6. Ejemplares identificados.....	27
Figura 7. Almacenamiento de los ejemplares.....	27
Figura 8. Impresión del proceso de análisis para limpieza de secuencias obtenidas con software Cromas.	30
Figura 9. Blast de secuencias en NCBI.	31
Figura 10. Alineamiento de secuencias mediante MUSCLE en el programa MEGA7.....	31
Figura 11. Resultados del programa JModelTest 1.2.7.	32
Figura 12. PCR utilizando primer´s universales M) Marcador de peso molecular 1 y 2) <i>D. mexicanus</i> , 3y4) <i>D. frontalis</i> , 5) Control negativo.	34
Figura 13. Resultados de PCR con primer´s dmex 685 y dmex1048. E100pb) Marcador de peso molecular de 100-1000pb. 52-46) <i>D.mexicanus</i>	35
Figura 14. Fallas en las secuencias señales confusas.....	35
Figura 15. Árbol filogenético molecular mediante el método de máxima verosimilitud de acuerdo al modelo Tamura 3 parámetros con distribución gamma.	38
Figura 16. Árbol consenso construido mediante el método de máxima verosimilitud mediante el modelo Hasegawa-Kishino Yanno con 10,000 repeticiones.....	41
Figura 17. Árbol mejor representativo estimado mediante el método de máxima verosimilitud con 10,000 repeticiones.	42

Figura 18. Mapa de haplotipos de las 19 secuencias obtenidas en este estudio.	44
Figura 19. Árbol consenso construido mediante el método de Máxima verosimilitud bajo el modelo Hasegawa Kishino Yanno G+I a 1,000 repeticiones en el programa MEGA7.....	46
Figura 20. Árbol consenso construido mediante el método de Máxima verosimilitud bajo el modelo Hasegawa Kishino Yanno G+I a 10,000 repeticiones en el programa MEGA7.....	47
Figura 21. Red de haplotipos construido mediante el modelo de clados anidados.	48

Dirección General de Bibliotecas UAQ

I. INTRODUCCIÓN

Los bosques templados de coníferas cubren el 13% de la superficie terrestre de México (Salinas-Moreno *et al.*, 2010). La mayoría de estos bosques se componen de árboles de los géneros, *Pinus*, *Pseudotsuga*, *Abies* y *Picea* (Rzedowski, 1981; Styles, 1998). Se considera al territorio mexicano como un centro de diversificación del género *Pinus*, por tener 49 especies (40%) de las 120 especies en el mundo. Nueve de los 10 géneros de coníferas mexicanas son considerados representativos de la flora templada del hemisferio norte, con especies en los Estados Unidos y algunas en Canadá que alcanzan sus límites sureños en México, la mayor concentración de diversidad de géneros de coníferas se localiza en Hidalgo, Veracruz, Puebla y Oaxaca (Gernandt & Pérez-de la Rosa, 2014).

Este tipo de vegetación nos brinda servicios ambientales como degradación de desechos orgánicos, la formación de suelo y control de la erosión, fijación del nitrógeno, proporciona recursos alimenticios, control biológico de plagas, productos farmacéuticos y naturistas, turismo de bajo impacto y secuestro de dióxido de carbono (CONABIO, 2014). No obstante, muchos de los bosques de coníferas han sufrido una disminución del área cubierta, desapareciendo o cambiando su estructura y composición (Duran & Poloni, 2014). Las causas de mayor impacto son la deforestación y el cambio del uso del suelo, aunado a cambios en los patrones del clima como la temperatura y la precipitación que incrementan fenómenos como incendios, enfermedades y plagas forestales (Jones *et al.*, 2004)

Una de las plagas más importantes en Norte América que afecta las poblaciones de pinos es causada por escarabajos descortezadores del género *Dendroctonus*. El papel ecológico de este género es el de regular las poblaciones de pino, dicha plaga forestal ha incrementado su densidad poblacional en Norte América, con efectos directos en la productividad y cobertura de los bosques

templados (FAO, 2010; Salinas-Moreno *et al.*, 2010). Se reporta que entre 1997-2008, *D. ponderosae* afectó más de 13 millones de hectáreas de bosque en el oeste de Canadá (Duran & Poloni, 2014), para 2010 las cifras llegaron a 15 millones de hectáreas solo en Columbia Británica (Keeling *et al.*, 2012), mientras que en México 55 mil hectáreas de bosque se han perdido a causa de esta plaga (Cuellar-Rodriguez, 2013).

Debido a las crecientes colonizaciones de *Dendroctonus mexicanus* y el impacto que estas tienen en los bosques de México es importante conocer el estado genético con el fin de saber si las especies están experimentando algún cambio en su estructura o si presentan resistencia de origen genético a cierto factor abiótico, para que en estudios posteriores se puedan establecer proyectos para la identificación pronta y diseñar estrategias de control de acuerdo a cada región de las principales especies devastadoras en México.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Los descortezadores son un grupo de coleópteros estrechamente ligados a las masas forestales, donde predominan los pinos que son altamente apreciados por los servicios ecosistémicos que generan. Algunos de estos servicios son la producción de grandes cantidades de madera, purificación del agua y el aire, proveen alimentos, ayudan a la polinización y ofrecen beneficios recreativos. Los resultados del Inventario Nacional Forestal Periódico estiman la superficie forestal de México en 141 745 169 has, lo que representa 72% del territorio nacional. La superficie arbolada del país suma poco más de 56 millones de hectáreas, de las cuales 54% corresponde a bosques. Las áreas boscosas se concentran mayormente en los estados de Chihuahua (23.2%), Durango (16.3%) y Oaxaca (8.9%) (CONABIO, 2014).

En México se reconoce a la especie *Dendroctonus mexicanus* de gran importancia debido a los daños que ha ocasionado en pinares, a tal grado que en algunos proyectos de monitoreo se considera como especie objetivo (se denomina así a especies que demuestran gran capacidad de matar árboles sanos) (Macías-Sámago & Niño-Domínguez, 2016).

Los brotes de *Dendroctonus mexicanus* en los bosques de México se incrementaron en el año 2013. El 12% de los bosques presentó brotes de esta plaga y la superficie perturbada superó a la de los incendios forestales. En 2014 la superficie afectada fue de 27,062 ha y para 2015 el daño se cuantificó en 55 mil ha (CONAFOR, 2015). Dentro de los estados más afectados está Nuevo León, donde los escarabajos afectaron más de 5,000 ha de bosques de coníferas entre 2008 y 2009, mientras que en el 2012 se calculó el daño a 8,959 ha (Cuellar-Rodríguez, 2013).

2.1. Descripción del género *Dendroctonus*

Dendroctonus Erichson es un género relativamente pequeño, pero desproporcionadamente grande en cuanto al impacto en los bosques de coníferas. Su nombre describe muy bien las cualidades de este grupo (*Dendro-Árbol, tonus- destructor*) debido a que son uno de los principales escarabajos descortezadores que matan coníferas en el mundo (Armendáriz-Toledano *et al.*, 2014; Six & Bracewell, 2014). Las especies de este género son muy similares morfológicamente. Su cuerpo es ovalado con una pendiente empinada convexa, la coloración para adultos es de marrón oscuro a negro, en algunas especies son de color marrón rojizo o la posesión de los élitros de color marrón rojizo, el extremo de las antenas tiene una terminación redonda aplanada (Six & Bracewell, 2014).

Las especies grandes de *Dendroctonus* como *D. valens* en general restringen su alimentación a las regiones de los árboles con floema más grueso (cuello de la raíz, el tocón, y fuste menor), mientras especies de tamaño mediano y pequeño tienden a colonizar porciones más altas del tallo (menor a mediados de tronco). En cuanto al dimorfismo sexual *Dendroctonus* tiene diferencias específicas de cada sexo y existen en algunas especies pero en otras no, esto se presenta entre las especies que tienen historias de vida y sistemas de apareamiento similares (Six & Bracewell, 2014).

Actualmente se registran 19 especies de las cuales 17 se encuentran en el norte y Centroamérica. Se han reportado 2 en Asia y Europa (Armendáriz-Toledano *et al.*, 2014). En México se encuentran 12 especies; *D. frontalis*, *D. mexicanus*, *D. brevicomis*, *D. adjunctus*, *D. parallelocollis*, *D. aproximatus*, *D. jeffreyi*, *D. ponderosae*, *D. pseudotdugae*, *D. rhizophagus*, *D. valens* y *D. vitei* (Zúñiga, Mendoza-Correa, Cisneros, & Salinas, 1999). De las anteriores, las especies que se han considerado como plagas primarias (son capaces de matar arboles sanos) de los bosques de pino en México son: *D. frontalis*, *D. mexicanus* y *D. adjunctus* (Leon-García, 2013; Macías-Sámago & Niño-Domínguez, 2016).

2.2. *Dendroctonus mexicanus* Erichson.

Dendroctonus mexicanus se reporta como el insecto descortezador que mayor daño causa a los bosques de pino en México. De 1972 a 1973 afectó 50 mil hectáreas en el estado de Michoacán, donde destruyó 1,200,000 m³ de madera de pino. En el mismo año se extendió al Distrito Federal y Estado de México afectando 17 mil ha de bosque de pino, de 1977 a 1978 se combatió esta plaga en 5 mil hectáreas en el Estado de México. En Michoacán y Distrito Federal, su afectación abarcó una superficie boscosa de 40 mil hectáreas (Sánchez-González, 2008). En los bosques del estado de Nuevo León, esta especie contribuyó a la pérdida de superficie de bosques. El mayor daño en estos bosques se presentó de 1997 a 2002 donde fueron devastadas 2,726.85 hectáreas (Cuellar-Rodriguez, 2013). Mientras que en el periodo de 2004 a 2011, 7,734 ha de bosques de pino fueron perturbadas. Significando una afectación en promedio de 145 m³ /ha (Castellanos-Bolaños, Ruíz-Martínez, Gómez-Cárdenas, & González-Cubas, 2013).

2.2.1 Distribución.

La distribución geográfica de esta especie se extiende desde el Norte de México hasta Honduras (Wood, 1982). Recientemente fue registrada en el Sur de los Estados Unidos (Moser, Fitzgibbon, & Klepzig, 2005). En México se distribuye en los estados de Aguascalientes, Chiapas, Colima, Durango, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Zacatecas (Armendáriz-Toledano *et al.*, 2014; Cibrian *et al.*, 1995) (Fig. 1).

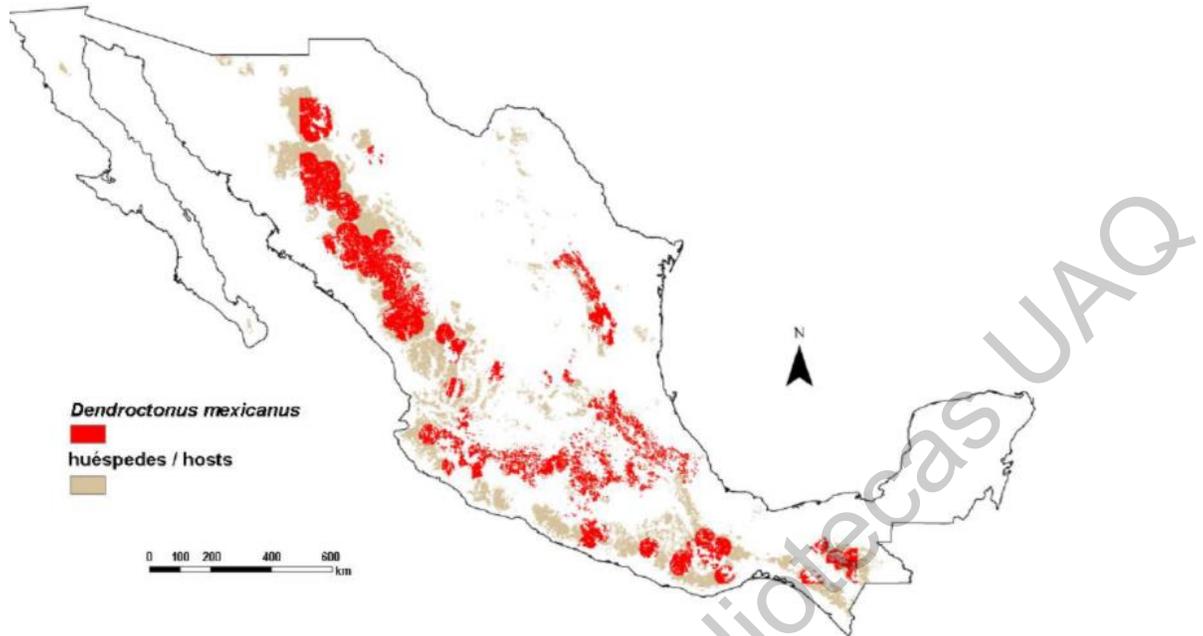


Figura 1. Distribución de *Dendroctonus mexicanus* y sus hospedadores a lo largo del territorio mexicano. Modificado de Salinas-Moreno, 2010.

2.2.2. Descripción.

Los organismos adultos tienen un tamaño que va de 2.3 a 4.5 mm de longitud y su coloración puede ser café oscuro o negro, en ocasiones muy brillante. Su frente presenta un ángulo convexo en la parte frontal de la cabeza, en ella se observan dos elevaciones separadas por un surco que baja por la parte media de la cabeza. En los machos puede distinguirse una elevación entre estos surcos mientras que en las hembras no es muy evidente o puede no presentarse. Los élitros presentan un total de nueve estrías que presentan puntos poco profundos. El declive elitral es convexo (Fig. 2). Las setas que se observan en el declive se presentan de dos tamaños, cabe aclarar que las setas sirven para diferenciar a esta especie de *D. frontalis* (Cibrian *et al.*, 1995).



Figura 2. *Dendroctonus mexicanus*. Tomado por Dioseline Girón Gutiérrez

El huevecillo de estas especies presenta una forma ovalada y de coloración blanquecina aperlada. La larva presenta la cabeza bien esclerosada, con un aparato bucal fuerte, masticador; su cuerpo es cilíndrico, con setas pequeñas, esta especie pasa por cuatro estados larvarios (Cibrian *et al.*, 1995).

2.2.3 Ciclo de vida y hábitos.

Se pueden presentar varias generaciones por año, el tiempo de generación (de huevo a huevo) varía de acuerdo a la temperatura y condiciones de desarrollo, desde 42 hasta 125 días, por lo que puede haber de 3 a 5 generaciones por año. Esta variación en ocasiones depende de la altitud (Cibrian *et al.*, 1995).

Los estados de desarrollo están sobrepuestos, las hembras son las que seleccionan a sus hospedantes, en los cuales hacen orificios entre las placas de corteza hasta llegar al floema; dichas hembras inician la emisión de feromonas de agregación, que atraerá a machos y a hembras al árbol escogido. Una vez que las hembras lograron penetrar al floema, llegan a la zona de cambium e inician su alimentación (Cibrian *et al.*, 1995).

Al arribar los machos y alcanzar a las hembras en el interior de las galerías, se produce la cópula y poco después la hembra inicia la ovoposición, para lo cual

avanza entre el cambium y el floema, ya sea hacia arriba o hacia abajo del fuste del árbol, el macho sigue a la hembra y junto con ella mantiene libre de residuos y excrementos a una distancia de varios centímetros de longitud que permita el libre tránsito de ambos sexos. Una parte de la población de hembras fertilizadas puede salir del árbol infestado, volar hacia nuevos árboles, infestarlos exitosamente y continuar la ovoposición en ellos (Cibrian *et al.*, 1995).

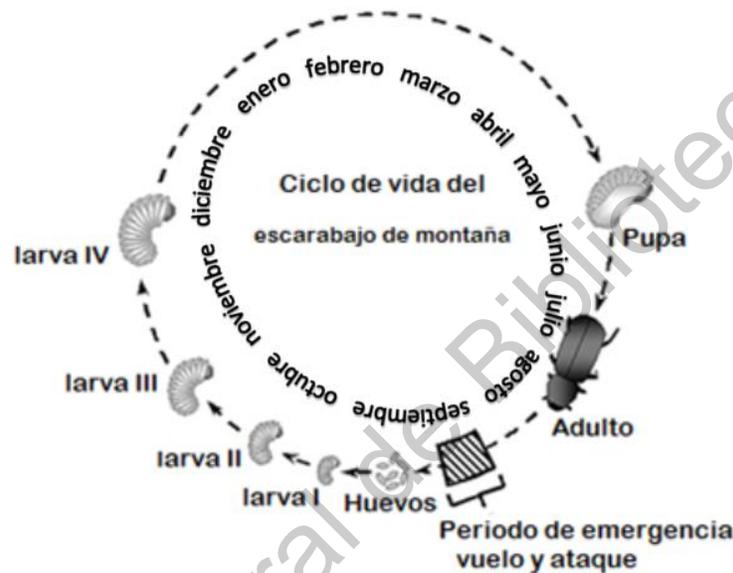


Figura 3. Ciclo de vida de escarabajos descortezadores. Tomado de www.rdos.bc.ca

2.3. Herramientas y estudios genéticos.

La variación genética o diversidad genética en un contexto general, es el componente más básico de la biodiversidad. Se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie. En años recientes, la ecología molecular se ha encargado de estudiar estas variaciones, que resultan en grandes cambios físicos, fisiológicos, etc., en los organismos. La mayoría de las poblaciones naturales poseen una elevada variabilidad genética. Sin embargo, la variabilidad observada en un determinado carácter puede atribuirse a variabilidad genética o a factores ambientales. En muchos casos se ha establecido que las

diferencias genéticas explican la variación morfológica (Fernandez de Castro, 2009; Lanteri, Loiácono, & Margaría, 2002; Piñero, 2015).

El resto de la biodiversidad se deriva de los procesos evolutivos que operan sobre esas variaciones. De ahí que su conocimiento y comprensión sea de vital importancia tanto para la conservación y el avance de la genética evolutiva (Piñero, 2015). La caracterización genética de las poblaciones naturales se ha realizado, a través de marcadores moleculares que hacen posible describir las diferencias y similitudes entre individuos, así como las interacciones entre el genotipo y el ambiente.

En 1960, una de las primeras técnicas empleadas que permitió establecer un análisis genético en poblaciones silvestres de manera rápida y con una amplia aplicación fue la electroforesis horizontal de geles de almidón (aloenzimas), en donde se procesaban proteínas. Durante mucho tiempo resultó en una herramienta fundamental para el desarrollo de los estudios sobre genética de poblaciones aplicando técnicas moleculares. Cabe señalar que la separación de moléculas mediante electroforesis es la base de la mayoría de los protocolos actuales que se especializan en la variación molecular ya sea de enzimas o de secuencias de ADN (Domínguez, 2000).

2.3.1 Reacción en cadena de la polimerasa PCR.

La Reacción en cadena de la polimerasa ha sido la principal herramienta diagnóstica que ha aprovechado las bondades de la biología molecular a tal punto de alcanzar gran valor y versatilidad como técnica de análisis debido en parte, a su adaptabilidad y aplicabilidad (Bolivar, Rojas, & Garcia-Lugo, 2014). Se trata de una reacción enzimática que conlleva a la amplificación de secuencias de ADN específico a partir de un ADN molde.

2.3.2. Secuenciación

Las secuencias de genes mitocondriales son ampliamente utilizadas en la actualidad, para realizar estudios filogenéticos de poblaciones o especies próximas (Normark & Lanteri, 1998; Sequeira, Normark, & Farrell, 2000), pues su tasa de mutación es elevada con respecto a la de otros genes (nucleares o ribosomales) y por lo tanto adecuada a los niveles específico e intraespecífico. Los genes más estudiados son los de la Citocromo Oxidasa, subunidades I y II (COI y COII). Cuando se analizan secuencias de genes mitocondriales, las unidades terminales del análisis filogenético son los haplotipos mitocondriales o variantes del ADN mitocondrial. El número de haplotipos presentes en una especie o población brinda una estimación de su diversidad genética y permite realizar inferencias sobre su historia evolutiva (Kirkpatrick, 2011).

2.3.3. El ADNmt como marcador

El ADN mitocondrial es un material genético en forma circular bicatenario cerrado localizado en el interior del mismo organelo. Puede ser de un tamaño de 16,500 pares de bases (p.b.), codifica una pequeña fracción de las proteínas mitocondriales. Este tipo de ADN contiene la información de 38 genes: 2rRNA (12S y 16S), 22tRNA y 13 genes estructurales, que codifican para diferentes complejos enzimáticos del sistema de fosforilación oxidativa: Tres subunidades de la citocromo c-oxidasa (COI, II y III) (Fig. 4).

Las proteínas restantes del ADNmt son codificadas por el DNA nuclear. Presenta tres características que lo hace muy útil en la reconstrucción de relaciones evolutivas; poliplasmia, herencia materna y elevada tasa de cambio molecular (Domínguez, 2000).

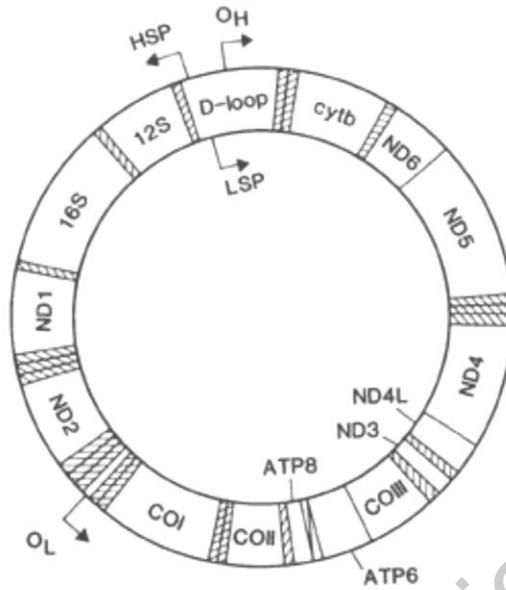


Figura 4. Esquema del genoma mitocondrial en humanos. Modificado de Fernández-Domínguez, 2005.

La poliplasmia, se refiere al elevado número de copias de ADNmt que existe en cada mitocondria y, por extensión, en la célula. En el interior de la mitocondria el ADN se encuentra unido a ciertas proteínas (binding proteins), formando un complejo denominado nucleoide. Una mitocondria puede contener entre 2 y 10 de estas estructuras, por lo que el número de copias de ADNmt por célula oscila entre 1,000 y 10,000. Tal particularidad hace muy recomendable el estudio de ADNmt en los casos en los que el material genético de partida es muy escaso o está muy degradado (Domínguez, 2000).

Se considera que el ADNmt es matrilineal, porque se transmite de forma no mendeliana por línea materna, esto se debe a que el citoplasma celular del cigoto, donde se localizan las mitocondrias, procede del ovocito. Los espermatozoides contienen un gran número de mitocondrias en la pieza media, pero raramente sobreviven a la primera división celular. De ahí se ha postulado que en el propio ovocito hay un mecanismo que reconoce y elimina las mitocondrias de origen paterno (Kaneda *et al.*, 1995; Sutovsky & Schatten, 1998). Otra explicación

podiera ser la diferencia en el número de moléculas de ADNmt de origen materno y paterno: mientras que un ovocito maduro puede llegar a contener entre 100,000 y 200,000 copias de ADNmt (Marchington, Hartshorne, Barlow, & Poulton, 1997), un espermatozoide puede contener 50 (Ankel-Simons & Cummins, 1996). Por lo tanto, aun suponiendo que todas estas moléculas, penetraran en el ovocito, su proporción respecto al mtDNA de origen materno sería ínfima (Domínguez, 2000).

La alta tasa de cambio molecular es explicada debido a que el mtDNA no está protegido por proteínas tipo histonas como el nDNA y se ve continuamente expuesto a la acción de los radicales libres generados por el metabolismo oxidativo. Además, se ha demostrado que los sistemas genéticos de reparación del mtDNA son menos eficientes que los nucleares. Los tres factores bastarían, en principio, para explicar la elevada tasa de mutación del mtDNA, pero hay que añadirles, además, la elevada susceptibilidad de este material genético a los efectos de la deriva genética, mecanismo mediante el cual las mutaciones que experimenta tienen elevada probabilidad de fijación (Wallace, 1994).

2.4. Análisis de secuencias

Los índices de diversidad proporcionan una medida de la cantidad de variación de una población, siendo especialmente útiles para realizar comparaciones entre poblaciones. Los índices más empleados en el estudio de la variabilidad del mtDNA son: el número de posiciones variables (v), el número de haplotipos diferentes (k), la diversidad genética (o haplotípica) de Nei (H), la diversidad nucleotídica (π) y el número medio de diferencias por parejas (π_n) (Martínez-Castilla, 2007).

En el caso de los haplotipos mitocondriales, las secuencias de una muestra determinada se comparan dos a dos y se calcula el número de diferencias. Por lo tanto, si existen n secuencias en la muestra será necesaria la realización de $n(n-1)/2$ comparaciones.

1)/2 de estas comparaciones. Finalmente se construye un histograma con la frecuencia observada para cada número de diferencias (Domínguez, 2000).

Además de describir la diversidad de una muestra, estas distribuciones permiten realizar inferencias acerca de la historia demográfica de las poblaciones. Se ha demostrado que los episodios de crecimiento demográfico, de declive o los cuellos de botella sufridos por una población dejan huellas características en la distribución de las diferencias por parejas. En general aquellas poblaciones con una distribución *gaussiana* de las diferencias por parejas del mtDNA han experimentado un período de crecimiento demográfico rápido a partir de una o unas pocas variantes. Por el contrario una distribución asimétrica de las diferencias por parejas es indicadora de una población cuyo tamaño ha sido constante durante largo tiempo (Rogers & Harpending, 1992).

2.5. Métodos de estimación de filogenias

Los métodos de inferencia de árboles filogenéticos se pueden clasificar en; aquellos basados en distancias y los basados en caracteres. Los primeros calculan las distancias entre cada par de secuencias de acuerdo a alguna medida predeterminada, generalmente la cantidad de disimilitud entre secuencias, y desechan los datos reales, usando únicamente las distancias fijadas para derivar los árboles. Los segundos derivan los árboles que optimizan la distribución de los patrones de datos reales para cada carácter; las distancias pareadas no son fijadas sino determinadas por la topología del árbol (pero de todas formas, dado un árbol, existe una distancia entre cada par de secuencias), y por ello se ha propuesto que sería más correcto que los métodos de distancias y los métodos de caracteres se llamaran, respectivamente, métodos de construcción de árboles y búsqueda de árboles (Martinez-Castilla, 2007).

2.5.1. Métodos basados en distancias.

Un método de distancias podría reconstruir el árbol verdadero (el que represente la serie de eventos de divergencia entre las unidades taxonómicas estudiadas en el orden en que ocurrió), si todos los eventos estuvieran adecuadamente representados en las secuencias (Brinkman, 2001). Sin embargo, al saturarse las secuencias, el grado de divergencia alcanza un límite máximo, por lo que muchos métodos basados en distancias buscan corregir esto mediante el uso de una matriz de tasas, que supone que una proporción de las identidades observadas debe de ser consecuencia de mutaciones múltiples, y que esa proporción aumenta junto con el grado de divergencia total (Swofford *et al.*, 1996).

Estas correcciones han sido incorporadas por programas de estimación de filogenias como MEGA 2.1 (Kumar, Tamura, Jakobsen, & Nei, 2001). La distancia gama representa una mejoría respecto a la corrección de Poisson al tomar en cuenta la desigualdad en las tasas de sustitución entre sitios. Los métodos de distancia son menos demandantes en poder de cálculo y mucho más rápido que los basados en máxima verosimilitud, pero apelan a los mismos modelos de evolución molecular, siendo probablemente esta su principal ventaja. La desventaja es que, para fines prácticos, los datos reales son desechados (Morrone, 2000; Brinkman y Leipe, 2001; Lewis, 2001) es decir, la información contenida en la comparación carácter por carácter se colapsa en una única medida de distancia entre cada par de secuencias (Stoneking, 1986; Torroni *et al.*, 1992; Domínguez, 2000).

2.5.2. Haplotipos.

Un haplogrupo o *cluster* mitocondrial se define como una agrupación de haplotipos que comparten ciertas sustituciones diagnósticas (definidas por enzimas de restricción o por secuenciación directa) y que presentan un origen común. Esto implica que los polimorfismos que definen cada haplogrupo se

produjeron exclusivamente en las líneas antecesoras de todos los haplotipos que lo integran. El concepto de haplogrupo fue introducido por vez primera por A. Torroni, D. Wallace y colaboradores a inicios de los 90' (Torroni *et al.*, 1992). Muchas secuencias de ADN cuentan con una alta variación molecular neutral que puede ser utilizada para reconstruir su genealogía. De acuerdo a lo anterior, el uso de secuencias para inferir procesos evolutivos en el pasado a nivel poblacional, examina la distribución de la genealogía de alelos o haplotipos en un contexto geográfico, utiliza la información histórica contenida en los genes y caracteriza la subdivisión de poblaciones ya que reconoce patrones geográficos de la estructura genealógica a lo largo del rango de distribución de una especie (Eguiarte *et al.*, 2007).

A nivel poblacional es preferible el uso de redes de haplotipos en lugar de árboles filogenéticos, ya que la inferencia cladística de relaciones filogenéticas requiere que las variantes genéticas no formen linajes reticulados (Schaal, Hayworth, Olsen, Rausher, & Smith, 1988). Las genealogías trazan las relaciones evolutivas entre haplotipos o alelos (Schaal, Gaskin, & Caicedo, 2003) que permiten reconstruir los procesos evolutivos con los principios de la coalescencia (Eguiarte *et al.*, 2007).

Por ejemplo, se predice que una población que se ha estado expandiendo va a presentar una filogenia en forma de estrella (Avice, 2000). En el análisis de Templeton *et al.* (1995), se reconstruyen redes de haplotipos que se unen en clados anidados con el programa TCS (*phylogenetic network estimation using statistical parsimony*; Clement *et al.*, 2000). Este algoritmo de anidamiento agrupa haplotipos y después clados, dependiendo del número de cambios mutacionales, separándolos paso a paso hasta que todos los haplotipos o clados quedan agrupados y unidos en grupos de uno, dos o más pasos mutacionales, donde el último nivel de anidamiento comprende la red entera (Templeton, Boerwinkle, & Sing, 1987). La relación entre haplotipos/clados y la geografía se puede examinar a través de un análisis estadístico llamado de permutaciones.

En los últimos años el interés por las especies consideradas como plaga ha aumentado, la información que proporcionan es indispensable para determinar el manejo de los bosques de acuerdo a cada especie registrada. La variación genética es una herramienta que se ha estudiado poco y también ha evolucionado con el tiempo.

El estudio genético de escarabajos descortezadores empezó con el empleo de isoenzimas, el trabajo de (Langor & Spence, 1991), fue uno de los primeros estudios en donde se hizo la observación de las primeras colonizaciones tempranas y la superposición de generaciones de escarabajos, para determinar la variación genética emplearon isoenzimas y analizaron la relación con el hospedador de las poblaciones de *D. ponderosae*. Reportaron que observaron niveles relativamente altos de diferenciación genética, en la frecuencia alélica, entre los escarabajos de diferentes sitios, especies hospederas, estaciones y árboles individuales de la misma especie dentro de un sitio. Atribuyéndolo a la supervivencia al azar en lugar de atribuirlo a un genotipo de escarabajos que prefiera a cierto tipo de hospedero.

También realizaron un análisis estandarizado discriminante de 12 caracteres morfológicos que indicaron diferencias significativas en la forma del escarabajo entre sexos, especies hospedantes y entre sitios. Concluyendo en el estudio hubo poca evidencia de selección preferencial de hospedante por parte de los escarabajos, lo que implicaría la subestructuración de las poblaciones de *Dendroctonus ponderosae* Hopkins según las líneas de hospedantes.

La información para las explicaciones ecológicas en cuanto a la prevalencia de los descortezadores especialistas en recursos son abundantes, mientras que las pruebas filogenéticas sobre sus orígenes son escasas por lo que Kelley y Farrell, (1998), hicieron una comparación filogenética entre 19 especies de escarabajos especialistas o generalistas mediante ADN mitocondrial amplificando por PCR un fragmento del gen Citocromo Oxidasa I, encontrando que la evolución

de las afiliaciones con hospederos de *Pinus* y *Picea* en las especies estudiadas fue conservadora entre las especies de escarabajos, pero no hubo una correlación significativa entre la filogenia de estos escarabajos y la de sus hospederos de *Pinaceae*. Por otro lado, la evolución de la especialización en *Dendroctonus* demostró que los especialistas eran altamente lábiles y se separaron de los generalistas por lo menos seis veces (sin inversión), todos en posiciones derivadas, y un examen más detenido de algunos especialistas reveló casos en los que parecían haber perdido determinadas especies huéspedes de su dieta. Sin embargo, la evidencia de la literatura ecológica también sugiere que varios generalistas de *Dendroctonus* pueden haber aumentado el rango de los géneros hospedantes dentro de las Pináceas.

Posteriormente se observó una relación entre los cambios de temperatura y las explosiones de poblaciones de escarabajos *Dendroctonus ponderosae* a lo largo de su área de distribución en Canadá, por lo que Mock *et al.*, (2006) realizaron un estudio, para determinar si existía alguna diferenciación a lo largo de Canadá, así como, determinar si existían diferencias genéticas detectables entre las poblaciones de *D. ponderosae*, ocupando diferentes árboles huéspedes en localidades comunes y analizaron la existencia de una firma molecular, que confirmara la expansión demográfica en todo el rango de distribución.

El estudio lo realizaron mediante una combinación de secuenciación de ADN mitocondrial y AFLP (amplified fragment length polymorphism), colectaron ejemplares en zonas infestadas y también colocaron trampas tipo Lindgren con atrayente, almacenaron en alcohol al 95% y en laboratorio los congelaron. Utilizaron de 2 a 3 ejemplares por cada población que fueron usados como replicas. Para los análisis con AFLP utilizó 7 combinaciones de primer's. Para el análisis de las secuencias se evaluaron mediante la estimación del haplotipo diversidad; diversidad de nucleótidos (π), número de sitios segregados (S); y el número promedio de diferencias de nucleótidos (k) usando el software DNAsp versión 4.10.3 entre otros.

Los resultados que obtuvieron sugieren que el patrón geográfico del flujo genético sigue la distribución central del principal *D. ponderosae*, alrededor de los desiertos de la Gran Cuenca y del Mojave en lugar de a través de ellos. También encontraron que los patrones de diversidad y divergencia de haplotipos fueron consistentes con una población en expansión en toda la zona, esta señal fue pronunciada en la parte norte donde la actividad de los brotes estaba en aumento. En cuanto a los marcadores AFLP, fueron incapaces de detectar diferencias significativas entre grupos de insectos muestreados de diferentes árboles hospederos en lugares comunes.

En México Zúñiga *et al.*, (2006) también estudiaron la estructura genética basada en el hospedero de las poblaciones de *Dendroctonus mexicanus* en el eje neovolcánico transversal (TMVB). Se analizaron doce loci génicos por electroforesis con isoenzimas en 17 poblaciones encontradas en pinos de (*Leiophyllae*). Las relaciones genéticas entre las poblaciones, se establecieron mediante el método Neighbour-Joining y el análisis de componentes principales, utilizando las distancias genéticas de Nei. La fiabilidad del dendrograma se evaluó mediante el análisis bootstrap y el coeficiente de correlación mediante el uso de la prueba de Mantel.

Los resultados mostraron que la heterocigosidad de *D. mexicanus* es similar a la de otros escolítidos. También encontraron que una alta proporción de loci estaba fuera de Equilibrio Hardy Weinberg por exceso de homocigoto, lo que puede explicarse por múltiples factores. El escaso número de alelos fijos, el patrón de variación del alelo, las distancias genéticas por pares y las estadísticas F sugirieron un modelo de aislamiento por distancia para *D. mexicanus* en la TMVB como resultado de eventos recientes de dispersión.

Anducho-Reyes, Cognato, Hayes, & Zúñiga, 2008, examinaron el patrón de variación genética a través del rango de distribución en México y así evaluar la

historia demográfica y patrón filogeográfico. Tuvieron como resultado un alto número de haplotipos y baja diversidad de nucleótidos y la D de Tajima indicó que *D. mexicanus* experimentó una rápida expansión de la población durante su dispersión a través de los sistemas montañosos dentro de su rango actual. También observaron eventos de aislamiento entre haplotipos provenientes del Cofre de Perote/Cinturón Volcánico Trans-Mexicano/Sierra Madre Oriental y el Cinturón Volcánico Trans-Mexicano/Sierra Madre del Sur, lo cual es consistente con la actual conformación de los sistemas montañosos en México y el surgimiento de barreras geográficas durante el Pleistoceno.

III OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar la variabilidad genética entre poblaciones de *Dendroctonus mexicanus*, procedentes de tres regiones de México.

3.2 Objetivos específicos

- Analizar la variación entre poblaciones de *D. mexicanus* de tres regiones de México mediante el gen Citocromo Oxidasa I.
- Determinar y analizar los patrones de distribución presentes en las poblaciones estudiadas.
- Analizar las relaciones filogenéticas intra e interespecíficas
- Determinar las diferentes relaciones evolutivas que existen entre las poblaciones entre regiones.

IV. METODOLOGÍA

4.1. Zona de estudio

Se realizó un muestreo específico mediante el uso de semioquímicos (feromonas + kairomonas) ya que son sustancias químicas conductuales (Macías y Niño, 2016), que ayudaron en la selección de los ejemplares. La colecta se realizó en los estados de Durango, Nuevo León, Jalisco, Querétaro, Hidalgo y Oaxaca con el objetivo de representar las principales zonas montañosas en México (Fig. 5).

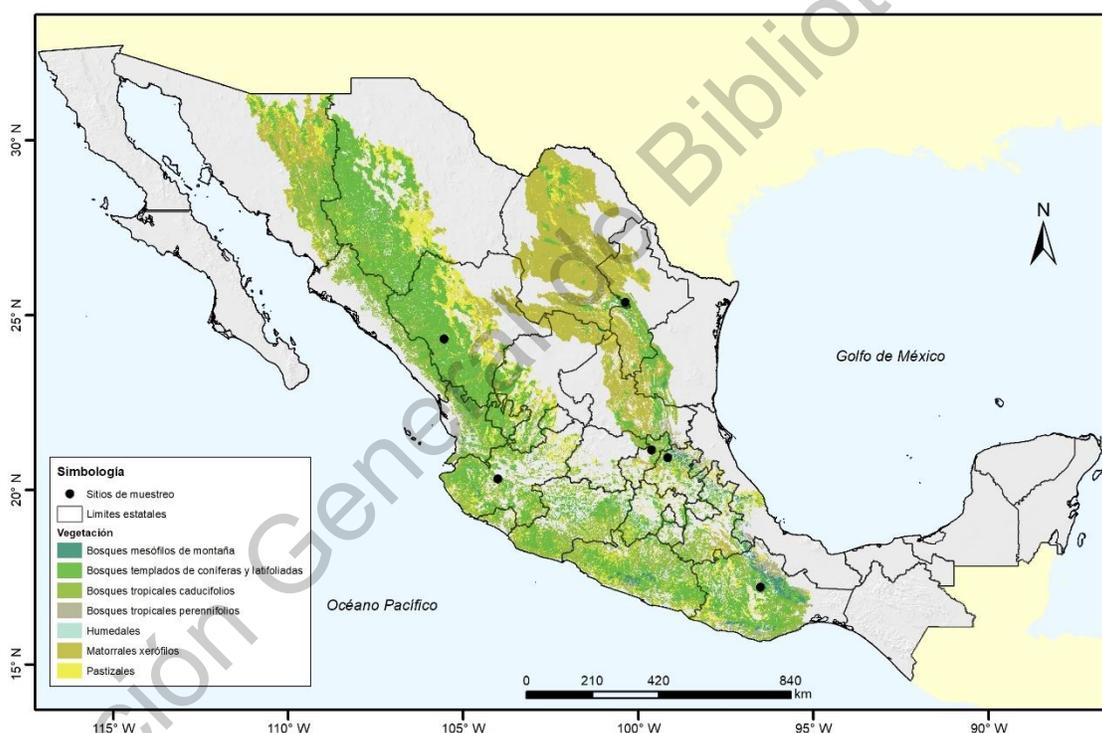


Figura 5. Mapa de la ubicación de los sitios de muestreo. Dioseline Girón Gutiérrez.

El muestreo se llevó a cabo mediante trampas tipo Lingren® con atrayentes semioquímicos, estas trampas funcionan mediante una columna de 8 embudos que contienen en medio una bolsa con atrayentes compuestos por Kairomonas y feromonas las cuales se reemplazaron cada mes, al final de esta columna se colocó un vaso colector con anticongelante para evitar el maltrato de los

ejemplares. Las trampas fueron colocadas en árboles no hospederos para evitar invasiones no deseadas.

4.2. Identificación taxonómica de insectos

Los insectos colectados se analizaron en el Laboratorio de Entomología de la Universidad Autónoma de Querétaro, donde se identificaron con el uso de claves específicas para *Dendroctonus* (Wood, 1982, Cibrian *et al.*, 1995) (Fig.6). Una vez identificados los ejemplares fueron debidamente etiquetados y almacenados en frascos con alcohol al 70% (Fig.7).



Figura 6. Ejemplares identificados.



Figura 7. Almacenamiento de los ejemplares.

4.3. Extracción de ADN

Los ejemplares fueron lavados con agua libre de nucleasas y fueron macerados. Para la maceración, se colocaron de 8 a 10 insectos en un tubo tipo eppendorf y 5 perlas de cerámica, más 50 µl de agua libre de nucleasas estéril. Los tubos fueron colocados en un homogenizador de tejidos y se sometieron a 3 ciclos de 4000 rpm durante 30 segundos con descanso de 15 segundos entre ciclos. El macerado se sometió a las indicaciones del Kit de extracción de ADN Analytik Jena®. Se cuantificó la calidad del ADN obtenido mediante un espectrofotómetro Nanodrop de la marca Leica®.

4.4. PCR

Se realizó la técnica de PCR para la determinación del gen citocromo Oxidasa I buscándose un fragmento de 246pb, se prepararon reacciones con un volumen final de 50 µl, utilizando oligonucleotidos y especificaciones de Anducho-Reyes *et al.*, (2014).

Cuadro 1. Componentes de la reacción para PCR.

<i>Componentes</i>	<i>Concentración</i>	<i>Cantidad p/ Vol. F 50µl</i>
<i>Buffer 10x</i>	1x	5µl
<i>DNTP'S</i>	150µM	.75µl
<i>MgCl₂</i>	2.5Mm	2.5µl
<i>TAQ Polimerasa</i>	1.5 U	0.6µl
<i>Agua Libre de nucleasas</i>	---	39.14µl
<i>Primer's</i>	0.1 µM	0.5µl

Se corrieron 35 ciclos bajo las siguientes condiciones (Cuadro 2). Después de la amplificación, se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con los productos de PCR, para la confirmación del tamaño del fragmento deseado. Posteriormente se purificaron con el kit de purificación de productos de PCR de la marca Zymo®.

Cuadro 2. Ciclos utilizados en termociclador.

Temperatura	Tiempo
95°C	5 minutos (desnaturalización)
95°C	30 segundos
51°C	1 minuto
72°C	45 segundos
72°C	10 minutos (extensión final)

Se corrieron 35 ciclos bajo las siguientes condiciones (Cuadro 2). Después de la amplificación, se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con los productos de PCR, para la confirmación del tamaño del fragmento deseado. Posteriormente se purificaron con el kit de purificación de productos de PCR de la marca Zymo ®.

4.5. Secuenciación

Se enviaron 30µl de producto de PCR purificado en microtubos etiquetados, así como 100µl de cada primer (dmex685 y dmex1048). Las secuencias de los fragmentos fueron obtenidas con el método de secuenciación capilar con terminadores fluorescentes en secuenciadores 3730XL por la empresa canadiense BioBasic INC.

4.6. Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante el software de licencia libre Chromas 2.6.5 ©Technelysium (Fig.8). Mediante este programa en cada secuencia obtenida por el primer forward fue buscada la secuencia del primer para la ubicación del mismo en el cromatograma del primer reverse, después de esto en la secuencia del primer reverse se construyó la secuencia reverso complementario, al igual que a la secuencia del primer. Posteriormente las dos secuencias fueron comparadas para verificar que las bases detectadas fueran la misma y que cada una de ellas tuviera buena calidad en su señal, estos

resultados se corroboraron con los resultados obtenidos por la plataforma GALAXY (licencia a cargo de la Universidad de Pennsylvania).

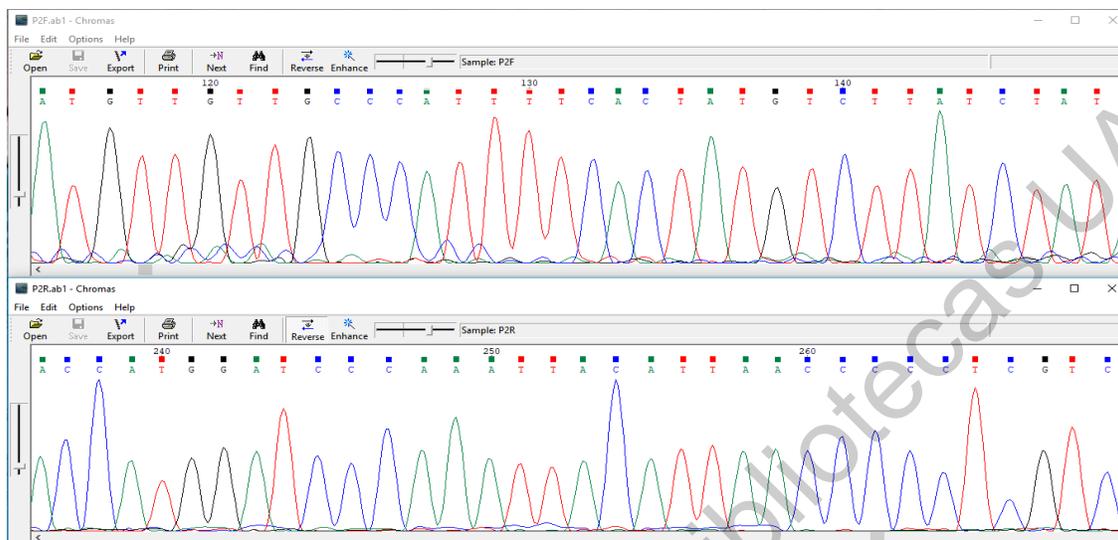
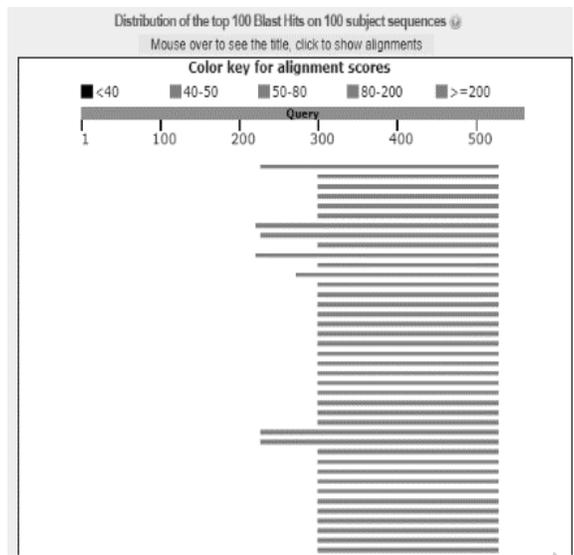


Figura 8. Impresión del proceso de análisis para limpieza de secuencias obtenidas con software Chromas.

Se realizó una búsqueda, para verificar que la secuencia obtenida corresponde a las secuencias establecidas en las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology information) (Fig.9).

Se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas con secuencias de *D. ponderosae* como grupo externo con el método MUSCLE (Multiple Sequence Comparis by Long-Expectation) (Fig. 10).



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Dendroctonus mexicanus cytochrome oxidase I (COI) gene, mitochondrial gene encoding mitochondrial protein, partial cds	470	470	53%	3e-128	95%	AF067988.1
Dendroctonus mexicanus isolate VER11 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	412	412	40%	5e-111	99%	DQ022214.1
Dendroctonus mexicanus isolate VER1 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	407	407	40%	2e-109	99%	DQ022216.1
Dendroctonus mexicanus isolate VER7 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	407	407	40%	2e-109	99%	DQ022215.1
Dendroctonus mexicanus isolate VER4 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	401	401	40%	1e-107	98%	DQ022218.1
Dendroctonus mexicanus isolate VER5 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	401	401	40%	1e-107	98%	DQ022217.1
Dendroctonus frontalis haplotype 02 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds, mitochondrial	385	385	54%	1e-102	89%	KC855257.1
Dendroctonus frontalis haplotype 01 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds, mitochondrial	379	379	53%	5e-101	89%	KC855256.1
Dendroctonus mexicanus isolate VER13 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	379	379	40%	5e-101	97%	DQ022219.1
Dendroctonus frontalis isolate H114 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial gene for mitochondrial product	379	379	54%	5e-101	89%	AF067986.2
Dendroctonus mexicanus isolate OPO1 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	374	374	40%	2e-99	96%	DQ022229.1
Dendroctonus vitiei cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	368	368	45%	1e-97	93%	KT364538.1
Dendroctonus mexicanus isolate CAR10 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	368	368	40%	1e-97	96%	DQ022225.1
Dendroctonus mexicanus isolate ZAR2 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	368	368	40%	1e-97	96%	DQ022224.1
Dendroctonus mexicanus isolate ZAR1 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	368	368	40%	1e-97	96%	DQ022222.1
Dendroctonus mexicanus isolate BOC5 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds, mitochondrial	363	363	40%	5e-96	95%	DQ022280.1

Figura 9. Blast de secuencias en NCBI.

M7: Alignment Explorer (alin_muscl_sin_oax14_oax15yn148.fas)

Data Edit Search Alignment Web Sequencer Display Help

DNA Sequences Translated Protein Sequences

Species/Abbrv	Group Name	Sequence
1. D.ponderosae1		GCTACATATCATGGATCTCAAATTACATTAACCTCCCTGCTCCCTTTGAGCTATTGGATTATTTTTCTTTTACTTTAGGGGGATTAACA
2. D.ponderosae2		GCTACATATCATGGATCTCAAATTACATTAACCTCCCTGCTCCCTTTGAGCTATTGGATTATTTTTCTTTTACTTTAGGGGGATTAACA
3. Jalisco		GCTACATATCCATGGATCCCAAATTACATTAACCCCTGGTCTTTATGGGCTATTGGATTATTTTTTATTTACTATGGGGGGTTAAACA
4. Queretaro		GCTACATATCCATGGATCCCAAATTACATTAACCCCTGGTCTTTATGGGCTATTGGTTTCATTTTTTATTTACTATGGGGGGTTAAACT
5. N.Leon54		GCTACATATCCATGGATCCCAAATTACATTAACCCCTGGTCTTTATGGGCTATTGGTTTCATTTTTTATTTACTATGGGGGGTTAAACT
6. N.Leon53		GCTACATATCCATGGATCCCAAATTACATTAACCCCTGGTCTTTATGGGCTATTGGTTTCATTTTTTATTTACTATGGGGGGTTAAACT
7. N.Leon49		GCTACATATCCATGGATCCCAAATTACATTAACCCCTGGTCTTTATGGGCTATTGGTTTCATTTTTTATTTACTATGGGGGGTTAAACT
8. Oaxaca47		GCTACATATCCATGGATCCCAAATTACATTAACCCCTGGTCTTTATGGGCTATTGGTTTCATTTTTTATTTACTATGGGGGGTTAAACT
9. N.Leon46		GCTACATATCCATGGATCCCAAATTACATTAACCCCTGGTCTTTATGGGCTATTGGTTTCATTTTTTATTTACTATGGGGGGTTAAACA
10. N.Leon44		GCTACATATCCATGGATCCCAAATTACATTAACCCCTGGTCTTTATGGGCTATTGGTTTCATTTTTTATTTACTATGGGGGGTTAAACT
11. N.Leon43		GCTACATATCCATGGATCCCAAATTACATTAACCCCTGGTCTTTATGGGCTATTGGTTTCATTTTTTATTTACTATGGGGGGTTAAACT
12. Oaxaca14		GCTACATATCCATGGATCCCAAATTACATTAACCCCTGGTCTTTATGGGCTATTGGTTTCATTTTTTATTTACTATGGGGGGTTAAACT
13. Durango26		GCTACATATCCATGGATCCCAAATTACATTAACCCCTGGTCTTTATGGGCTATTGGTTTCATTTTTTATTTACTATGGGGGGTTAAACT
14. Durango23		GCTACATATCCATGGATCCCAAATTACATTAACCCCTGGTCTTTATGGGCTATTGGTTTCATTTTTTATTTACTATGGGGGGTTAAACT
15. Durango22		GCTACATATCCATGGATCCCAAATTACATTAACCCCTGGTCTTTATGGGCTATTGGTTTCATTTTTTATTTACTATGGGGGGTTAAACT
16. Durango21		GCTACATATCCATGGATCCCAAATTACATTAACCCCTGGTCTTTATGGGCTATTGGTTTCATTTTTTATTTACTATGGGGGGTTAAACT
17. Oaxaca17		GATACATATCCATGGATCCCAAATTATTTAAACCCCTGCTTTATGAGCTATTGGATTATTTTTTATTTACTATAGGGAGGATTAACA
18. Oaxaca16		GCTACATATCCATGGATCCCAAATTACATTAACCTTTCTTTATGAGCTATTGGATTATTTTTTATTTACTATAGGGAGGATTAACA
19. Oaxaca12		GCTACATATCCATGGATCCCAAATTACATTAACCCCTGGTCTTTATGGGCTATTGGTTTCATTTTTTATTTACTATGGGGGGTTAAACT
20. N.Leon8		GCTACATATCCATGGATCCCAAATTACATTAACCCCTGGTCTTTATGGGCTATTGGTTTCATTTTTTATTTACTATGGGGGGTTAAACT
21. N.Leon2		GCTACATATCCATGGATCCCAAATTACATTAACCCCTGGTCTTTATGGGCTATTGGTTTCATTTTTTATTTACTATGGGGGGTTAAACT

Figura 10. Alineamiento de secuencias mediante MUSCLE en el programa MEGA7.

Para construir las relaciones filogenéticas de las secuencias obtenidas, primero se hizo la evaluación del método evolutivo que mejor describe el patrón de sustitución de bases a lo largo del tiempo, utilizando el estadístico de Máxima similitud, para esto el alineamiento se analizó con el software JModelTest 1.2.7, que utiliza el criterio AKAIKE (Fig.11).

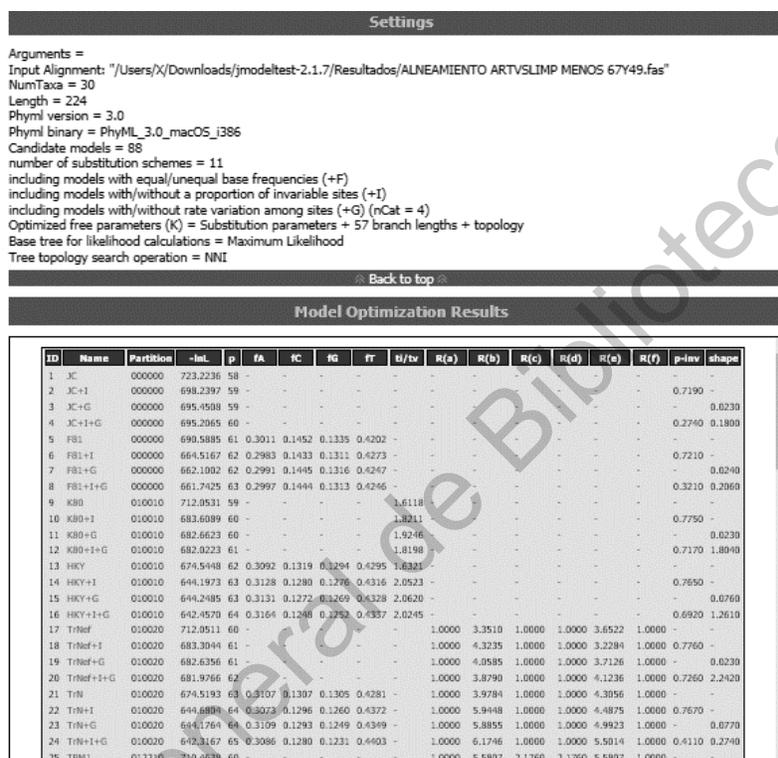


Figura 11. Resultados del programa JModelTest 1.2.7.

Una vez obtenido el método óptimo de análisis se construyó un árbol filogenético mediante el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA7). Se elaboró un mapa de haplotipos para confirmar la información del árbol con el programa Populations Analysis with Reticulate Trees (PopART 1.7).

V RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Extracción de ADN

Se obtuvieron un total de 100 muestras de ADN, de las cuales solo 26 fueron aptas para la amplificación del gen COI y de estas solo 19 pudieron ser secuenciadas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Muestras que fueron secuenciadas.

No. Muestra	Lugar de colecta	Concentración (ng/μl)	Pureza (260/280)
2	Nuevo León	350	1.9
8	Nuevo León	680	1.9
12	Oaxaca	200	1.7
14	Oaxaca	86	2.07
16	Oaxaca	25.6	2
17	Oaxaca	26	2
21	Durango	386	2
22	Durango	475	2
23	Durango	266.2	1.96
26	Durango	135.9	2.1
43	Nuevo León	574.1	2
44	Nuevo León	745.5	1.99
46	Nuevo León	416.1	2
47	Oaxaca	47.4	1.8
49	Nuevo León	987.37	2
53	Nuevo León	228.7	2
54	Nuevo León	942.6	2
57	Querétaro	242.5	1.9
62	Jalisco	304	2

Se hicieron pruebas con diferentes primer's, los primeros en utilizarse fueron los primer's universales diseñados por (Simon *et al.*, 1994) (Fig.12). Estos fueron diseñados específicamente para insectos fitófagos TL9192 y CJN2191, se realizaron 12 PCR's con las 50 muestras de ADN y no hubo resultados positivos. Cabe señalar que dentro de estas 50 muestras se encontraban muestras de *D. frontalis* y *D. mexicanus*.

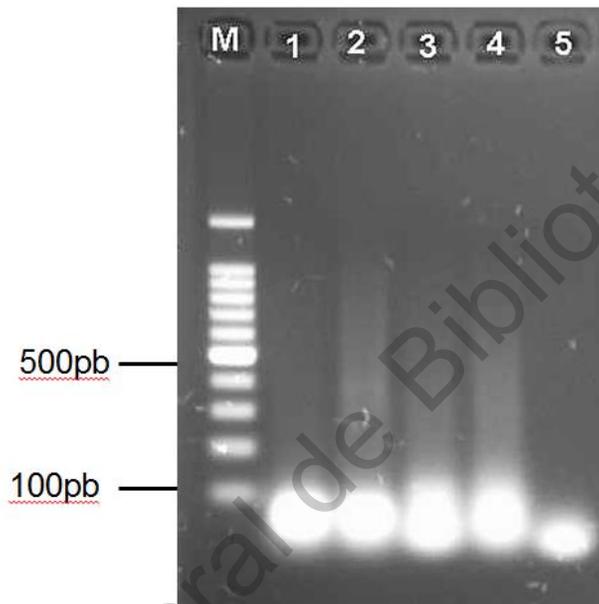


Figura 12. PCR utilizando primer's universales M) Marcador de peso molecular 1 y 2) *D. mexicanus*, 3y4) *D. frontalis*, 5) Control negativo.

Posteriormente se usaron los primer's diseñados por (Anducho-Reyes *et al.*, 2008), así como las condiciones de ciclado, los cuales arrojaron resultados favorables en la mayoría de las muestras de ADN (Fig.13).

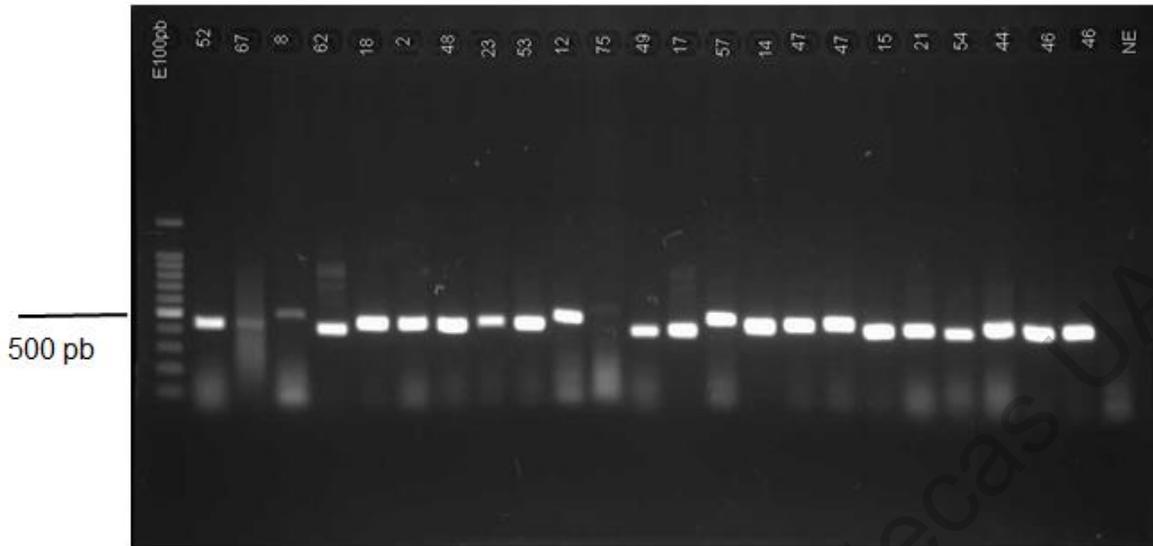


Figura 13. Resultados de PCR con primer`s dmex 685 y dmex1048. E100pb) Marcador de peso molecular de 100-1000pb. 52-46) *D.mexicanus*.

5.2. Secuenciación

De las 50 muestras de ADN procesadas (*D. frontalis* y *D.mexicanus*) solo 26 pudieron ser enviadas a secuenciar (*D.mexicanus*), los criterios para la eliminación de muestras de ADN fueron: 1.- En la muestra no hubo amplificación de fragmento requerido y 2.- La calidad de la amplificación no era buena, presentaban una degradación muy marcada (barrido) o presentaban bandas inespecíficas (diferente peso molecular al esperado) (Fig.14).

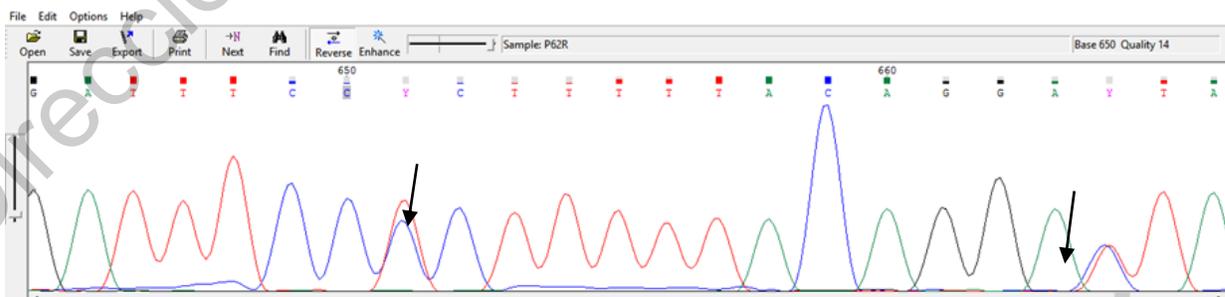


Figura 14. Fallas en las secuencias señales confusas.

5.3. Análisis de secuencias

De las 26 secuencias (pm 400 pb) obtenidas se eliminaron 2 debido a que no se obtuvieron las secuencias con un primer lo que dificultaba el análisis y lo hace poco confiable posteriormente se eliminaron 4 secuencias más por que presentaban anomalías como señales dobles, y al momento del análisis BLAST no concordaban con la especie con la que estaba identificada.

5.4. Análisis del modelo para construcción de filogenia.

Los programas JModelTest y MEGA arrojaron que el modelo Tamura 3-Parameter, con una distribución G (gamma) de acuerdo al criterio BIC (criterio de información bayesiano) y Hasegawa –Kshyno con distribución G+I de acuerdo al AIC (Criterio de información de Akaike) (Cuadro 3). Los índices AIC y BIC (Criterio de información de Akaike y criterio de información bayesiano, respectivamente) son dos criterios de uso frecuente para la selección de modelos. El AIC fue propuesto por Akaike (1974) como un estimador insesgado asintótico de la información esperada, entre un modelo candidato ajustado y el verdadero modelo. El BIC fue derivado por Schwarz en 1978, como una aproximación, a una transformación de la probabilidad posterior de un modelo candidato (Montesinos, 2011).

Cuadro 4. Modelos evaluados para el análisis evolutivo de las secuencias, resultado de MEGA7.

Model	BIC	AICc	lnL	Gamma	R
T92+G	2533.6867	2204.3419	-1053.8398	0.274882	1.6001251
T92+I	2538.2757	2208.9309	-1056.1343	n/a	1.545816
T92+G+I	2539.05881	2202.8665	-1052.0883	0.466821	1.6065418
HKY+G	2543.62933	2200.5902	-1049.936	0.280488	1.5644192
HKY+I	2548.70168	2205.6625	-1052.4722	n/a	1.4891901
HKY+G+I	2548.9815	2199.096	-1048.1745	0.482175	1.5710736
TN93+G	2552.05777	2202.1723	-1049.7126	0.283098	1.5810143
TN93+G+I	2557.36129	2200.6301	-1047.9268	0.479206	1.5872946
TN93+I	2557.44865	2207.5632	-1052.4081	n/a	1.4882074
GTR+I	2571.51534	2201.0944	-1046.1287	n/a	1.4895712
GTR+G	2572.60882	2202.1878	-1046.6754	0.297968	1.3971205
GTR+G+I	2577.07223	2199.8072	-1044.4696	0.537969	1.4203432
T92	2591.57155	2269.0748	-1087.2198	n/a	1.2793697
HKY	2600.42761	2264.2353	-1082.7727	n/a	1.2820643
K2+G	2607.14573	2284.6489	-1095.0069	0.319365	1.3627634
TN93	2608.15733	2265.1182	-1082.2	n/a	1.2857552
K2+I	2613.99219	2291.4954	-1098.4301	n/a	1.3461733
K2+G+I	2615.24738	2285.9026	-1094.6202	0.507838	1.3677498
JC+G	2628.65219	2313.004	-1110.1977	0.329838	0.5
GTR	2630.26989	2266.6935	-1079.9435	n/a	0.975292
JC+I	2632.39249	2316.7443	-1112.0679	n/a	0.5
JC+G+I	2634.50444	2312.0077	-1108.6863	0.509757	0.5
K2	2656.5529	2340.9047	-1124.1481	n/a	1.2598805
JC	2673.90538	2365.1064	-1137.2619	n/a	0.5

HKY: Hasegawa-Kishino-Yano; TN93: Tamura-Nei; T92: Tamura 3-parameter; K2: Kimura 2-parameter; JC: Jukes-Cantor. BIC: Índice de criterio bayesiano, AIC: Criterio de información de Akaike.

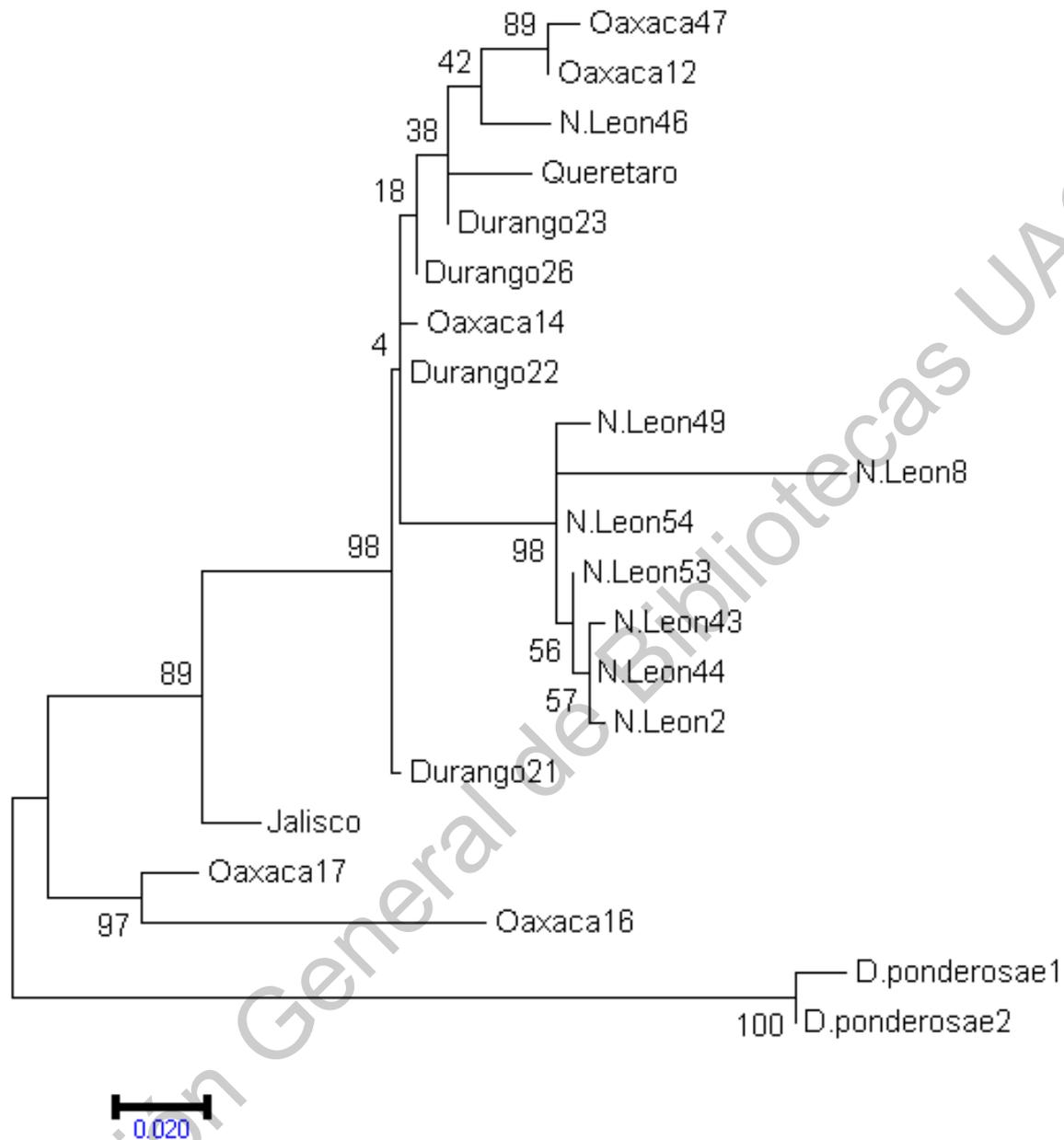


Figura 15. Árbol filogenético molecular mediante el método de máxima verosimilitud de acuerdo al modelo Tamura 3 parámetros con distribución gamma.

Los árboles iniciales para la búsqueda heurística, se obtuvieron automáticamente aplicando los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque Maximum Composite Likelihood (MCL) y luego seleccionando la topología con un valor de verosimilitud log superior. Se usó una distribución de Gamma discreta para modelar las diferencias de velocidad

evolutivas entre sitios (5 categorías (+ G, parámetro = 0.2744). El árbol está dibujado a escala, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 21 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían lagunas y datos faltantes. Hubo un total de 298 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo en MEGA7.

Se puede observar, que las secuencias se agrupan de acuerdo a la región de donde pertenecen, a excepción de la secuencia de Durango 22 y Nuevo León 46. Sin embargo existe un nodo que presenta un valor estadístico de 4, el cual representa un porcentaje bajo, lo que provoca una baja confianza en el nodo, esto es mencionado por Morrone (2000), en donde describe que “bootstrap” es el estadístico que se utiliza para determinar la confianza en la construcción en un árbol el cual elimina al azar la mitad de los caracteres de una matriz, para obtener el cladograma más parsimonioso, este proceso se repite normalmente 100 veces y el número de veces en el que el nodo se presentó de la misma manera, es el porcentaje que aparece en cada rama, de esta manera, si una rama tiene un valor de 50 quiere decir que es confiable. Cabe señalar que en el presente trabajo se realizó un bootstrap de 1,000 repeticiones y aun así el nodo presentó un valor más bajo por lo que se optó por descartar el primer modelo (Tamura de 3 parámetros con distribución gamma). Esta situación, también fue observada por Anducho-Reyes *et al.*, 2014. En donde debido a los problemas de valores bajos en los nodos, cambiaron de modelo estadístico hasta que encontraron uno que se adecuaba mejor a sus muestras.

Se realizó un análisis con el modelo Hasegawa-Kishino Yano, con una distribución en el que se aplicaron 10,000 repeticiones, para determinar valores más estables. Se muestra el árbol consenso debido a que resuelve los conflictos que existen entre los nodos problemáticos (con valores pequeños) es decir; produce un árbol compuesto que es un consenso entre todos los árboles, en el que todos los patrones de ramificación en conflicto entre los árboles se resuelven,

por hacer que esos nodos, se multipliquen o como un consenso de la regla de mayoría, en el cual los patrones de ramificación se resuelven seleccionando el patrón visto en más del 50% de los árboles (Nei y Kumar, 2000).

En la figura 10 se observa que las relaciones entre las muestras obtenidas de Durango y Oaxaca no pueden ser resueltas, por otro lado, las secuencias de Nuevo León se encuentran separadas en un grupo más sólido, sin embargo, existe una distancia marcada entre ellas y la secuencias Nuevo León 46. Para confirmar esta divergencia se consultó el árbol mejor representativo (Fig.11) en donde esta distancia se conserva, en este mismo árbol puede observarse que la rama exterior de la secuencia Nuevo León 46 es larga, con respecto a las demás, indicando que existe algún grado de diferenciación como lo explica (Salas-Lizana, 2013), la cantidad de variación esperada en un población que ha crecido o se ha expandido recientemente, se reconoce en la topología de su genealogía, por lo que se espera que la mayor parte de mutaciones se lleven a cabo en las ramas externas, provocando que estas sean largas y muy pocas en las ramas internas ocasionando ramas cortas.

Por otro lado cuando una población diverge en un pasado antiguo, se espera que los linajes principales coincidan con su origen geográfico, sin embargo, cuando no obedecen a esta generalidad el evento es conocido como migración, el cual se refiere a un proceso de transferencia de alelos de una población a otra, lo que puede resultar en cambios en las frecuencias génicas (Hey & Machado, 2003), lo anterior, puede explicar lo obtenido para las secuencias de Durango, Oaxaca y Nuevo León 46, las cuales presentan un patrón diferente aun utilizando diversos modelos. Sin embargo, en estos casos es difícil distinguir con base en la topología de los árboles, qué parte de los alelos que aparecen en la rama, no corresponden a esta o provienen de migración y cuáles son el resultado del sorteo incompleto de linaje (Salas-Lizana, 2013).

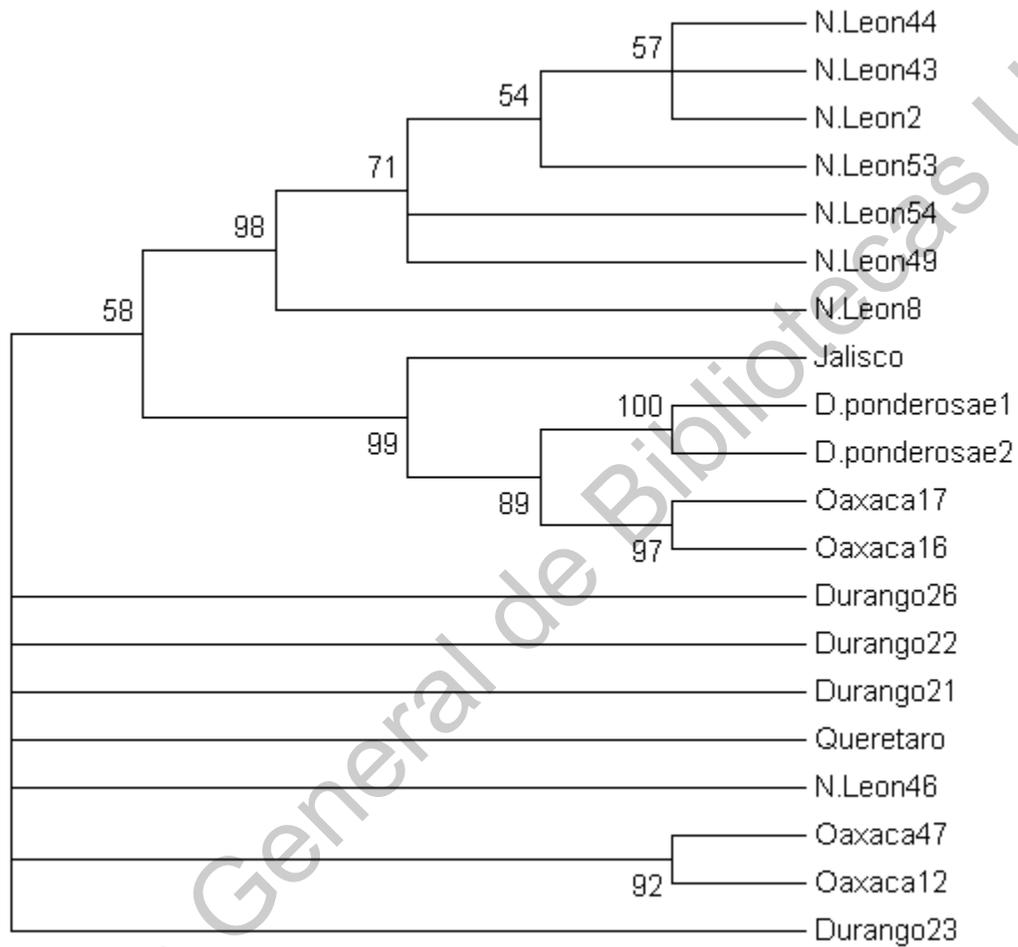


Figura 16. Árbol consenso construido mediante el método de máxima verosimilitud mediante el modelo Hasegawa-Kishino Yanno con 10,000 repeticiones.

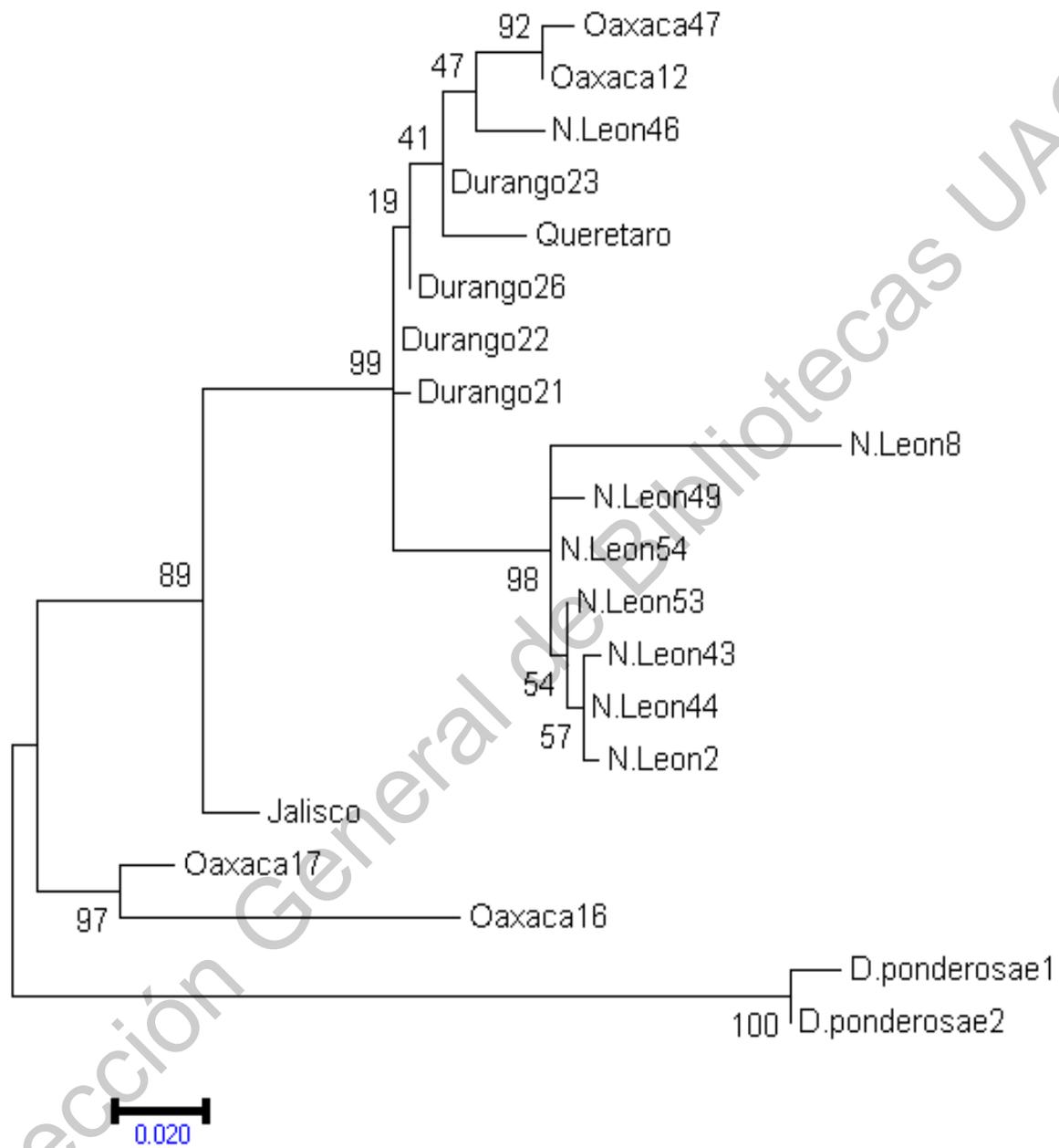


Figura 17. Árbol mejor representativo estimado mediante el método de máxima verosimilitud con 10,000 repeticiones.

Para determinar la diversidad, se usó el estimador D'Tajima, con un resultado de -1.00027, aún cuando este resultado es negativo no es significativo

estadísticamente, esto pudiera deberse probablemente al bajo número de secuencias analizadas.

5.5. Red de haplotipos

Se realizó un mapa de haplotipos con las 19 secuencias analizadas en el presente trabajo, mediante un análisis de clados anidados (NCA), para determinar patrones de subpoblaciones (Fig.12), en donde no se muestra algún patrón específico, que pueda indicar algún fenómeno de anidación, sin embargo, se puede inferir, que los haplotipos encontrados son relativamente recientes, de acuerdo con Herrera & Ramos, 2015. Los nodos exhibidos en una red de haplotipos que tienen una conexión, están unidos a otros similares, dado que han evolucionado recientemente y por lo tanto, no han tenido el tiempo suficiente para mostrar una dispersión. Otro punto particular en el comportamiento de estas poblaciones es que se observan algunas agrupaciones de secuencias por regiones, como es el caso de Nuevo León que presenta una separación de 6 bases de diferencia con Durango 23. Por otro lado la muestra Nuevo León 49 es marcadamente aislada de la muestra Nuevo León 54.

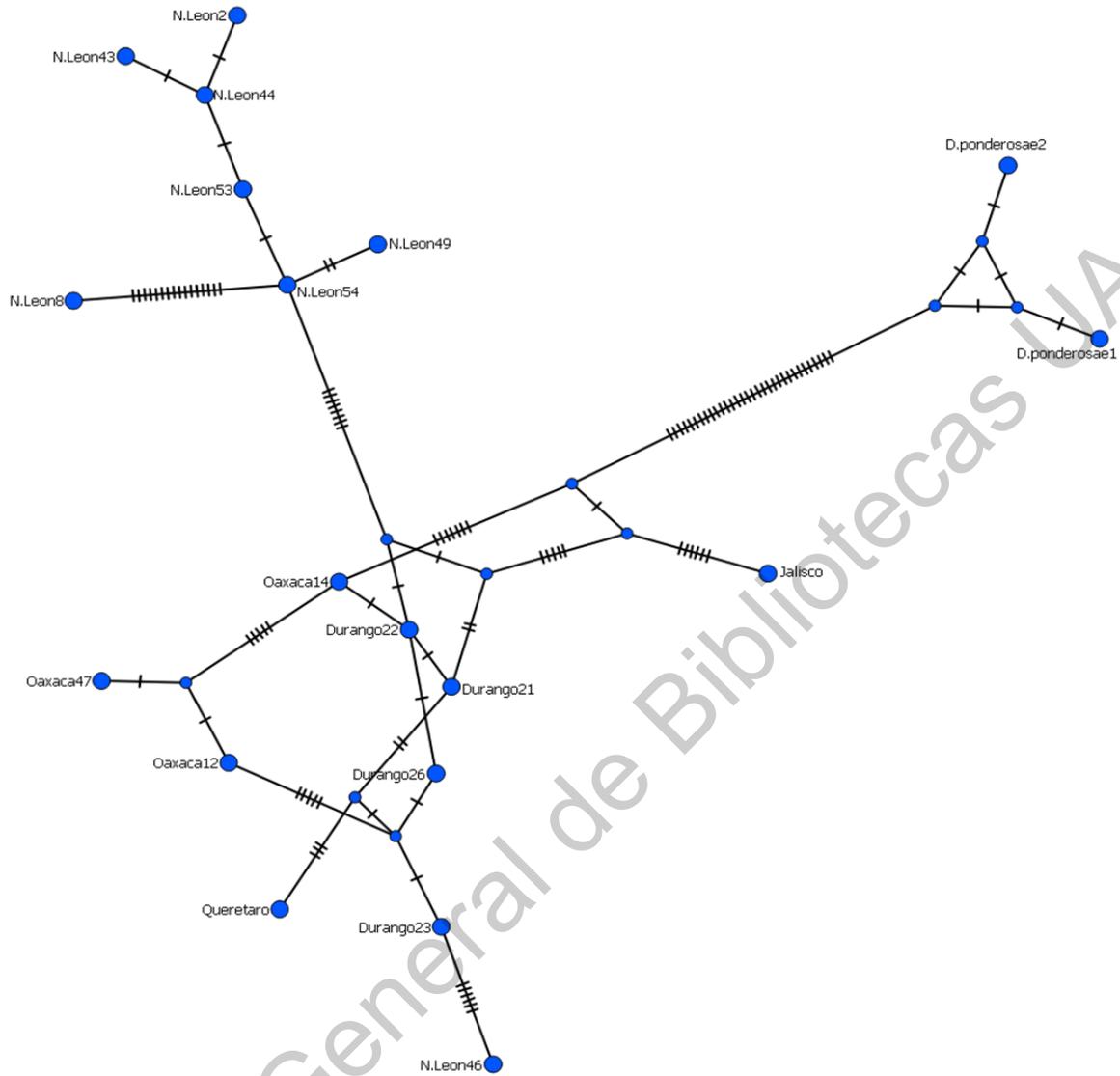


Figura 18. Mapa de haplotipos de las 19 secuencias obtenidas en este estudio.

5.6. Análisis comparativos

Se realizó un análisis con 53 secuencias establecidas en la base de datos NUCLEOTIDE de la página del NCBI y 19 secuencias obtenidas en el presente estudio, al mismo tiempo, se agregaron 2 secuencias de la especie *D.ponderosae* como grupo externo.

El análisis general arrojó, que se determinaron 66 haplotipos, en donde existe una diversidad haplotípica de 0.9930, lo que es considerado alto, de acuerdo con los rangos establecidos, en donde 0.96 se considera bajo y 1.0 alto, este resultado, nos indica, que existe una alta probabilidad de que los haplotipos encontrados sean únicos y exclusivos con un tamaño muestral bajo en las poblaciones (Calle-Arenas & García-Merchán, 2011).

También se calcularon estadísticos para la población como D' Tajima el cual tiene un resultado de $D = -1.93727$, este resultado no es significativo, sin embargo, es negativo, lo que confirma que a nivel nacional la población tuvo un crecimiento posterior a un cuello de botella muy severo o a la recuperación de la variación genética, después de un periodo fuerte de selección purificadora, es decir, se presentaron mutaciones deletéreas en la población (Eguiarte *et al.*, 2007; Salas-Lizana, 2013; Tajima, 1989).

Se estimó un árbol consenso, mediante el método de máxima verosimilitud mediante el modelo Hasegawa-Kishino Yanno, con una distribución G (Fig.19). En donde se observan valores estables y confiables, pero muestra a una gran cantidad de haplotipos como grupos monofiléticos, a excepción de los haplotipos de Ver2, Ver3, Oaxaca 16, 17 y Jal 62, lo que sugiere que las relaciones entre los haplotipos restantes no fueron resueltas.

No obstante, también se construyó un árbol base (Fig.20), en el que se pueden ubicar algunos haplotipos que presentan mutaciones recientes, en este caso la secuencia Nuevo León 46 y Nuevo León 8 se comportan diferente con respecto a las demás secuencias procedentes del mismo lugar.

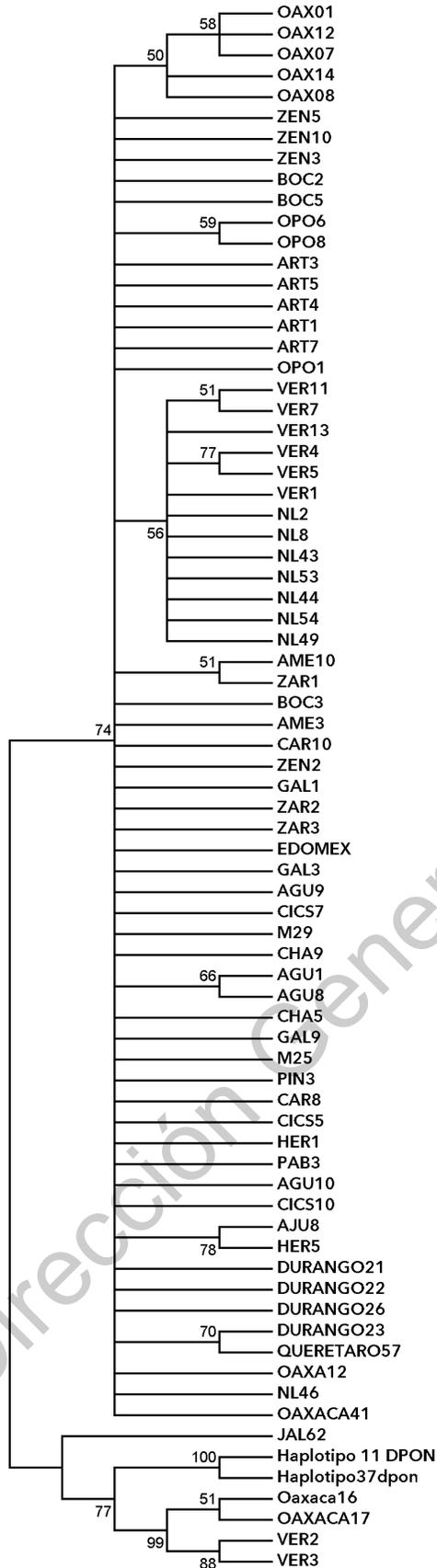


Figura 19. Árbol consenso construido mediante el método de Máxima verosimilitud bajo el modelo Hasegawa Kishino Yanno G+I a 1,000 repeticiones en el programa MEGA7.

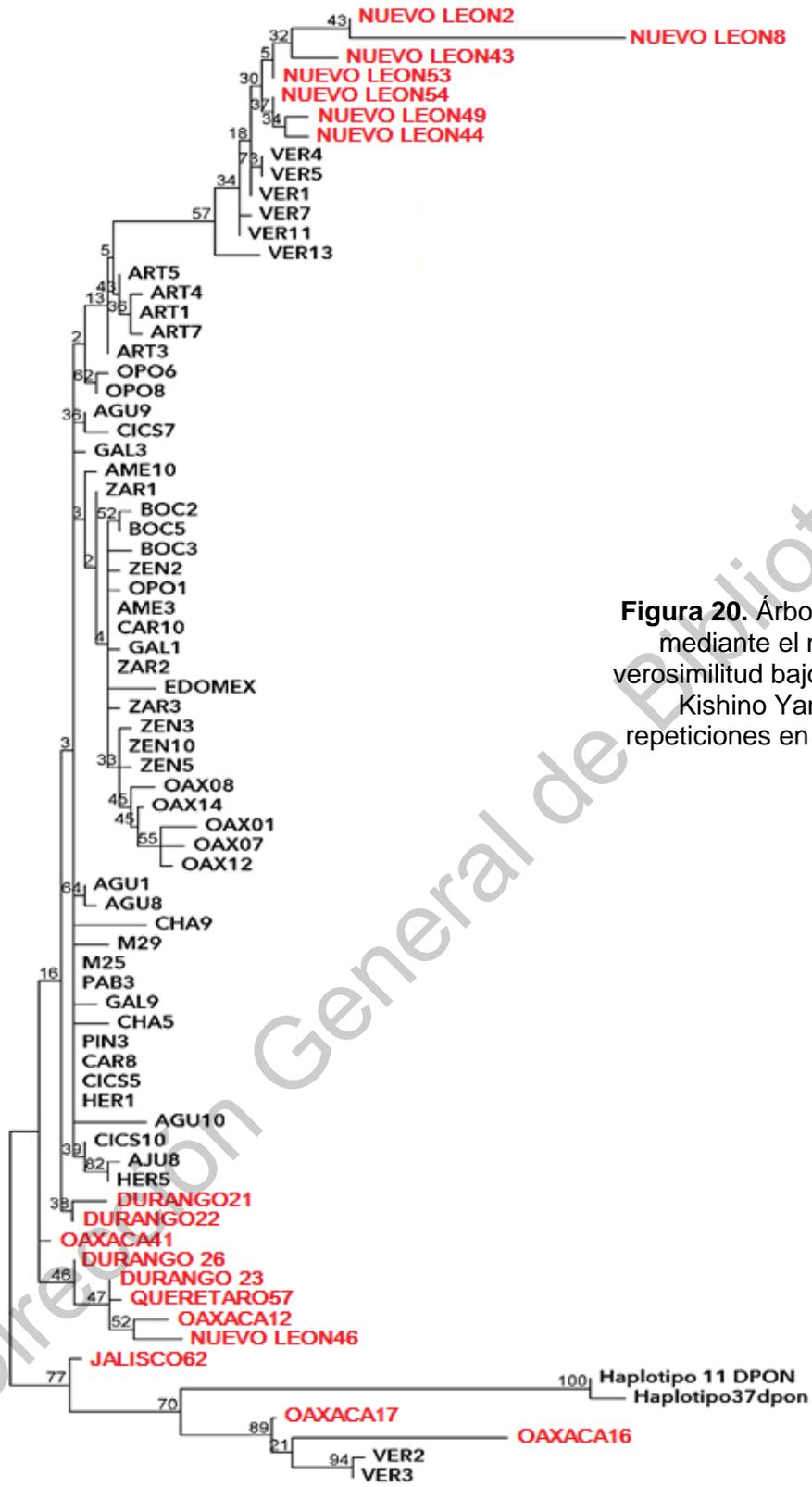


Figura 20. Árbol consenso construido mediante el método de Máxima verosimilitud bajo el modelo Hasegawa Kishino Yanno G+I a 10,000 repeticiones en el programa MEGA7.

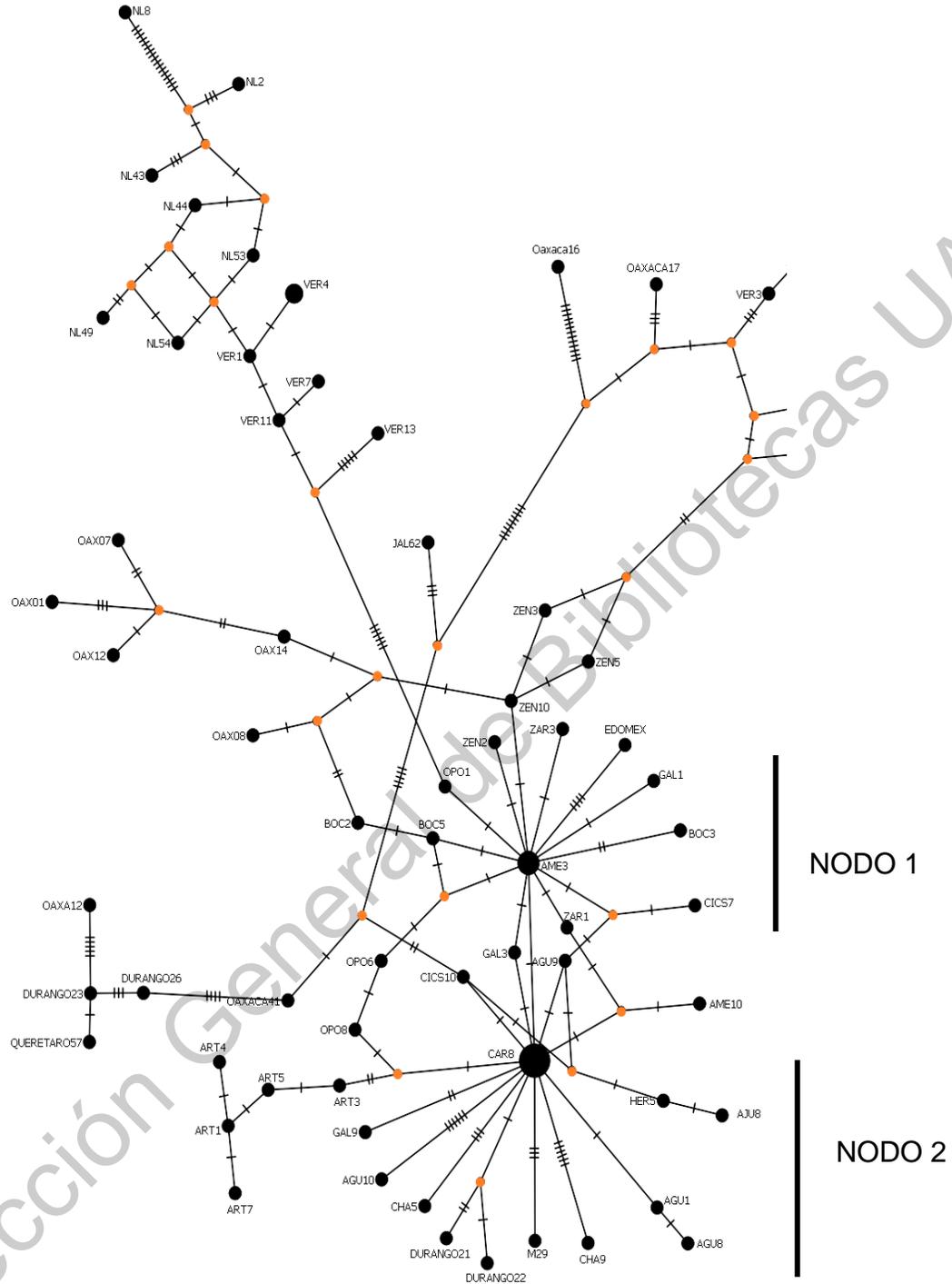


Figura 21. Red de haplotipos construido mediante el modelo de clados anidados.
 NL=Nuevo León, VER=Veracruz, OAX=Oaxaca (Santa Catalina), JAL=Jalisco, ART=Artega Coahuila, CAR= Hidalgo, AGU=Aguascalientes, AJUS= Estado de México, HER=Querétaro(Los Herrera), BOC= Chihuahua (Bocoína), AME=Estado de México (AMECAMECA), GAL= Nuevo León (Galeana), CHA=Michoacán (Charandas) , ZEN= Estado de México (Zentlalpan), OPO= Michoacán (Opopeo),NL= Nuevo Leon (Las Peñitas), DURANGO= Durango (San Dimas), QUERETARO= QUERETARO (Arroyo Seco) OAXACA= Santos Reyes Pápalo, CICS=Estado de México (CICCyTEC-IPN), HAPLOTIPO37PON= *D. ponderosae* (E.U.). NODO2= CAR, CICS, HER, M25, PAB, NODO1=AME,CAR ,ZAR.

Los análisis de las redes de haplotipos son importantes, debido a que, a nivel poblacional estos parecen explicar mejor su comportamiento genealógico, que los arboles filogenéticos como lo explica Eguiarte *et al.*, (2007), debido a que la inferencia cladística de relaciones filogenéticas requiere que las variantes genéticas no formen linajes. Las genealogías trazan las relaciones evolutivas entre haplotipos o alelos, que permiten reconstruir los procesos evolutivos con los principios de la coalescencia. Los métodos que utilizan estos principios, tratan de modelar el pasado, utilizando un proceso estocástico, esto es, la coalescencia, basado en el concepto de que los alelos en una población pueden ser rastreados hacia atrás en el tiempo hasta el punto en el que coalescen en un alelo ancestral común.

De acuerdo a la figura 21, cada nodo (negro) hace referencia a un haplotipo, mientras que los puntos intermedios (naranja) son haplotipos o “pasos” que el programa infiere, estuvieron antes para dar origen a los haplotipos terminales. Las líneas horizontales muestran en número de mutaciones que existe entre cada nodo. Se pueden observar dos grupos ancestrales (el grupo uno (nodo1) compuesto por los haplotipos ZAR, EDOMEX, CISC, BOC, GAL, OPO, y el grupo 2 (nodo2) conformado por AGU, CHA, M, AJU, HER, CARB), ya que muestran tener alta frecuencia, así como también presentan múltiples conexiones con otros haplotipos lo que coincide con la descripción de un alelo ancestral (Herrera & Ramos, 2015).

Este comportamiento de expansión presentado en las secuencias obtenidas es confirmado por Avise, (2000), el cual propone, que los cambios en tamaños poblacionales o en niveles de flujo génico a través del tiempo dejan patrones que pueden reconocerse y que son marcas de historias poblacionales particulares. Por ejemplo, se predice que una población que se ha estado expandiendo va a presentar una filogenia en forma de estrella, este patrón descrito es el mismo que puede observarse entre los nodos 1 y 2 de la Fig. 21.

Estos patrones también fueron observados por Anducho-Reyes *et al.*, 2008, que analizó secuencias con origen en diversos puntos de México y donde llegó a la conclusión, que al menos las poblaciones del centro y norte del país tenían una alta tasa de interacción y al mismo tiempo encontró, que existía un alto grado de diferenciación con respecto a las originadas de Veracruz y Oaxaca, el cual atribuye desde los eventos ocurridos entre el plioceno tardío y pleistoceno temprano en donde se conoce que se originó la depresión de balsas y el valle de Tehuacán-Cuicatlán, que asumió el papel de una barrera geográfica. De acuerdo a los análisis que realizaron la diferenciación entre las poblaciones del centro y sur de México ocurrió en el Pleistoceno.

VI CONCLUSIONES

Los oligonucleótidos utilizados, fueron tan efectivos que se lograron encontrar 16 haplotipos de las 19 muestras que fueron procesadas.

Los haplotipos de Durango, Oaxaca y Querétaro, presentan patrones de interacción similares de acuerdo a la topología de los árboles creados en el presente estudio, apuntando que esta especie puede tomar al sistema montañoso (sierra madre occidental) como corredor.

Aún existe una gran problemática para los análisis filogenéticos en esta especie, debido a que algunas relaciones inter e intrapoblacionales no pudieron ser resueltas eficazmente con los modelos utilizados.

Las variaciones genéticas presentadas se deben a tres factores muy importantes que pueden ser tomados en cuenta. El primero, se refiere a que la variación dependiente de la ubicación geográfica, el segundo se atribuye al tipo de hospedero y por último la migración también puede afectar la estabilidad genética de la población.

Todos los haplotipos obtenidos en el presente trabajo son diferentes entre sí.

VII LITERATURA CITADA

- Anducho-Reyes, M. A., Cognato, A. I., Hayes, J. L., & Zúñiga, G. (2008). Phylogeography of the bark beetle *Dendroctonus mexicanus* Hopkins (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.09.005>
- Ankel-Simons, F., & Cummins, J. . (1996). Misconceptions about mitochondria and mammalian fertilization: implications for theories en human evolution. *Natl. Acad. Sci*, 93(24), 13859–13863.
- Armendáriz-Toledano, F., Niño-Domínguez, A., Sullivan, B. T., Macías-Sámamo, J., Víctor, J., Clarke, S. R., & Zúñiga, G. (2014). Two Species within *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae): Evidence from Morphological, Karyological, Molecular, and Crossing Studies. *107*, 1, 11–27. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1603/AN13047>
- Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press.
- Bolivar, A., Rojas, A., & Garcia-Lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización (PCR and PCR-Multiplex: critical parameters and standardization protocol), 3, 25–33.
- Brinkman, L. (2001). Phylogenetic analysis. In B. A.D. & O. B.F.F. (Eds.), *BIOINFORMATICS A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins SECOND EDITION* (Segunda Ed, pp. 323–357). Nueva York: Wiley-Interscience. Retrieved from <http://211.69.141.12/upload/fe6a2527-a4b1-4083-8471-07b31f5e3bfd.pdf>
- Calle-Arenas, W. C., & García-Merchán, V. H. (2011). Estadística filogeográfica en *Culex annulirostris*: construcción de redes de haplotipos en estudios de genealogías intraespecíficas, usando tres metodologías diferentes. *Revista de La Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 23(January 2011), 31–41.
- Castellanos-Bolaños, J. ., Ruíz-Martínez, E. ., Gómez-Cárdenas, M., & González-Cubas, R. (2013). *Guía metodológica para combatir plagas de descortezadores de pino en el sur de México*. México D.F. Retrieved from http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/3840/CI-RPAS_01020827600049488.pdf?sequence=1
- Cibrian, D., Mendez, J. T., Yates, H. O., & Flores, J. E. (1995). Tres especies del genero *Dendroctonus* encontradas en México. In *Insectos Forestales de México* (Vol. 6, pp. 269–285). Comision Forestal de America del Norte.
- CONAFOR. (2015). Inventario eMapas. Retrieved from <http://www.conafor.gob.mx/web/transparencia/transparencia-focalizada/emapas/inventario/>

- Cuellar-Rodriguez, L. G. (2013). *DINAMICA POBLACIONAL-TEMPORAL DE Dendroctonus mexicanus Hopkins (Curculionide: Scolytinae) EN EL MUNICIPIO DE ARAMBERRY, NUEVO LEON*. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de Mexico.
- Domínguez, E. F. (2000). *Introducción: El ADN mitocondrial*. Universidad de Barcelona. Retrieved from <https://www.tesisenred.net/handle/10803/795>
- Duran, E., & Poloni, A. (2014). Escarabajos decortezadores: diversidad y sanamiento en bosques de Oaxaca., 7–12.
- Eguiarte, L. E., Souza, V., & Aguirre, X. (2007). *Ecología molecular*. (I. N. de Ecología & Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad., Eds.). México.
- FAO. (2010). Evaluación de los recursos forestales mundiales 2010 Informe principal. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/013/i1757s/i1757s.pdf>
- Fernandez de Castro, I. (2009). Variabilidad genética en poblaciones naturales: detección, cuantificación y significado.
- Gernandt, D. S., & Pérez-de la Rosa, J. A. (2014). Biodiversidad de Pinophyta (coníferas) en México. 85, 126–133. <https://doi.org/10.7550/rmb.32195>
- Herrera, T., & Ramos, A. (2015). *Aplicación de redes de haplotipos para estudios genético espaciales del complejo de especies Lutzomya longipalpis (Diptera: Phlebotominae), utilizando la región mitocondrial COI*. Universidad Central de Venezuela. Retrieved from <http://saber.ucv.ve/bitstream/123456789/13330/1/Trabajo Especial de Grado. Ana Ramos.pdf>
- Hey, J., & Machado, C. A. (2003). The study of structured populations--new hope for a difficult and divided science. *Nature Reviews Genetics*, 7(4), 535–543. <https://doi.org/10.1038/nrg1112>
- J.J, M. (2000). *El lenguaje de la Cladística* (Universidad). Mexico. <https://doi.org/10.1063/1.1427144>
- Jones, R. , Magallán-Hernández, F., Domínguez-Sánchez, B., & Caltzonzin-Fernández, K. (2004). *Diagnóstico Fitosanitario de Bosques Selectos del estado de Querétaro*. Universidad Autónoma de Querétaro-Comisión Nacional Foresta.
- Kaneda, H., Hayashi, J., Takahama, S., Taya, C., Lindahl, K. F., & Yonekawa, H. (1995). Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10), 4542–4546. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.10.4542>
- Keeling, C. I., Henderson, H., Li, M., Yuen, M., Clark, E. L., Fraser, J. D., ... Bohlmann, J. (2012). Transcriptome and full-length cDNA resources for the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* Hopkins, a major insect pest

of pine forests. 42, 525–536. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.03.010>

Kirkpatrick, B. (2011). Haplotypes versus genotypes on pedigrees. *Algorithms for Molecular Biology : AMB*, 6(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1748-7188-6-10>

Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B., & Nei, M. (2001). MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 17(12), 1244–1245. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11751241>

Langor, D. ., & Spence, J. (1991). HOST EFFECTS ON ALLOZYME AND MORPHOLOGICAL VARIATION OF THE MOUNTAIN PINE BEETLE, DENDROCTONUS PONDEROSAE HOPKINS (COLEOPTERA: SCOLYTIDAE, 123, 395–410.

Lanteri, A. A., Loíacono, M. S., & Margaría, C. (2002). APORTES DE LA BIOLOGIA MOLECULAR LA CONSERVACION DE LOS INSECTOS (Vol. 2, pp. 207–220). La Plata, Argentina.: Proyecto de Red Iberoamericana de Biografía y Entomología Sistemática.

Leon-Garcia, N. (2013). *Estudio comprativo de Dendroctonus valens y D. rhizophagus (Curculionidae: Scolytinae) y sus hongos asociados*. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de Mexico.

Lewis P.Paul. (2001). Phylogenetics systematics turns over a new leaf. *TRENDS in Ecology & Evolution*, 16(1). Retrieved from https://marine.rutgers.edu/dmcs/ms309/Lec1718/Lewis_newleaf.pdf

Macías-Sámago, J. E., & Niño-Domínguez, A. (2016). *Manual de trampeo de descortezadores de pino mediante el uso de semioquímicos*. Imprenta Caleb.

Marchington, D. R., Hartshorne, G. M., Barlow, D., & Poulton, J. (1997). Homopolymeric tract heteroplasmy in mtDNA from tissues and single oocytes: support for a genetic bottleneck. *Am. J. Hum. Genet*, 60, 408–416.

Martinez-Castilla, L. (2007). Reconstrucción de la historia de cambio de los caracteres. In *Ecología Molecular* (pp. 87–152).

Montesinos A.L. (2011). *ESTUDIO DEL AIC Y BIC EN LA SELECCIÓN DE MODELOS DE VIDA CON DATOS CENSURADOS*. Centro de Investigación en Matemáticas, Guanajuato. Retrieved from <http://probayestadistica.cimat.mx/sites/default/files/PDFs/TE414MontesinosLopez.pdf>

Moser, J., Fitzgibbon, B., & Klepzig, K. (2005). Mexican pine beetle, *Dendroctonus mexicanus*: first record in the United States and co-occurrence with the southern pine beetle-*Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: *Entomological News*, 116(4), 235–243. Retrieved from <http://www.cabdirect.org/abstracts/20063015516.html>

Nei, M., Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. (O. U. Press, Ed.). New York.

- Normark, B. B., & Lanteri, A. A. (1998). Incongruence between morphological and mitochondrial DNA characters suggests hybrid origins of parthenogenetic weevil lineages (genus *Aramigus*). *Syst. Biology*, 47(3), 475–494.
- Piñero, D. (2015). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. In *Capacidad Natural de México* (Vol. 20, pp. 468–494). CONABIO.
- Rogers, A., & Harpending, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.*, 9(3), 552–569.
- Salas-Lizana, R. (2013). *Estructura genética y recombinación en Lophodermium, un hongo endófito de pinos*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Salinas-Moreno, Y., Vargas-Mendoza, C. ., Zuñiga, G., Victor, J., Ager, A., & Hayes, J. . (2010). *Atlas de distribución geográfica de los descortezadores del género*.
- Sánchez-González, A. (2008). Una visión actual de la diversidad y distribución actual de los pinos de México. *Madera y Bosques*, 14, 107–120.
- Schaal, B. A., Gaskin, J. F., & Caicedo, A. L. (2003). Phylogeography, haplotype trees and invasive plant species. *Heredity*, 94, 197–204.
- Schaal, B. A., Hayworth, D. A., Olsen, K. M., Rausher, J. T., & Smith, W. A. (1988). Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, 7, 465–474.
- Sequeira, A. S., Normark, B. B., & Farrell, B. D. (2000). Evolutionary assembly of the conifer fauna: Distinguishing ancient from recent associations in bark beetles. *Proceedings of the Royal Society Biological Series B* 267, 2359–2366.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., & Flook, P. (1994). Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6), 651–701. <https://doi.org/10.1093/aesa/87.6.651>
- Six, D. L., & Bracewell, R. (2014). Chapter 8. Dendroctonus (p. 46). University of Montana, Missoula, MT, USA.
- Stoneking, M., Bhatia, K., & Wilson, A. C. (1986). Rate of sequence divergence estimated from restriction maps of mitochondrial DNAs from Papua New Guinea. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51 Pt 1, 433–439. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3472733>
- Sutovsky, P., & Schatten, G. (1998). Ultrastructural aspects of mammalian fertilization: new discoveries and inspirations from the work of Daniel Szollosi. *Reprod Nutr Dev*, 38(6), 629–641.
- Swofford, D., Olsen, G., Waddell, P., & Hillis, D. (1996). Phylogenetic inference. In

D. . Hillis, C. Moritz, & B. . Mable (Eds.), *Molecular systematics*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585–595. <https://doi.org/PMC1203831>

Templeton, A. R., Boerwinkle, E., & Sing, C. F. (1987). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics*, 117(2), 343–351. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2822535>

Torrioni, A., Schurr, T. G., Yang, C. C., Szathmary, E. J., Williams, R. C., Schanfield, M. S., ... Weiss, K. M. (1992). Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics*, 130(1), 153–162. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1346260>

Wallace, D. C. (1994). Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(19), 8739–8746. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.19.8739>

Wood, S. . (1982). The bark and ambrosia beetles of North and Central America (Coleoptera: Scolytidae), a taxonomic monograph. *Great Basin Naturalist Memoirs*, 6, 1–1356.

Zúñiga, G., Mendoza-Correa, G., Cisneros, R., & Salinas, M. . (1999). Zonas de sobreposición de las áreas de distribución geográfica de las especies mexicanas de *Dendroctonus* Erichson (Coleoptera: Scolytidae) y sus implicaciones ecológico-evolutivas, 77, 1–22.