

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



“DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE *Avicennia germinans* Y *Rhizophora mangle*, EN LOS ECOSISTEMAS DE MANGLAR DE MÉXICO”

T E S I S

**QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS
NECESARIOS PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

EDUARDO SANDOVAL CASTRO

Ensenada, Baja California, México

Febrero de 2012

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOTECNOLOGÍA

**“DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE *Avicennia germinans* Y
Rhizophora mangle, EN LOS ECOSISTEMAS DE MANGLAR DE
MÉXICO”**

T E S I S

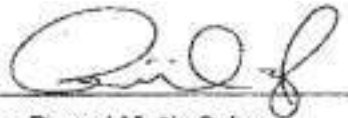
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

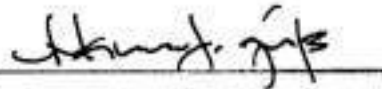
PRESENTA:

EDUARDO SANDOVAL CASTRO

Aprobada por:

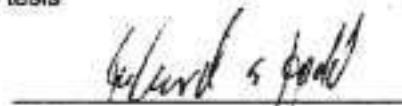


Dra. Raquel Muñiz Salazar
Director de tesis



Dr. Luis Manuel Enriquez Paredes

Sinodal



Dr. Richard S. Dodd

Sinodal



Dr. Rafael Ríosmea Rodríguez

Sinodal



Dr. Cristian Tovilla Hernández

Sinodal



Dra. M. Concepción Arredondo García

Sinodal

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por su apoyo incondicional y por motivarme en todo momento a la superación en todos sus aspectos. ¡Mi vida no será suficiente para agradecerles, gracias Papás!

A la Dra. Raquel Muñoz Salazar, por su apoyo académico, moral y económico brindado durante la realización de esta tesis de doctorado y sobre todo por su valiosa amistad.

Al Dr. Luis M. Enríquez, por su amistad y por su valiosa aportación de ideas en el área de genética de poblaciones que han contribuido significativamente en mi formación académica y en el desarrollo de la presente tesis.

A mis sinodales, Dr. Cristian Tovilla Hernández, Dr. Rafael Riosmena Rodríguez, Luis M. Enríquez Paredes, Dr. Richard S. Dodd y Ma. Concepción Arredondo García por todo su apoyo y por dedicar parte de su valioso tiempo a la revisión de este trabajo.

Al Dr. Cristian Tovilla, Dr. Juan M. López Vivas, Dr. Bily Aguilar, Oc. José Guzmán, Biól. Jorge L. Tordecillas por su valiosa cooperación durante la colecta de muestras.

Al Laboratorio de Epidemiología y Ecología Molecular de la Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Baja California Unidad Valle Dorado, por abrirme las puertas de sus instalaciones durante el análisis genético de las muestras.

Al personal técnico y estudiantes que conforman el laboratorio de Epidemiología y Ecología Molecular, por su apoyo en el procesamiento de muestras y por hacer de mi estancia en el laboratorio un rato agradable y sopesar las largas jornadas de trabajo durante el procesamiento de muestras.

A todos mis amigos, por todo su apoyo y por darme la oportunidad de compartir su tiempo y por hacer del mío más placentero.

A CONACYT por otorgarme la beca No. 201092 que me permitió dedicar tiempo completo al desarrollo de este trabajo.

A la universidad Autónoma de Baja California, proyecto interno No. 0843, a The International Community Foundation Mar-Isla (20030900) y a CONACYT-SEMARNAT-INE 2009, (000000000107696) por el financiamiento de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias Marinas, por brindarme la oportunidad de ser parte de ella y por contribuir significativamente en mi formación académica.

RESUMEN

Se evaluó la diversidad y estructura genética intra-específica de *Avicennia germinans* y *Rhizophora mangle* en los ecosistemas de Manglar de México. Ambas especies mostraron bajos niveles de diversidad genética, principalmente en la región del Golfo de California, donde se ubica el límite norte de distribución de las especies de mangle y donde se presume que los cambios históricos de temperatura debido a los eventos de glaciación han ocasionado diferentes eventos de colonización y recolonización de las especies de mangle. La diversidad genética de *A. germinans* está constituida por 93 alelos, 27 de ellos compartidos entre las costas del Pacífico y del Atlántico y 33 exclusivos para cada una de las costas. En *R. mangle* el número de alelos fue menor, en total se detectaron 34 alelos de los cuales 17 fueron compartidos entre el Pacífico y Atlántico, 12 fueron exclusivos del Pacífico y cuatro del Atlántico. La costa del Atlántico registró la mayor diversidad genética de *A. germinans*, mientras que en *R. mangle*, la mayor diversidad genética fue registrada en la región de “La Encrucijada” en el Sureste y en el área de Marismas Nacionales en el Noroeste, donde se ubican los ecosistemas de manglar de mayor cobertura en el Pacífico Mexicano. Los resultados de diversidad genética mostraron diferencias en composición y abundancia de alelos entre los sitios analizados, resultando en una alta y significativa estructura genética. La mayor diferenciación genética se registró entre la costa del Atlántico y la del Pacífico, lo que sugiere que la elevación del Istmo de Panamá ha funcionado como una barrera geográfica que restringe de manera efectiva el flujo genético entre ambas costas. De acuerdo al análisis de agrupamiento bayesiano, *A. germinans* presenta la mayor diferenciación genética, la cual se distribuye en seis grupos, cinco en el Pacífico y uno en el Atlántico, mientras que en *R. mangle* se observó la presencia de cinco grupos, cuatro en el Pacífico y uno en el Atlántico. En ambas especies, los manglares del Noroeste se dividieron en tres grupos, dos de ellos en el Golfo de California y el tercero en Marismas Nacionales. Tanto *R. mangle* como *A. germinans* mostraron una estructura genética poblacional muy similar, lo cual sugiere que las otras especies de mangle con las que comparten el hábitat muestren un comportamiento semejante. El Análisis de Varianza Molecular mostró la presencia de estructura genética por lo que se sugiere que en futuros programas de reforestación, se utilicen propágulos provenientes de una fuente local y de diferentes árboles a lo largo del bosque para reducir el riesgo de endogamia en la población trasplantada.

ABSTRACT

Intra-specific genetic diversity and structure of *Avicennia germinans* and *Rhizophora mangle* was assessed in the mangrove ecosystems of Mexico. Both species showed low levels of genetic diversity, mainly in the Gulf of California, where is located the northern limit of distribution of mangrove species and where it is assumed that historical changes in temperature due to glacial events have led to recent colonization and re-colonization of the mangrove species. The genetic diversity of *A. germinans* consists of 93 alleles, 27 were shared between the Pacific and the Atlantic and 33 exclusive to each coasts. In *R. mangle* the number of alleles was lower in total 34 alleles were detected of which 17 were shared between the Pacific and Atlantic, 12 were unique to the Pacific and 4 at Atlantic. The Atlantic coast had the highest genetic diversity of *A. germinans*, whereas in *R. mangle*, the greatest genetic diversity was recorded in the region of "La Encrucijada" in the Southeast and around "Marismas Nacionales" on the Northwest, which are the largest mangrove ecosystems in the Mexican Pacific. The results of genetic diversity showed differences in composition and abundance of alleles among the samples analyzed, resulting in a high and significant genetic structure. Most genetic differentiation occurred between the Atlantic and Pacific, suggesting that the uplift of the Isthmus of Panama has functioned as a geographical barrier that effectively restricts gene flow between both coasts. According to the Bayesian analysis, *A. germinans* has the highest genetic differentiation, which is cluster into six groups, five in the Pacific and one in the Atlantic, while *R. mangle* was clustered into five groups, four in the Pacific and one in the Atlantic. In both species, mangrove forests of the Northwest were divided into three groups, two in the Gulf of California and the third in "Marismas Nacionales". Both *R. mangle* and *A. germinans* showed a very similar genetic structure pattern, suggesting that the others mangrove species in the same habitat exhibit similar behavior. AMOVA analysis showed that both mangrove species are genetically structured, furthermore, it is suggested that propagules used in future reforestation programs should be from local sources and from different trees along the forest to reduce the risk of inbreeding.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	i
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
1. Introducción General	1
2. Antecedentes generales.....	8
3. Genética poblacional de <i>Avicennia germinans</i> en México	18
3.1 Introducción.....	18
3.2 Objetivos	21
3.3 Materiales y Métodos	22
3.3.1 Área de estudio.....	22
3.3.2 Colecta de material foliar	25
3.3.3 Extracción de ADN.....	25
3.3.4 Análisis genético	26
3.3.4.1 Amplificación de loci de microsatélites.....	28
3.3.5 Análisis de datos.....	29
3.3.5.1 Diversidad genética.....	29
3.3.5.2 Asignación poblacional.....	29
3.3.5.3 Estructura genética poblacional	30
3.4 Resultados	31

3.4.1	Diversidad genética	31
3.4.2	Asignación Poblacional.....	48
3.4.3	Estructura Genética	50
3.5	Discusión.....	54
3.5.1	Diversidad Genética	54
3.5.2	Estructura Genética.....	58
4.	Genética poblacional de <i>Rhizophora mangle</i> en México.	62
4.1	Introducción.....	62
4.2	Objetivos	65
4.3	Materiales y Métodos	66
4.3.1	Área de estudio.....	66
4.3.2	Colecta de material foliar	69
4.3.3	Extracción de ADN	69
4.3.4	Análisis genético.....	70
4.3.4.1	Amplificación de loci de microsatélites.....	72
4.3.5	Análisis de datos.....	73
4.3.5.1	Diversidad genética.....	73
4.3.5.2	Asignación Poblacional	73
4.3.5.3	Estructura genética Poblacional.....	74
4.4	Resultados	76
4.4.1	Diversidad genética	76
4.4.2	Asignación Poblacional.....	89
4.4.3	Estructura Genética	91

4.5	Discusión.....	94
4.5.1	Diversidad Genética	94
4.5.2	Estructura genética.....	99
5.	Discusión general	102
6.	Conclusiones	110
	Literatura Citada.....	113

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Ubicación geográfica, entidad y código de los sitios de colecta de <i>A. germinans</i> en las costas del Pacífico y Atlántico.	24
Tabla II. Microsatélites de <i>A. germinans</i> utilizados para el análisis genético poblacional.	27
Tabla III. Diversidad genética de <i>A. germinans</i>	34
Tabla IV. Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) jerárquico, aplicado en los bosques del mangle <i>A. germinans</i> del Pacífico y Atlántico.	52
Tabla V. Comparaciones pareadas entre los grupos establecidos de acuerdo al análisis en STRUCTURE.....	53
Tabla VI. Ubicación geográfica, entidad y código de los sitios de colecta de <i>R. mangle</i> en las costas del Pacífico y Atlántico.....	68
Tabla VII. Microsatélites de <i>R. mangle</i> utilizados para el análisis genético poblacional.	71
Tabla VIII. Diversidad genética de <i>R. mangle</i>	78
Tabla IX. Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) jerárquico, aplicado en los bosques del mangle <i>R. mangle</i> del Pacífico y Atlántico.	92
Tabla X. Comparaciones pareadas entre los grupos establecidos de acuerdo al análisis en STRUCTURE.....	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Área de estudio y sitios de colecta de <i>A. germinans</i> en las costas del Atlántico y Pacífico de México.....	23
Figura 2. Frecuencias alélicas de los cuatro alelos detectados mediante el locus AgT8..	36
Figura 3. Frecuencias alélicas de los ocho alelos detectados mediante el locus AgT9..	38
Figura 4. Frecuencias alélicas de los 13 alelos detectados mediante el locus AgT7.....	40
Figura 5. Frecuencias alélicas de los 13 alelos detectados mediante el locus AgT4.....	42
Figura 6. Frecuencias alélicas de los 17 alelos detectados mediante el locus AgD6.	44
Figura 7. Frecuencias alélicas de los 23 alelos detectados mediante el locus AgD13.	45
Figura 8. Frecuencias alélicas de los 15 alelos detectados mediante el locus CA_002.	47
Figura 9. Resultados del análisis bayesiano en <i>A. germinans</i> (K = 6)..	49
Figura 10. Área de estudio y sitios de colecta de <i>R. mangle</i> en las costas del Atlántico y Pacífico de México.....	67
Figura 11. Frecuencias alélicas de los tres alelos detectados mediante el locus Rm46..	80
Figura 12. Frecuencias alélicas de los cinco alelos detectados mediante el locus Rm21.	81
Figura 13. Frecuencias alélicas de los cinco alelos detectados mediante el locus Rm7..	83
Figura 14. Frecuencias alélicas de.....	84
Figura 15. Frecuencias alélicas de los ocho alelos detectados mediante el locus Rm38.	86
Figura 16. Frecuencias alélicas de los nueve alelos detectados mediante el locus Rm19..	88
Figura 17. Resultados del análisis de agrupamiento en <i>R. mangle</i> (K = 5).....	90

Figura 18. Tendencia decreciente de la diversidad genética (Heterocigosidad observada) hacia el límite norte de distribución de las especies de mangle (29° N)..... 103

1. Introducción General

El termino manglar describe a un grupo ecológico que congrega a diversas especies de plantas tropicales de diferentes grupos taxonómicos con adaptaciones particulares que les permiten desarrollarse en la zona costera; entre los principales mecanismos de adaptación, sobresalen la viviparidad y la presencia de neumatóforos y raíces aéreas que permiten la ventilación de sus raíces mientras están sumergidas, además de la presencia de glándulas para la exclusión o excreción de sal durante el balance osmótico en el ambiente salino (Tomlinson 1994). El ecosistema de manglar es un término complejo que incluye tanto a los componentes bióticos como abióticos que interactúan y contribuyen en el funcionamiento del sistema. Sin embargo, comúnmente se les conoce como ecosistemas de manglar debido a que son las especies de mangle las de mayor abundancia e importancia en el ecosistema.

Estos ecosistemas presentan una distribución tropical-subtropical, generalmente entre los 30° N y 30° S y se ha observado que principalmente la tolerancia fisiológica de cada especie a bajas temperaturas limita su distribución global entre la isoterma de los 16°C del aire en el mes más frío (Duke et al. 1998a). Sin embargo, debido a la diversidad de hábitats y a sus cualidades adaptativas, en ocasiones las especies de mangle pueden extender su distribución a latitudes mayores. Por ejemplo, en Japón, se han registrado a los

31°22' N y en Bermuda a los 32°20' N. En el hemisferio sur, el límite se ha observado en Nueva Zelanda a los 38°03' S, en Australia a los 38°45' S y en la costa oeste del sur de África, 32°59' S (Tomlinson 1994; Kathiresan & Bingham 2001; Ellison 2002).

Las especies de mangle se encuentran geográficamente distribuidas en dos hemisferios globales, el Atlántico-Este del Pacífico (AEP) y el Indo-Oeste del Pacífico (IWP, por sus siglas en Inglés), siendo el IWP el área donde se encuentra la mayor diversidad de especies, con alrededor de 58 especies en 23 géneros, comparado con 13 especies en 8 géneros en AEP (Duke et al. 1998b). Se cree que la gran diversidad de especies encontrada en IWP puede deberse a que es el centro de origen y diversificó la flora actual de manglar y a que la ruta de dispersión de las especies de mangle detuvieron su avance al cerrarse la comunicación entre el Océano Índico y el Mar Mediterráneo (Rico-Gray 1993; Ricklefs et al. 2006). El paso de las especies de mangle hacia el continente Americano se dio antes de que se cerrara la conexión a través del Mar de Tetis, permitiendo el paso solamente a los géneros más antiguos, entre ellos *Rhizophora* y *Avicennia*, que actualmente dominan en el continente Americano (Graham 1995; Rull 1998; Graham 2006) y gran parte del IWP (Duke et al. 1998a; Ellison et al. 1999).

Estudios palinológicos sugieren que el género *Rhizophora* llegó a América aproximadamente durante el Eoceno superior, cuando la vegetación de manglar

era dominada por los géneros *Acrostichum* y *Pelliciera*, posteriormente, en el Mioceno inferior apareció el género *Avicennia*. Después de esto, llegaron los géneros *Laguncularia* durante el plioceno inferior y *Conocarpus* en el superior (Rull 1998). Durante la época en que los primeros géneros de mangle arribaron al continente Americano, el Istmo de Panamá se encontraba abierto, lo que permitió la colonización de la costa Oeste de América.

Desde sus orígenes, tanto el número como el rango de distribución y extensión de las especies de mangle se han visto afectados por la presencia de barreras geográficas y oceanográficas, así como también por los cambios cíclicos en la temperatura y el nivel del mar, dando origen a diferentes eventos de colonización y re-colonización durante los períodos de glaciación (Dodd et al. 2000; Stuart et al. 2007). Estimaciones recientes indican que alrededor del 75% de las costas tropicales y subtropicales están cubiertas por manglar (137,760 km²) (Giri et al. 2011). Los cinco países con mayor extensión de acuerdo a Giri et al. (2011) son Indonesia (22.6%) seguido por Australia (7.1%), Brasil (7.0%), México (5.4%) y Nigeria (4.7%). Lamentablemente, en los últimos años la intensa actividad humana sobre la zona costera ha tenido un impacto negativo sobre la cobertura de manglar, los países más afectados son aquellos en los que la acuacultura y el desarrollo costero han presentado su máximo desarrollo, por ejemplo en el sureste de Asia se han registrado pérdidas del 12% de la cobertura, en Filipinas 72%, en Tailandia 55% y en Vietnam 37%. En América,

los países más afectados, son Ecuador, con una reducción del 73%, la región del Golfo de Fonseca, con una reducción del 22% y México con reducciones que varían del 12 al 60% (Spalding et al. 1997; Valiela et al. 2001; Ruiz-Luna et al. 2008; Giri et al. 2011).

Numerosos estudios han demostrado la importancia de los ecosistemas de manglar en las pesquerías costeras y estuarinas, y en las de profundidad (Nagelkerken et al. 2008). Esto es debido a que los ecosistemas de manglar, además de ser extremadamente productivos ($16 - 26 \text{ Kg C Ha}^{-1} \text{ dia}^{-1}$) (Vega-Rodríguez 2008), se caracterizan por mantener complejas redes marinas tróficas y por favorecer un intenso intercambio de materia orgánica en forma de detritus y de organismos hacia los sistemas marinos adyacentes, dando origen a importantes flujos de materia y energía entre los sistemas costeros y marinos (Orihuela-Belmonte et al. 2004).

Debido a su complejidad e importancia, generalmente es difícil realizar una valoración real sobre los bienes y servicios que se obtienen del ecosistema de manglar (Walters et al. 2008). Sin embargo, algunas aproximaciones han estimado que pueden llegar a alcanzar un valor económico de alrededor de \$ 1,648 billones de dólares anuales por hectárea (Costanza et al. 1997; Rönnbäck 1999). Particularmente, para el noroeste de México, Aburto-Oropeza et al., (2008) estimaron que una hectárea de manglar puede alcanzar un valor promedio de \$ 37,500 dólares anuales, sólo por los peces y crustáceos de

importancia comercial capturados en la región del Golfo de California. En este sentido, la conservación de los ecosistemas de manglar es imprescindible para el sustento de los habitantes de la zona costera, quienes hacen de la pesca, su principal actividad económica y dependen directamente del ecosistema, tanto en el desarrollo de la pesquería local así como también como fuente de combustible, alimento, medicina y otras necesidades básicas (Hernández-Cornejo et al. 2005; Nagelkerken et al. 2008). Considerando el valor ecológico y económico de los ecosistemas de manglar, por una parte, y el efecto que podría tener la reducción de su cobertura en la biodiversidad del ecosistema, la necesidad de promover medidas para su conservación se ha hecho cada vez más evidente (Gray 1997; Richards et al. 2010; Raven et al. 2011).

Los esfuerzos por recuperar a los ecosistemas de manglar es una actividad relativamente reciente que se ha puesto en práctica en países como Puerto Rico, Estados Unidos, Cuba, Malasia, Tailandia, Australia, Filipinas, Indonesia y México (Bosire et al. 2008). Hasta hace poco tiempo, la siembra directa de hipocótilos o el trasplante de plántulas producidas en vivero eran las principales técnicas a seguir en los proyectos de reforestación en México. Sin embargo, el éxito de los trasplantes ha sido muy bajo, variando de 30 – 60% de supervivencia. Posteriormente, se incluyó la restauración hidrológica (Tovilla-Hernández & Orihuela-Belmonte 2002; Benitez-Pardo 2007).

Actualmente, la preservación de la diversidad genética se ha convertido en uno de los principales objetivos en los planes de manejo y conservación de las especies, ya que la pérdida de diversidad genética puede reflejarse en una baja capacidad de adaptación y resistencia a los cambios ambientales y enfermedades (Charlesworth et al. 1993; Amos & Balmford 2001; Saura et al. 2008). Por esta razón, es importante llevar a cabo un monitoreo de la diversidad y estructura genética entre las poblaciones nativas de mangle, así como de las plántulas que se recolectan como fuente de germoplasma antes de llevar a cabo la reforestación de las áreas potenciales a rehabilitar (Saura et al. 2008; Richards et al. 2010; Pil et al. 2011).

Existen estudios en plantas, que demuestran que en los sitios donde se han realizado programas de reforestación utilizando individuos procedentes de otros lugares, sin previo estudio genético, la diversidad genética ha disminuido al paso del tiempo (Williams et al. 2001; Ramp et al. 2006; Bosire et al. 2008). Esta disminución en la diversidad genética se ha visto reflejada en la aparición de mutaciones deletéreas, un ejemplo de ello es la aparición de propágulos albinos provocando el deterioro del ecosistema (Duke & Watkinson 2002). Sumado a lo anterior, si los individuos con los que se está reforestando provienen de una sola fuente, se corre el riesgo de que estos desplacen a las variantes genéticas presentes en el medio natural. Es por ello que los programas de reforestación deben conducirse con precaución, principalmente

donde se desconoce la identidad genética de la población nativa, para evitar un deterioro de su diversidad genética y por consiguiente del ecosistema.

En el presente estudio se evaluó la diversidad y estructura genética de *A. germinans* y *R. mangle* en las costas de México. En la costa del Pacífico se analizó desde su límite norte de distribución en el Golfo de California hasta la frontera con Guatemala, mientras que en el Atlántico se evaluó a las poblaciones del Golfo de México, Península de Yucatán y Mar Caribe. La información generada sirve para promover el desarrollo integral de un plan de manejo y conservación de las especies de mangle teniendo como meta la preservación de la diversidad genética y de especies en los ecosistemas de manglar en México.

2. Antecedentes generales

Durante las últimas décadas, se han desarrollado diferentes tipos de marcadores moleculares los cuales han aportado información valiosa sobre la variabilidad, estructura genética y relaciones taxonómicas de las especies en las poblaciones naturales (Parker et al. 1998; Triest 2008). Estudios moleculares en pastos marinos (McMillan 1982) marcaron la pauta para su aplicación en las especies de mangle y han mostrado gran utilidad para descifrar la filogeografía y estructura genética poblacional de las especies (Triest 2008).

El uso de las técnicas moleculares en las especies de mangle es relativamente reciente, siendo los géneros de *Avicennia* y *Rhizophora* los más estudiados. Goodall y Stoddart, (1989) detectaron a través de 14 sistemas enzimáticos (aloenzimas) una baja diversidad y estructura genética en poblaciones australianas de *Rhizophora stylosa*. Este mismo patrón fue observado por McMillan (1986) en poblaciones de *A. germinans* analizadas en la región del Golfo de México, Mar Caribe y Pacífico de Panamá. En una escala más amplia, estudios sobre la variabilidad enzimática de las especies de *Avicennia* alrededor del IWP han revelado que cada una de las variedades consideradas para *A. marina* corresponden a grupos particulares de individuos que llegaron y se establecieron en diferentes eventos de colonización,

aumentando la diversidad genética por introgresión (Duke et al. 1998b). El análisis de alozimas también ha sido utilizado para evaluar el estrés ambiental de *A. marina* en suelos contaminados con hidrocarburos y desechos urbanos en Sídney, Australia (Melville & Burchett 2002). Los resultados mostraron mayor diversidad genética en *A. marina* de suelos no contaminados.

En general, la diversidad genética en manglares y otras especies acuáticas ha mostrado valores inferiores al reportado para las angiospermas terrestres (Triest 2008). Por ejemplo, Ge & Sun (1999) reportaron una heterocigosidad esperada (H_E) de 0.026 in *A. corniculatum*, mientras que Sun et al. (1998) reportaron en *Kandelia candel* un valor de $H_E = 0.033$. Goodall & Stodart (1989) reportaron niveles muy bajos de polimorfismo en *R. stylosa*, solo 2 de 28 loci fueron variables. Además de los bajos niveles de diversidad, Nuñez-Farfán et al., (2002) reportaron altos niveles de endogamia y diferenciación genética en *R. mangle* en el Pacífico y Golfo de México.

Otros marcadores como RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) y AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism), han mostrado mayor diversidad que las alozimas en especies de mangle (Triest 2008). Por ejemplo, Abeysinghe et al., (2000) reportaron altos niveles de diversidad de RAPDs (1-13 fragmentos amplificados por cada par de cebadores) en especies de *Bruguiera* del suroeste de Sri Lanka. De igual forma, Giang et al., (2003) reportaron altos

niveles de diversidad (232 loci polimórficos de AFLPs) en poblaciones de *A. marina* en Vietnam.

Por otro lado, el análisis de secuencias de ADN del cloroplasto (cpDNA) han mostrado ser muy informativos en especies de mangle, principalmente en estudios filogenéticos. Por ejemplo, Chiang et al. (2001) mediante el análisis de cpDNA revelaron la presencia de dos linajes distintos de *K. candei* en la región del sureste de China y Vietnam (Taiwán, Japón) y otro más hacia la región sur del mar de China (Sarawak), con bajos niveles de diferenciación genética entre las unidades filogeográficas, reflejando una baja efectividad de flujo génico. Kado et al. (2004) evaluaron la región del *matK* (1500 pb) en tres especies de mangle, *A. marina*, *K. candei* y *Lumnitzera racemosa* detectando una marcada diferencia entre las poblaciones de *A. marina* de Vietnam con respecto a las de Okinawa, Japón. De igual forma, se detectó una clara discontinuidad de haplotipos de *K. candei* entre Norte y Sur de Vietnam. Sin embargo, no se registro variabilidad genética en las poblaciones de *L. racemosa*

Nettel y Dodd (2007) estudiaron poblaciones de *A. germinans* en la región AEP utilizando AFLPs, secuencias de cpDNA y región ITS (Internal Transcribed Spacers). Los resultados resaltan la presencia de haplotipos compartidos entre poblaciones del Este de África y Suramérica, sugiriendo una posible migración reciente a través del Atlántico. De igual forma, sobresale el hecho de haber registrado una mayor diversidad de haplotipos en el Pacífico con respecto al

Atlántico, y el haber detectado mayor diferenciación genética entre Pacífico y Atlántico que entre Este y Oeste del Atlántico.

Los microsatélites son uno de los marcadores moleculares que más se han utilizado para evaluar la diversidad de las especies de mangle y en algunas ocasiones para evaluar cuestiones de hibridación. Estos consisten de secuencias cortas y variables de ADN de uno a seis nucleótidos, repetidas en tándem, que se encuentran ampliamente distribuidas y con alta frecuencia en el genoma nuclear y del cloroplasto (Kalia et al. 2011). Sus principales características son un elevado polimorfismo, herencia co-dominante, reproducibilidad, abundancia relativa y extensa cobertura en el genoma. Los microsatélites rápidamente se han convertido en una de las herramientas más utilizadas en estudios de diversidad y estructura genética de poblaciones.

Diversos autores han caracterizado loci de microsatélites en especies de mangle, por citar algunos, Maguire et al. (2000a) para *A. marina*, Rosero-Galindo et al. (2002), Takayama et al. (2008) para *R. mangle*, Teixeira et al. (2003) para *A. alba*, Islam et al. (2004) para *R. stylosa*, Nettel et al. (2005), Cerón-Sousa et al. (2006) y Mori et al. (2010) para *A. germinans*, Geng et al. (2006) para *Aegiceras corniculatum*, Castillo-Cárdenas & Toro-Perea (2007) para *Pelliciera rhizophorae*.

El diseño de estos microsatélites ha permitido el desarrollo de estudios enfocados principalmente, a la evaluación de la diversidad genética, estructura poblacional e hibridación. Por ejemplo, Maguire et al. (2000b) analizaron la diversidad y estructura genética de 14 poblaciones de *A. marina* a lo largo de su distribución geográfica, encontrando altos niveles de diversidad genética y una marcada diferenciación entre sus poblaciones. Giang et al.(2003), analizaron 12 poblaciones de *A. marina* en las costas de Vietnam, las cuales mostraron resultados muy similares a los reportados por Maguire et al. (2000b). Arnaud-Haond et al. (2006) evaluaron la composición genética y los sistemas de apareamiento de *A. marina* en poblaciones de Vietnam, norte de Filipinas y Australia, encontrando una mayor diversidad y menor estructura genética en las poblaciones ubicadas a menores latitudes que aquellas encontradas en las poblaciones cercanas a sus límites de distribución.

Los estudios con microsatélites en especies de mangle en el continente Americano, son pocos y relativamente recientes. Arbelaéz-Cortes et al. (2007) evaluaron la diversidad genética poblacional de *R. mangle* en cinco poblaciones del Pacífico colombiano, mediante tres de los diez microsatélites previamente diseñados por Rosero-Galindo et al. (2002). Los resultados revelaron altos niveles de diversidad genética ($H_E = 0.66$) y bajos niveles de estructura genética poblacional ($F_{ST} = 0.05$), sugiriendo un efectivo flujo genético entre las poblaciones analizadas. Estudios posteriores sugieren que la alta diversidad de

R. mangle en Colombia puede atribuirse a una antigua hibridación entre especies del género *Rhizophora* (Cerón-Souza et al. 2010). Nettel et al. (2008), evaluaron la diversidad genética de *A. germinans* y *A. bicolor* en el Pacífico de Centroamérica utilizando además de microsatélites, la secuencia de la región ITS y cpDNA. Los resultados del ITS mostraron evidencias de hibridación entre *A. germinans* y *A. bicolor* en la región del Pacífico sur de México. Sin embargo, los resultados con microsatélites revelaron un aislamiento contemporáneo y altos índices de diversidad genética que los autores lo atribuyen a una introgresión por hibridación antigua entre ambas especies. Salas-Leiva et al. (2009), evaluaron la diversidad genética de *A. germinans* en la costas del Atlántico y Pacífico de Colombia. Los resultados muestran una mayor diversidad genética en las poblaciones del Atlántico, con respecto a las del Pacífico y evidencia de estructura genética entre ambas costas ($F_{ST} = 0.39$). Los valores de diversidad genética resultaron ser menores a los previamente reportados por Nettel et al. (2008), lo cual hace pensar a los autores en una posible disminución de la diversidad genética de *A. germinans* debido a la fragmentación de los bosques de mangle en la costa Colombiana.

Pil et al. (2011), utilizaron ocho microsatélites previamente diseñados por Rosero-Galindo et al. (2002) y Takayama et al. (2008) para evaluar la diversidad y estructura genética en 10 poblaciones de *R. mangle* a lo largo de la costa Brasileña. Las poblaciones más sureñas marcan el límite sur de

distribución de *R. mangle* detectándose la menor diversidad genética. Lo anterior sugiere que los cambios en temperatura durante los periodos de glaciación han influido en la pérdida de diversidad genética de las poblaciones ubicadas al límite debido a la pérdida de alelos durante consecutivos eventos de colonización después de la última glaciación.

México representa el límite Norte de distribución de las especies de mangle en el Pacífico oriental (Pacheco-Ruiz et al. 2006) y a lo largo de sus costas, es posible observar una gran diversidad de hábitats y características morfológicas (Domínguez et al. 1998; Méndez-Alonzo et al. 2008), que sugieren diferencias genéticas entre sus poblaciones. Actualmente, México cuenta con aproximadamente 770,057 ha de manglar (Acosta-Velázquez et al. 2009), incluyendo la costa del Atlántico y del Pacífico y se ubica en el cuarto lugar en cobertura de manglar a nivel mundial y en el segundo en América, después de Brasil (Giri et al. 2011). Sin embargo, y debido a su acelerada deforestación y fragmentación del hábitat, la necesidad de un plan integral de manejo y conservación de las especies se ha hecho cada vez más evidente (CONABIO 2009).

La ubicación geográfica de México lo convierte en un país privilegiado donde se conjuntan diferentes climas y áreas biogeográficas que dan lugar a una gran diversidad de hábitats, entre los que destacan los ambientes costeros, dando lugar a más de 130 lagunas costeras (Lankford 1977; Contreras 1993).

El litoral mexicano tiene una longitud de aproximadamente 11,500 km de los cuales el 68% corresponde al Océano Pacífico incluyendo el Mar de Cortés en el Golfo de California, y 32% al Golfo de México y Mar Caribe en el Océano Atlántico.

En el Océano Pacífico, el litoral se caracteriza por presentar una fisiografía de alto relieve, bordeadas por montañas con elevaciones de hasta 3,000 m y por amplias planicies costeras donde se desarrollan prevalentemente cuatro especies de mangle (Flores-Verdugo 1992). El litoral del Pacífico comprende una gran diversidad de hábitats y se extiende desde las costas del Alto Golfo de California, una de las regiones más áridas del planeta, hasta las costas de Oaxaca y Chiapas con vegetación exuberante y alta precipitación. Debido a su heterogeneidad, y a las condiciones estructurales de los manglares, el litoral del Pacífico fue dividido en tres regiones, pacífico Norte, Centro y Sur (CONABIO 2009).

La costa del Océano Pacífico Norte comprende a los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora, Sinaloa y Nayarit. Esta región es considerada de gran importancia por ser un área de transición entre las regiones tropical y templada, lo que ha favorecido a una gran biodiversidad con un considerable número de endemismos. Asimismo, en esta área se encuentra el límite norte de distribución de las especies de mangle (Pacheco-Ruiz et al. 2006; Acosta-Velázquez et al. 2009) y una de las zonas de manglar de mayor

extensión en el Pacífico Mexicano, el sistema estuarino Teacapán-Agua Brava-Marismas Nacionales, con una superficie estimada de 113,238 ha. (Flores-Verdugo 1992).

La región Pacífico centro comprende a los estados de Jalisco, Colima y Michoacán. Esta región se caracteriza por presentar una planicie costera muy estrecha y debido a ello es donde se encuentra la menor extensión de manglar con 6,590 ha que representan un poco menos del 1 % del total de manglar en México (Acosta-Velázquez et al. 2009).

Por último, el Pacífico sur está integrado por los estados de Guerrero, Oaxaca y Chiapas. Debido a la alta precipitación y a la gran diversidad de ríos, lagunas costeras y bahías, el Pacífico sur alberga a una gran diversidad de especies, entre ellas a seis especies de mangle con una extensión aproximada a 66,374 ha que corresponden al 8.6% de la cobertura total nacional (CONABIO 2009).

La zona costera del Atlántico Mexicano cuenta con una amplia planicie costera lo cual favorece el desarrollo de extensas áreas de manglar, representando el 66% de la cobertura total nacional. De acuerdo a la clasificación de Conabio (CONABIO 2009) la costa del Atlántico se compone de la zona costera de la Península de Yucatán y el Golfo de México. La primera está compuesta por los estados de Campeche, Quintana Roo y Yucatán y

comprende el 55% de la cobertura, mientras que el Golfo de México, integrado por los estados de Tamaulipas, Veracruz y Tabasco representa el 11% de la cobertura nacional (Acosta-Velázquez et al. 2009).

De acuerdo a lo anterior, y debido a que México cuenta con una amplia extensión costera, la mayoría bordeada por ecosistemas de manglar, es considerado como uno de los primeros cinco países con mayor extensión de manglar (Giri et al. 2011). Los bosques con mayor desarrollo estructural se encuentran en las zonas de alta precipitación como es el caso del Pacífico Sur y en zonas de amplia planicie costera como el área de Marismas Nacionales Nayarit y en algunos sitios del Golfo de México. Por el contrario, las regiones áridas en el Golfo de California y las de planicie costera reducida en el centro del Pacífico presentan un menor desarrollo estructural con menor cobertura y mayor fragmentación.

3. Genética poblacional de *Avicennia germinans* en México

3.1 Introducción

Avicennia germinans (L. y Stearn 1958), comúnmente conocido como mangle negro, es uno de los principales constituyentes en los ecosistemas de manglar de América. Su distribución en el Atlántico va desde el norte del Golfo de México, en Florida (29° 53' N), hasta Espíritu Santo en Brasil (23° 00' S). En las costas del Pacífico, su distribución inicia en el Golfo de California (Punta Lobos, Sonora), México (30° 15' N) hasta el sur de Punta Malpelo, Perú (3° 40' S) (Tomlinson 1994).

Es una especie de floración estacional (principalmente en verano), sus flores son pequeñas (1 a 2 cm de ancho) y se desarrollan en inflorescencias axilares y terminales. La polinización ocurre a través de insectos, principalmente abejas aunque el viento también juega un importante papel. Sus flores presentan tanto estructuras masculinas como femeninas, sin embargo estas desarrollan en tiempos diferentes (protandra) lo cual evita la autopolinización y reduce la endogamia. La especie se considera vivípara debido a que la germinación ocurre cuando el embrión se encuentra aun encerrado dentro del fruto (Tomlinson 1994).

Los propágulos vivíparos se encuentran encerrados en una cápsula ovalada y achatada de 2.2 cm y 1.2 g de peso promedio, al desprenderse de la

planta pueden flotar y permanecer viables hasta por tres meses, pero una vez en el sustrato, los propágulos se arraigan rápidamente y empiezan a desarrollar las primeras hojas en un periodo de alrededor de tres semanas, alcanzando su estado adulto a los 2-3 años de vida (Tovilla-Hernández & Orihuela-Belmonte 2002).

El mangle negro alcanza su máximo desarrollo estructural en ambientes con bajos niveles de estrés ambiental y antropogénico. Sin embargo, debido a su alta tolerancia a altos rangos de salinidad y temperatura, es posible encontrarlos en los límites de distribución bajo condiciones inhóspitas para la gran mayoría de las especies de mangle. Sin embargo y debido al estrés fisiológico su desarrollo estructural es muy inferior al encontrado en sus condiciones óptimas. Diversos estudios han documentado una gran diversidad morfológica, atribuida principalmente a la gran diversidad de hábitats y condiciones ambientales en las que habita (Méndez-Alonzo et al. 2008; Agraz Hernández et al. 2011; Alleman & Hester 2011).

Esta gran diversidad morfológica contrasta con la baja diversidad genética que ha sido reportada para las especies de *Avicennia*, sobre todo en aquellas poblaciones ubicadas en los márgenes de distribución (Maguire et al. 2000b; Arnaud-Haond et al. 2006). Richards et al. (2010) denominaron a esta diversidad morfológica, como plasticidad fenotípica y sugieren que ésta plasticidad puede ser mayor en aquellas especies con un alto rango de

distribución y con elevada variabilidad genética. Es por eso que la conservación de la diversidad genética se ha convertido en uno de los principales objetivos en los planes de manejo y conservación de las especies. En la presente investigación se evaluó la diversidad y estructura genética poblacional, así como su grado de conectividad y flujo génico entre poblaciones del mangle negro en México.

3.2 Objetivos

Objetivo general

Evaluar la diversidad y estructura genética de *Avicennia germinans* en las costas del Pacífico y Golfo de México.

Objetivos Específicos

1. Determinar la composición genética de *Avicennia germinans* en las costas del Pacífico y Golfo de México.
2. Evaluar la estructura genética poblacional y los patrones de dispersión de *Avicennia germinans* en las costas del Pacífico y Golfo de México.
3. Identificar la ubicación geográfica de las regiones de mayor diversidad genética en México.
4. Analizar los principales mecanismos que pudieron haber intervenido en la composición y distribución actual de la diversidad genética de *A. germinans* en México.

3.3 Materiales y Métodos

3.3.1 Área de estudio

Se analizaron individuos de 19 bosques del mangle *A. germinans* en las costas Mexicanas dentro de las cinco regiones establecidas en el Inventario Nacional de Manglares (Pacífico Norte, Pacífico Centro, Pacífico Sur, Golfo de México y Península de Yucatán) establecido por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO 2009) (Figura 1, Tabla I).

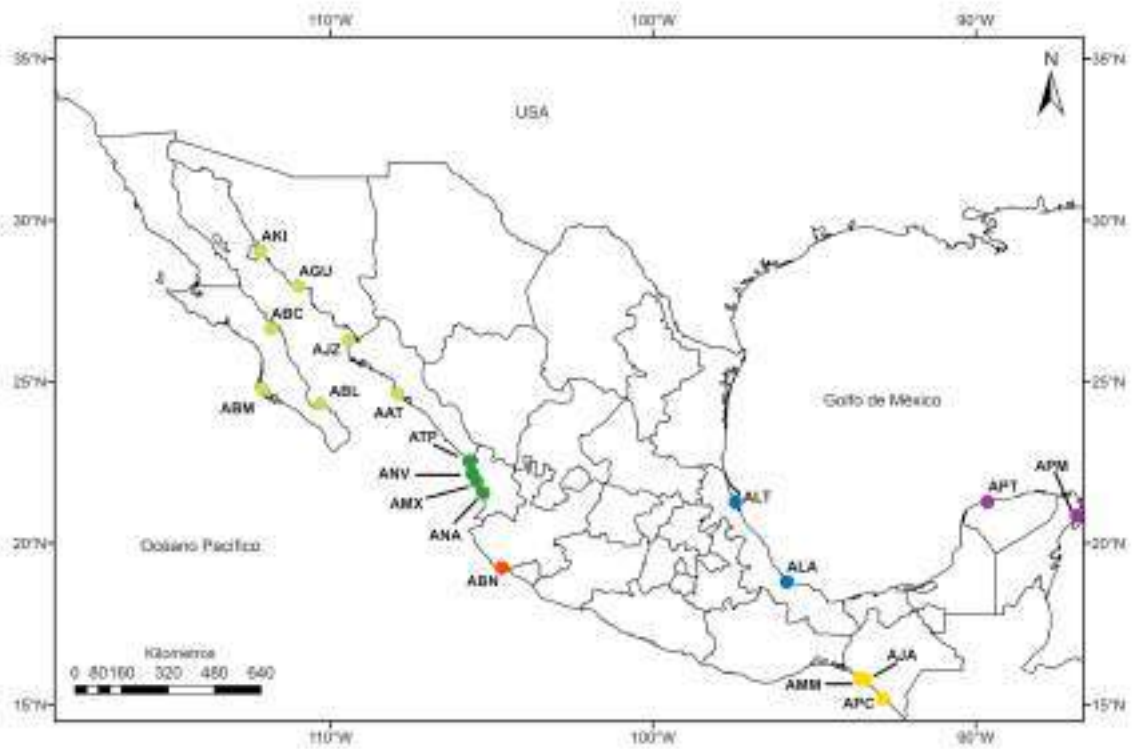


Figura 1. Área de estudio y sitios de colecta de *A. germinans* en las costas del Atlántico y Pacífico de México. Círculos morados; Región Península de Yucatán, Círculos azules; Región Golfo de México, Círculos amarillos; Región Pacífico Sur, Círculos naranja; Región Pacífico Centro, Círculos verdes; Región Pacífico Norte (Verde oscuro; Subregión Marismas nacionales, Verde claro; Subregión Golfo de California).

Tabla I. Ubicación geográfica, entidad y código de los sitios de colecta de *A. germinans* en las costas del Pacífico y Atlántico. ^aSubregión Golfo de California; ^bSubregión Marismas Nacionales.

Sitio de Colecta	Entidad	Código	Latitud	Longitud
Pacífico Norte				
^a Bahía Concepción	Baja California Sur	ABC	26°38'23N	111°49'48W
^a Bahía Magdalena	Baja California Sur	ABM	24°45'12N	111°59'06W
^a Bahía Balandra	Baja California Sur	ABL	24°19'20N	110°19'00W
^a Bahía Kino	Sonora	AKI	29°02'28N	112°09'94W
^a Guaymas	Sonora	AGU	27°57'34N	110°58'51W
^a El Jitzámuri	Sinaloa	AJZ	26°18'09N	109°14'27W
^a Bahía de Altata	Sinaloa	AAT	24°37'23N	107°54'38W
^b Estero de Teacapán	Sinaloa	ATP	22°32'10N	105°41'44W
^b Novillero-Agua Brava	Nayarit	ANV	22°11'17N	105°34'145W
^b Laguna de Mexcaltitán	Nayarit	AMX	21°55'58N	105°27'68W
^b San Blas	Nayarit	ANA	21°32'01N	105°15'48W
Pacífico Centro				
Barra de Navidad	Jalisco	ABN	19°11'46N	104°39'55W
Pacífico Sur				
Laguna Joaquín Amaro	Chiapas	AJA	15°45'37N	93°25'50W
Laguna Mar Muerto	Chiapas	AMM	15°59'12N	93°54'21W
Laguna Panzancola	Chiapas	APC	15°05'54N	92°44'59W
Golfo de México				
Laguna Tamiahua	Veracruz	ALT	21°15'30"N	97°26'21"W
Laguna Alvarado	Veracruz	ALA	18°48'05"N	95°41'26"W
Península de Yucatán				
Puerto Telchac	Yucatán	APT	21°19'59"N	89°20'10"W
Puerto Morelos	Quintana Roo	APM	20°53'18N	86°52'19"W

3.3.2 Colecta de material foliar

Se colectó material foliar de aproximadamente 20 individuos de *A. germinans* en cada uno de los 19 sitios de colecta en las costas del Pacífico y Atlántico de México (Tabla I, Figura 1). Las muestras fueron tomadas de especímenes separados por una distancia mínima de 30 m entre individuos, con el objetivo de reducir la probabilidad de muestrear individuos con cierto grado de parentesco. La excepción fue en Bahía de Kino (AKI), donde se colectaron individuos a una distancia de 10 m debido al reducido tamaño del manglar. Las muestras colectadas se deshidrataron y se almacenaron con gel de sílica hasta la extracción del ADN.

3.3.3 Extracción de ADN

El ADN genómico fue extraído a partir de 20 mg de tejido foliar utilizando el método de CTAB/PVP (hexadecil trimetil amonio bromuro/polivinil pirrolidona) modificado por Muñiz-Salazar et al.(2005). El método consistió en homogenizar el tejido con hielo seco y resuspender en 0.85 volúmenes de CTAB/PVP para después incubar a 65°C durante 6 h. Posteriormente el homogenizado fue extraído con aproximadamente 0.6 volúmenes de cloroformo/ alcohol isoamílico (24:1 v/v) y centrifugado a 13,000 rpm por 10 min. para separar las fases. El ADN fue precipitado con 0.7 volúmenes de isopropanol a -20°C durante 12 h. Al

final, el ADN obtenido fue re-suspendido en 100 μ L de TE 1X y almacenado a -20°C hasta su posterior análisis.

La eficiencia de la extracción fue evaluada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.4% teñida en una solución al 10% de Gel-Star® para visualizar el ADN a través de luz ultravioleta. La calidad del ADN se evaluó al considerar a una banda bien definida como ADN de buena calidad y a las bandas barridas como ADN degradado. La cantidad de ADN se evaluó al comparar con la intensidad de las bandas de un marcador comercial de concentración conocida.

3.3.4 Análisis genético

Se amplificaron siete loci de microsatélites específicos de *A. germinans*, seis de éstos, caracterizados por Nettel et al. (2005) y uno más, el *locus* CA_002, caracterizado por Ceron-Sousa et al. (2006), cuyos cebadores fueron etiquetados con distintos fluorocromos (Tabla II). Posteriormente, éstos fueron amplificados mediante una reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) conteniendo 1X Buffer (10mM Tris HCl, 50 mM KCl, pH 8.3, SIGMA), 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.15 μ M de cada cebador, 1 unidad de *Taq* ADN polimerasa (SIGMA) y 20 ng de ADN genómico en un volumen final de 20 μ L de reacción.

Tabla II. Microsatélites de *A. germinans* utilizados para el análisis genético poblacional. Al final de la secuencia de cada cebador F se indica el fluorocromo con el que fueron etiquetados, T °C: indica la temperatura de alineación utilizada en la PCR para cada cebador.

Locus	Secuencia 5'-3'	Tipo de repetición	T°C
	F: forward / R: reverse		
AgT4	F: CAAGATTTTGATCAATTATG ^{PET} R: ACGTGACGCATTGATCTACC	(CATA) ₅ CATG(CATA) ₉	50
AgT7	F: CTAAGTAGGACAGTAATGCGAC ^{NEB} R: AATCATCAGAATCCCTCAAGTGC	(CAT) ₂ (AT) ₃ (GTAT) ₅	50
AgT8	F: ACACAACGCAGATAAATCC ^{VIC} R: AATGATGCGCTGTCTCCGTC	(TGTA) ₆	50
AgT9	F: GAACCTGATTAATGGTTGC ^{NEB} R: TCAAATTGCTTGTAGAGG	(CA) ₈ (GA) ₂ (CAGA) ₅	50
AgD6	F: TATATGGAAACCAACCATGC ^{FAM} R: GATGGTGCGGGCTGTC	(ATT) ₄ N ₇ (GT) ₁₅	59
AgD13	F: TTCACCTATATGAATGGCGCAC ^{FAM} R: GGAGCACGCGATAACAAGAGC	(CA) ₁₀	55
CA002	F: AGCCCTGGTGATAGTGACAG ^{VIC} R: AACAGCAAAATGTAAAGTGGCATC	(CA) ₁₂	55

3.3.4.1 Amplificación de loci de microsatélites

Las reacciones de la PCR se llevaron a cabo en un termociclador Mycycler Biorad. Todos los loci de microsatélites fueron amplificados con el mismo perfil de temperatura, con excepción de la temperatura de alineación de los cebadores, la cual se modificó de acuerdo a la temperatura óptima de cada cebador (Tabla II). En general, el perfil de amplificación consistió de un periodo de desnaturalización inicial de 5min a 95°C seguido de 35 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a la temperatura óptima de alineación de cada cebador, 45 s a 72°C y una extensión final de 30 min a 72°C.

La concentración de los productos amplificados se evaluó utilizando una regla molecular de concentración conocida mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñida en una solución al 10% de Gel-Star® y visualizada con luz ultravioleta. Posteriormente, las muestras se ajustaron a una concentración de 2 ng/μL, que es la requerida para el análisis de fragmentos en el secuenciador automático.

Para asegurar la reproducibilidad y consistencia en el proceso de amplificación, el 5% de las muestras fueron re-amplificadas y en cada reacción de PCR se incluyó un control negativo para detectar problemas de contaminación. Los productos de amplificación de PCR fueron separados por electroforesis capilar mediante un secuenciador automático de ADN Applied

Biosystems 310 Genetic Analyzer. El tamaño de los alelos se determinó con el programa GeneMarker 1.85 (Softgenetics) y el programa Microchecker (Oosterhout et al. 2004) para detectar la presencia de alelos nulos.

3.3.5 Análisis de datos

3.3.5.1 *Diversidad genética*

El análisis de diversidad genética, en el que se incluye al número y frecuencia de alelos, así como al grado de heterocigosis en cada población, fue calculado mediante el programa GDA 1.1 (Lewis & Zaykin 2001). La riqueza alélica por locus y por población fue calculada usando el FSTAT 2.9.3 (Goudet 2001). Por otra parte, la prueba global para detectar desviaciones al equilibrio de Hardy-Weinberg, así como el análisis de desequilibrio en el ligamiento entre todos los pares de loci fue analizado utilizando GENEPOP 4.0 (Raymond & Rousset 1995; Rousset 2008). La significancia para todas las pruebas múltiples se fijó en 0.05, con la corrección de Bonferroni (Rice 1989).

3.3.5.2 *Asignación poblacional*

Para determinar la estructura poblacional de *A. germinans* en las costas del Pacífico y Atlántico de México y simultáneamente asignar individuos a las áreas geográficamente definidas se utilizó el método de agrupamiento

Bayesiano implementado en el programa STRUCTURE 2.2.3. (Pritchard et al. 2000). Este consistió de un análisis exploratorio para inferir la estructura genética poblacional y asignar los individuos probabilísticamente dentro de K grupos de acuerdo a sus similitudes en frecuencia y número de alelos.

Las simulaciones se hicieron con base en 5×10^5 interacciones después de un calentamiento inicial de igual longitud, suponiendo frecuencias alélicas correlacionadas y bajo el modelo de poblaciones mezcladas (admixture model). Con el objetivo de asegurar la convergencia en las cadenas de Markov y la reproducibilidad del análisis, se corrieron 10 replicas para cada K grupo. El número más probable de K grupos fue aquel que tuvo el más alto valor de $\Pr(X|K)$ (Pritchard et al. 2000). Posteriormente, el número de grupos fue ajustado de acuerdo al algoritmo ΔK descrito por Evanno et al. (2005).

3.3.5.3 Estructura genética poblacional

La distribución de la variación genética de los grupos obtenidos del análisis del programa STRUCTURE fue estimado mediante un análisis de varianza molecular, AMOVA (Excoffier et al. 1992) bajo el modelo de alelos infinitos (Infinite Allele Model; IAM) y el de mutación por pasos (Single-Step Mutation Model; SMM) empleando el programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). La variación genética fue cuantificada utilizando cuatro niveles jerárquicos: entre grupos, entre poblaciones dentro de grupos, entre individuos

dentro de poblaciones y entre individuos. La significancia estadística fue evaluada a través de 10,000 permutaciones no paramétricas con base en los estadísticos F de Wright: F_{ST} , F_{IS} y F_{IT} ; (Wright 1965). Se calcularon los coeficientes de diferenciación genética F_{ST} y R_{ST} , el primero sólo considera la frecuencia de los alelos detectados mientras que el segundo considera además de su frecuencia, la distancia genética molecular entre éstos. El valor de significancia para todas las pruebas múltiples se fijó en 0.05, con la corrección de Bonferroni (Rice 1989).

3.4 Resultados

3.4.1 *Diversidad genética*

El análisis de siete microsatélites registró 93 alelos diferentes en los 448 individuos de *A. germinans* examinados, de los cuales 27 fueron compartidos entre Pacífico y Atlántico, 33 fueron exclusivos del Pacífico y 33 del Atlántico. El número total de alelos por población varió de 7 (AKI) a 31 (AJA, AMM) en el pacífico y de 23 (APM) a 42 (APT, ALA) en el Atlántico.

La mayor diversidad genética se observó en la costa del Atlántico ($RA = 3.64$) y además no se observó diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los cuatro sitios analizados. En contraste, en la costa del Pacífico, la diversidad genética

fue mayor en la región del Pacífico sur (AMM, AJA, APC; RA = 3.34), seguido por la región de Marismas Nacionales (AAT, ATP, ANV, AMX, ANA; RA = 2.06), centro del Pacífico (ABN; RA = 1.56) y la región del Golfo de California (ABC, ABL, ABM, AKI, AGU AJZ; RA = 1.22) en el norte.

La mayoría de los loci fueron polimórficos en todas las localidades analizadas, con excepción de AKI. La H_o varió de 0.00 (AKI) a 0.51 (APC) en el Pacífico y de 0.37 (ALT) a 0.48 (APT) en el Atlántico (Tabla III). El número total de alelos por locus varió de 4 (AgT8) a 23 alelos (AgD13) con uno y seis alelos privados, respectivamente y una heterocigosidad observada que varió de 0.06 (AgT9) a 0.34 (CA_002).

El número de alelos privados (AP) varió de 0.0 (ABC, ABM, AKI, AAT, ANA, AMM) a 2.0 (ABL, ABN, AJA, APC) en el Pacífico y de 1.0 (APM) a 5.0 (ALA, ALT, APT) en el Atlántico, con un número total de 29 alelos privados en ambas costas (Tabla III). La riqueza alélica (RA) varió de 1.00 (AKI) a 3.51 (APC) en el Pacífico y de 3.26 (APM) a 4.14 (APT) en el Atlántico, con un promedio de 2.3 alelos por locus en los 19 sitios de colecta. Los sitios de colecta ubicados en la región norte del Golfo de California (ABC, ABL, ABM, AKI, AGU, AJZ) mostraron la menor riqueza alélica (RA < 1.3), principalmente aquellos localizados en la Península, donde se observó la fijación de un sólo alelo en tres (AgT7, AgT8 y AgD13) de los siete loci analizados. Además, donde

se ubicó el sitio de muestreo más norteño (AKI) en el Golfo de California, se observó nula variabilidad genética.

Los siete loci analizados se comportaron de manera independiente, y no se registró la presencia de genes ligados o la presencia de alelos nulos en ninguno de los sitios de colecta ($P > 0.05$). La prueba global de Hardy-Weinberg reveló un déficit de heterocigotos ($P < 0.05$) en siete de los 19 sitios analizados. Tres se localizan en la costa Pacífico (ANA, AMM, AJA) y cuatro en la costa del Atlántico (ALA, ALT, APT, APM).

Tabla III. Diversidad genética de *A. germinans* en términos del número total de alelos (A), proporción de loci polimórficos (P), riqueza alélica (RA), alelos privados (PA), heterocigosidad esperada (HE) y observada (HO), y coeficiente de endogamia (FIS). (*) Fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg ($P < 0.05$)

Región	Localidad	N	A	P	RA	AP	H _E	H _O	F _{IS}
Costa del Pacífico									
Pacífico Norte	ABC	18	10	0.28	1.29	0	0.08	0.07	0.19
	ABL	30	9	0.28	1.15	2	0.02	0.02	-0.04
	ABM	34	9	0.28	1.08	0	0.01	0.01	-0.01
	AKI	29	7	0.00	1.00	0	0.00	0.00	---
	AGU	24	14	0.57	1.41	1	0.07	0.06	0.10
	AJZ	30	15	0.71	1.37	1	0.05	0.05	-0.01
	AAT	30	19	1.00	1.94	0	0.21	0.21	0.02
	ATP	30	22	1.00	2.12	1	0.24	0.24	0.00
	ANV	24	24	1.00	2.21	1	0.25	0.22	0.12
AMX	17	18	0.71	2.03	1	0.22	0.18	0.17	
Pacífico Centro	ANA	30	19	0.85	1.96	0	0.23	0.18	0.19*
	ABN	10	12	0.57	1.56	2	0.10	0.10	-0.05
Pacífico Sur	AMM	16	31	1.00	3.32	0	0.42	0.36	0.14*
	AJA	20	31	0.85	3.18	2	0.38	0.35	0.10
	APC	10	28	1.00	3.51	2	0.51	0.51	0.00
<i>Promedio Pacífico</i>				0.68	1.94		0.19	0.17	0.07
Costa del Atlántico									
Golfo de México	ALT	28	41	0.85	3.52	5	0.43	0.36	0.16*
	ALA	30	42	1.00	3.62	5	0.45	0.41	0.08*
Península de Yucatán	APT	30	42	0.85	4.14	5	0.56	0.48	0.15*
	APM	8	23	0.85	3.26	1	0.55	0.44	0.21
<i>Promedio Atlántico</i>				0.88	3.64		0.49	0.42	0.15*
Total		448	93	1.00	2.3	29	0.26	0.23	0.11

El locus AgT8, mostró el menor número de alelos ($A = 4$) y sólo tres fueron detectados en el Pacífico y Golfo de México. De los cuatro alelos detectados (106, 110, 114, 118; longitud en Pb), el alelo 118 se detectó sólo en el sitio APM, al sureste de la Península de Yucatán. La frecuencia en la que éste fue detectado (18.75 %) sugiere que es un alelo real y no un artefacto durante el proceso de genotipado, lectura y/o asignación de alelos.

Se registró una marcada diferencia entre la frecuencia de los alelos detectados en las costas del Pacífico y Atlántico (Fig. 2). En la costa del Pacífico se detectaron tres alelos, siendo el alelo 110 el más frecuente (83 %). Mientras que en la costa del Atlántico se registraron 4 alelos, siendo el alelo 114 el más frecuente (65 %). El alelo más frecuente en el Pacífico, se encuentra escasamente en el Atlántico (8 %) y además se observó una tendencia decreciente hacia el interior del Golfo de México hasta desaparecer en el sitio más norteño (ALT). Por el contrario, el alelo 114 fue el más frecuente en el Atlántico (65 %) y en el Pacífico su frecuencia fue considerablemente menor (25 %). El alelo 106 no fue detectado en el noroeste de México. Sin embargo, si fue detectado en algunos individuos colectados en el sur del Pacífico y Golfo de México, alcanzando su máxima frecuencia en la Península de Yucatán (44 %). En ambas costas se observó una tendencia hacia la fijación del alelo más común conforme se acercaban hacia el Golfo de California en el Pacífico y hacia el Golfo de México en el Atlántico.

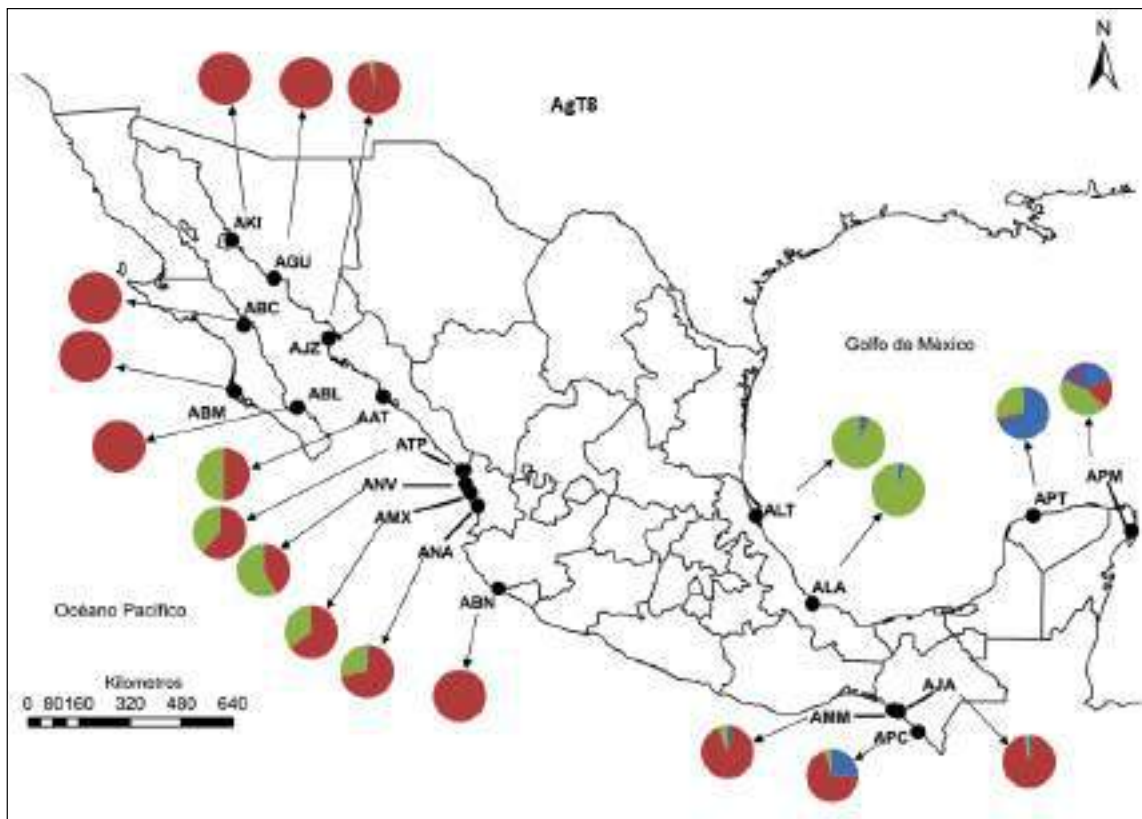


Figura 2. Frecuencias alélicas de los cuatro alelos detectados mediante el locus AgT8. En cada gráfico de pastel, los colores indican alelos diferentes y la proporción de colores indica la frecuencia de cada uno de los alelos en los sitios de colecta.

El locus AgT9 está representado por ocho alelos. Sin embargo, la diversidad en la región norte y centro del Pacífico estuvo representada por sólo cuatro alelos, de los cuales, uno de ellos (237 Pb) con un porcentaje superior al 95 %. Por otro lado, en la costa del Atlántico sólo se observaron dos alelos, uno de ellos exclusivo de ALA pero con una frecuencia muy baja (2 %), ya que fue detectado en sólo un individuo, mientras que el resto de individuos colectados en el Atlántico fueron clones (Fig. 3) y homocigotos para el alelo (228 Pb), consecuentemente, fue el locus que registró el mayor porcentaje de individuos homocigotos.

Es importante resaltar que el individuo que registró el alelo privado fue re-analizado para corroborar la longitud del alelo y su presencia en el sitio. El resultado fue positivo y por ende fue considerado como un alelo real y no un artefacto del proceso de amplificación y/o genotipado.

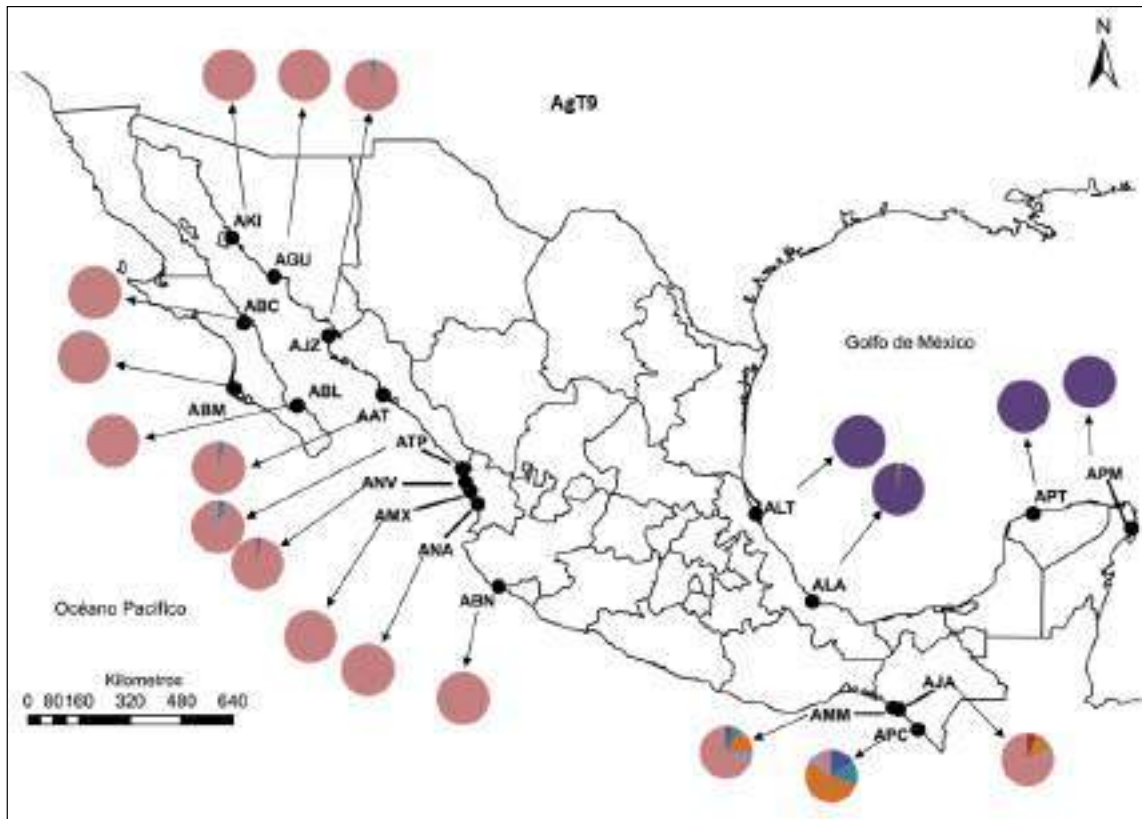


Figura 3. Frecuencias alélicas de los ocho alelos detectados mediante el locus AgT9. En cada gráfico de pastel, los colores indican alelos diferentes y la proporción de colores indica la frecuencia de cada uno de los alelos en los sitios de colecta.

El locus AgT7 está representado por 13 alelos. Sin embargo, la diversidad observada en la costa del pacífico es muy baja ya que sólo se detectó a ocho alelos y más del 90% de los individuos fueron homocigotos y clones para uno solo de ellos, observándose la fijación del mismo en la región del Golfo de California (Fig. 4). Por otro lado, en la costa del Atlántico se registró una mayor variabilidad con 12 alelos en total. El alelo más frecuente del Pacífico sólo fue detectado en uno de los individuos analizados en el Atlántico (ALT) y viceversa. Este locus mostró cinco alelos exclusivos de la costa del Atlántico, dos de ellos estuvieron presentes tanto en la región del Golfo de México como en la Península de Yucatán, dos fueron exclusivos de la península de Yucatán (APT) y uno más de el Golfo de México (ALA).

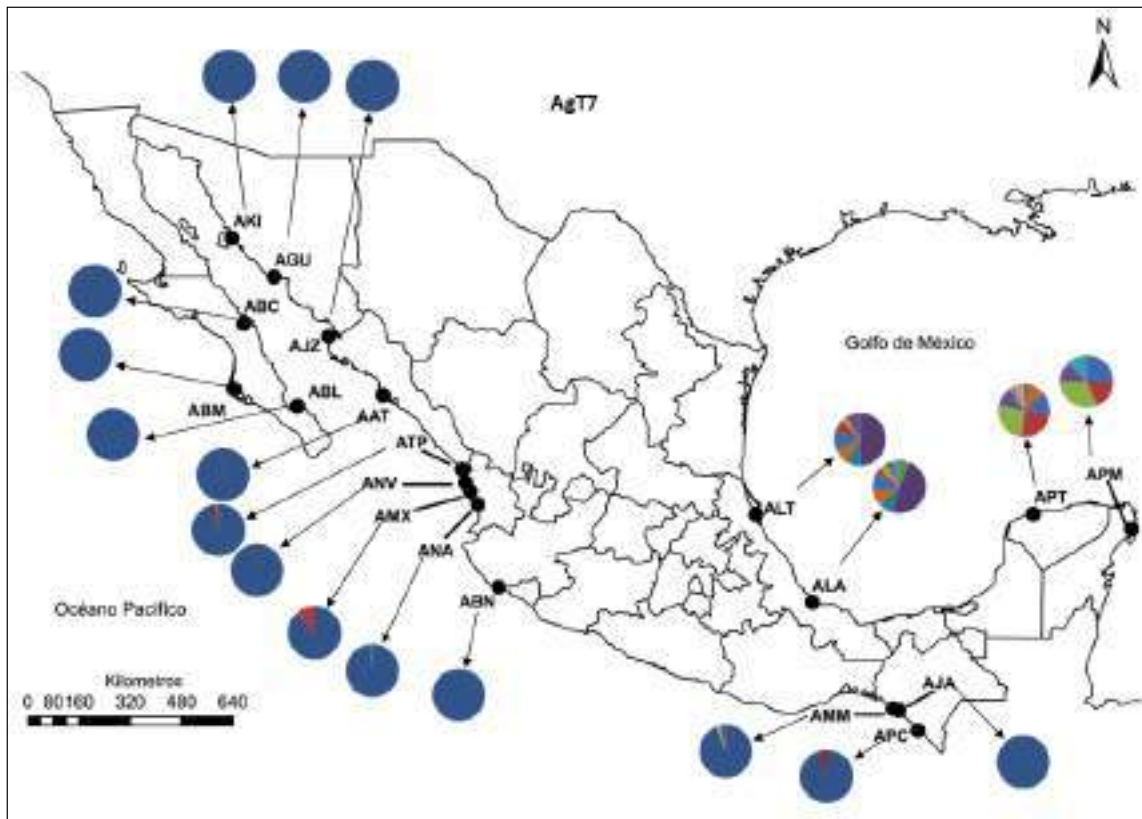


Figura 4. Frecuencias alélicas de los 13 alelos detectados mediante el locus AgT7. En cada gráfico de pastel, los colores indican alelos diferentes y la proporción de colores indica la frecuencia de cada uno de los alelos en los sitios de colecta.

El locus AgT4, al igual que el AgT7 también está representado por 13 alelos, siete fueron exclusivos del Pacífico y dos del Atlántico con un total de 10 y 6 alelos, respectivamente (Fig. 5). La región del Pacífico Norte y centro se caracterizó por presentar un alelo en común con una frecuencia mayor al 90%. Este mismo alelo se detectó en la región Pacífico sur, pero en menor frecuencia (10 – 20 %). Por el contrario, este mismo alelo no estuvo presente en ninguna de las localidades analizadas en la costa del Atlántico (Fig. 5). En el caso de la región Pacífico sur, el alelo con mayor frecuencia (> 55 %) fue registrado con una frecuencia muy similar en la costa del Atlántico.

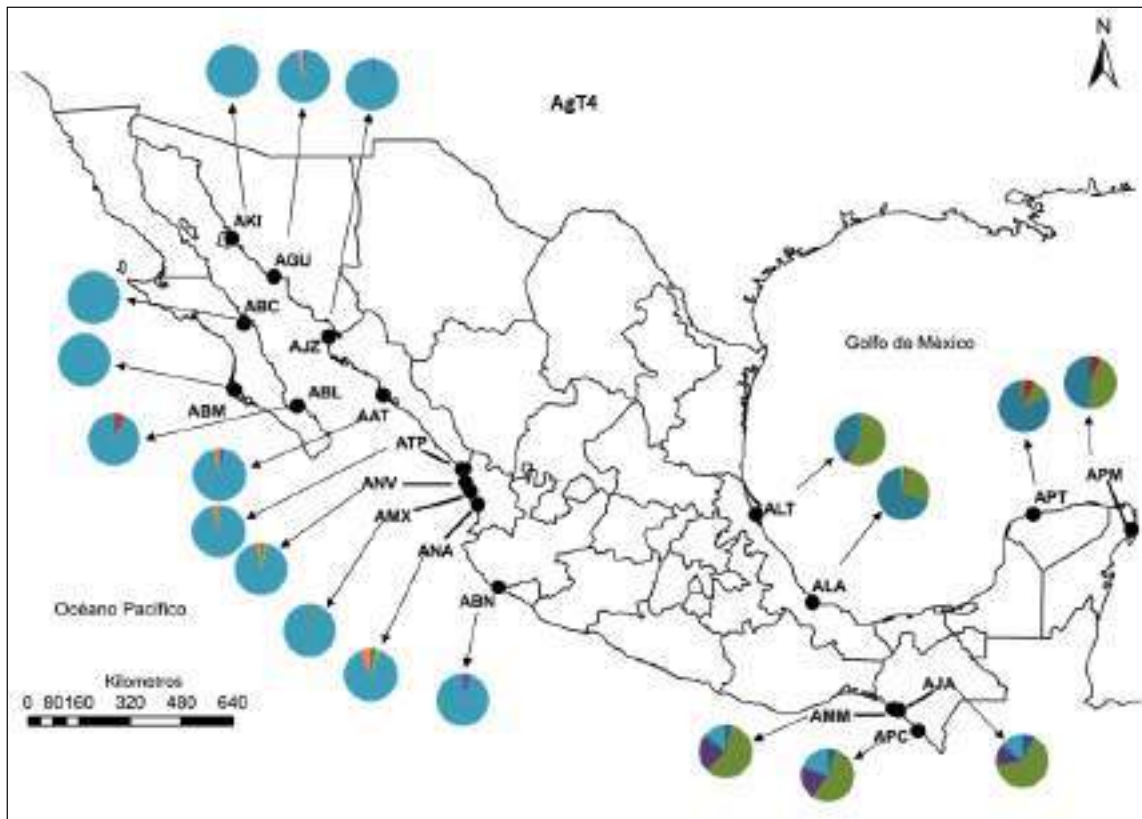


Figura 5. Frecuencias alélicas de los 13 alelos detectados mediante el locus AgT4. En cada gráfico de pastel, los colores indican alelos diferentes y la proporción de colores indica la frecuencia de cada uno de los alelos en los sitios de colecta.

Los loci AgD6 y AgD13 mostraron un patrón muy similar al observado en el locus AgT4, donde los alelos más representativos en el Pacífico difieren de aquellos alelos más representativos del Atlántico. Es importante destacar que el locus AgD6 (Fig. 6) mostró seis alelos privados, tres en la península de Yucatán (APT), dos en el Golfo de México (ALA, ALT) y uno en el Pacífico sur (AJA). El locus AgD13 registró el mayor número de alelos ($A = 23$). Sin embargo, la mayor parte de éstos fue detectada en la costa del Atlántico, sólo seis alelos fueron detectados en el Pacífico, de los cuales, uno que domina en el Pacífico norte y otro que domina en el centro y sur del Pacífico (Fig. 7). Además, es importante mencionar que éste locus, presentó desviaciones al equilibrio de Hardy-Weinberg por déficit de heterocigotos en toda la costa del Atlántico, así como en una localidad de Marismas Nacionales (ANV) y en una del Pacífico Sur (AJA), principalmente debido a la baja frecuencia en la que aparecieron la mayor parte de sus alelos.

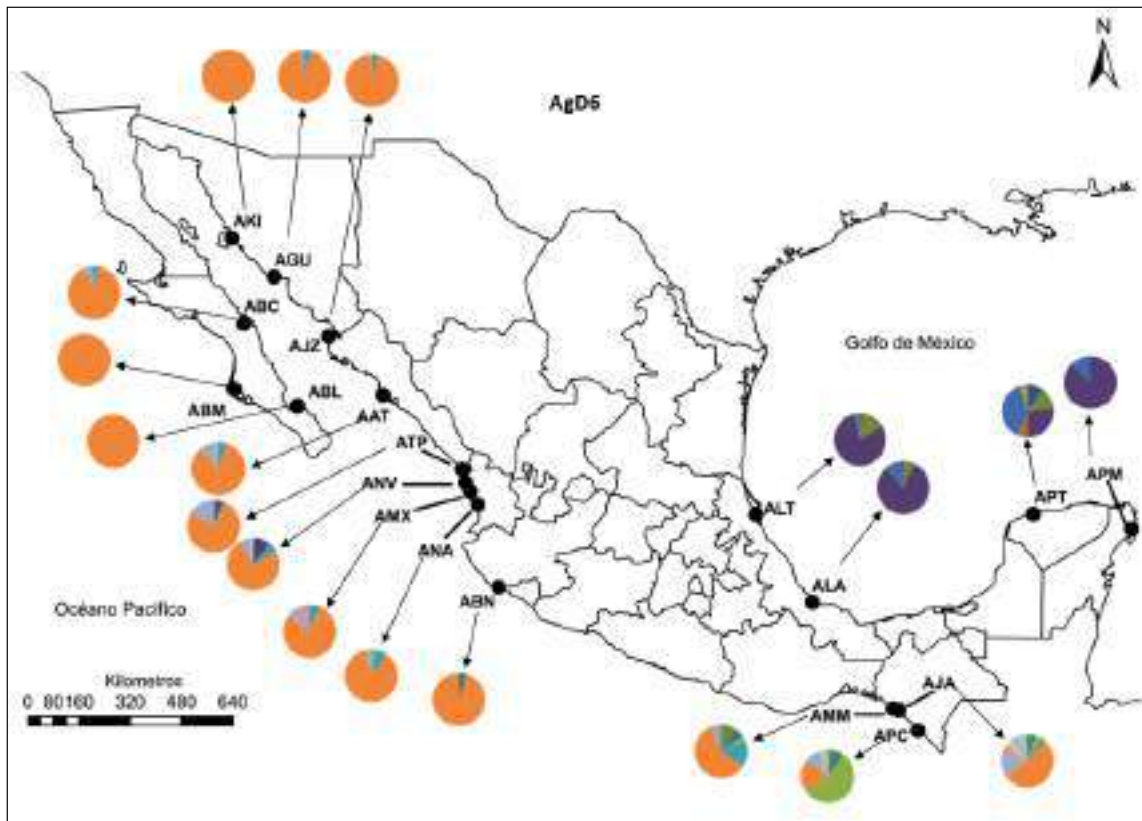


Figura 6. Frecuencias alélicas de los 17 alelos detectados mediante el locus AgD6. En cada gráfico de pastel, los colores indican alelos diferentes y la proporción de colores indica la frecuencia de cada uno de los alelos en los sitios de colecta.

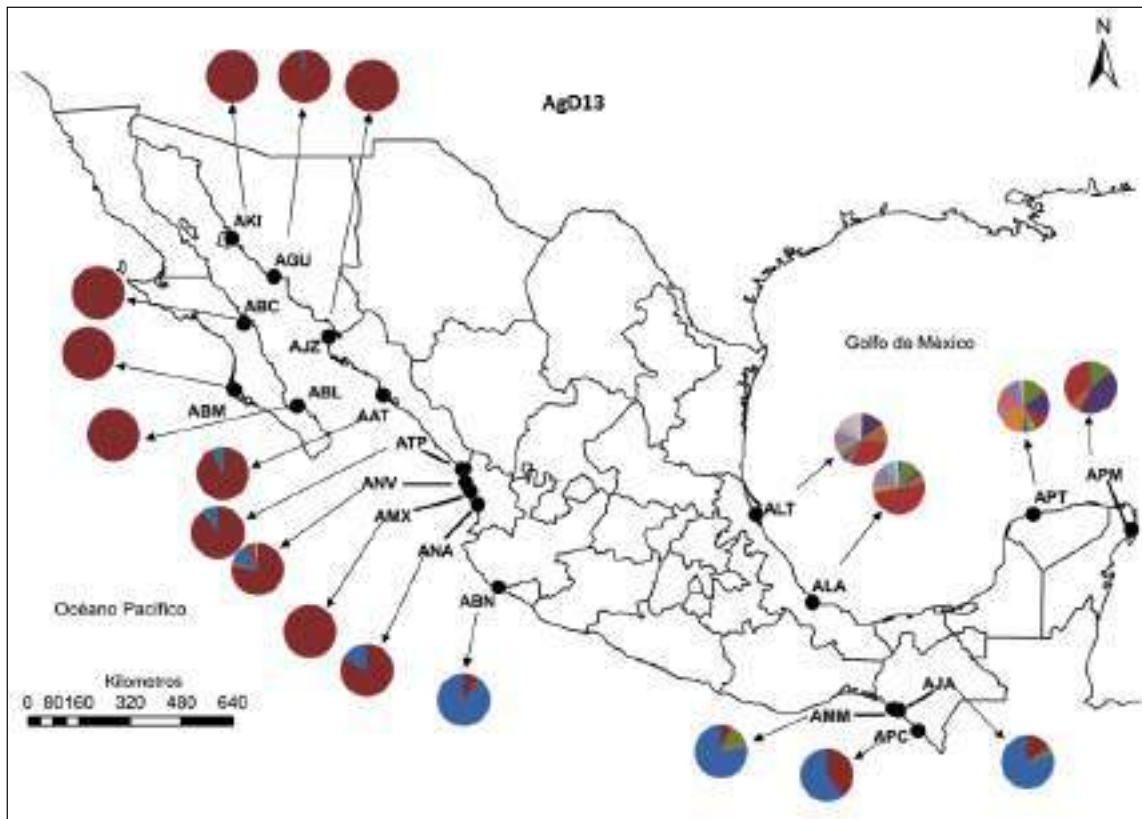


Figura 7. Frecuencias alélicas de los 23 alelos detectados mediante el locus AgD13. En cada gráfico de pastel, los colores indican alelos diferentes y la proporción de colores indica la frecuencia de cada uno de los alelos en los sitios de colecta.

El locus CA_002 mostró 15 alelos, siete de ellos privados, dos en la entrada del Golfo de California, uno en la península (ABL) y otro en la costa de Sinaloa (AJZ), dos más en Marismas Nacionales (ATP, AMX), uno en el Pacífico centro (ABN) y otro más en el Pacífico Sur (APC), mientras que en el Atlántico sólo un alelo privado fue registrado en la región del Golfo de México (ALA). Es importante destacar que el alelo más frecuente detectado en el Golfo de México (40-60%), también se registró en el Golfo de California (ABC) con una frecuencia similar, mientras que en el resto del Pacífico la frecuencia fue menor (3 - 15%; Fig. 8).

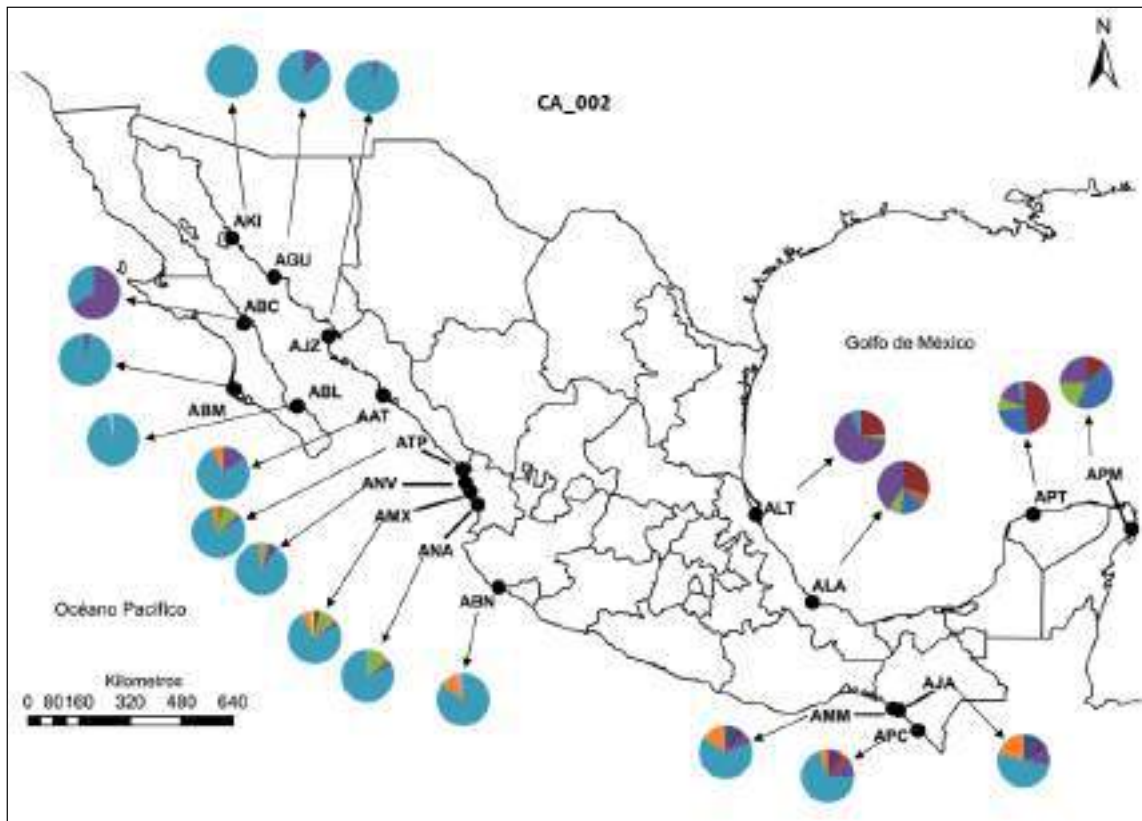


Figura 8. Frecuencias alélicas de los 15 alelos detectados mediante el locus CA_002. En cada gráfico de pastel, los colores indican alelos diferentes y la proporción de colores indica la frecuencia de cada uno de los alelos en los sitios de colecta.

3.4.2 Asignación Poblacional

El análisis de agrupamiento reveló que la variabilidad genética de *A. germinans* en México se encuentra heterogéneamente distribuida. De acuerdo al análisis bayesiano realizado en el programa STRUCTURE y a la corrección sugerida por Evanno et al. (2005), la variabilidad genética de *A. germinans* se encuentra distribuida en seis diferentes grupos ($K = 6$, Fig. 9). Los sitios con el porcentaje de asignación individual ($>90\%$), fueron APM, APT, ALA, ALT en el Atlántico y APC, AJA, AMM en el Pacífico sur (Fig. 9).

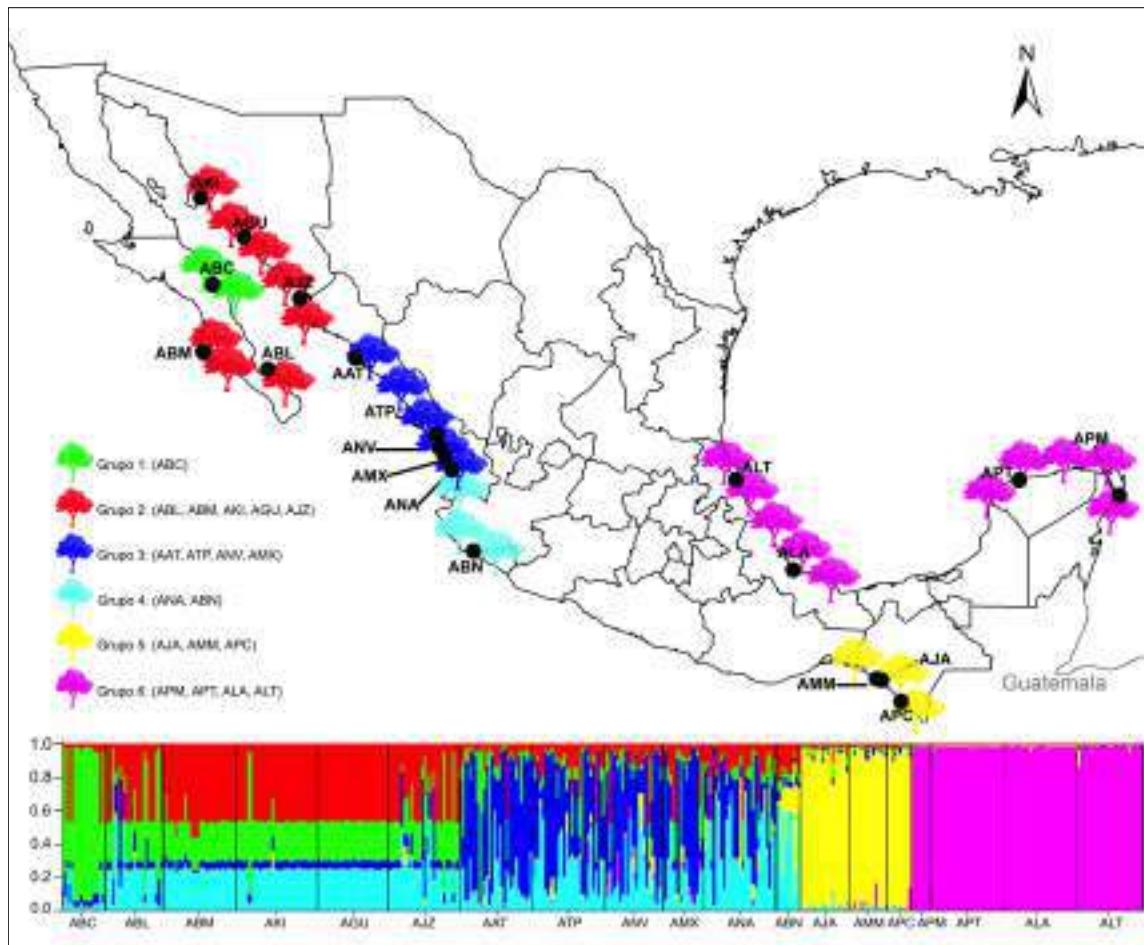


Figura 9. Resultados del análisis bayesiano ($K = 6$). En el gráfico, las barras verticales representan al porcentaje de asignación de cada uno de los individuos de *A. germinans* analizados. Cada color representa a un grupo diferente y su distribución en la costa de México.

El análisis de agrupamiento bayesiano detectó la presencia de cuatro grupos en la región norte y centro del Pacífico (Fig. 9). En cada uno de los grupos el porcentaje de asignación individual fue menor al 50 % excepto en el grupo 1 (Fig. 9) donde el porcentaje fue mayor al 60 %. Este bajo porcentaje de asignación sugiere que los grupos no se han separado del todo, o bien que permanecen en contacto mediante flujo génico actual. Por otro lado, el alto porcentaje de asignación individual de los manglares en el Atlántico, respecto a los de toda la costa del Pacífico sugiere que éstos se comportan como unidades independientes y aunque comparten gran parte de su composición genética, la frecuencia de sus alelos es muy diferente, posiblemente debido su aislamiento desde la elevación del Istmo de Panamá hace aproximadamente 3 millones de años.

3.4.3 Estructura Genética

El AMOVA, aplicado a cuatro niveles jerárquicos de diferenciación genética (Tabla IV) mostró que el mayor porcentaje de la variación molecular corresponde a la diferencia entre los seis grupos establecidos por el análisis bayesiano (Figura 9), ($F_{ST} = 52$; $R_{ST} = 81\%$) ($P < 0.05$), soportando los resultados del análisis de agrupamiento e indicando una fuerte estructura en la distribución de la composición genética de los bosques de mangle a lo largo del

Pacífico y Golfo de México. En el análisis de comparaciones pareadas entre los grupos, todas las comparaciones mostraron diferencias significativas (Tabla V).

Tabla IV. Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) jerárquico, aplicado bajo dos aproximaciones al modelo de mutación de los microsatélites (IAM y SMM) en los bosques del mangle *A. germinans* del Pacífico y Atlántico; % Var., Porcentaje de variación explicado por el nivel jerárquico; *, Estadísticamente significativo ($P < 0.05$).

Fuente de Variación	IAM		SMM	
	% Var.	F_{ST}	% Var.	R_{ST}
Entre Grupos	52.95*	0.52*	81.00*	0.81*
Entre poblaciones dentro de grupos	5.67*	0.12*	2.35*	0.12*
Entre individuos dentro de poblaciones	4.33*	0.10*	2.79*	0.16*
Entre individuos	37.05*	0.62*	13.86*	0.86*

Grupo 1 (ABC); Grupo 2 (ABL, ABM, AKI, AGU, AJZ); Grupo 3 (AAT, ATP, ANV, AMX); Grupo 4 (ANA, ABN); Grupo 5 (AJA, AMM, APC); Grupo 6 (APM, APT, ALA, ALT)

Tabla V. Comparaciones pareadas entre los grupos establecidos de acuerdo al análisis en STRUCTURE. Bajo la diagonal, distancias calculadas en base al modelo de alelos infinitos (F_{ST}) y sobre la diagonal, con base en el modelo de mutación por pasos (R_{ST}).

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
Grupo 1	-----	0.20	0.05	0.17	0.66	0.83
Grupo 2	0.59	-----	0.10	0.27	0.85	0.91
Grupo 3	0.25	0.24	-----	0.04	0.75	0.86
Grupo 4	0.28	0.28	0.08	-----	0.70	0.84
Grupo 5	0.39	0.62	0.39	0.27	-----	0.60
Grupo 6	0.56	0.74	0.58	0.55	0.45	-----

Grupo 1 (ABC); Grupo 2 (ABL, ABM, AKI, AGU, AJZ); Grupo 3 (AAT, ATP, ANV, AMX); Grupo 4 (ANA, ABN); Grupo 5 (AJA, AMM, APC); Grupo 6 (APM, APT, ALA, ALT)

3.5 Discusión

3.5.1 Diversidad Genética

Los niveles más bajos de diversidad genética en este estudio se registraron en la región del Pacífico Norte, principalmente en el Golfo de California donde se ubica el límite norte de distribución de las especies de mangle del Pacífico oriental. Diversos estudios han documentado que las poblaciones cercanas a su límite de distribución se caracterizan por presentar bajos niveles de diversidad y altos niveles de estructura genética (Maguire et al. 2000b; Arnaud-Haond et al. 2006; Triest 2008; Pil et al. 2011). La principal explicación que han dado es que estas poblaciones se encuentran alejadas de la población ancestral y que las condiciones ambientales no son las más propicias para el reclutamiento y óptimo desarrollo de la especie. En este estudio la población de Bahía de Kino (AKI) es la más norteña y presentó nula diversidad genética, ya que los 29 individuos analizados son genéticamente idénticos.

La diversidad genética en la costa del Pacífico mostró una tendencia decreciente hacia las poblaciones más norteñas, lo cual puede deberse a que las condiciones ambientales que favorecen al desarrollo de las especies de mangle se tornan más desfavorables hacia el límite de su distribución y por ende su cobertura y desarrollo estructural es menor. Otra hipótesis es que las

poblaciones actuales fueron recolonizadas a partir de un número reducido de individuos provenientes de las poblaciones más sureñas siguiendo el modelo de migración por pasos, (Kimura & Weiss 1964b) y a que durante cada evento de colonización hacia el norte la diversidad genética fue reduciéndose debido a repetidos eventos fundador, de tal manera que las poblaciones más norteñas contienen una menor proporción del pool genético ancestral (Broders et al. 1999; Hedrick et al. 2001; Abdelkrim et al. 2005).

La baja diversidad genética que caracteriza a las poblaciones cercanas a su límite de distribución se debe a diversos factores históricos, biogeográficos y ecológicos. Las poblaciones más norteñas son las más afectadas por eventos históricos de extinción y recolonización debido a los periodos de glaciación (Hewitt 2004). Estos eventos de re-colonización o expansión del hábitat a partir de poblaciones ancestrales pudieron haberse dado a partir de un número reducido de individuos de diversidad genética lo que explica la baja diversidad genética de las poblaciones más norteñas analizadas en este estudio. Este mismo patrón ya ha sido reportado para *A. germinans* en la región AEP (Dodd et al. 2002; Nettel & Dodd 2007) y para *A. marina* en la región IWP (Maguire et al. 2000a; Maguire et al. 2000b; Giang et al. 2003; Arnaud-Haond et al. 2006).

En contraste, el efecto de los periodos de glaciación sobre la diversidad genética de las especies de mangle no ha afectado a las poblaciones ubicadas en el centro de distribución, debido a la alta biodiversidad registrada

actualmente, especialmente para el área de la costa Pacífico de Colombia, Panamá y Costa Rica (Duke et al. 1998a), considerada como una zona de refugio de las especies costeras tropicales durante los periodos glaciares. De acuerdo a lo anterior, se sugiere que la diversidad y estructura genética de las especies de mangle en esta región está compuesta por la mayor parte del pool genético ancestral, además de las nuevas variantes que han surgido a lo largo de su historia. Esta hipótesis concuerda con los resultados obtenidos por Salas-Leiva et al. (2009) quienes reportan una mayor diversidad genética en la costa colombiana con respecto a lo reportado en este estudio.

En general, los valores de diversidad genética fueron mayores en la costa del Atlántico que en la del Pacífico. Este mismo comportamiento fue reportado por Salas Leiva et al. (2009) en poblaciones colombianas de *A. germinans* (Pacífico RA = 3.7, HO = 0.27; Atlántico RA = 5.6, HO = 0.43). Es importante resaltar que Salas-Leiva et al. (2009) evaluaron la diversidad genética y los niveles de flujo génico utilizando nueve loci de microsatélites, de los cuales, cinco son los mismos utilizados en este estudio.

En la costa del Pacífico Mexicano, la mayor diversidad genética de *A. germinans* se encuentra en la región Pacífico sur, la cual ha sido reportada como una zona de hibridación (Nettel et. al. 2008). La alta diversidad de especies taxonómicamente emparentadas que cohabitan en espacio y tiempo promueve los procesos de hibridación (Mallet 2005), incrementando el pool

genético original. Nettel et al. (2008) reportaron un incremento de la diversidad genética de *A. germinans* debido a una antigua hibridación con *A. bicolor*. Sin embargo, además de la hibridación, las extensas zonas de manglar y la conectividad de los ecosistemas costeros de la región Pacífico sur también contribuyen significativamente en la elevada diversidad genética que contienen.

En el caso de los sitios analizados en la costa del Atlántico, los valores de diversidad genética fueron muy similares a los detectados en el Pacífico Sur. Dos de los tres sitios de colecta en el Pacífico Sur y los cuatro del Atlántico mostraron indicios de endogamia debido al déficit de individuos heterocigotos (Tabla III). Estos resultados son consistentes con lo reportado por Salas-Leiva et al. (2009), quienes reportaron indicios de endogamia en el Pacífico y Atlántico de Colombia. Estos autores atribuyen el elevado índice de endogamia a la fragmentación de los bosques de mangle por deforestación en Colombia. Sin embargo, en México no se tiene un registro exacto de la tasa de deforestación de manglar y mucho menos por especie. Se ha reportado de manera general una reducción en cobertura de manglar del 12 al 60% (Ruiz-Luna et al. 2008) lo cual puede estar influyendo en la reducción y alteración de las frecuencias alélicas y genotípicas en las poblaciones de mangle en México.

3.5.2 Estructura Genética.

El análisis de agrupamiento de este estudio demostró que las poblaciones geográficamente más apartadas tienden a mostrar una mayor diferenciación genética y aún cuando comparten la mayor parte de su composición genética, la frecuencia y organización de la misma es heterogéneamente distribuida. De acuerdo a los resultados, las poblaciones se agruparon en seis diferentes grupos que mayormente corresponden al origen geográfico de las muestras: Grupo 1) ABC, población más norteña en la península de Baja California; Grupo 2) ABL-ABM-AKI-AGU-AJZ, centro y sur del Golfo de California; Grupo 3) AAT-ATP-ANV-AMX, subregión de Marismas Nacionales; Grupo 4) ANA-ABN, región del Pacífico central; Grupo 5) AJA-AMM-APC, región Pacífico sur y Grupo 6) APM-APT-ALA-ALT, región Golfo de México y Península de Yucatán en la costa del Atlántico (Figura 9).

La restricción del flujo genético potencialmente favorece la subestructuración de las poblaciones, como se observa en los resultados del presente estudio y como ha sido reportado para otras plantas tropicales (Hanson et al. 2008). La estructura genética poblacional resulta de la interacción de diversos mecanismos como la mutación, migración, selección y deriva génica que operan de manera alternada o ininterrumpida a lo largo de la historia de vida de las poblaciones y especies (Loveless & Hamrick 1984). Las

especies de plantas debido a su naturaleza sésil, además de los mecanismos mencionados, su estructura genética responde en gran medida a la estructura espacial de sus poblaciones e individuos (Sousa et al. 2007). A pesar de que las especies de mangle han sido catalogadas por mantener un alto potencial para dispersarse a largas distancias (Rabinowitz 1978; Dodd et al. 2002; Nettel & Dodd 2007), diversos factores locales como patrón de vientos, corrientes, polinizadores, entre otros; pueden influir en las frecuencias de alelos y genotipos en un determinado espacio, dándole forma a la estructura local del ecosistema y propiciando la formación de demos o unidades poblacionales independientes (Sousa et al. 2007).

La dispersión a través de polen y semillas en las especies de plantas son el principal mecanismo de flujo genético que determina la diversidad y estructura genética (Dick et al. 2003). Sin embargo, la actual diversidad y estructura genética de *A. germinans* en México puede atribuirse a diferentes procesos ecológicos, ambientales y a la influencia de actividades humanas sobre la zona costera a lo largo del tiempo. La polinización es uno de estos procesos y constituye un mecanismo de gran importancia en la historia de las poblaciones, debido a que representa el intercambio genético entre diferentes individuos. La dispersión del polen a grandes distancias ayuda a mantener el flujo genético y potencialmente a reducir la endogamia y estructura genética de las poblaciones (Hanson et al. 2008), por lo tanto la estructura genética

dependerá parcialmente de los mecanismos de polinización y del potencial de desplazamiento de sus polinizadores.

A. germinans es una especie protándrica, lo cual significa que puede producir tanto flores masculinas como femeninas. Sin embargo, la maduración de sus órganos sexuales se lleva a cabo en diferentes etapas para reducir el riesgo de autopolinización (Tomlinson 1994). La polinización es principalmente conducida por abejas (Tomlinson 1994; Tovilla-Hernández & Orihuela-Belmonte 2002), las cuales tienen la capacidad de dispersarse a largas distancias y por ende transferir polen entre árboles apartados por varios kilómetros (Cain et al. 2000; Ghazoul 2005). Sin embargo, la fragmentación del hábitat puede restringir la dispersión del polen cuando esta se convierte y actúa como una barrera para el desplazamiento de los polinizadores (Hanson et al. 2008). A pesar de que la polinización puede limitarse a la dispersión local, se ha observado que la dispersión de propágulos de *A. germinans* a través de las corrientes marinas puede asegurar el intercambio de migrantes a largas distancias e incluso atravesar océanos y mantener en contacto a poblaciones trasatlánticas (Dodd et al. 2002; Nettel & Dodd 2007). Sin embargo este mecanismo no procede en presencia de barreras físicas y oceanográficas como es el caso de la elevación del Istmo de Panamá que interrumpió el flujo genético entre las poblaciones del Atlántico y las del Pacífico hace aproximadamente 3.5 millones de años. Este aislamiento provocado por la elevación del Istmo de Panamá, ha favorecido a la

diferenciación genética de diferentes especies, entre ellas las de mangle y se ha visto reflejado en los resultados de Dodd et al (2002) y Nettel y Dodd (2007) con AFLPs y análisis de secuenciación de ITS y genes del cloroplasto en *A. germinans* y son ahora corroborados con análisis de microsatélites (Este estudio).

Los resultados de este estudio indican que la diversidad genética de *A. germinans* esta significativamente estructurada entre las regiones decretadas por el análisis de agrupamiento, pero además entre poblaciones dentro de las regiones. Estos resultados son consistentes con los previamente reportados por Cerón-Souza et al. (2005) y Salas-Leiva et al. (2009) en la costa Colombiana, aunque las poblaciones mexicanas presentaron valores de diferenciación genética mayor. De acuerdo a lo anterior, se sugiere que el germoplasma que sea utilizado durante los programas de reforestación, provenga de una fuente local y no mezclar con el de otras localidades. Además, es importante que los propagulos con que se va a reforestar un sitio provengan de diferentes árboles para evitar o reducir el riesgo de endogamia en la población trasplantada.

4. Genética poblacional de *Rhizophora mangle* en México.

4.1 Introducción

Rhizophora mangle L., (Rhizophoraceae) comúnmente conocido como mangle rojo, es un árbol perene considerado como una especie rara debido a lo restringido de su hábitat a la zona intermareal en lagunas costeras y bahías protegidas de la acción física del oleaje y mareas. Éste es encontrado desde México hasta el norte de Ecuador en la costa Pacífico y de México a Brasil en la costa Oeste del Atlántico (Tomlinson 1994). Esta especie es además localizada en la costa Oeste de África desde Angola hasta Mauritania (Tomlinson 1994). En América, *R. mangle* tiene su límite norte a los 24°N en el Golfo de México y a los 29°N en Bahía de Los Ángeles en el Golfo de California (Pacheco-Ruiz et al. 2006).

A pesar de que la especie tiene una marcada especificidad por el hábitat, esta ocurre sobre diversas condiciones ambientales y paisajes geomorfológicamente distintos. Estas diferencias en el hábitat están asociadas con diferencias locales de hidrología, salinidad y temperatura del agua; y a una escala más amplia con el clima (Duke et al. 2002; Gilman et al. 2008; Krauss et al. 2008), resultando en una gran diversidad morfológica de los árboles, sus estructuras reproductivas y del bosque en conjunto (Flores-Verdugo et al. 1990; Flores-Verdugo 1992; Tomlinson 1994; Domínguez et al. 1998). Con excepción

de las grandes extensiones de *R. mangle* localizadas en los estados de Nayarit y Sinaloa (Marismas Nacionales), las poblaciones del Pacífico de México son más pequeñas y más dispersas que las del Golfo de México y Mar Caribe (Acosta-Velázquez et al. 2009; CONABIO 2009).

R. mangle es una especie que tiene flores durante todo el año. Sin embargo, su máxima floración ocurre a finales de verano. Sus flores presentan tanto estructuras masculinas como femeninas y la morfología general de la flor permite la autopolinización, la cual es llevada a cabo por el viento (Tomlinson 1994). La dispersión de *R. mangle* es a través de sus propágulos flotantes, los cuales pueden permanecer viables por periodos de hasta un año (Rabinowitz 1978; Tomlinson 1994).

Al igual que la mayoría de las especies, el mangle rojo alcanza su máximo desarrollo estructural en ambientes con bajos niveles de estrés ambiental y antropogénico. Sin embargo, debido a su alta tolerancia a altos rangos de salinidad y temperatura, es posible encontrarlos en los límites de distribución bajo condiciones inhóspitas para la gran mayoría de las especies de mangle. Sin embargo y debido al estrés fisiológico su desarrollo estructural es muy inferior al encontrado en sus condiciones óptimas, observándose una gran diversidad morfológica, atribuida principalmente a la gran diversidad de hábitats y condiciones ambientales en las que habita (Domínguez et al. 1998; Agraz Hernández et al. 2011).

Richards et al. (2010) denominaron a esta diversidad morfológica, como plasticidad fenotípica y sugieren que ésta plasticidad puede ser mayor en aquellas especies con un alto rango de distribución y con elevada variabilidad genética. Es por eso que la conservación de la diversidad genética se ha convertido en uno de los principales objetivos en los planes de manejo y conservación de las especies. En el siguiente capítulo, se pretende evaluar la variabilidad genética poblacional, así como su grado de conectividad y flujo génico poblacional del mangle rojo *R. mangle* en México.

4.2 Objetivos

Objetivo general

Evaluar la diversidad y estructura genética de *Rhizophora mangle* en las costas del Pacífico y Atlántico de México.

Objetivos Específicos

1. Determinar la composición genética de *R. mangle* en las costas del Pacífico y Golfo de México.
2. Evaluar la estructura genética poblacional y los patrones de dispersión de *R. mangle* en las costas del Pacífico y Golfo de México.
3. Identificar la ubicación geográfica de las regiones de mayor diversidad genética en México.
4. Analizar los principales mecanismos que pudieron haber intervenido en la composición y distribución actual de la diversidad genética de *R. mangle* en México.

4.3 Materiales y Métodos

4.3.1 Área de estudio

Se analizaron individuos de 22 bosques de mangle *R. mangle* en las costas Mexicanas dentro de las cinco regiones establecidas en el Inventario Nacional de Manglares (Pacífico Norte, Pacífico Centro, Pacífico Sur, Golfo de México y Península de Yucatán; Figura 1, Tabla VI) establecido por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO 2009).

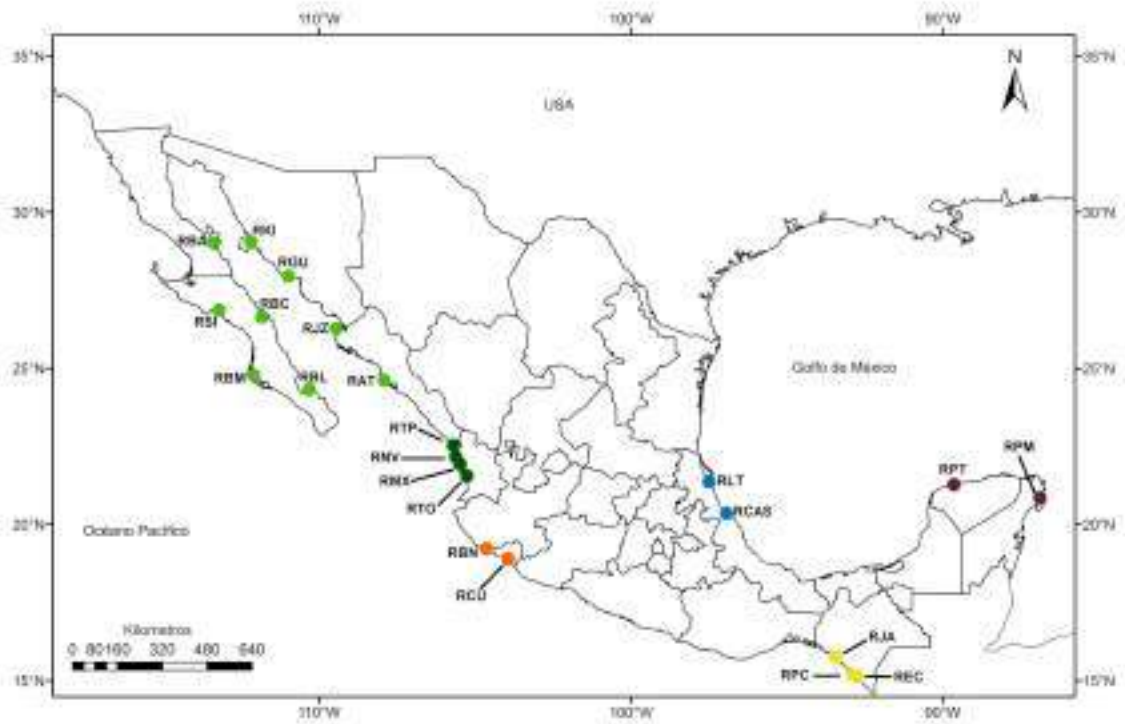


Figura 10. Área de estudio y sitios de colecta de *R. mangle* en las costas del Atlántico y Pacífico de México. Círculos morados; Región Península de Yucatán, Círculos azules; Región Golfo de México, Círculos amarillos; Región Pacífico Sur, Círculos naranja; Región Pacífico Centro, Círculos verdes; Región Pacífico Norte (Verde oscuro; Subregión Marismas nacionales, Verde claro; Subregión Golfo de California).

Tabla VI. Ubicación geográfica, entidad y código de los sitios de colecta de *R. mangle* en las costas del Pacífico y Atlántico. ^aSubregión Golfo de California; ^bSubregión Marismas Nacionales.

Sitio de Muestreo	Entidad	Código	Latitud	Longitud
Pacífico Norte				
^a Bahía de Los Ángeles	Baja California	RBA	29°02'72N	113°30'1W
^a Bahía Concepción	Baja California Sur	RBC	26°45'44N	111°53'34W
^a Laguna San Ignacio	Baja California Sur	RSI	26°79'06N	113°15'27W
^a Bahía Magdalena	Baja California Sur	RBM	24°44'25N	112°03'31W
^a Bahía Balandra	Baja California Sur	RBL	24°19'08N	110°18'59W
^a Bahía Kino	Sonora	RKI	28°48'37N	111°55'19W
^a Guaymas	Sonora	RGU	27°57'25N	110°58'31W
^a El Jitzámuri	Sinaloa	RJZ	26°17'07N	109°14'54W
^a Bahía de Altata	Sinaloa	RAT	24°32'15N	107°49'58W
^b Estero deTeacapán	Sinaloa	RTP	22°38'46N	105°42'35W
^b Novillero-Agua Brava	Nayarit	RNV	22°11'42N	105°35'14W
^b Laguna de Mexcaltitán	Nayarit	RMX	21°54'30N	105°27'52W
^b La Tovera, San Blas	Nayarit	RTO	21°32'31N	105°15'23W
Pacífico Centro				
Barra de Navidad	Jalisco	RBN	19°11'46N	104°39'55W
Laguna Cuyutlán	Colima	RCU	18°54'15N	104°01'56W
Pacífico Sur				
Laguna Joaquín Amaro	Chiapas	RJA	15°45'54N	93°30'30W
Laguna Panzancola	Chiapas	RPC	15°13'59N	92°54'48W
La Encrucijada	Chiapas	REC	15°05'22N	92°46'88W
Golfo de México				
Laguna Tamiahua	Veracruz	RLT	21°15'30N	97°26'21W
Laguna Casitas	Veracruz	RCAS	20°15'64N	96°48'68W
Península de Yucatán				
Puerto Morelos	Quintana Roo	RPM	20°53'18N	86°52'19W
Telchac-Progresso	Yucatán	RPT	21°19'59N	89°20'10W

4.3.2 Colecta de material foliar

Se colectó material foliar de aproximadamente 20 individuos de *R. mangle* en cada uno de los 22 bosques analizados en las costas del Pacífico y Atlántico de México (Tabla VI, Fig. 10). Las muestras fueron tomadas de especímenes separados por una distancia mínima de 30 m entre individuos, con el objetivo de reducir la probabilidad de muestrear individuos con cierto grado de parentesco. La excepción fue en Bahía de los Ángeles (RBA) y Bahía de Kino (RKI), donde se colectaron a una distancia de 10 m debido al reducido tamaño del manglar. Las muestras colectadas se deshidrataron y se almacenaron con gel de sílica hasta la extracción del ADN.

4.3.3 Extracción de ADN

El ADN genómico fue extraído a partir de 20 mg de tejido foliar utilizando el método de CTAB/PVP (hexadecil trimetil amonio bromuro/polivinil pirrolidona) modificado por Muñiz-Salazar et al.(2005). El método consistió en homogenizar el tejido con hielo seco y resuspender en 0.85 volúmenes de CTAB/PVP para después incubar a 65°C durante 6 h. Posteriormente el homogenizado fue extraído con aproximadamente 0.6 volúmenes de cloroformo/ alcohol isoamílico (24:1 v/v) y centrifugado a 13,000 rpm por 10 min. para separar las fases. El ADN fue precipitado con 0.7 volúmenes de isopropanol a -20°C durante 12 h. Al

final, el ADN obtenido fue re-suspendido en 100 μ L de TE 1X y almacenado a -20°C hasta su posterior análisis.

La eficiencia de la extracción fue evaluada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.4% teñida en una solución al 10% de Gel-Star® para visualizar el ADN a través de luz ultravioleta. La calidad del ADN se evaluó al considerar a una banda bien definida como ADN de buena calidad y a las bandas barridas como ADN degradado. La cantidad de ADN se evaluó al comparar con la intensidad de las bandas de un marcador comercial de concentración conocida.

4.3.4 Análisis genético

Se amplificaron seis loci de microsatélites específicos de *R. mangle*, previamente reportados por Rosero-Galindo et al. (2002). Los iniciadores de secuencia fueron etiquetados con distintos fluorocromos (Tabla VII) y posteriormente, los microsatélites fueron amplificados mediante una reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) conteniendo 1X Buffer (10mM Tris HCl, 50 mM KCl, pH 8.3, SIGMA), 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM de dNTPs, 0.15 μ M de cada cebador, 1 unidad de *Taq* ADN polimerasa (SIGMA) y 20 ng de ADN genómico en un volumen final de 20 μ L de reacción.

Tabla VII. Microsatélites de *R. mangle* utilizados para el análisis genético poblacional. Al final de la secuencia de cada cebador F se indica el fluorocromo con el que fueron etiquetados, T °C: indica la temperatura de alineación utilizada en la PCR para cada cebador.

Locus	Secuencia 5'-3'	Tipo de repetición	T°C
	F: forward / R: reverse		
Rm7	F: TGTTGTGCTACAGACTTCATGC ^{NED}	(TA) ₁₄ (TGTA) ₂ (CA) ₁₁ (TA) ₃	50
	R: AGAGATACCAATCCAAGAAGCTGC	(GA) ₄ (GA) ₂	
Rm11	F: GGTGGGATTTGGTCTGGC ^{FAM}	(CT) ₁₆ (CA) ₃	50
	R: TTGCTTCCACACAGGAAAGAAG		
Rm19	F: TGCCCTCTACGTTGTGAATG ^{NED}	(AG) ₂₆	50
	R: CTGTCTGAGCTTGCATCATTG		
Rm21	F: TTGCACTACCACAAACCAACC ^{PEI}	(CT) ₁₂	50
	R: TTGCACAAGCACAAGAGCATAC		
Rm38	F: CTCATGCACACGGATACAGACAC ^{VIC}	(CA) ₈	50
	R: TGTCCTATTCTCAAATGATGCC		
Rm46	F: ACAGTCCTCCAATCGTGAAT ^{VIC}	(AT) ₄ (GCGT) ₈ (GT) ₈ (GGAA) ₂	50
	R: TTTAATTCTGACGGGACCAG		

4.3.4.1 Amplificación de loci de microsatélites

Las reacciones de la PCR se llevaron a cabo en un termociclador Mycycler Biorad. Todos los loci de microsatélites fueron amplificados con el mismo perfil de temperatura. En general, el perfil de amplificación consistió de un periodo de desnaturalización inicial de 4min a 95°C seguido de 35 ciclos de 20 s a 95°C, 20 s a 50°C y 45 s a 72°C. Los 35 ciclos finalizaron con una extensión final de 30 min a 72°C.

La concentración de los productos amplificados se evaluó utilizando una regla molecular de concentración conocida mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñida en una solución al 10% de Gel-Star® y visualizada con luz ultravioleta. Posteriormente, las muestras se ajustaron a una concentración de 2 ng/μL, que es la requerida para el análisis de fragmentos en el secuenciador automático.

Para asegurar la reproducibilidad y consistencia en el proceso de amplificación, el 5% de las muestras fueron re-amplificadas y en cada reacción de PCR se incluyó un control negativo para detectar problemas de contaminación. Los productos de amplificación de PCR fueron separados por electroforesis capilar mediante un secuenciador automático de ADN Applied Biosystems 310 Genetic Analyzer. El tamaño de los alelos se determinó con el

programa GeneMarker 1.85 (Softgenetics) y el programa Microchecker (Oosterhout et al. 2004) para detectar la presencia de alelos nulos.

4.3.5 Análisis de datos

4.3.5.1 Diversidad genética

El análisis de diversidad genética, en el que se incluye al número y frecuencia de alelos, así como al grado de heterocigosidad en cada población, fue calculado mediante el programa GDA 1.1 (Lewis & Zaykin 2001). La riqueza alélica por locus y por población fue calculada usando el FSTAT 2.9.3 (Goudet 2001). Por otra parte, la prueba global para detectar desviaciones al equilibrio de Hardy-Weinberg, así como el análisis de disequilibrio en el ligamiento entre todos los pares de loci fue analizado utilizando GENEPOP 4.0 (Raymond & Rousset 1995; Rousset 2008). La significancia para todas las pruebas múltiples se fijó en 0.05, con la corrección de Bonferroni (Rice 1989).

4.3.5.2 Asignación Poblacional

Para determinar la estructura poblacional de *R. mangle* en las costas del Pacífico y Atlántico de México y simultáneamente asignar individuos a las áreas geográficamente definidas se utilizó el método de agrupamiento Bayesiano implementado en el programa STRUCTURE v2.2.3 (Pritchard et al. 2000). Este consistió de un análisis exploratorio para inferir la estructura genética

poblacional y asignar los individuos probabilísticamente dentro de K grupos de acuerdo a sus similitudes en frecuencia y número de alelos.

Las simulaciones se hicieron en base en 5×10^5 interacciones después de un calentamiento inicial de igual longitud, suponiendo frecuencias alélicas correlacionadas y bajo el modelo de poblaciones mezcladas (admixture model). Con el objetivo de asegurar la convergencia en las cadenas de Markov y la reproducibilidad del análisis, se corrieron 10 replicas para cada K grupo. El número más probable de K grupos fue aquel que tuvo el más alto valor de $\Pr(X|K)$ (Pritchard et al. 2000). Posteriormente, el número de grupos fue ajustado de acuerdo al algoritmo ΔK descrito por Evanno et al. (2005).

4.3.5.3 Estructura genética Poblacional

La distribución de la variación genética de los grupos obtenidos del análisis del programa STRUCTURE fue estimado mediante un análisis de varianza molecular, AMOVA (Excoffier et al. 1992) bajo el modelo de alelos infinitos (Infinite Allele Model; IAM) y el de mutación por pasos (Single-Step Mutation Model; SMM) empleando el programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010). La variación genética fue cuantificada utilizando cuatro niveles jerárquicos: entre grupos, entre poblaciones dentro de grupos, entre individuos dentro de poblaciones y entre individuos. La significancia estadística fue evaluada a través de 10,000 permutaciones no paramétricas con base en los

estadísticos F de Wright: F_{ST} , F_{IS} y F_{IT} ; (Wright 1965). Se calcularon los coeficientes de diferenciación genética F_{ST} y R_{ST} , el primero sólo considera la frecuencia de los alelos detectados mientras que el segundo considera además de su frecuencia, la distancia genética molecular entre éstos. El valor de significancia para todas las pruebas múltiples se fijó en 0.05, con la corrección de Bonferroni (Rice 1989).

4.4 Resultados

4.4.1 Diversidad genética

Los seis loci analizados se comportaron de manera independiente, y en ninguno de los sitios de colecta se registró la presencia de genes ligados o la presencia de alelos nulos. En general, los seis loci analizados mostraron bajos niveles de diversidad genética. El número total de alelos por locus varió de 3 (Rm46) a 9 (Rm19), los microsatélites compuestos presentaron la menor diversidad y los di-nucleótidos con mayor número de repeticiones la mayor diversidad genética. En general, los bosques de mangle ubicados en el Golfo de California registraron la menor diversidad genética, principalmente aquellos localizados en la Península, donde se observó la fijación de un sólo alelo en dos (Rm7, Rm46) de los seis loci analizados.

En total, se detectaron 34 alelos diferentes entre los 600 individuos examinados, de los cuales 17 fueron compartidos entre Pacífico y Atlántico, 13 fueron exclusivos del Pacífico y 4 del Atlántico. El número total de alelos por población varió de 8 (RBA) a 22 (RPC) en el pacífico y de 12 (RCAS) a 16 (RPM) en el Atlántico.

Todos los loci fueron polimórficos en todos los sitios analizados. Sin embargo, la menor diversidad genética se registró en la subregión del Golfo de California, sobre todo en las localidades ubicadas en el límite norte de

distribución. La heterocigosidad observada varió de 0.06 (RBA) a 0.56 (REC) en el Pacífico y de 0.20 (RLT) a 0.31 (RPM) en el Atlántico (Tabla VIII). Aquellos microsatélites que contienen un mayor número de repeticiones registraron el más alto nivel de diversidad genética y alelos privados. El número total de alelos por locus varió de 3 (Rm46) a 9 alelos (RM19) con uno y tres alelos privados, respectivamente y una heterocigosidad observada que varió de 0.13 (Rm7) a 0.36 (Rm19).

La riqueza alélica (RA) en las poblaciones analizadas varió de 1.25 (RBA) a 3.09 (REC) en el Pacífico y de 1.92 (RLT) a 2.37 (RPM) en el Atlántico, con un promedio de 1.97 alelos por locus en las 22 localidades analizadas. El número de alelos privados (AP) varió de cero a dos en el pacífico, mientras que en el Atlántico las cuatro localidades presentaron un alelo privado, registrando un total de 10 alelos privados en ambas costas (Tabla VIII).

La prueba global de Hardy-Weinberg reveló desviaciones al modelo de equilibrio en nueve de las 22 localidades analizadas, RBL por exceso de heterocigotos y (RSI, RBA, RKI, RTP, RCU) por deficiencia de heterocigotos en la costa Pacífico. Por otro lado, en la costa del Atlántico, tres de las cuatro poblaciones analizadas mostraron indicios de endogamia, sólo Laguna Casitas (RCAS), en Veracruz se encontró en equilibrio. Las tres poblaciones ubicadas en el límite norte de distribución en el Pacífico (RSI, RBA, RKI), mostraron la menor diversidad genética e indicios de endogamia.

Tabla VIII. Diversidad genética de *R. mangle* en términos del número total de alelos (A), proporción de loci polimórficos (P), riqueza alélica (RA), alelos privados (PA), heterocigosidad esperada (HE) y observada (HO) y coeficiente de endogamia (FIS). (*) Fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg ($P < 0.05$)

Región	Código	N	A	P	RA	AP	H _E	H _O	F _{IS}
Costa del Pacífico									
Pacífico Norte	RBA	48	8	0.17	1.25	0	0.09	0.06	0.33*
	RBC	26	9	0.50	1.43	0	0.12	0.12	0.00
	RSI	30	9	0.50	1.43	0	0.13	0.09	0.32*
	RBM	30	10	0.67	1.48	0	0.18	0.19	-0.04
	RBL	30	11	0.67	1.60	1	0.18	0.26	-0.44*
	RKI	27	9	0.50	1.33	0	0.10	0.08	0.18*
	RGU	28	13	0.67	1.76	1	0.15	0.13	0.15
	RJZ	28	12	0.83	1.87	0	0.26	0.26	-0.02
	RAT	29	15	1.00	2.12	1	0.26	0.27	-0.05
	RTP	29	14	1.00	2.12	0	0.32	0.24	0.25*
	RNV	39	14	0.83	2.05	0	0.32	0.33	-0.06
RMX	26	13	0.83	2.00	0	0.31	0.32	-0.02	
Pacífico Centro	RTO	29	14	0.83	2.07	0	0.33	0.33	-0.02
	RBN	10	13	0.83	2.17	0	0.36	0.30	0.17
	RCU	18	12	0.83	1.85	1	0.28	0.16	0.44*
Pacífico Sur	RJA	31	17	1.00	2.49	0	0.42	0.40	0.05
	RPC	30	22	1.00	2.80	2	0.47	0.46	0.02
	REC	11	19	1.00	3.09	0	0.48	0.56	-0.19
<i>Promedio Pacífico</i>				0.76	1.94	0.33	0.26	0.25	0.00
Costa del Atlántico									
Golfo de México	RLT	30	13	0.83	1.92	1	0.26	0.20	0.23*
	RCAS	16	12	0.83	1.99	1	0.25	0.27	-0.07
Península de Yucatán	RPM	28	16	0.83	2.37	1	0.38	0.31	0.18*
	RPT	27	13	0.67	2.08	1	0.35	0.27	0.24*
<i>Promedio Atlántico</i>				0.79	2.09	1	0.31	0.26	-0.07
Total		600	34	1.00	1.97	10	0.27	0.25	0.06

El locus Rm46 mostró el menor número de alelos ($A = 3$), uno de ellos fue encontrado exclusivamente en un individuo colectado en el sitio RPC de la región del Pacífico sur. Los otros dos alelos, fueron detectados tanto en la costa del Atlántico como en la del Pacífico. Sin embargo, uno de ellos presentó una frecuencia mayor en la costa del Atlántico y el otro en la del Pacífico (Fig. 11).

El locus Rm21 está representado por cinco alelos (Fig. 12), cuya frecuencia presentó un patrón muy similar al observado mediante el locus Rm46. Ambos mostraron una marcada diferencia entre las costas del Pacífico y Atlántico. Sin embargo el locus Rm21 mostro la presencia de dos alelos privados, uno en la región norte (RBL) y otro en la región centro del Pacífico. De igual forma, se observó mediante el locus Rm21 que el alelo más frecuente en la costa del Pacífico se encuentra fijo en los sitios ubicados en la subregión del Golfo de California, en el límite de distribución (RBA, RSI, RKI). Mientras que el Alelo de mayor frecuencia en la costa del Atlántico, se encuentra fijo en la región del Golfo de México.

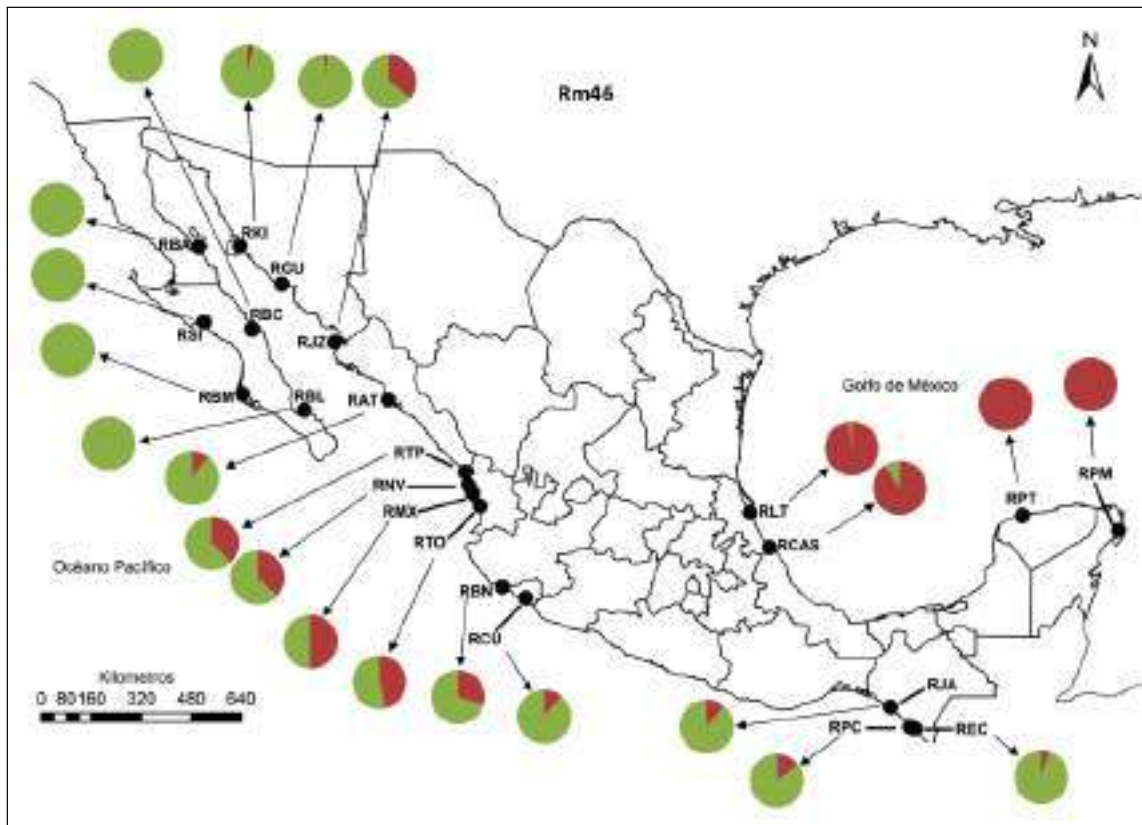


Figura 11. Frecuencias alélicas de los tres alelos detectados mediante el locus Rm46. En cada gráfico de pastel, los colores indican alelos diferentes y la proporción de colores indica la frecuencia de cada uno de los alelos en los sitios de colecta.

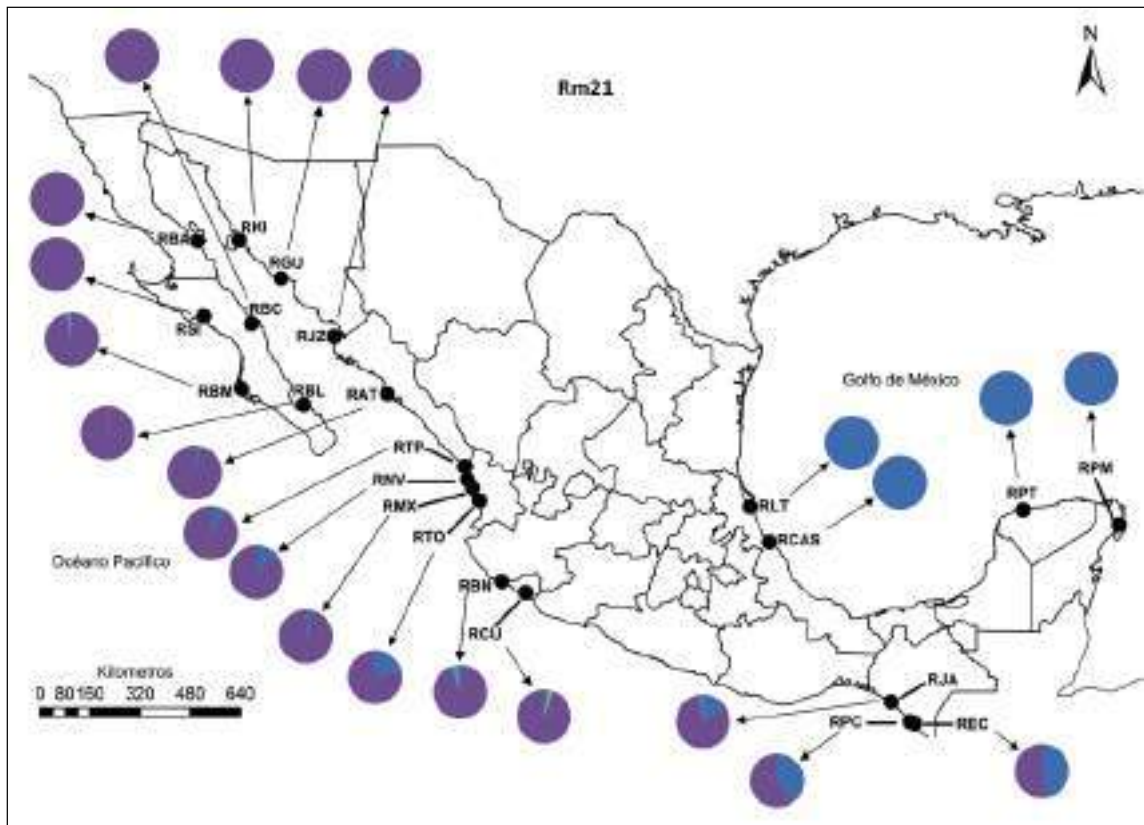


Figura 12. Frecuencias alélicas de los cinco alelos detectados mediante el locus Rm21. En cada gráfico de pastel, los colores indican alelos diferentes y la proporción de colores indica la frecuencia de cada uno de los alelos en los sitios de colecta.

El locus Rm7 mostró la presencia de cinco alelos, dos de éstos fueron detectados exclusivamente en la costa del Pacífico (RAT, RPC). En la región norte y centro del Pacífico el alelo predominante mostró una frecuencia mayor al 95% (Fig. 13). El alelo identificado como predominante en el Pacífico, fue detectado también en el Atlántico, aunque su frecuencia en esta costa no fue mayor al 35%.

El locus Rm11, mostró la presencia de cuatro alelos. Sin embargo, sólo en la región del Pacífico sur se logró detectar a los cuatro, ya que en las regiones centro y Norte del Pacífico sólo se registraron tres y dos en la costa del Atlántico (Fig. 14).

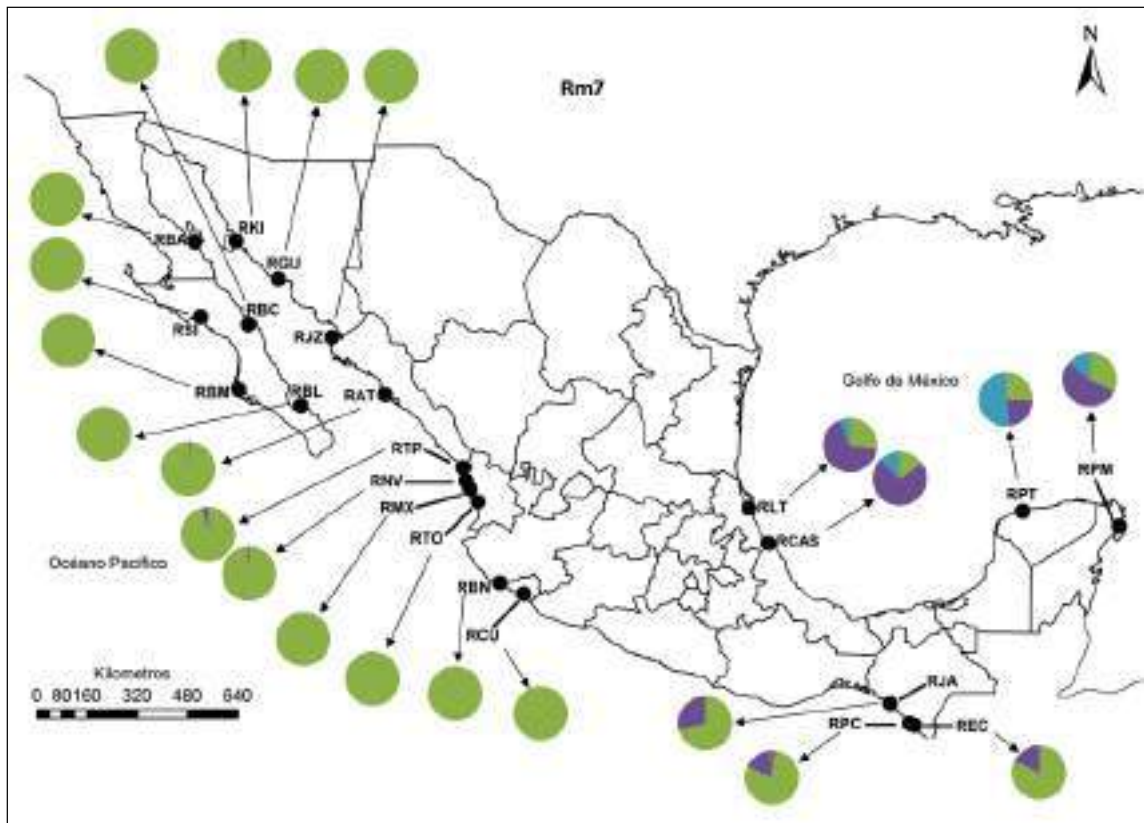


Figura 13. Frecuencias alélicas de los cinco alelos detectados mediante el locus Rm7. En cada gráfico de pastel, los colores indican alelos diferentes y la proporción de colores indica la frecuencia de cada uno de los alelos en los sitios de colecta.

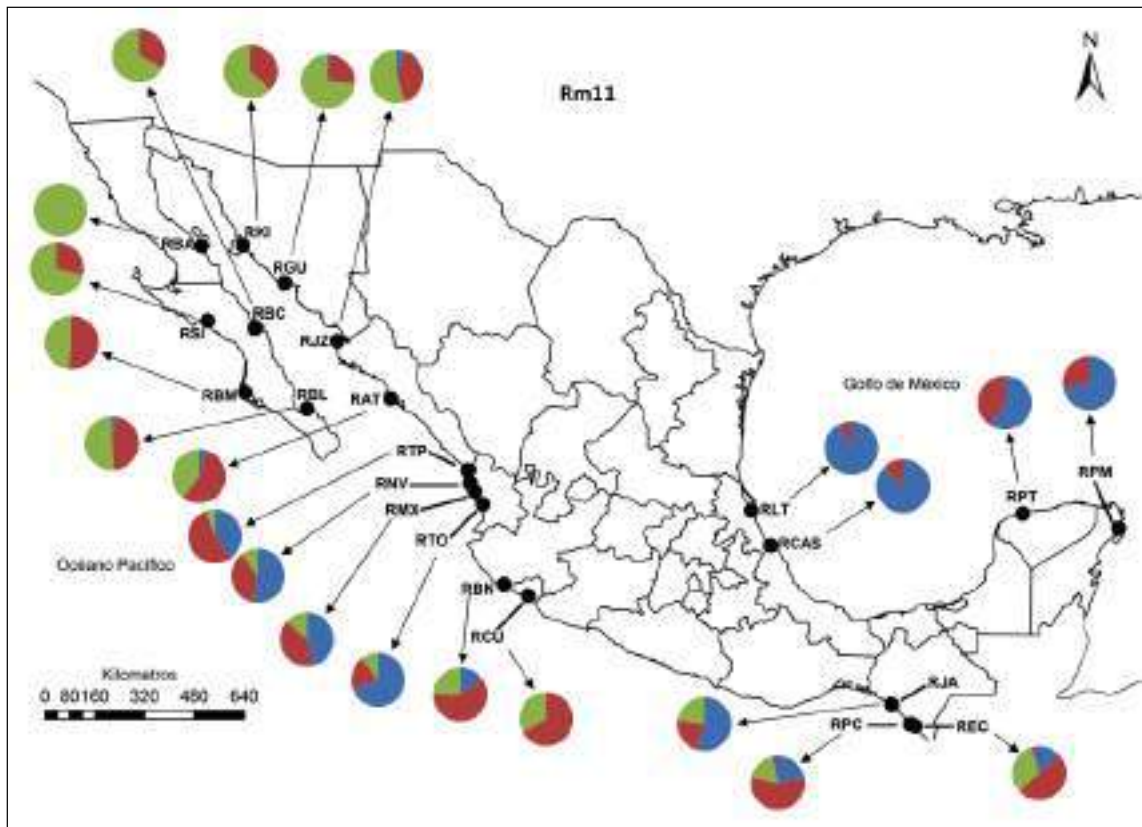


Figura 14. Frecuencias alélicas de los cuatro alelos detectados mediante el locus Rm11. En cada gráfico de pastel, los colores indican alelos diferentes y la proporción de colores indica la frecuencia de cada uno de los alelos en los sitios de colecta.

El locus Rm38 registró un comportamiento muy singular ya que el alelo más frecuente en la subregión del Golfo de California es el mismo que predomina en la costa del Atlántico y aunque está presente en el resto del litoral del Pacífico su frecuencia no es la más importante (Fig. 15). Este microsatélite registró dos alelos privados, uno en la subregión del Golfo de California (RGU) en la costa del Pacífico y otro en la región del Golfo de México (RLT) en la costa del Atlántico. Sin embargo la frecuencia a la que aparecen es muy baja ya que fue registrada en tan sólo uno o dos individuos de cada localidad en la que fueron detectados.

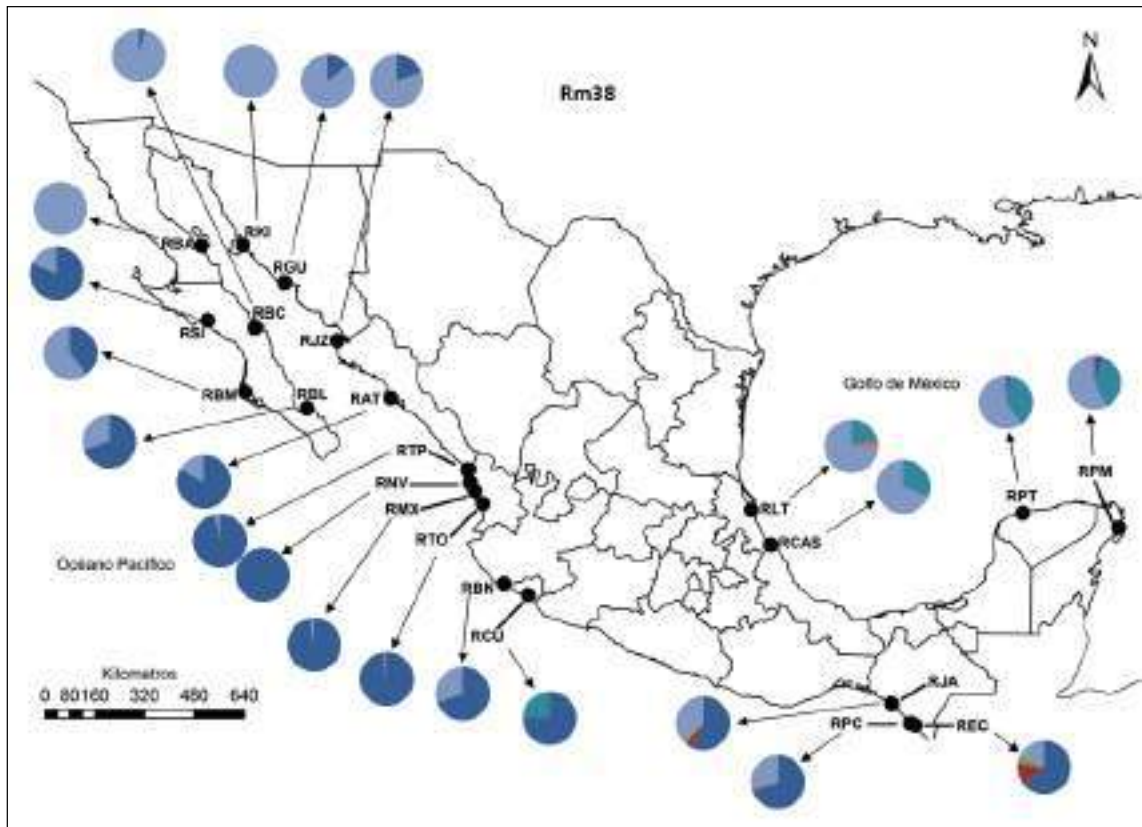


Figura 15. Frecuencias alélicas de los ocho alelos detectados mediante el locus Rm38. En cada gráfico de pastel, los colores indican alelos diferentes y la proporción de colores indica la frecuencia de cada uno de los alelos en los sitios de colecta.

El locus Rm19 presentó la mayor diversidad genética, en total registró la presencia de nueve alelos, tres de ellos exclusivos del Atlántico, dos del Pacífico y cuatro compartidos entre ambas costas (Fig. 16). La subregión del Golfo de California estuvo dominada por un alelo predominante con una frecuencia superior al 85% a excepción de en RBA donde tuvo una frecuencia del 42%. El alelo más frecuente de RBA (55%) aunque fue detectado en el resto del litoral del Pacífico, su frecuencia no superó el 20% en la región norte y centro. Sin embargo, en la región del Pacífico sur llegó al 41%, alcanzando una frecuencia por encima del 50% en la costa del Atlántico.

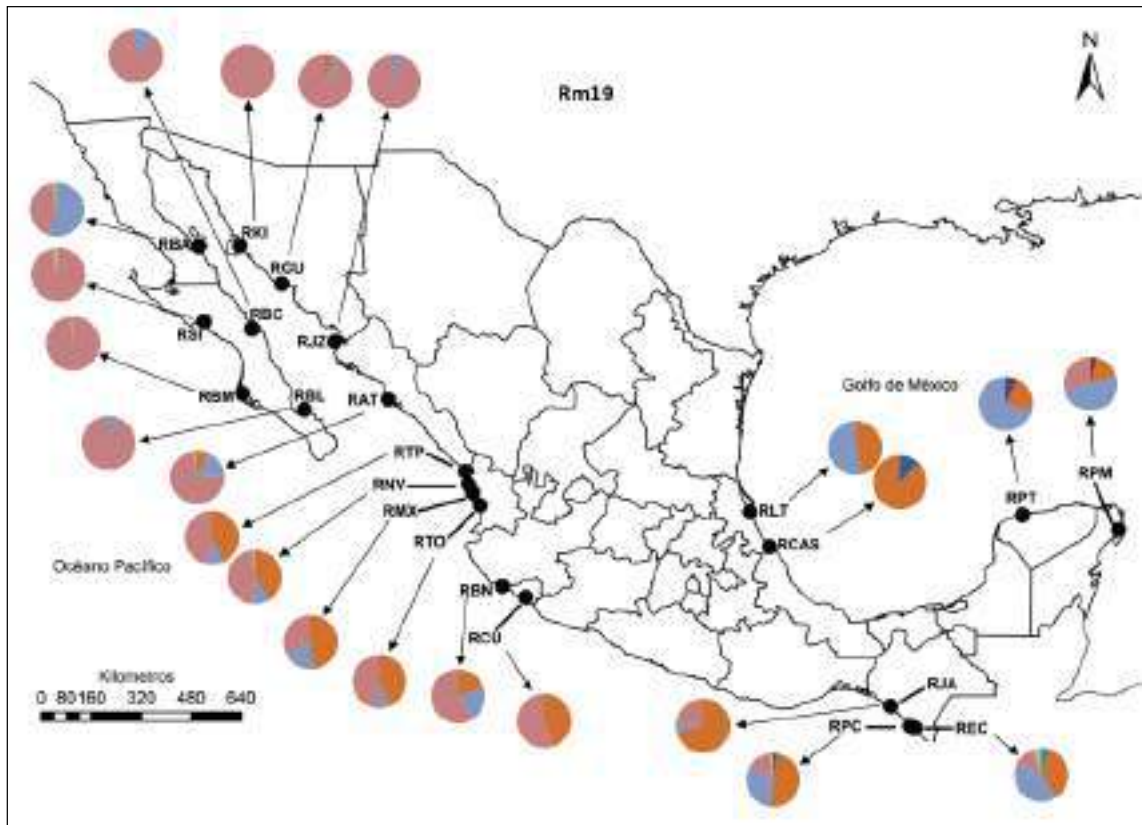


Figura 16. Frecuencias alélicas de los nueve alelos detectados mediante el locus Rm19. En cada gráfico de pastel, los colores indican alelos diferentes y la proporción de colores indica la frecuencia de cada uno de los alelos en los sitios de colecta.

4.4.2 Asignación Poblacional

El análisis de agrupamiento reveló que la variabilidad genética de *R. mangle* en México se encuentra heterogéneamente distribuida. De acuerdo al análisis bayesiano realizado en el programa STRUCTURE y a la corrección sugerida por Evanno et al. (2005), la variabilidad genética de *R. mangle* se encuentra distribuida en cinco diferentes grupos ($K = 5$, Fig. 17). Los grupos se integraron de la siguiente manera: Grupo 1 (RBA, RBC, RKI, RGU); Grupo 2 (RSI, RBM, RBL, RJZ, RAT); Grupo 3 (RTP, RNV, RMX, RTO); Grupo 4 (RBN, RCU, RJA, RPC, REC) y Grupo 5 (RPM, RPT, RLT, RCAS). El grupo 5, integrado por los cuatro sitios de colecta analizados en la costa del Atlántico fue el mejor definido ya que la mayor parte de los individuos colectados, presentaron un alto porcentaje de asignación ($> 90\%$; Fig. 17). En la costa del Pacífico se observó la formación de cuatro grupos a lo largo del litoral. Sin embargo, en promedio los porcentajes de asignación de cada uno de los sitios de colecta son bajos ($< 70\%$) y en algunos casos se observó a individuos con un porcentaje de asignación a grupos diferentes al de la región donde fueron colectados, lo cual sugiere que hay intercambio genético entre las regiones analizadas (Fig. 17).

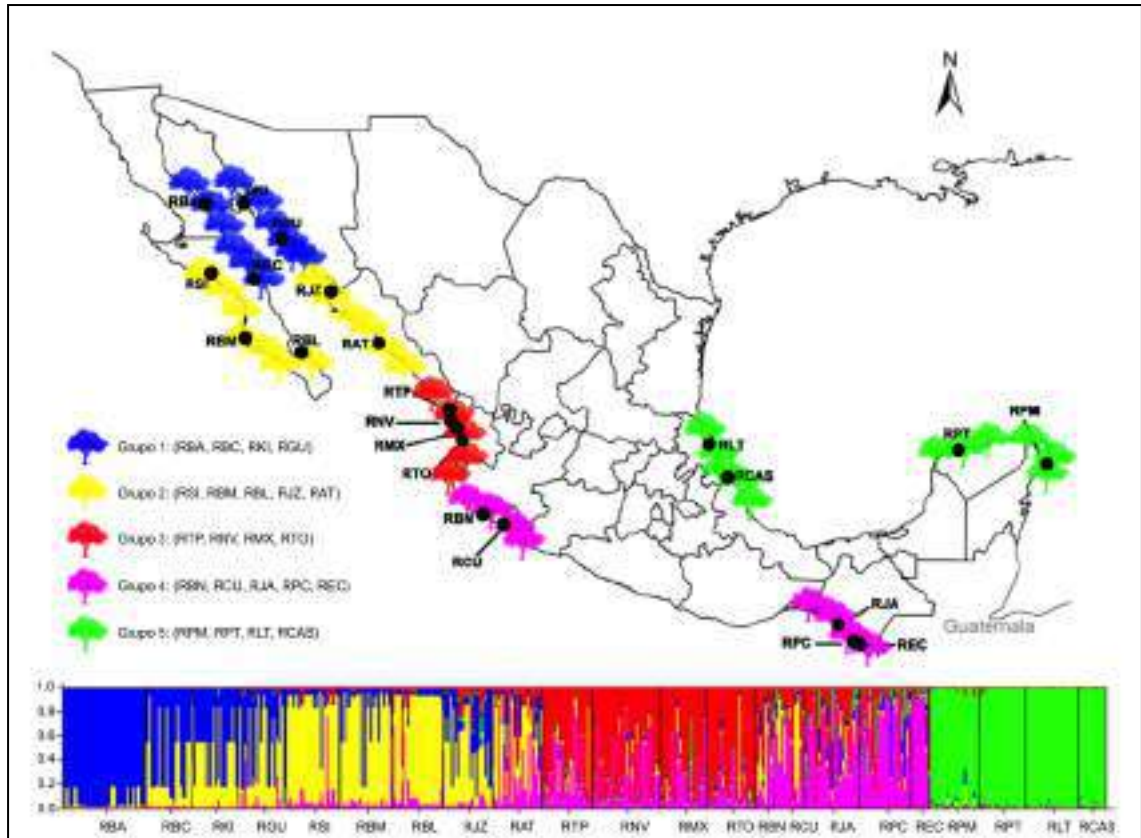


Figura 17. Resultados del análisis de agrupamiento ($K = 5$). En el gráfico, las barras verticales representan al porcentaje de asignación de cada uno de los individuos de *R. mangle* analizados. Cada color representa a un grupo diferente y su distribución en la costa de México.

4.4.3 Estructura Genética

El AMOVA, aplicado a cuatro niveles jerárquicos de diferenciación genética (Tabla IX) mostró que el mayor porcentaje de la variación molecular corresponde a la diferencia entre los cinco grupos establecidos por el análisis bayesiano ($F_{ST} = 45$; $R_{ST} = 58\%$; Fig. 17) seguido por la diferencia entre los 600 individuos analizados ($F_{ST} = 45$; $R_{ST} = 33\%$) y entre poblaciones dentro de los grupos ($F_{ST} = 7$; $R_{ST} = 5\%$; $P < 0.05$), soportando los resultados del análisis de agrupamiento e indicando una fuerte estructura en la distribución de la composición genética de los bosques de mangle a lo largo del Pacífico y Atlántico de México. En el análisis de comparaciones pareadas entre los grupos, todas las comparaciones mostraron diferencias significativas. Sin embargo, se observa una marcada diferencia entre el grupo compuesto por la costa del Atlántico con respecto a los cuatro grupos en el Pacífico (Tabla X), lo cual sugiere que actualmente no hay intercambio genético entre ambas costas debido al aislamiento desde la elevación del Istmo de Panamá.

Tabla IX. Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) jerárquico, aplicado bajo dos aproximaciones al modelo de mutación de los microsatélites (IAM y SMM) en los bosques del mangle *R. mangle* del Pacífico y Atlántico; % Var., Porcentaje de variación explicado por el nivel jerárquico; *, Estadísticamente significativo ($P < 0.05$).

Fuente de Variación	IAM		SMM	
	% Var.	F_{ST}	% Var.	R_{ST}
Entre Grupos	44.82*	0.45*	58.50*	0.58*
Entre Poblaciones dentro de Grupos	6.65*	0.12*	5.46*	0.13*
Entre individuos dentro de poblaciones	3.22*	0.06*	0.00	0.00
Entre individuos	45.31*	0.54*	33.37*	0.62*

Grupo 1 (RBA, RBC, RKI, RGU); grupo 2 (RSI, RBM, RBL, RJZ, RAT); grupo 3 (RTP, RNV, RMX, RTO); grupo 4 (RBN, RCU, RJA, RPC, REC); grupo 5 (RPM, RPT, RLT, RCAS)

Tabla X. Comparaciones pareadas entre los grupos establecidos de acuerdo al análisis en STRUCTURE. Bajo la diagonal, distancias calculadas en base al modelo de alelos infinitos (F_{ST}) y sobre la diagonal, con base en el modelo de mutación por pasos (R_{ST}).

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
Grupo 1	-----	0.42	0.82	0.56	0.84
Grupo 2	0.26	-----	0.35	0.11	0.69
Grupo 3	0.54	0.30	-----	0.17	0.85
Grupo 4	0.37	0.20	0.10	-----	0.63
Grupo 5	0.71	0.67	0.54	0.47	-----

Grupo 1 (RBA, RBC, RKI, RGU); grupo 2 (RSI, RBM, RBL, RJZ, RAT); grupo 3 (RTP, RNV, RMX, RTO); grupo 4 (RBN, RCU, RJA, RPC, REC); grupo 5 (RPM, RPT, RLT, RCAS)

4.5 Discusión

4.5.1 Diversidad Genética

Los niveles más bajos de diversidad genética en este estudio fueron registrados en la región del Pacífico norte, principalmente en el Golfo de California donde se ubica el límite norte de distribución de las especies de mangle del Pacífico oriental. La mayor diversidad genética fue observada en la región del Pacífico sur, donde se observó el mayor número de alelos ($A = 22$) e individuos heterocigotos ($H_o = 0.56$) en los sitios REC y RPC respectivamente; seguido por la diversidad en la subregión de Marismas Nacionales. En estas dos regiones es donde se ubican los sistemas de manglar con mayor extensión en el Pacífico de México, el sistema de Manglar de la Encrucijada en Chiapas y el sistema lagunar de marismas Nacionales (Acosta-Velázquez et al. 2009), lo cual sugiere una relación entre el tamaño poblacional y la diversidad genética. Estos resultados son consistentes con los previamente reportados por Nuñez-Farfán et al. (2002) mediante el análisis de seis isoenzimas en costas mexicanas y con los reportes de Arbeláez-Cortés et al. (2007) en el Pacífico de Colombia y de Pil et al. (2011) en Brasil mediante loci de microsatélites.

A pesar de que *R. mangle* es uno de los principales constituyentes de los ecosistemas de manglar en el continente Americano, hasta ahora han habido muy pocos estudios que han evaluado la diversidad y distribución de su

composición genética. Sin embargo, de acuerdo a lo que hasta ahora se ha reportado, la diversidad genética de las especies de mangle es relativamente baja con respecto a la de las angiospermas terrestres (Ricklefs et al. 2006). El primer estudio en *R. mangle* del que se tiene reporte en México es relativamente reciente (Núñez-Farfán et al. 2002) y sus resultados sugieren una diversidad genética muy reducida ($H_o = 0.06$). Sin embargo, es posible que esta baja diversidad encontrada por Núñez-Farfán et al. (2002) se deba a la baja resolución molecular que ha caracterizado a las isoenzimas (Triest 2008). De acuerdo a los resultados aquí presentados, la diversidad genética de *R. mangle* en México ($H_o = 0.25$), se encuentra dentro del rango de diversidad genética previamente reportado para *R. mangle* mediante loci de microsatélites, al estar por encima de los valores reportados por Pil et al. (2011) en la costa de Brasil ($H_o = 0.11$), y por debajo de los reportados por Arbeláez-Cortes et al. (2007) en la costa Pacífico de Colombia ($H_o = 0.49$).

Es importante mencionar que en los trabajos de Arbeláez-Cortes et al.(2007), Pil et al. (2011) y en el presente estudio se utilizaron algunos loci de microsatélites en común (Rm19, Rm46) previamente diseñados por Rosero-Galindo et al. (2002) lo cual sugiere que la diferencia detectada entre los valores de diversidad genética no se debe a la resolución del marcador si no a procesos y/o factores naturales o estocásticos actuando en diferente magnitud y periodicidad a lo largo del rango de distribución de la especie (Duke et al.

1998a). Tales procesos podrían incluir a la selección natural (reduce o mantiene la variación), la deriva génica (reduce la variación genética a nivel local, la mantiene a nivel global, pero incrementa la diferenciación al azar entre poblaciones); flujo génico (en su ausencia, las poblaciones tienden a divergir genéticamente por deriva o selección); sistemas de apareamiento (modifican la variabilidad genética o genotípica de la población y puede actuar de manera conjunta con la deriva) y a la mutación (aumenta la diversidad genética y favorece la diferenciación, aunque su efecto es generalmente bajo) (Duke 1995; Duke et al. 1998a; Abeyasinghe et al. 2000; Duke et al. 2002; Gienapp et al. 2008; Triest 2008; Cerón-Souza et al. 2010; Pil et al. 2011).

Resulta difícil evaluar el efecto de la selección natural y de la mutación sobre la diversidad genética de *R. mangle* (Ricklefs et al. 2006; Gienapp et al. 2008) y más aún, atribuir a estos dos procesos como moderadores de la composición y distribución de la diversidad genética en México, debido a la naturaleza neutral del marcador molecular utilizado en el presente estudio y a la baja tasa de mutación que se ha reportado para las especies de mangle. Sin embargo es posible que la diversidad genética actual de *R. mangle* en México este modulada no sólo por un factor si no por la interacción entre varios procesos históricos, biogeográficos y ecológicos, entre los que podrían destacar la baja efectividad del flujo génico, la deriva génica y los sistemas de apareamiento de la especie que inducen a la endogamia.

Los eventos de extinción y recolonización han mostrado un marcado efecto sobre la biodiversidad, la cual puede ser observada desde una escala espacio-temporal tan pequeña como podría ser la recuperación de un bosque después de la devastación por un huracán (Tovilla-Hernández & Orihuela-Belmonte 2004; Piou et al. 2006) o en el otro extremo, a una escala mucho mayor, a la recolonización periódica durante los procesos de glaciación (Hewitt 2004; Pil et al. 2011). Aunque estos eventos de extinción y recolonización afectan a cualquiera de los tres niveles de diversidad (ecosistemas, especies y genes), este estudio se ha enfocado en lo que a diversidad genética respecta. Cualquiera que sea la escala, en la mayoría de los casos tenderá hacia un efecto negativo sobre la diversidad genética. Sin embargo, dicho efecto es casi imposible de evaluar a una escala espacio-temporal tan baja como el ejemplo antes citado, sobretodo en poblaciones grandes donde el efecto de la deriva génica es menor. Esta es posiblemente una de las causas por las cuales a este tipo de estudios no se le ha dado la importancia debida.

En donde si es fácil de apreciar los cambios de diversidad genética debido a períodos de extinción y recolonización es a través de una escala mucho mayor, por ejemplo durante los períodos de glaciación. El último evento de glaciación ocurrió hace aproximadamente 18000 años (Yokoyama et al. 2000). Durante este tiempo, grandes capas de hielo en el hemisferio norte se expandieron considerablemente y las zonas de vegetación fueron confinadas a

las regiones ecuatoriales (Clark & Mix 2002; Hewitt 2004). Debido a que la temperatura es uno de los principales factores que determina la distribución latitudinal de las especies de mangle (Duke et al. 1998a) su distribución durante aquella época fue muy probablemente restringida a regiones ecuatoriales y a partir de entonces y a medida que se fue incrementando la temperatura, las costas se fueron colonizando. Es por ello que en los resultados de éste trabajo se observó una tendencia decreciente de la diversidad genética hacia las localidades más norteñas, donde se presume que se dio la más reciente colonización a partir de individuos provenientes de bajas latitudes (Rull 1998; Graham 2006). y que además esta se condujo a partir de consecutivos eventos fundador, asociados al modelo de mutación por pasos (step-stone model) (Kimura & Weiss 1964b), quedando gran parte de sus variantes genéticas a lo largo de lo que es su actual distribución.

Resulta fácil de entender a través del modelo de dispersión por pasos cómo es que la periódica colonización resulta en sub-poblaciones con menor diversidad genética hacia los límites de distribución de las especies. Sin embargo, es difícil concebir cómo es que esta baja diversidad se haya mantenido durante tanto tiempo. Algunos estudios han mencionado que la endogamia es una característica común en poblaciones de *R. mangle* (Núñez-Farfán et al. 2002; Arbeláez-Cortes et al. 2007; Pil et al. 2011) y concuerda con los resultados de esta investigación. La habilidad de autofecundación que

poseen algunas especies como *R. mangle*, les favorece para colonizar rápidamente en nuevas áreas (Lowenfeld & Kledowski 1992) aún cuando la tasa de reclutamiento de propágulos sea muy reducida la nueva colonia puede fácilmente establecerse, pero inevitablemente con una muy baja diversidad genética. Después de haberse establecido la población, resulta difícil que posteriores migrantes compitan con los primeros colonizadores y contribuyan significativamente al pool reproductivo y genético de la población inicial (Hewitt 1996). Lo cual podría explicar, al menos parcialmente el porqué las poblaciones han mantenido baja diversidad genética durante un largo tiempo.

4.5.2 Estructura genética

De acuerdo al análisis de diversidad genética, en el que se observó que la composición y abundancia de los alelos que componen el pool genético de *R. mangle* es heterogéneamente distribuido, sugiere un alto grado de estructura genética poblacional. Los resultados del análisis de agrupamiento bayesiano lo ratifica y sugieren que la diversidad genética de *R. mangle* en México está distribuida en cinco diferentes grupos de acuerdo a la composición y frecuencia de sus alelos (Fig. 17).

Los coeficientes de diferenciación genética, F_{ST} y R_{ST} (0.45 y 0.58, respectivamente) fueron elevados en comparación a los reportados para la costa de Colombia ($F_{ST} = 0.05$), en el pacífico (Arbeláez-Cortes et al. 2007), y

para la de Brasil ($F_{ST} = 0.29$), en el Atlántico (Pil et al. 2011). Sin embargo, es importante aclarar que en este estudio se están comparando poblaciones tanto del Pacífico como del Atlántico y que la diferencia entre las poblaciones de ambas costas hace que la diferenciación genética medida a través del índice global de diferenciación se incremente, evidenciando claramente que la fragmentación del hábitat contribuye significativamente a la estructura y diferenciación genética de las poblaciones.

Es importante mencionar que en este estudio se cubrió a una escala geográfica mayor que la que se analizó para la costa de Colombia y de Brasil. Como se ha reportado para otros estudios, cuando se analiza una amplia escala geográfica, se ha visto que las poblaciones tienden a presentar una mayor diferenciación genética, sobre todo entre aquellas poblaciones geográficamente más apartadas y con baja efectividad de flujo génico (Triest 2008). Hasta ahora no ha habido estudios que analicen la diversidad genética de *R. mangle* a lo largo de su distribución como se ha hecho para otras especies de mangle en la región del Indo-Pacífico (Maguire et al. 2000b). La estructura genética encontrada en *R. mangle* en México ($F_{ST} = 0.45$; $R_{ST} = 0.58$) presenta valores de diferenciación muy similares a los reportados para *Avicennia marina* ($F_{ST} = 0.41$; $R_{ST} = 0.71$) a lo largo de su distribución (Maguire et al. 2000b).

Los resultados de este estudio indican que la diversidad genética de *R. mangle* está significativamente estructurada entre las regiones decretadas por el análisis de agrupamiento, pero además entre poblaciones dentro de las regiones. De acuerdo a lo anterior, se sugiere que el germoplasma que sea utilizado durante los programas de reforestación, provenga de una fuente local y no mezclar con el de otras localidades. Además, es importante que los propágulos con que se va a reforestar un sitio provengan de diferentes árboles para evitar o reducir el riesgo de endogamia en la población trasplantada.

5. Discusión general

Los resultados de este estudio muestran que las poblaciones mexicanas de *A. germinans* y *R. mangle* presentan bajos niveles de diversidad genética con respecto a lo reportado en otras poblaciones de mangle de las costas de Colombia {Arbeláez-Cortes, 2007 #3} y Brasil {Pil, 2011 #232}. La mayor diversidad genética de *A. germinans* fue detectada en las regiones del Golfo de México y Península de Yucatán de la costa del Atlántico, mientras que en *R. mangle*, los valores más altos fueron detectados en la región del Pacífico Sur y en la subregión de Marismas Nacionales, donde se ubican los ecosistemas de manglar de mayor cobertura en la costa del Pacífico Mexicano (Acosta-Velázquez et al. 2009), lo cual sugiere que las poblaciones con mayor cobertura, albergan a una mayor diversidad genética. En ambas especies, se observó una tendencia de las poblaciones a reducir su diversidad genética hacia las poblaciones más norteñas, observándose la menor diversidad genética en la región del Pacífico norte, específicamente en la subregión del Golfo de California, donde las especies de mangle alcanzan su límite de distribución natural (Fig.18).

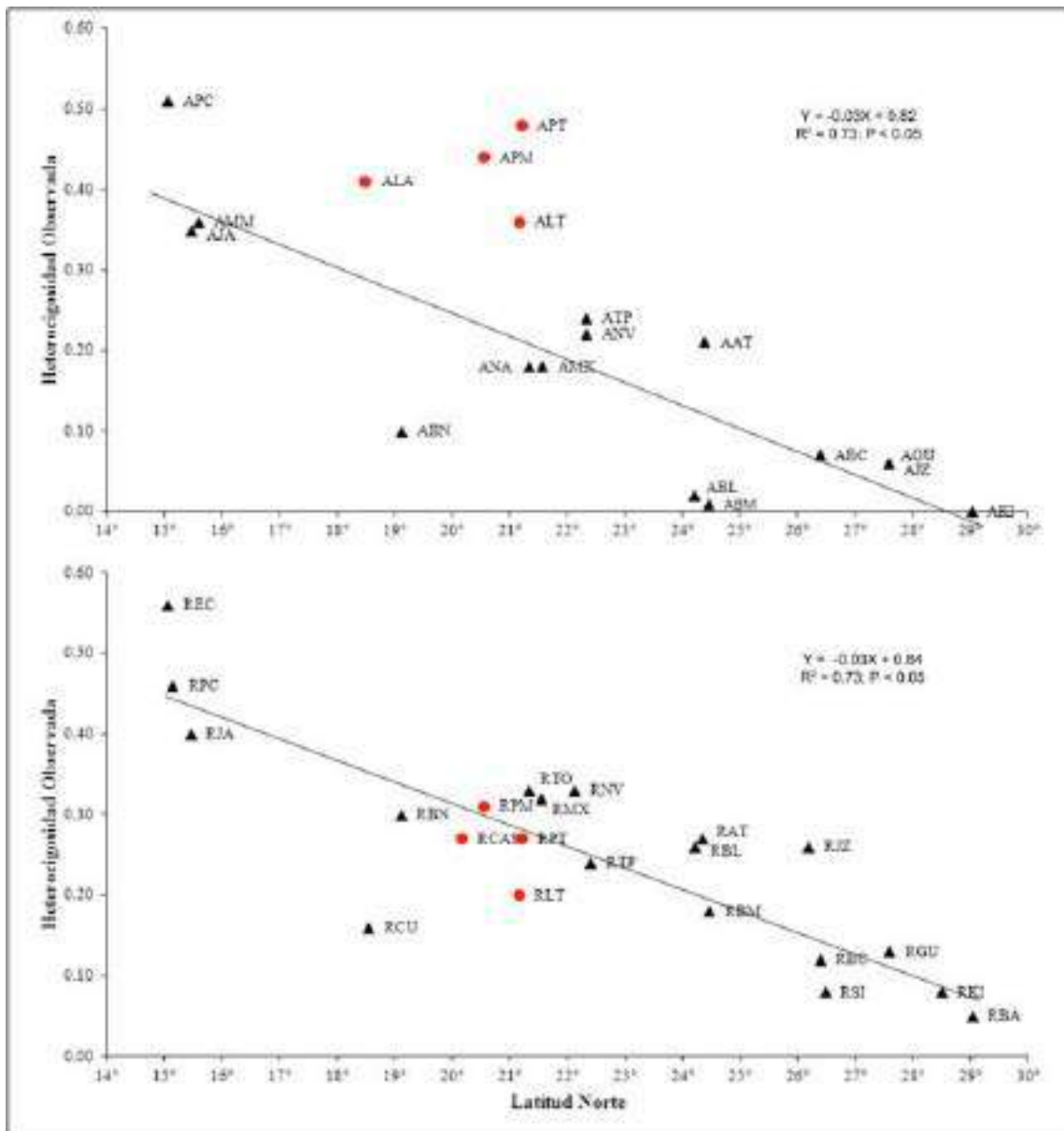


Figura 18. Tendencia decreciente de la diversidad genética (Heterocigosidad observada) hacia el límite norte de distribución de las especies de mangle (29° N). Arriba, *A. germinans*; abajo, *R. mangle*; círculos rojos, sitios de muestreo del Atlántico; triángulos, sitios de muestreo en el pacífico.

La baja diversidad genética de *A. germinans* y *R. mangle* en las poblaciones cercanas al límite de su distribución en este estudio, concuerda con lo reportado para el límite de distribución de *A. marina* en la región del IWP (Maguire et al. 2000b; Arnaud-Haond et al. 2006). La baja diversidad genética en los límites de distribución se debe principalmente a un bajo tamaño poblacional y a factores históricos, biogeográficos y ecológicos. Analizando los factores históricos en las poblaciones mexicanas de *A. germinans* y *R. mangle* que se localizan en el límite norte de distribución, sugiere que han sufrido eventos históricos de extinción y recolonización durante los periodos de glaciación, al igual que otras especies de mangle bajo las mismas condiciones (Hewitt 2004). Estos eventos de colonización o expansión del hábitat desde las poblaciones ancestrales, pudieron haberse dado a partir de un número reducido de individuos y por ende de diversidad genética, lo cual explica en parte, la baja diversidad genética de las poblaciones analizadas. Este mismo patrón ha sido reportado para el mangle negro *A. germinans* en la región biogeográfica AEP (Dodd et al. 2002; Nettel & Dodd 2007), para *A. marina* en la región biogeográfica IWP (Maguire et al. 2000b; Giang et al. 2003; Arnaud-Haond et al. 2006) y para el mangle rojo, *R. mangle* en el límite sur de su distribución en la costa de Brasil (Pil et al. 2011).

El efecto de los periodos de glaciación sobre la biodiversidad de las especies de mangle, aparentemente no ha afectado a las poblaciones ubicadas

en el centro de distribución geográfica, debido la alta diversidad genética y taxonómica registrada actualmente para esta región, especialmente para el área de la costa del Pacífico de Colombia, Panamá y Costa Rica (Duke et al. 1998a; Triest 2008), lo cual sugiere que en esta región biogeográfica, la diversidad y estructura genética de las especies de mangle está compuesta por la mayor parte del pool genético ancestral. Esta hipótesis concuerda con los resultados obtenidos por Arbeláez-Cortés et al. (2007) quienes reportaron una mayor diversidad genética de *R. mangle* en la costa del Pacífico de Colombia en comparación con lo reportado en las poblaciones en el límite norte analizadas en este estudio y a lo reportado por Pil et al. (2011) en el límite sur del Oeste del Atlántico. Este mismo patrón fue también observado por Cerón-Souza et al. (2005) en *A. germinans* al registrar una mayor diversidad genética en la costa colombiana con respecto a la diversidad genética reportada para esta misma especie en latitudes superiores (Dodd et al. 2002).

Por otro lado, la diversidad genética de las poblaciones también puede verse afectada por procesos de hibridación entre especies que comparten el mismo hábitat (Mallet 2005). En algunos casos, los procesos de hibridación se han visto reflejados en un incremento de la diversidad genética, por ejemplo, Nettel et al. (2008) reportaron un incremento de la diversidad genética en *A. germinans* debido a una antigua hibridación con *A. bicolor*. Así también, el proceso de hibridación introgresiva antigua y persistente entre las especies de

Rhizophora (*R. mangle*, *R. racemosa* y *R. harrisonii*) en la región del Pacífico de Colombia, Panamá y Costa Rica se ve reflejado en los valores altos de diversidad genética reportados para esta región (Arbeláez-Cortes et al. 2007; Cerón-Souza et al. 2010). En contraste, los valores de diversidad genética reportados en este estudio, tanto para *R. mangle* como para *A. germinans* en su límite norte de distribución en la región del Golfo de California fueron bajos, esto debido a que a esta latitud, ambos géneros están representados por una sola especie, a diferencia de los manglares de bajas latitudes, donde la flora de manglar es más diversa y es posible encontrar compitiendo por espacio a dos o tres especies del mismo género.

Los resultados de diversidad genética mostraron diferencias en composición y abundancia de alelos, resultando en una alta y significativa estructura genética. La mayor divergencia se observó entre las costas del Atlántico y Pacífico, que entre los sitios de cada una de estas costas, lo cual sugiere que el aislamiento de las poblaciones desde la elevación del Istmo de Panamá hace aproximadamente 3.5 millones de años (Collins et al. 1996) ha conducido a la diferenciación genética entre los manglares de ambas costas. Estos resultados no concuerdan con los de Núñez-Farfán et al. (2002) quienes no registraron diferencias en la diversidad genética de *R. mangle* de la costa del Pacífico, con respecto a la del Atlántico. Sin embargo, es importante resaltar que en el estudio de Núñez-Farfán et al. (2002) se utilizaron alozimas como

marcador molecular, cuya resolución es mucho menor que la que han mostrado los microsatélites para estudios de diversidad y estructura genética (Triest 2008).

De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis bayesiano implementado en el programa STRUCTURE, la diversidad genética se encuentra distribuida en seis grupos para *A. germinans* y en cinco para *R. mangle*, los cuales difieren en cuanto a los sitios que lo integran y la frecuencia de sus alelos. La excepción se observó en la costa del Atlántico, en donde todos los sitios analizados para ambas especies forman un solo grupo. Con respecto a la costa del Pacífico, la estructura genética para *A. germinans* es de cinco grupos y para *R. mangle* de cuatro. En ambas especies, la región Pacífico Norte se dividió en tres grupos, dos de ellos en la subregión del Golfo de California y el tercer grupo lo constituyen los manglares de la subregión de Marismas Nacionales. Sin embargo, la región Pacífico Centro fue considerada como un grupo diferente en *A. germinans*, mientras que en *R. mangle*, fue agrupada junto con la región del Pacífico Sur.

Aunque ambas especies presentaron un patrón muy similar de estructura genética poblacional, la observada en *A. germinans* es ligeramente mayor a la registrada por *R. mangle*. Lo anterior puede deberse principalmente a tres factores que están directamente relacionados con las diferencias en el potencial de dispersión de las especies: 1) la flotabilidad de los propágulos, 2) los

periodos de floración y 3) los sistemas de polinización. En primer lugar, *R. mangle* tiene un mayor potencial de dispersión debido a que sus propágulos pueden flotar y permanecer viables por periodos de tiempo más prolongados que *A. germinans* (Rabinowitz 1978). En segundo lugar, *A. germinans* tiene un período de floración estacional en verano, mientras que en *R. mangle* es posible encontrar flores durante todo el año aunque su máxima floración ocurre también en verano (Tomlinson 1994). Esta cualidad hace que se incremente el potencial de dispersión de *R. mangle* debido a la disponibilidad de propágulos durante todo el año, favoreciendo el intercambio de individuos entre diferentes bosques de mangle. Por último, la polinización en *R. mangle* es principalmente anemófila, mientras que en *A. germinans* es entomófila, principalmente por abejas (Tomlinson 1994), por lo tanto la dispersión a través del polen se ve limitada por el potencial de dispersión de sus polinizadores.

El patrón de estructura genética poblacional registrado en ambas especies coincide parcialmente con la categorización de las regiones de mangle decretadas en el inventario nacional de manglares (CONABIO 2009). Sin embargo, debido al grado de diferenciación genética observado en la región del Pacífico Norte, es recomendable que se considere la separación de ésta región en al menos dos diferentes subregiones de acuerdo a la diversidad genética y su distribución en la región. La primera subregión abarcaría a los manglares de la región del Golfo de California y Península de Baja California, mientras que la

segunda subregión abarcaría a los manglares del sistema de manglares de Marismas Nacionales.

En este estudio, tanto *R. mangle* y *A. germinans* mostraron un patrón similar con respecto a la estructura genética poblacional, por lo que, la posibilidad de que el resto de las especies de mangle, como *L. racemosa* y *C. erectus*, con las que comparten el hábitat, muestren un comportamiento semejante. De esta manera, la información generada en esta investigación puede ser utilizada como base en programas de reforestación, planeación y conservación de ecosistemas del manglar en México.

La diversidad genética es un aspecto de la biodiversidad que no ha recibido la importancia que se merece en México y es fundamental en la propuesta de alternativas de conservación. Con el fin de obtener una respuesta a las nuevas interrogantes derivadas del estudio genético, se considera necesario abordar el problema utilizando varios marcadores moleculares a la vez. Esta perspectiva es promisoría ya que el presente estudio ha sentado las bases para nuevas investigaciones sobre la evolución de *A. germinans* y *R. mangle*, sin reducir la importancia de los estudios sobre conservación de la diversidad genética ya que están profundamente ligados.

6. Conclusiones

1. La diversidad genética de *A. germinans* y *R. mangle* en México es baja, principalmente en la región del Pacífico Norte, en la subregión del Golfo de California, donde se ubica el límite norte de distribución de ambas especies de mangle.
2. Los individuos de ambas especies de mangle colectados en su límite norte de distribución natural, en el Golfo de California, se caracterizan por presentar un alto grado de endogamia y un alto número de individuos genéticamente idénticos (clones).
3. La mayor diversidad genética de *A. germinans* se registró en la costa del Atlántico, mientras que para *R. mangle* en la región del Pacífico Sur y en el área de Marismas Nacionales.
4. En la costa del Pacífico, ambas especies mostraron una tendencia de disminución de la diversidad genética hacia el límite norte (Golfo de California).
5. En la costa del Atlántico la mayor diversidad genética de ambas especies se registró en la Península de Yucatán.
6. El mayor porcentaje de diferenciación genética se registró para ambas especies entre poblaciones de la costa del Atlántico y del Pacífico, lo que

sugiere que la elevación del Istmo de Panamá funciona como una barrera geográfica que restringe de manera efectiva el flujo genético.

7. La distribución de la composición genética de ambas especies se encuentra organizada en diferentes grupos que mayormente responden a su ubicación geográfica.
8. De acuerdo al análisis de agrupamiento bayesiano, la diversidad genética se distribuye en seis grupos para *A. germinans* y en cinco para *R. mangle*.
9. En la costa del Atlántico, la diversidad genética para ambas especies se encuentra aleatoriamente distribuida y la diferenciación genética es no significativa entre los sitios analizados, por lo que los manglares de la región del Golfo de México y los de la Península de Yucatán pueden considerarse como una sola población o una unidad panmictica.
10. *R. mangle* y *A. germinans* se distribuyen en tres grupos diferentes en la región Pacífico Norte, uno en la zona de Marismas Nacionales y dos más en el Golfo de California.
11. Para *A. germinans*, la región Pacífico Centro es significativamente diferente del Pacífico Sur, en contraste, para *R. mangle*, ambas regiones formaron un solo grupo.

12. Se sugiere que para los programas de reforestación tanto para *A. germinans* y *R. mangle* se utilicen propágulos que provengan de sitios del mismo grupo sugeridos en este estudio. De igual forma, se propone que los propágulos sean colectados de diferentes árboles para evitar la endogamia de las nuevas generaciones.

Literatura Citada

- Abdelkrim J, Pascal M, Samadi S (2005) Island colonization and founder effects: the invasion of the Guadeloupe islands by ship rats (*Rattus rattus*). *Molecular Ecology* 14: 2923-2931
- Abeyasinghe PD, Triest L, Greef BD, Koedam N, Hettiarachi S (2000) Genetic and geographic variation of the mangrove tree *Bruguiera* in Sri Lanka. *Aquatic Botany* 67: 131-141
- Aburto-Oropeza O, Ezcurra E, Danemann G, Valdez V, Murray J, Sala E (2008) Mangroves in the Gulf of California increase fishery yields. *Proceeding of the National Academy Sciences* 105: 10456-10459
- Acosta-Velázquez J, Rodríguez-Zuñiga T, Díaz-Gallegos JR, Cerdeira-Estrada S, Troche-Souza C, Cruz I, Ressler R, Jiménez R (2009) Assessing a nationwide spatial distribution of mangrove forest for Mexico: an analysis with high resolution images 33rd International Symposium on Remote Sensing of Environment, Stressa, Italy, pp 1-4
- Agraz Hernández C, García Zaragoza C, Iriarte-Vivar S, Flores-Verdugo F, Moreno Casasola P (2011) Forest structure, productivity and species phenology of mangroves in the La Mancha lagoon in the Atlantic coast of Mexico. *Wetlands Ecology and Management* 19: 273-293

- Alleman L, Hester M (2011) Refinement of the fundamental niche of black mangrove (*Avicennia germinans*) seedlings in Louisiana: Applications for restoration. *Wetlands Ecology and Management* 19: 47-60
- Amos W, Balmford A (2001) When does conservation genetics matter? *Heredity* 87: 257-265
- Arbeláez-Cortés E, Castillo-Cárdenas MF, Toro-Perea N, Cárdenas-Henao H (2007) Genetic structure of the red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) on the Colombian Pacific detected by microsatellite molecular markers. *Hydrobiologia* 583: 321-330
- Arnaud-Haond S, Teixeira S, Massa SI, Billot C, Saenger P, Coupland G, Duarte CM, Serrão EA (2006) Genetic structure at range edge: low diversity and high inbreeding in Southeast Asian mangrove (*Avicennia marina*) populations. *Molecular Ecology* 15: 3515–3525
- Benitez-Pardo D (2007) Forestación artificial con mangles en isletas de dragados en una región semiárida de México. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz Baja California
- Bosire JO, Dahdouh-Guebas F, Walton M, Crona BI, Lewis III RR, Field C, Kairo JG, Koedam N (2008) Functionality of restored mangroves: A review. *Aquatic Botany* 89: 251-259

- Broders HG, Mahoney SP, Montevecchi WA, Davidson WS (1999) Population genetic structure and the effect of founder events on the genetic variability of moose, *Alces alces*, in Canada. *Molecular Ecology* 8: 1309-1315
- Cain ML, Milligan BG, Strand AE (2000) Long-distance seed dispersal in plant populations. *American Journal of Botany* 87: 1217-1227
- Castillo-Cardenas MF, Toro-Perea N (2007) Development and characterization of the first microsatellite markers in the mangroves species *Pelliciera rhizophorae* Triana y Planchon. *Molecular Ecology Notes* 7: 1232-1234
- Cerón-Souza I, Rivera-Ocasio E, Funk SM, McMillan WO (2006) Development of six microsatellite loci for black mangrove (*Avicennia germinans*). *Molecular Ecology Notes* 6: 692-694
- Cerón-Souza I, Rivera-Ocasio E, Medina E, Jiménez JA, McMillan WO, Bermingham E (2010) Hybridization and introgression in New World red mangroves, *Rhizophora* (*Rhizophoraceae*). *American Journal of Botany* 97: 945-957
- Cerón-Souza I, Toro-Perea N, Cárdenas-Henao H (2005) Population Genetic Structure of Neotropical Mangrove Species on the Colombian Pacific Coast: *Avicennia germinans* (*Avicenniaceae*)¹. *Biotropica* 37: 258-265

- Charlesworth B, Morgan MT, Charlesworth D (1993) The Effect of Deleterious Mutations on Neutral Molecular Variation. *Genetics* 134: 1289-1303
- Chiang TY, Chiang YC, Chen YJ, Chou CH, Havanond S, Hong TN, Huang S (2001) Phylogeography of *Kandelia candel* in East Asiatic mangroves based on nucleotide variation of chloroplast and mitochondrial DNAs. *Molecular Ecology* 10: 2697-2710
- Clark PU, Mix AC (2002) Ice sheets and sea level of the Last Glacial Maximum. *Quaternary Science Reviews* 21: 1-7
- Collins LS, Budd AF, Coates AG (1996) Earliest evolution associated with closure of the Tropical American Seaway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 6069-6072
- CONABIO (2009) Manglares de México: Extensión y Distribución. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México
- Contreras EF (1993) Ecosistemas costeros mexicanos. Comisión Nacional Para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad-Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Mexico D.F.
- Costanza R, d'Arge R, de Groot R, Farber S, Grasso M, Hannon B, Limburg K, Naeem S, O'Neill RV, Paruelo J, Raskin RG, Sutton P, Van den Belt M

(1997) The value of the world's ecosystem services and natural capital.
Nature 387: 253-260

Dick CW, Etchelecu G, Austerlitz F (2003) Pollen dispersal of tropical trees (*Dinizia excelsa*: *Fabaceae*) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. Molecular Ecology 12: 753-764

Dodd RS, Afzal-Rafii Z, Kashani N, Budrick J (2002) Land barriers and open oceans: effects on genetic diversity and population structure in *Avicennia germinans* L. (*Avicenniaceae*). Molecular Ecology 11: 1327-1338

Dodd RS, Raffi ZA, Bousquet Melou A (2000) Evolutionary divergence in the pan-Atlantic mangrove *Avicennia germinans*. New Phytologist 145: 115-125

Domínguez CA, Eguiarte LE, Núñez-Farfán J, Dirzo R (1998) Flower morphometry of *Rhizophora mangle* (*Rhizophoraceae*): geographical variation in Mexican populations. American Journal of Botany 85: 637

Duke NC (1995) Genetic diversity, distributional barriers and rafting continents—more thoughts on the evolution of mangroves. Hydrobiologia 295: 167-181

- Duke NC, Ball MC, Ellison JC (1998a) Factors influencing biodiversity and distributional gradients in mangroves. *Global Ecology and Biogeography Letters* 7: 27-47
- Duke NC, Benzie JAH, Goodall JA, Ballment ER (1998b) Genetic Structure and Evolution of Species in the Mangrove Genus *Avicennia* (Avicenniaceae) in the Indo-West Pacific. *Evolution* 52: 1612-1626
- Duke NC, Lo EYY, Sun M (2002) Global distribution and genetic discontinuities of mangroves-emerging patterns in the evolution of *Rhizophora*. *Trees* 16: 65-79
- Duke NC, Watkinson AJ (2002) Chlorophyll-deficient propagules of *Avicennia marina* and apparent longer term deterioration of mangrove fitness in oil-polluted sediments. *Marine Pollution Bulletin* 44: 1269-1276
- Ellison A (2002) Macroecology of mangroves: large-scale patterns and processes in tropical coastal forests. *Trees - Structure and Function* 16: 181-194
- Ellison AM, Farnsworth EJ, Merkt RE (1999) Origins of mangrove ecosystems and the mangrove biodiversity anomaly. *Global Ecology and Biogeography* 8: 95-115

- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620
- Excoffier L, Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491
- Flores-Verdugo F (1992) Mangrove Ecosystems of the Pacific Coast of Mexico: Distribution, Structure, Litterfall and Detritus Dynamics. In: Seeliger U (ed) *Coastal plant communities of Latin America*. Academic Press, New York, pp 269-287
- Flores-Verdugo F, González-Farías F, Ramírez-Flores O, Amezcua-Linares F, Yáñez-Arancibia A, Alvarez-Rubio M, Day J (1990) Mangrove ecology, aquatic primary productivity, and fish community dynamics in the Teacapán-Agua Brava Lagoon-Estuarine system (Mexican Pacific). *Estuaries and Coasts* 13: 219-230

- Ge XJ, Sun M (1999) Reproductive biology and genetic diversity of a cryptoviviparous mangrove *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceae) using allozyme and intersimple sequence repeat (ISSR) analysis. *Molecular Ecology* 8: 2061-2069
- Geng QF, Lian CL, Tao JM, Qiu RI, Hogetsus T (2006) Development of microsatellite markers in mangrove tree species *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceae). *Molecular Ecology Notes* 6: 1231-1233
- Ghazoul J (2005) Pollen and seed dispersal among dispersed plants. *Biological Reviews* 80: 413-443
- Giang LH, Hong PN, Tuan MS, Harada K (2003) Genetic variation of *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (*Avicenniaceae*) in Vietnam revealed by microsatellite and AFLP markers. *Genes and Genetic Systems* 78: 399-407
- Gienapp P, Teplitsky C, Alho JS, Mills JA, Merilä J (2008) Climate change and evolution: disentangling environmental and genetic responses. *Molecular Ecology* 17: 167-178
- Gilman EL, Ellison J, Duke NC, Field C (2008) Threats to mangroves from climate change and adaptation options: A review. *Aquatic Botany* 89: 237-250

- Giri C, Ochieng E, Tieszen LL, Zhu Z, Singh A, Loveland T, Masek J, Duke N (2011) Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. *Global Ecology and Biogeography* 20: 154-159
- Goodall JA, Stoddart JA (1989) Techniques for the electrophoresis of mangrove tissue. *Aquatic Botany* 35: 197-207
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Institut d'Ecologie, Bâtiment de Biologie Université de Lausanne, Switzerland
- Graham A (1995) Diversification of Gulf/Caribbean Mangrove Communities through Cenozoic Time. *Biotropica* 27: 20-27
- Graham A (2006) Paleobotanical evidence and molecular data in reconstructing the historical phytogeography of *Rhizophoraceae* *Annals of the Missouri Botanical Garden, Missouri*, pp 325-334
- Gray JS (1997) Marine biodiversity: patterns, threats and conservation needs. *Biodiversity and Conservation* 6: 153-175
- Hanson TR, Brunsfeld SJ, Finegan B, Waits LP (2008) Pollen dispersal and genetic structure of the tropical tree *Dipteryx panamensis* in a fragmented Costa Rican landscape. *Molecular Ecology* 17: 2060-2073

- Hedrick PW, Gutierrez-Espeleta GA, Lee N (2001) Founder effect in an island population of bighorn sheep. *Molecular Ecology* 10: 851-857
- Hernández-Cornejo R, Koedam N, Ruiz-Luna A, Troell M, Dahdouh-Guebas F (2005) Remote Sensing and Ethnobotanical Assessment of the Mangrove Forest Changes in the Navachiste-San Ignacio-Macapule Lagoon Complex, Sinaloa, Mexico. *Ecology and Society* 10: 16
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247-276
- Hewitt GM (2004) A climate for colonization. *Heredity* 92: 1-2
- Islam MS, Lian C, Kameyama N, Wu B, Hogetsu T (2004) Development of microsatellite markers in *Rhizophora stylosa* using a dual-suppression-polymerase chain reaction technique. *Molecular Ecology Notes* 4: 110-112
- Kado T, Fujimoto A, Giang LH, Tuan M, Hong PN, Harada KO, Tachida H (2004) Genetic structures of natural populations of three mangrove species, *Avicennia marina*, *Kandelia candel* and *Lumnitzera racemosa*, in Vietnam revealed by maturase sequences of plastid DNA. *Plant Species Biology* 19: 91-99

- Kalia R, Rai M, Kalia S, Singh R, Dhawan A (2011) Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177: 309-334
- Kathiresan K, Bingham BL (2001) Biology of Mangroves and Mangrove Ecosystems *Advances in Marine Biology*. 40: 81-251, India, pp 145
- Kimura M, Weiss GH (1964b) The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics* 49: 561-576
- Krauss KW, Lovelock CE, McKee KL, López-Hoffman L, Ewe SML, Sousa WP (2008) Environmental drivers in mangrove establishment and early development: A review. *Aquatic Botany* 89: 105-127
- Lankford RR (1977) Coastal lagoons of Mexico: Their origin and classification. In: Willey M (ed) *Estuarine Processes*. Academic Press, New York, pp 182-215
- Lewis P, Zaykin D (2001) Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data
- Loveless MD, Hamrick JL (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15: 65-98

- Lowenfeld R, Kledowski EJ (1992) Mangrove genetics. I. Mating system and mutation rates of *Rhizophora mangle* in Florida and San Salvador islands, Bahamas. *International Journal of Plant Sciences* 153: 394-399
- Maguire TL, Edwards KJ, Henry R (2000a) Characterization and analysis of microsatellite loci in a mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (*Avicenniaceae*). *Theoretical and Applied Genetics* 101: 279-285
- Maguire TL, Saenger P, Baverstocks P, Henry R (2000b) Microsatellite analysis of genetic structure in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk) Vierh. (*Avicenniaceae*). *Molecular Ecology* 9: 1853-1852
- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 229-237
- McMillan C (1982) Isozymes in seagrasses. *Aquatic Botany* 14: 231-243
- McMillan C (1986) Isozyme patterns among populations of black mangrove *Avicennia germinans*, from the Gulf of México-Caribbean and Pacific Panama. *Contributions in Marine Science* 29: 17-25
- Melville F, Burchett M (2002) Genetic variation in *Avicennia marina* in three estuaries of Sidney (Australia) and implications for rehabilitation and Management. *Marine Pollution Bulletin* 44: 469-479

- Méndez-Alonzo R, López-Portillo J, Rivera-Monroy VH (2008) Latitudinal Variation in Leaf and Tree Traits of the Mangrove *Avicennia germinans* (*Avicenniaceae*) in the Central Region of the Gulf of Mexico. *Biotropica* 40: 449-456
- Mori GM, Zucchi MI, Sampaio I, Souza AP (2010) Microsatellites for the mangrove tree *Avicennia germinans* (*Acanthaceae*): Tools for hybridization and mating system studies. *American Journal of Botany* 97: 79-81
- Muñiz-Salazar R, Talbot SL, Sage GK, Ward DH, Cabello-Pasini A (2005) Population genetic structure of annual and perennial populations of *Zostera marina* L. along the Pacific coast of Baja California and the Gulf of California. *Molecular Ecology* 14: 711-722
- Nagelkerken I, Blaber SJM, Bouillon S, Green P, Haywood M, Kirton LG, Meynecke JO, Pawlik J, Penrose HM, Sasekumar A, Somerfield PJ (2008) The habitat function of mangroves for terrestrial and marine fauna: A review. *Aquatic Botany* 89: 155-185
- Nettel A, Dodd RS (2007) Drifting propagules and receding swamps: genetic footprints of mangrove recolonization and dispersal along tropical coasts. *Evolution* 61: 958-971

- Nettel A, Dodd RS, Afzal-Rafii Z, Tovilla-Hernández C (2008) Genetic diversity enhanced by ancient introgression and secondary contact in East Pacific black mangroves. *Molecular Ecology* 17: 2680-2690
- Nettel A, Rafii F, Dodd RS (2005) Characterization of microsatellite markers for the mangrove tree *Avicennia germinans* L. (*Avicenniaceae*). *Molecular Ecology Notes* 5: 103-105
- Núñez-Farfán J, Domínguez CA, Eguiarte LE, Cornejo A, Quijano M, Vargas J, Dirzo R (2002) Genetic divergence among Mexican populations of red mangrove (*Rhizophora mangle*): geographic and historic effects. *Evolutionary Ecology Research* 4: 1049-1064
- Oosterhout CV, Hutchinson WF, Wills DP, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538
- Orihuela-Belmonte DE, Tovilla-Hernández C, Vester HFM, Álvarez-Legorreta T (2004) Flujo de materia en un manglar de la costa de Chiapas, México. *Madera y Bosques Número especial*: 45-61
- Pacheco-Ruiz I, Zertuche-Gonzalez JA, Meling-Lopez AE, Riosmena-Rodriguez R, Orduña-Rojas J (2006) El límite geográfico de *Rhizophora mangle* para el Golfo de California. *Ciencia y Mar* 28: 19-22

- Parker PG, Snow AA, Schug MD, Booton GC, Fuerst PA (1998) What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79: 361-382
- Pil MW, Boeger MRT, Muschner VC, Pie MR, Ostrensky A, Boeger WA (2011) Postglacial north-south expansion of populations of *Rhizophora mangle* (*Rhizophoraceae*) along the Brazilian coast revealed by microsatellite analysis. *American Journal of Botany* 98: 1031-1039
- Piou C, Feller LC, Berger U, Chi F (2006) Zonation Patterns of Belizean Offshore Mangrove Forrests 41 Years After a Catastrophic Hurricane. *Biotropica* 38: 365-374
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959
- Rabinowitz D (1978) Dispersal Properties Of Mangrove Propagules. *Biotropica* 10: 45-57
- Ramp J, Collinge S, Ranker T (2006) Restoration genetics of the vernal pool endemic *Lasthenia conjugens* (Asteraceae). *Conservation Genetics* 7: 631-649
- Raven PH, Chase JM, Pires C (2011) Introduction to special issue on biodiversity. *American Journal of Botany* 98: 333-335

- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (v 1.2): Population genetics software for exact test and ecumenecism. *Journal of Heredity* 86: 248-249
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225
- Richards C, Wares J, Mackie J (2010) Evaluating Adaptive Processes for Conservation and Management of Estuarine and Coastal Resources. *Estuaries and Coasts* 33: 805-810
- Ricklefs RE, Schwarzbach AE, Renner SS (2006) Rate of Linaje Origin Explains the Diversity Anomaly in the World's Mangrove vegetation. *The American Naturalist* 168: 805-810
- Rico-Gray V (1993) Origen y rutas de dispersión de los mangles: una revisión con énfasis en las especies de América. *Acta Botánica Mexicana* 25: 1-13
- Rönnbäck P (1999) The ecological basis for economic value of seafood production supported by mangrove ecosystems. *Ecological Economics* 29: 235-252
- Rosero-Galindo C, Gaitan-Solis E, Cárdenas-Henao H, Tohme J, Toro-Perea N (2002) Polymorphic microsatellites in a mangrove species, *Rhizophora mangle* L. (*Rhizophoraceae*). *Molecular Ecology Notes* 2: 281-283

- Rousset F (2008) GENEPOP 007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 281-283
- Ruiz-Luna A, Acosta-Velázquez J, Berlanga-Robles CA (2008) On the reliability of the data of the extent of mangroves; a case study in Mexico. *Ocean and Coastal Management* 51: 342-351
- Rull V (1998) Evolución de los manglares Neotropicales: La crisis del Eoceno. *Interciencia* 23: 255-262
- Salas-Leiva DE, Mayor-Durán VM, Toro-Perea N (2009) Genetic diversity of the black mangrove (*Avicennia germinans* L.) in Colombia. *Aquatic Botany* 91: 187-193
- Saura M, Pérez-Figueroa A, Fernández J, Toro MA, Caballero A (2008) Preserving Population Allele Frequencies in Ex Situ Conservation Programs. *Conservation Biology* 22: 1277-1287
- Sousa WP, Kennedy PG, Mitchell BJ, Ordóñez BM (2007) Supply-side ecology in mangroves: do propagule dispersal and seedling establishment explain forest structure? *Ecology Monographs* 77 (1): 53-76
- Spalding M, Blasco F, Field C (1997) *World Mangrove Atlas*. The International Society for Mangrove Ecosystems, Okinawa, Japan

- Stuart SA, Choat B, Martin KC, Holbrook NM, Ball MC (2007) The role of freezing in setting the latitudinal limits of mangrove forests. *New Phytologist* 173: 576-583
- Takayama K, Tamura M, Tateishi Y, Kajita T (2008) Isolation and characterization of microsatellite loci in the red mangrove *Rhizophora mangle* (*Rhizophoraceae*) and its related species. *Conservation Genetics* 9: 1323-1325
- Teixeira S, Arnaud-Haond S, Duarte CM, Serrao (2003) Polymorphic microsatellite DNA markers in the mangrove tree *Avicennia alba*. *Molecular Ecology Notes* 3: 544-546
- Tomlinson PB (1994) *The Botany of Mangroves*. Cambridge University Press
Cambridge, UK
- Tovilla-Hernández C, Orihuela-Belmonte D (2002) *Manual de técnicas y métodos de restauración de zonas alteradas en manglares*. El Colegio de La Frontera Sur, Tapachula, Chiapas, México
- Tovilla-Hernández C, Orihuela-Belmonte DE (2004) Impacto del huracán Rosa sobre los bosques de manglar de la costa norte de Nayarit, México. *Madera y Bosques* 2: 63-75

- Triest L (2008) Molecular ecology and biogeography of mangrove trees towards conceptual insights on gene flow and barriers: A review. *Aquatic Botany* 89: 138-154
- Valiela I, Bowen JL, York JK (2001) Mangrove Forests: One of the World's Threatened Major Tropical Environments. *BioScience* 51: 807-815
- Vega-Rodríguez M (2008) Estimating primary productivity of red mangroves in southwestern Puerto Rico from remote sensing and field measurements. *Marine Science, Puerto Rico*
- Walters BB, Rönnbäck P, Kovacs JM, Crona B, Hussain SA, Badola R, Primavera JH, Barbier E, Dahdouh-Guebas F (2008) Ethnobiology, socio-economics and management of mangrove forests: A review. *Aquatic Botany* 89: 220-236
- Williams CF, Ruvinsky J, Scott PE, Hews DK (2001) Pollination, breeding system, and genetic structure in two sympatric *Delphinium* (Ranunculaceae) species. *American Journal of Botany* 88: 1623-1633
- Wright S (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420

Yokoyama Y, Lambeck K, De Deckker P, Johnston P, Fifield LK (2000) Timing of the Last Glacial Maximum from observed sea-level minima. *Nature* 406: 713-716