



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICO DE *Targionia hypophylla* L. (Targioniaceae,
Marchantiopsida) BASADO EN MARCADORES DE CLOROPLASTO.**

Tesis

Que presenta:

BIÓL. KARLA YUNUEN MAGAÑA MARCIAL

**Como requisito para obtener el título de
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Director de tesis:

DR. OMAR DOMÍNGUEZ DOMÍNGUEZ

Co-Directora

DRA. DENEBA GARCÍA ÁVILA

Morelia, Michoacán. Agosto 2018.





UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

DRA. LILIANA MÁRQUEZ BENAVIDES
COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICO DE *Targionia hypophylla* L. (TARGIONIACEAE, MARCHANTIOPSIDA) BASADO EN MARCADORES DE CLOROPLASTO)" presentado por la BIOL. Karla Yunuen Magaña Marcial con Número de Matrícula 0618928D, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestra en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Morelia, Michoacán, a 17 de agosto de 2018

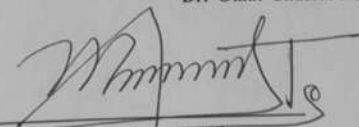
MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA


Dr. Omar Domínguez Domínguez


Dra. Deneb García Ávila


Dr. Antonio González Rodríguez


Dr. Omar Chassin Noria


Dr. Miguel Martínez Trujillo

Karla Yunuen Magaña Marcial es egresada del Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Este trabajo fue realizado como parte de su proyecto de maestría y será sometido a la revista _____ para su publicación.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor el Doctor Omar Domínguez, por su apoyo incondicional a este proyecto.

A mi co-asesora, la Dra. Deneb García Ávila por su apoyo y dedicación desde el primer día.

A los doctores, Dr. Omar Chassin Noria, Dr. Miguel Martínez Trujillo y Dr. Antonio González Rodríguez, por sus valiosos comentarios y observaciones para la mejora de este trabajo.

A mi familia, que me han apoyado de incontables maneras. Especialmente a mi mamá por su apoyo.

A Jorge, por acompañarme y apoyarme incondicionalmente.

A mis amigos de vida, Alfonso, Rita y Yoseline, gracias por estar siempre ahí.

A Joseline Cervantes y Enrique Hernández por su amistad y ayuda.

Al laboratorio de biología acuática por adoptarme aunque trabaja con plantas: Gaby, Naya, Pancho, Yare, Alex y Edgar. Especialmente gracias a mis compañeros de desvelos y frustración Francisco Loera, Quetzal, Adrian.

Índice

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	- 1 -
Biología reproductiva de briofitas	- 2 -
División Marchantiophyta	- 4 -
Estructura genética y filogeografía	- 5 -
Marcadores moleculares utilizados para briofitas	- 7 -
LITERATURA CITADA.....	- 8 -
ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICO DE <i>Targionia hypophylla</i> L. (Targioniaceae, Marchantiopsida) BASADO EN MARCADORES DE CLOROPLASTO.	- 11 -
Resumen	- 11 -
Abstract	- 12 -
INTRODUCCIÓN.....	- 14 -
Materiales y métodos	- 17 -
Obtención y determinación de ejemplares	- 17 -
Obtención de ADN y amplificación de genes	- 17 -
Estadística descriptiva y redes de haplotipos	- 18 -
RESULTADOS.....	- 19 -
Estadística descriptiva	- 20 -
Redes de haplotipos	- 21 -
Estructura poblacional	- 21 -
Pruebas de neutralidad y demografía histórica	- 22 -
Discusión.....	- 22 -
Taxonomía.....	- 22 -
Demografía histórica y variación genética.....	- 24 -
Diferencias genéticas a micro escala.....	- 26 -

Biogeografía	- 28 -
Dispersión	- 28 -
Conclusiones	- 30 -
LITERATURA CITADA.....	- 33 -
Cuadros y Figuras	- 39 -
Cuadro 1. Localidades de muestreo de los ejemplares de <i>Targionia hypophylla</i>	- 39 -
Cuadro 2. Índices de diversidad genética para las poblaciones de <i>T. hypophylla</i>	- 43 -
Cuadro 3. Análisis de varianza molecular (AMOVA)	- 43 -
Cuadro 4. Estimación de la demografía histórica.....	- 44 -
Figura 2. Redes de haplotipos.....	- 46 -
Figura 3. Historia demográfica de las poblaciones de <i>Targionia hypophylla</i>	- 47 -

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las briofitas son un grupo de plantas no vasculares, divididas en tres grandes grupos: las de mayor diversidad Bryophyta (musgos), Anthocerotophyta que cuentan con pocas especies, y el grupo de diversidad intermedia Marchantiophyta (hepáticas) (Crandall-Stotler y Stotler, 2000).

A lo largo del tiempo se ha especulado acerca de los posibles métodos de dispersión que han llevado a las briofitas a tener una distribución reducida o cosmopolita dependiendo de la especie. Vanderpoorten & Goffinet (2009) retoman la teoría de Kürschner (2008), en la cual se proponía que la distribución de las briofitas se dio durante la separación de la pangea. Estos autores añaden que dicha explicación no solo podría aplicarse a briofitas sino también a otros grupos taxonómicos, debido a que al separarse Laurasia y Gondwana se registró una división que conllevó al aislamiento del Sur de América, Australia y Nueva Zelanda lo cual podría ser la causa de que estas regiones presenten tasas elevadas de endemismos.

Por su parte Tan & Pócs (2000) proponen agrupar a las briofitas en cinco patrones de distribución: distribución ártica y alpina, distribución boreal, distribuciones norte y del sur, distribución tropical y distribuciones sub antárticas y antártica, esto como resultado de estudios previos que muestran distribuciones bi-continetales para diferentes especies de briofitas. Estos autores recalcan que las briofitas cuentan con métodos de dispersión sencillos ya sea por esporas o propágulos vegetativos.

Se ha planteado también la posibilidad de dispersión de esporas de briofitas por medio de aves (Vanderpoorten & Goffinet, 2009). Otra teoría que se ha adoptado para explicar la distribución de las especies es el factor humano, algunos autores (Tan y Pócs, 2000; Vanderpoorten y Goffinet, 2009) refieren que la posibilidad más lógica para la dispersión a largas distancias es la introducción de especies mediadas por el hombre. Aunque las briofitas no son deliberadamente introducidas (a excepción de algunos musgos de jardín) esto se puede dar por error al introducirse plantas vasculares con briofitas en los tallos que llevan a una colonización exitosa en nuevas regiones geográficas.

Biología reproductiva de briofitas

Las briofitas comparten un ciclo de vida con alternancia de generaciones, es decir, tienen una fase haploide (n) que es la que predomina y una fase diploide ($2n$) que se desarrolla después de la fecundación. Existen dos tipos de reproducción en briofitas. 1) Reproducción sexual y 2) reproducción asexual.

La primera ocurre tanto en organismos dioicos como en monoicos. En las especies dioicas la estructura femenina se encuentra en un gametofito diferente a la masculina y se da una reproducción cruzada permitiendo recambio genético. Mientras que en organismos monoicos los órganos sexuales femeninos y masculinos se encuentran en el mismo gametofito a una distancia corta para aumentar así las posibilidades de fertilización exitosa y la producción de esporofitos. Por lo tanto, la reproducción en especies monoicas puede llevar a la autofecundación que implica la fusión de gametos genéticamente idénticos producidos por el mismo gametofito o por diferentes miembros del mismo clon (Longton & Schuster 1983).

En la reproducción sexual el gametofito (n) (parte verde de la planta) produce gametos femeninos (ovocélula) y gametos masculinos (anterozoides), la unión de estas dos células permite el intercambio de genes y se forma un esporofito ($2n$), en este se producen las esporas (n) que darán origen a nuevos gametofitos (n).

Por otra parte la reproducción asexual es una estrategia de suma importancia para el mantenimiento y desarrollo de la población así como para la propagación de la misma. Esta se presenta en la mayoría de los musgos, en numerosas especies de hepáticas y en algunos antocerotes (Longton & Schuster 1983).

Existen seis métodos de reproducción asexual según Longton & Schuster (1983) los cuales varían dependiendo del grupo y de la especie: 1) La producción de numerosos gametofitos de un mismo protonema (método restringido a musgos), 2) La desintegración de las partes del gametofito más viejas, por lo que el sector más joven de las ramas pierde contacto con la consiguiente multiplicación vegetativa, 3) Desarrollo de ramas mediante los rizoides o estolones, 4) La iniciación de un nuevo gametofito por un sistema de rizoides, 5) Regeneración por fragmentos de gametofitos, 6) Producción de gametofitos mediante estructuras especializadas (propágulos).

La reproducción asexual por medio de propágulos es una de las más comunes y conocidas para musgos y hepáticas, estos propágulos se pueden ubicar en los tallos, hojas o rizoides dependiendo de la especie de briofita que se trate (Shaw & Goffinet, 2000) las plantas resultantes de una reproducción asexual son genéticamente iguales a su progenitor.

División Marchantiophyta

La División Marchantiophyta abarca especies que se distribuyen en la mayoría de los ambientes terrestres que se conocen (Tan y Pócs, 2000). Se considera que cuenta con un aproximado de 6000-8000 especies a nivel mundial de acuerdo con Crandall-Stotler y Stotler, (2000). Estas se agrupan en tres clases: Marchantiopsida, Jungermanniopsida y Haplomitriopsida.

Dentro de la clase Marchantiopsida, tenemos a las hepáticas talosas complejas, las cuales tienen una morfología diversa. Por ejemplo, las del orden Marchantiales, presentan poros en el talo que pueden estar asociados a cámaras de aire, desarrollan estructuras especializadas para portar los órganos sexuales (Arquegonióforo y Anteridioforo), rizoides de dos tipos (lisos y rugosos), escamas ventrales y en algunos géneros copas de dispersión (Crandall-Stotler *et al.* 2009).

Targioniaceae forma parte de este orden, sin embargo posee una morfología más sencilla en comparación con el resto de los integrantes del orden. Esta familia es monogenérica y se caracteriza por presentar un involucro que porta el arquegonio en la porción ventral apical del talo, en lugar de un arquegonióforo como los demás integrantes del orden.

Otra diferencia de Targioniaceae radica en la estructura masculina (anteridio) la cual se ubica ligeramente embebido en una rama ventral corta anexa al gametofito femenino (Schuster, 1992), estas características definen a la especie como monoica y por la ubicación del macho respecto a la hembra es de tipo autoico (Shaw & Goffinet, 2000).

Algunas otras características de esta familia es que el talo es firme, usualmente ligulado a linear, la epidermis dorsal es firme y presenta poros claramente definidos rodeados de varios anillos de células diferenciadas (Schuster, 1992). Entre las particularidades del

género, además de las arriba mencionadas, está su alta tolerancia a la desecación. Cuando se encuentra deshidratada el talo se curva hacia dentro dándole a la planta una apariencia de ‘gusano’ de color negro (Schuster, 1992).

El género *Targionia* cuenta a nivel mundial con tres especies: *T. elongata* (Etiopía), *T. stellaris* (Argentina) y *T. hypophylla* (cosmopolita) (Schuster, 1992, Bischler-Causse *et al.*, 2005).

La familia Targioniaceae y en especial, *Targionia hypophylla* ha estado sujeta a cambios en su taxonomía debido a su plasticidad fenotípica, se han sinonimizado de 15 a 20 especies descritas con anterioridad (Bischler-Causse *et al.*, 2005; Consortium of North American Bryophyta Herbaria). Estas sinonimias se han realizado únicamente mediante tratamientos taxonómicos.

De acuerdo con Villarreal *et al.*, (2016) *Targionia hypophylla* apareció hace 100 a 110 millones de años y su grupo hermano es *Weisnerella denudata* (Wiesnerellaceae).

Targionia hypophylla ha sido considerada como una especie cosmopolita, poliploide, altamente variable y se presume que tiene una adecuación alta, esto último debido a su distribución tan amplia (Bischler-Causse, 1998, Boisselier-Dubayle y Bishler, 1999).

Estructura genética y filogeografía

Debido a las particularidades descritas anteriormente para esta especie, *Targionia hypophylla* resulta una especie interesante para estudiar aspectos poblacionales de diversidad y estructura genética, entendiéndose esto como el análisis del número de

mutaciones, recombinaciones y alteraciones de un genotipo y que pueden llegar a diferenciarlo genéticamente de los demás.

La estructura y/o diversidad genética se pueden cuantificar mediante diferentes parámetros poblacionales, como son: Diversidad nucleotídica, diversidad haplotípica, D' Tajima, F de Fú, así como el estadístico F_{ST} (Wright, 1931) el cual mide la cantidad de Heterocigosis que hay en la población y proporciona una medida de estructura genética.

Todos estos parámetros poblacionales tienen como objetivo determinar si las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg (el cual establece que una población permanece en equilibrio si sus frecuencias alélicas y genotípicas no cambian de una generación a la siguiente) y los posibles procesos o fuerzas evolutivas que se encuentren dirigiendo o eliminando la variación genética de las poblaciones.

En diferentes casos se ha observado una correlación entre la estructuración genética de las poblaciones con el arreglo geográfico, esto se interpreta como estructura filogeográfica. Entendiéndose la filogeografía como el estudio de la relación entre la genealogía y la distribución geográfica de las diferentes poblaciones para una especie dada. La filogeografía además lidia con la historia y los componentes filogenéticos de la distribución espacial de los diferentes linajes de genes (Avise, 2000).

Para realizar estudios filogeográficos se utilizan fragmentos específicos de ADN o proteínas llamados marcadores moleculares, los cuales están relacionados a un rasgo de herencia genética. Se usan principalmente para diferenciar taxones y localizar fuentes de variación genética.

Marcadores moleculares utilizados para briofitas

Las secuencias de ADN se han utilizado para estudios a nivel de especie tanto en plantas vasculares como en briofitas. De estas secuencias podemos escoger tres genomas: mitocondrial (mtADN), cloroplasto (cpADN) y nuclear (nADN). El mtADN se utiliza para resolver problemas a nivel de género, familia y órdenes, por su parte el cpADN es útil para separar especies e incluso para resolver patrones filogenéticos así como para disociar problemas poblacionales aunque la resolución de los resultados varían dependiendo de la especie. Los marcadores de núcleo (nADN) se utilizan para resolver mayormente problemas a nivel poblacional. (Azofeifa-Delgado., 2006; Shaw & Goffinet, 2000; Stech & Quandt, 2010).

En 2010, se realizó una revisión de los principales marcadores utilizados en las filogenias de briofitas, en la cual se encontró que las principales fuentes de variación molecular son las siguientes: 1) Secuencias de ADN, 2) Características genómicas estructurales, y 3) Huellas Genéticas. En el consenso de los genes que se utilizan destacan la región intergénica (trnL-F), la proteína ribosomal R4 (rps4), los espaciadores internos transcritos (ITS), la subunidad 5 deshidrogenasa (Nad5) y ribulosa 1-5-bifosfato-carboxilasa/oxigenasa (rbcL).

De acuerdo con Shaw *et al.*, (2002) las regiones del genoma que se han utilizado para análisis filogeográficos en briofitas provienen de genes del cloroplasto y núcleo. La región del cloroplasto más ampliamente utilizada para resolver patrones a nivel infra específico es el trnL, el genoma del cloroplasto en plantas es conservado a nivel de sustitución de nucleótidos.

A pesar de que la especie *T. hypophylla* cuenta con una distribución geográfica muy amplia no se han realizado estudios taxonómicos, moleculares o de variación genética en esta especie. El conocer la relación entre la distancia geográfica y la variación genética de *T. hypophylla* es importante debido a que nos puede ayudar a clarificar los diferentes cambios evolutivos que han ocurrido a través del tiempo, así como saber si existe una correlación entre la distribución genética y la distribución geográfica entre las poblaciones.

Además, nos ayudará a entender si la distribución cosmopolita de *T. hypophylla* está relacionada con los procesos de dispersión o con los diferentes cambios geológicos que han sucedido en una escala del tiempo determinada.

LITERATURA CITADA

- Avice, J.C. 2000. Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard University Press, Cambridge, MA. 447 pp.
- Azofeifa-Delgado, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* 17(2): 221-242. 2006
- Bischler-Causse, H. 1998. Systematics and Evolution of the genera Marchantiales. *Bryophytorum Bibliotheca* 51, 200pp.
- Bischler-Causse, H., Gradstein, S.R., Jovet-Ast, S., Long, D.G., Salazar-Allén, N. 2005. Marchantiidae. *Flora Neotropica* 97:1-262'
- Boisselier-Dubayle, M. C y Bischler, H. 1999. Genetic Relationship between Haploid and Triploid *Targionia* (Targioniaceae, Hepaticae). *International Journal of Plant Sciences* 160: 1163-1169.

- Consortium of North American Bryophyta Herbaria (CNALH). 2017. <http://bryophyteportal.org/portal/index.php>. Accessed on July 28.
- Crandall-Stotler, B., Stotler, R.E., 2000. Morphology and classification of the Marchantiophyta. In: Shaw, A.J., Goffinet, B. (Eds.), *Bryophyte Biology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 21–70
- Crandall-Stotler, B., Stotler, R.E., Long, D. 2009. Phylogeny and classification of the Marchantiophyta. *Edinburgh Journal of Botany* 66: 1- 55.
- Heinrichs, J., Hentschel, R., Wilson, R., Feldberg, K., y Schneider, H. 2007. Evolution of leafy liverworts (Jungermanniidae, Marchantiophyta): estimating divergence times from chloroplast DNA sequences using penalized likelihood with integrated fossil evidence. *Taxón* 56: 31-44
- Kürschner, H. 2008. Biogeography of South-West Asian Bryophytes- With special Emphasis on the Tropical Element. *Turkish Journal of Botany* 32: 433-446.
- Longton, R.E y R.M. Schuster. 1983. Reproductive Biology. In: R.M. Schuster (ed.). *New Manual of bryology*. Hattori Botanical Laboratory, Nichinan. 386-462pp.
- Schuster, R. 1992. The hepaticae and Antocerotae of North América. Vol VI. Columbia University Press, NY.
- Shaw, A.J y Goffinet, B. 2000. *Bryophyte Biology*. Cambridge University Press.
- Shaw et al. 2002. Phylogeography and Phylodemography. *The Bryologist* 105(3), pp. 373-383.
- McDaniel, S.F y Shaw, A.J. 2003. Phylogeographic structure and cryptic speciation in the trans-Antarctic moss *Pyrrhobryum mnioides*. *Evolution* 57(2):205-15.

- Stech, M y Quandt, D. 2010. 20,000 species and five key markers: The status of molecular bryophyte phylogenetics. *Phytotaxa* 9: 196–228pp.
- Tan, C. B y Pócs, T. 2000. Bryogeography and conservation of bryophytes. En: A. J. Shaw y B. Goffinet (eds.), *Bryophyte Biology*. Cambridge University Press.
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 28 Jul 2017 <http://www.tropicos.org>
- Vanderpoorten, A y Goffinet, B. 2009. *Introduction to Bryophytes*. Cambridge University Press.
- Villarreal, J.C., Crandall-Stotler B.J., Hart, M.L., Long D.G y L. L Forrest. 2016. Divergence times and the evolution of morphological complexity in an early land plant lineage (Marchantiopsida) with a slow molecular rate. *New Phytologist* (2016) 209: 1734–1746
- Wright, S. 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics* 16:97-159.

ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICO DE *Targionia hypophylla* L. (Targioniaceae, Marchantiopsida) BASADO EN MARCADORES DE CLOROPLASTO.

Resumen

Targionia hypophylla es una hepática talosa de la familia Targioniaceae (Marchantiopsida), y se distribuye ampliamente alrededor del mundo. Esta especie tiene un número considerable de sinonimias, además de ser poliploide y tener una adecuación alta. Por estas características de amplia distribución alrededor del mundo, alta adecuación y número de sinonimias la hacen una especie modelo para entender los procesos filogeográficos en espacio y tiempo de una especie cosmopolita. El presente trabajo tiene como objetivo conocer la historia evolutiva de *Targionia hypophylla* para responder la siguiente pregunta: De acuerdo a los marcadores moleculares de cloroplasto rpoC1, trnK-psbA, trnL-F, ¿Existe una congruencia geográfica en la distribución de la variación genética en las poblaciones de *T. hypophylla*? Para responder esta pregunta se realizó un muestreo representativo del rango geográfico de *T. hypophylla*. Se solicitaron ejemplares a diferentes herbarios internacionales, se realizaron salidas al campo en México y se pidió material fresco mediante la red de Briólogos –Bryonet. Se obtuvo un total de 297 secuencias de los marcadores de cloroplasto: rpoC1 (370pb, n=114), trnL-F (716pb, n=105) y trnK-psbA (1061pb, n=78) de la especie *Targionia hypophylla* pertenecientes a 31 poblaciones a lo largo de su distribución. Así como también se obtuvieron secuencias para las especie *Targionia elongata* (trnL-F= 1, trnKpsbA= 1). Para contestar nuestras preguntas se realizaron diferentes análisis: Redes espaciales de haplotipos, estadísticos poblacionales

(diversidades haplotípicas, nucleotídicas, D de Tajima y F de Fu) así como análisis de variación molecular entre regiones brioflorísticas. No se encontró pérdida de la conectividad genética por distancia, así como tampoco una estructuración filogeográfica con los marcadores utilizados. Sin embargo, los datos sugieren que las poblaciones de *T. hypophylla* se encuentran recuperándose de una reducción en su tamaño efectivo poblacional. Se concluye que *T. hypophylla* exhibe un patrón de distribución genética similar al de otras briofitas, la modificación del ambiente en épocas recientes ejerce un efecto negativo en *T. hypophylla* provocando decrecimiento en su tamaño efectivo poblacional.

Palabras clave: Briofitas, Estadística poblacional, Filogeografía, Genética de poblaciones.

Abstract

Targionia hypophylla is thalloid liverwort of the family Targioniaceae (Marchantiopsida), and it is widely distributed around the world. This species has a considerable number of synonyms, as well as being polyploidy and having high suitability. Due to these characteristics of wide distribution around the world, high adaptation and number of synonyms make it a model species to understand the phylogeographic processes in space and time of a cosmopolitan species. The present work aims to know the evolutionary history of *Targionia hypophylla* to answer the following question: According to the molecular markers of chloroplast *rpoC1*, *trnK-psbA*, *trnL-F*, is there a geographical congruence in the distribution of genetic variation in the populations of *T. hypophylla*? To answer this question, a representative sampling of the geographical range of *T. hypophylla*

was carried out. Copies were requested from different international herbaria, field trips were made in Mexico and fresh material was requested through Bryonet network. A total of 297 sequences of the chloroplast markers were obtained: rpoC1 (370pb, n = 114), trnL-F (716pb, n = 105) and trnK-psbA (1061pb, n = 78) of the species *Targionia hypophylla* belonging to 31 populations throughout its distribution. As well as sequences were obtained for the species *Targionia elongata* (trnL-F= 1, trnKpsbA= 1). To answer our questions, different analyzes were carried out: haplotype spatial networks, population statistics (haplotype, nucleotide, D de Tajima and F de Fu) as well as analysis of molecular variation between bryofloristics regions. There was not loss of genetic connectivity by distance or a phylogeographic structure with the used markers. However, the data suggest that populations of *T. hypophylla* are recovering from a reduction in their effective population size. It is concluded that *T. hypophylla* exhibits a pattern of genetic distribution similar to that of other bryophytes; the modification of the environment in recent times exerts a negative effect on *T. hypophylla*, causing a decrease in its effective population size.

INTRODUCCIÓN

La filogeografía en briofitas ha sido estudiada en tiempos recientes. Existen diferentes procesos que llevan a una diferenciación genética entre las poblaciones, como son: deriva génica, mutaciones y selección natural. Sin embargo, comúnmente las briofitas no presentan una estructuración genética definida por la distancia geográfica entre las poblaciones. Un claro ejemplo de lo anterior es el musgo *Pyrrhobryum mnioides*, el cual cuenta con una distribución amplia desde la región brioflorística holantártica hasta la holártica (Scholfied, 1992). Esta especie de musgo presenta una estructura genética definida por patrones de vicarianza por el surgimiento de montañas (McDaniel & Shaw, 2003). Existen diferentes estudios para hepáticas y musgos con rangos de distribución amplios que arrojan resultados similares: en donde la diferenciación genética no está correlacionada con la distancia geográfica al contrario la diferenciación entre las poblaciones se atribuyen al surgimiento de barreras geográficas como las montañas o a aquellas que quedan relegadas en refugios glaciares (Grundmann *et al.* 2007; McDaniel & Shaw., 2003; Buczkowska *et al.* 2010).

En briofitas con distribuciones cosmopolitas se ha encontrado que pueden compartir haplotipos entre masas continentales lo cual sugiere un flujo genético histórico o en curso dependiendo de la resolución del marcador molecular que se utilice (Laenen *et al.* 2011; Pisa *et al.* 2015).

Para especies con distribución disyunta entre masas continentales la historia parece no cambiar a aquellas especies que exhiben una distribución cosmopolita. Tal es el caso de dos especies del género *Metzgeria*, distribuidas en Norteamérica y Europa en la cual la

distancia geográfica no es un factor determinante para desencadenar un proceso de especiación por aislamiento, al contrario el número de substituciones nucleotídicas entre estas poblaciones fue bajo, atribuyendo esto a la existencia de flujo genético entre las poblaciones (Fuselier *et al.* 2009; Fuselier *et al.* 2011).

Existen especies de briofitas que exhiben concordancia entre la distancia geográfica y la distancia genética de las especies, aunque esta estructuración filogeográfica sea insuficiente para poder discernir entre algún proceso por aislamiento (Pokorny *et al.* 2011).

Targionia hypophylla es una especie de hepática talosa compleja con distribución cosmopolita y morfológicamente variable, cuenta con 15-20 sinonimias (Bischler-Causse *et al.*, 2005; Consortium of North American Bryophyta Herbaria) y actualmente se reconocen dos variedades y dos subespecie para *T. hypophylla* (trópicos.org). Por ende, existe un problema taxonómico con respecto al número de especies que deberían de reconocerse dentro del género *Targionia* como válidas e inclusive si la recientemente sinonimizada *Targionia lorbeeriana* Müll. Frib se debería considerar como una especie separada de *Targionia hypophylla*. Sobre la controversia en cuanto a la sinonimia *T. lorbeeriana*-*T. hypophylla*, Zamora *et al.* (1990) acotan que no existen caracteres morfológicos, anatómicos ni ecológicos para reconocerlas como especies separadas, que solamente a través de una dotación cromosómica es posible realizar una determinación precisa por lo cual debe de considerarse como una misma especie.

Para *T. hypophylla* se han realizado estudios de diferente naturaleza como conteo cromosómico (Zamora *et al.* 1990), taxonomía numérica (Zamora *et al.* 1990), taxonomía descriptiva para discernir entre especies (Scott & Price, 1988; Perold, 1993), así como estudios para analizar su respuesta a factores físicos y químicos para la inducción de estructuras reproductivas (Bapna *et al.* 1984).

Otro de los trabajos es el realizado por Boisselier-Dubayle & Bishler (1999) quienes analizaron isoenzimas de diferentes poblaciones de Europa, África, Australasia y las Islas del Atlántico para *Targionia hypophylla* y *Targionia lorbeeriana*. Las autoras encontraron un alto nivel de heterocigosis y duplicación cromosómica que caracterizan a las especies como triploides fértiles. Esta triploidía es explicada como el resultado de la hibridación entre dos muestras haploides, seguidas por la duplicación cromosómica y la no disyunción meiótica. Además se observó la variación morfológica entre los dos citotipos (haploide-triploide), sus requerimientos ecológicos y su distribución simpátrica, encontrándose que tres de las colonias africanas y australianas triploides no comparten el mismo genoma con las triploides de Europa e islas del Atlántico. Por lo que se indican orígenes independientes de las poblaciones Europa-Atlántico y poliploides afro-Australasia.

El presente trabajo tiene como objetivos conocer la historia evolutiva de *Targionia hypophylla* para responder las siguientes preguntas: 1) De acuerdo a los marcadores moleculares de cloroplasto trnK-psbA, trnL-F y rpoC1, ¿Existe una relación entre la distribución genética y la distribución geográfica de las diferentes poblaciones de *T. hypophylla*?, 2) En caso de obtener una diferenciación genética, ¿El aislamiento de las poblaciones se debe a procesos geológicos o al bajo o nulo flujo genético entre estas?.

Materiales y métodos

Obtención y determinación de ejemplares

La obtención de ejemplares, se realizó en salidas al campo (16 salidas realizadas entre agosto 2015- abril 2017) para ejemplares mexicanos. Además se consiguió el préstamo de ejemplares de todo el mundo provenientes de los siguientes Herbarios: Missouri Botanical Garden (MO), Herbario de la Universidad de DUKE, Royal Botanical Garden Edinburgh (RBGE), Instituto de Botanica de Brasil, Jardín Botánico de la Universidad de Helsinki y el Herbario Nacional (MEXU) (Cuadro I).

Se solicitó material fresco de la especie mediante la red mundial de briólogos Bryonet. De todos los ejemplares obtenidos se corroboró la determinación taxonómica de las diferentes muestras de *T. hypophylla* para evitar posibles errores al momento de seleccionar el tejido para los análisis moleculares.

Obtención de ADN y amplificación de genes

Para la extracción del ADN se utilizó el método propuesto por cada KIT adquirido para este fin (Plant/Seed DNA Microprep, ZymoResearch y DNeasy plant MiniKit, Quiagen).

Se amplificaron los marcadores de cloroplasto *rpoC1*, *trnL-F* y *trnK-psbA*. Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl (Cuadro S1) utilizando un par de primers para cada marcador. Los productos de PCR se purificaron utilizando ExoSAP-IT al 10% (USB corp) y se enviaron para su secuenciación a la empresa MacroGen Inc. (Seoul, Corea del Sur). El ensamblaje y edición de las secuencias se realizó con el programa ChromasPro© (McCarthy, 2004) para obtener la secuencia consenso de cada muestra. El alineamiento de las secuencias se hizo de forma manual para el gen

codificador rpoC1 y automática para los otros dos marcadores en el editor del MEGA 7.0.20 (Tamura *et al.*, 2013) utilizando los parámetros por defecto.

Las secuencias obtenidas serán depositadas en GenBank, con los números de acceso correspondientes (Cuadro S2).

Estadística descriptiva y redes de haplotipos.

Por medio del programa DnaSP (Rozas *et al.*, 2003) se estimó la diversidad haplotípica (H_d , Nei, 1987) y nucleotídica (π , Nei, 1987), el número de sitios polimórficos, los sitios parsimoniosamente informativos, el número promedio de diferencias nucleotídicas por pares (k ; Tajima, 1983) y el número de mutaciones para cada marcador molecular, por regiones brioflorísticas y sin ningún tipo de agrupamiento para observar las diferencias en el conjunto de datos.

Para analizar de manera gráfica la variación genética entre las diferentes poblaciones (Posada & Crandall, 2001), se construyó una red de haplotipos en el programa PopArt (Bandelt *et al.* 1999) para cada marcador molecular (rpoC1, trnK-psbA y trnL_F).

Estructura genética

Para determinar el grado de la diferenciación genética entre las regiones brioflorísticas, así como el patrón geográfico de subdivisión poblacional, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) considerando los índices de fijación F_{CT} , F_{ST} y F_{SC} . Estos se realizaron siguiendo dos agrupamientos: 1) Considerando a todos los individuos como una población en equilibrio Hardy-Weinberg (panmíctica), y 2) agrupación por reinos brioflorísticos (Scholfield, 1992).

Mediante el cálculo de F_{ST} por pares entre las poblaciones de reinos brioflorísticos se estimó la diferencia genética entre estas. Para dichos análisis se consideraron 1,000 permutaciones para la estimación de los valores de significancia utilizando ARLEQUIN 3.5 (Excoffier *et al.* 2005).

Demografía histórica

Las pruebas neutrales de demografía poblacional (D de Tajima, 1993 y F de Fu y Li, 1993) fueron calculadas en el programa Arlequin (Excoffier *et al.* 1992). La dinámica poblacional a través del tiempo fue analizada por medio del modelo Extended Bayesian Skyline Plot (EBSP) mediante el programa BEAST v.1.47 (Drummond *et al.* 2005; Drummond & Rambaut, 2007). El análisis se realizó con la matriz concatenada y se utilizó una tasa de mutación de 1×10^{-7} (límite inferior) a 4×10^{-4} (límite superior) sustituciones por sitio por millón de años (Laenen *et al.* 2014). Se estableció *a priori* un modelo de reloj molecular relajado y se ejecutaron 150 millones de generaciones. La convergencia de los parámetros fue visualizada con Tracer v.1.5 (Rambaut & Drummond 2007).

RESULTADOS

Se obtuvo un total de 267 secuencias de los marcadores de cloroplasto: rpoC1 (370pb, n=106), trnL-F (716pb, n=90) y trnK-psbA (1061pb, n=71) de la especie *Targionia hypophylla* pertenecientes a 91 localidades a lo largo de su rango de distribución, mientras que para *Targionia lorbeeriana* se obtuvieron 30 secuencias (rpoC1=8; trnL-F=15; trnK-psbA=7). Además se obtuvieron secuencias para la especie *Targionia elongata* (trnL-F= 1, trnK-psbA= 1) (endémica de África) (Figura 1; Cuadro 1).

Estadística descriptiva

Analizando la totalidad de las muestras, sin realizar una segregación por reinos brioflorísticos, se obtuvieron 36 sitios polimórficos y 23 haplotipos para el gen *rpoC1*, mientras que para el gen *trnK-psbA* se obtuvieron 139 sitios polimórficos y 24 haplotipos. Por su parte el gen *trnL-F* presentó 35 sitios polimórficos y 31 haplotipos (Cuadro 2). Se obtuvieron diversidades haplotípicas altas y nucleotídicas bajas para los marcadores moleculares utilizados (*rpoC1* = $Hd\ 0.7053 \pm 0.13356$, $\pi\ 0.13956 \pm 0.0056$; *trnL-F* = $Hd\ 0.8485 \pm 0.061$, $\pi\ 0.13956 \pm 0.02688$; *trnK-psbA*= $Hd\ 0.75552 \pm 0.043$, $\pi\ 0.01795 \pm 0.0012$) (Cuadro 2).

Al evaluar la diversidad genética por región brioflorística los resultados fueron similares, obteniendo diversidades haplotípicas altas y nucleotídicas bajas para los tres marcadores. Los marcadores *trnL-F* y *trnK-psbA* muestran un patrón de diversidad similar al mostrado en la región holantártica con una diversidad haplotípica muy alta ($Hd=1$) y una diversidad nucleotídica baja.

Para dos de los tres marcadores (*trnK-psbA* y *rpoC1*) la región Paleotropical exhibe los valores de Hd y π más altos, mientras que para el *trnL-F* los valores más altos fueron obtenidos para la región holantártica (Hd) y holártica (π).

La región con mayor número de sitios polimórficos fue la neotropical para el *trnL-F* ($S=236$) y el *trnK-psbA* ($S=95$), mientras que para el *rpoC1* fue la región holártica ($S=32$). El mayor número de haplotipos se concentró en la región holártica para todos los marcadores (Cuadro 2).

Redes de haplotipos

Las redes de haplotipos para los marcadores de cADN no denotan estructura filogeográfica (Figura 2). Para el gen *rpoC1*, se observa un haplotipo central compartido por las cuatro regiones brioflorísticas (RB) así como algunos haplotipos conectados por diferentes representantes de las RB.

Para el gen *trnK-psbA* (Figura 2B) la red de haplotipos muestra la existencia de haplotipos compartidos, sin embargo, se observa una ligera segregación geográfica de los haplogrupos. Uno de estos haplogrupos se encuentra conformada casi en su totalidad por haplotipos neotropicales y su contraparte por haplotipos holárticos, holantárticos y paleotropicales, sin embargo estos se separan por un solo paso mutacional. Por su parte el *trnL-F* exhibe a los haplotipos de las cuatro regiones brioflorísticas (holantártica, holártica, neotropical y paleotropical) mezclándose sin ningún tipo de estructura geográfica (Figura 2C).

En las redes de haplotipos para los tres marcadores (*rpoC1*, *trnK-psbA* y *trnL-F*), se observa que las muestras de *Targionia hypophylla* y *Targionia lorbeeriana* se encuentran compartiendo haplotipos (Figura 2) mezclándose entre sí. Mientras que la muestra representativa de *Targionia elongata* se encuentra conectada por 20 pasos mutacionales a la red de haplotipos como un haplotipo privado para los genes *trnK-psbA* y *trnL-F*. Esta especie se encuentra dentro del haplogrupo conformado por los ejemplares holárticos, holantárticos y paleotropicales en *trnK-psbA*.

Estructura poblacional

Los valores de F_{ST} en el resultado de las Amova resultaron no significativos para los tres marcadores moleculares (*trnL-F*, *trnK-psbA* y *rpoC1*). Al evaluar el porcentaje de variación

para las regiones brioflorísticas, se encontró el porcentaje más alto de diferenciación dentro de las poblaciones para los genes trnK-psbA (72.59%) y rpoC1 (75.3263%). El marcador molecular trnL-F demuestra una variación del 99.33% entre las poblaciones dentro de los grupos.

Pruebas de neutralidad y demografía histórica

Los valores D de Tajima y F de Fu, fueron negativos y significativos para todos los marcadores al tratar al conjunto de datos como una población panmíctica (Cuadro 4). Para los marcadores trnK-psbA y trnL-F segregados por región brioflorística se encontró que la región neotropical mantiene valores negativos y significativos para ambas pruebas (Cuadro 4). Mientras que las regiones holártica y paleotropical presentan valores negativos y significativos solamente para D de Tajima. La región holantártica no presenta ningún valor significativo para los marcadores, (Cuadro 1).

El análisis de Extended Bayesian Skyline Plot (EBSP) demuestra un decrecimiento poblacional reciente, aproximadamente de 30 000 a 10 000 años (Figura 3), seguido de una expansión demográfica.

DISCUSIÓN

Taxonomía

Targionia hypophylla es una especie variable morfológicamente, por esta razón ha experimentado numerosos cambios en su clasificación taxonómica en cuanto al número de sinonimias y/o inclusive al número de especies que deben de reconocerse en el género. El género *Targionia* cuenta con 3 especies reconocidas: *T. elongata* (Etiopía), *T. stellaris*

(Suramérica) y *T. hypophylla* de amplia distribución (Schuster, 1992; Bischler-Causse, *et al.*, 2005).

Una cuarta especie se encuentra en disputa, *T. lorbeeriana* que se encuentra distribuida en el Mediterráneo y Australia. Existe un estudio taxonómico basado en características morfológicas y cromosómicas (Zamora *et al.* 1990) con respecto a si la especie *Targionia lorbeeriana* debe de ser sinónimo de *T. hypophylla* o debe de considerarse como una especie diferente de esta. De acuerdo con nuestro estudio no existe evidencia molecular para separar a *T. lorbeeriana* de *T. hypophylla*.

En el presente estudio se encontró que existen haplotipos compartidos entre *T. hypophylla* y *T. lorbeeriana*. Una filogenia preliminar (Magaña-Marcial *et al.* datos inéditos no publicados) indica que ambas especies son parafiléticas, por lo que la hipótesis de manejarse como especies separadas debería ser desechada y considerar a *T. lorbeeriana* como un sinónimo de *T. hypophylla*. Esta sugerencia ya se había realizado basándose en datos merísticos y caracterización de esporas (Perold, 1993), en donde al considerar las diferencias en morfología y citogenética no se encontró ningún carácter que soporte la separación de ambos taxones. En estos estudios los autores concluyeron que estas variaciones pueden ser debidas a las distintas condiciones ambientales o ecológicas donde la población de estudio reside (Zamora *et al.* 1990; Perold, 1993).

En nuestros análisis utilizamos la especie *Targionia elongata*, especie endémica de África (parte Norte de Etiopía), para corroborar si genéticamente se encontraba separada de *Targionia hypophylla* y encontramos que aunque se ubica dentro de la red de haplotipos esta no compartía haplotipos con *T. hypophylla*. Nuestros resultados indicaron que *T. elongata* se ubica como un haplotipo privado para trnL-F y trnK-psbA, ubicándose como

parte del haplogrupo holártico, holantártico y paleotropical. La explicación para encontrarla conectada a estos haplogrupos podría ser por su distribución conocida, que es solamente para la parte norte de Etiopía resaltando que para esta porción de África se cuenta con presencia de la especie *T. hypophylla* (y de ejemplares antes catalogados como *T. lorbeeriana*) por lo cual las poblaciones podrían estar en simpatría. Cabe mencionar que para esta especie solo se utilizó un ejemplar debido a la poca accesibilidad a las muestras de herbario. Por lo que añadir más ejemplares de *T. elongata* a un estudio de esta naturaleza podría resultar interesante para analizar si realmente esta especie se encuentra separada de *T. hypophylla* o si este haplotipo privado es efecto de la baja representatividad de *T. elongata* en el muestreo obtenido. Las redes de haplotipos para los dos marcadores mencionados anteriormente no representaron modificaciones al analizarse sin la muestra de *T. elongata* (datos no mostrados).

Demografía histórica y variación genética.

Las poblaciones de *Targionia hypophylla*, de acuerdo con el análisis de marcadores de cloroplasto, exhiben una alta diversidad haplotípica pero baja diversidad nucleotídica (Cuadro 2). En briofitas este patrón de diversidad genética es habitual, se ha reportado en diversas especies tanto de hepáticas foliosas y talosas así como musgos (Boisselier-Dubayle & Bischler, 1997; Buczkowska *et al.* 2010; Chiang & Schall, 1999; Laenen *et al.* 2011). Al analizar la diversidad genética por región brioflorística se observaron regiones con diversidades haplotípicas de 1 como fue la región holantártica para trnK-psbA y trnL-F, esta región fue la única que en nuestro estudio contó con un número de muestra pequeña (N=5) y esto se debió a los requisitos de intercambio y préstamo de material biológico en

Australia. Por lo cual la alta diversidad haplotípica ($H_d=1$) para esta región, podría deberse al tamaño de muestra, aunque de acuerdo a los resultados de diversidad haplotípica alta para las regiones brioflorísticas restantes; es probable que aumentando el número de muestras en esta región la diversidad haplotípica siga manteniéndose alta fluctuando entre 0.7-0.9 como en las demás regiones (Cuadro 2)

La diversidad genética se calcula para comprender como se distribuye la diversidad a lo largo de las poblaciones en un área geográfica y dependiendo de la combinación de los valores se asocia a un evento definido. La naturaleza de los valores obtenidos (H_d alta y π baja) representan de manera general poblaciones con crecimiento poblacional rápido a partir de una población con tamaño efectivo poblacional pequeño (Grivet *et al.*, 2009; Holsinger, 2006).

Aunado a lo anterior, las pruebas de neutralidad muestran valores negativos y significativos para sus dos componentes (D de Tajima y F de Fu), lo que es consistente con los valores de diversidad genética obtenidos. La diversificación haplotípica observada para *T. hypophylla*, en donde se comparten los haplotipos para la totalidad de las regiones brioflorísticas, nos podría sugerir un ancestro en común para la especie como ha ocurrido para otras especies de briofitas, donde se ha reportado la recolonización de los continentes gracias a poblaciones protegidas por refugios pleistocénicos climáticos conservando su mismo hábitat para su posterior expansión (Laenen *et al.* 2011; Cronberg, 2000; McDaniel & Shaw, 2003). Aunque para *T. hypophylla* esto no está clarificado con la naturaleza de los estudios realizados, una investigación posterior sobre el proceso de colonización de *T.*

hypophylla podría ser útil para resolver la incógnita de cómo *T. hypophylla* ha logrado dispersarse y sobrevivir en diferentes ambientes.

De acuerdo al resultado obtenido del análisis Extended Bayesian Skyline Plot (EBSP) se deduce que durante el último máximo glacial (LGM) las poblaciones de *T. hypophylla* se encontraban constantes. Pero hace 30,000 años el tamaño poblacional decreció ligeramente, esta fluctuación es evidente alrededor de los 12 a 5 mil años en donde las poblaciones decrecen de manera abrupta. Esto puede deberse al aumento de la temperatura, ya que recordemos que esta especie aunque su distribución se asume como cosmopolita se encuentra mayormente asociada a climas fríos y de alta montaña de acuerdo a datos de referencia y de distribución potencial (Magaña-Marcial *et al.* datos inéditos no publicados). Sin embargo, el EBSP muestra un aumento en el tamaño efectivo poblacional hace aproximadamente 4 a 3 mil años (Figura 3).

Preguntarse si las briofitas serán capaces de sobrevivir a las fluctuaciones en el clima ha sido una de las mayores preocupaciones en briología. Los estudios para conocer los efectos del aumento de la temperatura se han basado principalmente en plantas vasculares (Corlett & Westcott., 2013; Parmesan & Hanley., 2015; Amedie, 2013). Sin embargo, He *et al.*, (2016) realizó una revisión de las implicaciones que podría tener el aumento de la temperatura sobre las poblaciones de briofitas encontrando que para Marchantiophyta el rango de temperatura óptima para fotosintetizar es de -20 a 27°C dependiendo de la especie. Particularmente, para hepáticas talosas complejas, como lo es *T. hypophylla*, la temperatura optima es de 20°C; mientras que para Bryophyta las temperaturas oscilan entre -22 a 27°C. Sin embargo diferentes estudios demuestran que las briofitas son capaces de

sobrevivir periodos de desecación, aumento de temperatura y luz (Bates *et al.* 2005; Desámore *et al.* 2012). De acuerdo a la NASA la temperatura global ha aumentado 0.9° C en los últimos 135 años, se predice que la temperatura puede aumentar de 1.5° a 2.5°C (Hansel *et al.* 2006; Yuan *et al.* 2004) durante el periodo interglacial. Las briofitas en general pueden sobrevivir aumentos de temperatura en un rango de 2 a 3°C (Dirckson, 1964; Antropova, 1974), por lo cual el aumento de la temperatura no debería ser un factor de riesgo para las briofitas. Estos datos climáticos ayudan a explicar las variaciones encontradas en la demografía poblacional de *T. hypophylla*.

Diferencias genéticas a micro escala

La estructuración genética de las poblaciones de *Targionia hypophylla* a escala geográfica amplia es inexistente sin embargo a micro escala se encontraron poblaciones con diferencias genéticas mínimas en la región holártica, dos ejemplares (Portugal, África) se encuentran separados por hasta 10 pasos mutacionales para los tres genes. En la filogenia preliminar en donde se utilizaron secuencias de otros Marchantiales (Magaña-Marcial *et al.* datos inéditos no mostrados) ambos ejemplares (Portugal y África) se encontraron en un clado separado del resto de las muestras de *T. hypophylla* mezclándose con ejemplares del género *Mannia* sugiriendo un posible evento de introgresión.

La hibridación en briofitas ha sido documentada en diversas ocasiones tanto para musgos (Wyatt *et al.* 1992; Jankowiak *et al.* 2005; Karlin *et al.* 2009) como para hepáticas (Odrzykoski *et al.* 1996; Vilnet *et al.* 2012), en algunos casos la hibridación entre especies puede conllevar a la aparición de una nueva especie para la ciencia (Barbulescu *et al.* 2017). En el caso de las muestras de *T. hypophylla*, que se encuentran compartiendo genes

con el género *Mannia* sería importante realizar un estudio sobre hibridación para ver si existe alguna introgresión de estos géneros así como un estudio ecológico más fino para delimitar si existen poblaciones de estos géneros que se encuentren viviendo en simpatría.

Biogeografía

Dispersión

Se han analizado diferentes patrones y/o regionalizaciones para comprender la distribución de las briofitas en el mundo. Tan & Pócs (2000), propusieron cinco patrones tomando en cuenta las zonas climáticas predominantes en el planeta con subdivisiones sucesivas, mientras que Scholfield (1992) consideró cinco reinos brioflorísticos basándose en la distribución de las plantas vasculares. Sin embargo ninguna de estas dos propuestas sobre patrones de distribución nos explican las distribuciones disyuntas en briofitas, por lo que se ha asumido que estas distribuciones son históricas o asociadas a eventos de dispersión (esporas, fragmentación, rutas migratorias de aves) y/o introducción accidental (Tan & Pócs, 2000; Vanderpoorten & Goffinet, 2009).

Los resultados de los análisis de varianza molecular (AMOVA) para observar la concordancia entre la red de haplotipos y la distribución geográfica segregada por reinos brioflorísticos revelan conectividad genética a lo largo del rango de distribución de *T. hypophylla*. La baja diferenciación genética entre briofitas con distribuciones extensas ha sido reportada en diversas ocasiones. Por ejemplo, para el musgo, *Bryum argenteum*, especie cosmopolita, se ha estudiado su origen y variación, demostrando que aunque tiene su origen en las islas de Tenerife, no exhibe una estructuración genética definida con respecto a su amplio rango de distribución (Pisa *et al.* 2015). Otros estudios como los

realizados para especies de hepáticas de distribución disyunta de los géneros *Metzgeria* y *Apometzgeria*, así como para la especie de musgo *Calypstrochaeta asplenoides*, demuestran que la distancia geográfica no es una barrera eficaz para impedir el flujo genético entre estas (Fuselier *et al.* 2009, 2011; Pokorny *et al.* 2011). Lo anterior, puede ser atribuido a las diferentes formas de dispersión que presentan como son: dispersión por agua, por aire e inclusive por actividad antropogénica, lo que conlleva a la dispersión a largas y cortas distancias (Vanderpoorten & Goffinet, 2009; Bequaert, 1921).

De acuerdo con diferentes estudios, es común que las especies cosmopolitas exhiban baja diferenciación poblacional entre masas continentales (McDaniel & Shaw, 2003, 2005) y que estas especies se encuentran relacionadas frecuentemente con ambientes modificados o fragmentados por actividad antropogénica, señalando la importancia de las migraciones transcontinentales en el grupo. (Pisa *et al.* 2015; Schuster, 1983). Aquellas especies que han exhibido diferenciación genética entre masas continentales se ha atribuido a la retención de polimorfismos históricos (Szövényi *et al.* 2008).

La capacidad de viabilidad de las esporas varía dependiendo de la especie de briofita, se han documentado esporas que sobreviven un par de horas (Wiklund & Rydin, 2004; Vanderpoorten & Goffinet, 2009) hasta aquellas que sobreviven años. Tomando en cuenta la caracterización de las esporas de *T. hypophylla* (J. Shevock, comunicación personal, Mayo 5, 2017; Deutsch, 1912) se esperaría una tasa de viabilidad alta, debido a que posee ornamentación y una coraza para protegerse de la desecación. Por lo tanto, pensar que la falta de estructuración filogeográfica de las poblaciones de *T. hypophylla*, puede estar siendo sostenida por la capacidad de las esporas de viajar largas distancias y, además

mantenerse viables por largos periodos de tiempo hasta encontrar las condiciones propicias para su desarrollo es factible.

Aunado a lo anterior, se debe de reconocer las características morfológicas y fisiológicas de *T. hypophylla* para protegerse de los cambios en el ambiente, como enrollar su talo de manera ventral para protegerse de la desecación en diferentes ambientes, porque a pesar de su asociación a climas fríos y de alta montaña, *T. hypophylla* ha sido registrada en climas xerófilos como en el desierto de Mojave, de acuerdo a una simulación sobre la distribución potencial de la especie (Magaña-Marcial *et al.* datos inéditos no publicados) se observa que *T. hypophylla* tiene una afinidad por ambientes que rondan una humedad de 400 a 700mm anual y por una temperatura templada que oscile entre 15° y 25° C. Lo anterior coincide con algunas colectas realizadas para este estudio en áreas para las cuales no se tenía registro para esta especie en México.

Conclusiones

- 1) La baja estructuración poblacional para *Targionia hypophylla*, indica una capacidad histórica de flujo génico que permitió la colonización de lugares con condiciones ambientales contrastantes de acuerdo a los datos de colecta de los ejemplares y registros de herbario.
- 2) *Targionia hypophylla* se está recuperando de un evento de disminución en el tamaño efectivo poblacional.

- 3) La homogeneidad genética observada para la especie de estudio, puede ser explicada por la combinación de dos factores: el crecimiento demográfico reciente y una distribución cosmopolita histórica.
- 4) Las regiones brioflorísticas propuestas no son una barrera efectiva para la segregación de esta especie.
- 5) Un análisis más fino con marcadores de alta resolución como los microsatélites ayudarían a clarificar los posibles eventos de hibridación.
- 6) Los datos moleculares sustentan la sinonimia de *Targonia lorbeeriana* con *Targonia hypophylla*.

Agradecimientos

A la Dra. Laura Forrest por el apoyo durante la estancia realizada en el Royal Botanical Garden Edinburgh. De igual manera al Dr. David Neil y Dr. David Long.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para mis estudios de Maestría. Así como al posgrado en Ciencias Biológicas (Ecología y conservación) por el financiamiento parcial para la realización de la estancia de investigación. A la Coordinación de la Investigación Científica (CIC-UMSNH) por financiar el proyecto “Diversidad genética y morfológica de *Targionia hypophylla* (Targioniaceae; Marchantiopsida)” durante el periodo 2015-2017.

Y especialmente gracias a las siguientes personas por permitir el préstamo, donación e intercambio de ejemplares: Dr. Alfons Schäfer-Verwimp, Dr. Bruce Allen (MO), Dr. Claudillo Delgadillo Moya (MEXU), Dr. David Long (RBGE), Dr. Denilson F. Peralta (IBOT), Dr. Louis Thouvenot, Dr. Pócs Tamás, Dr. Ron Porley, Dr. Xiaolan He (H), Dra. Blanka Shaw (DUKE), Dra. Cecília Sérgio (LISU), Dra. Christine Cargill (CANBR), Dra. Isabelle Charissou, Dra. Saara Velmala (H), Phd. Terry McIntosh.

LITERATURA CITADA

- Antropova, T.A., 1974. Temperature adaptation studies on the cells of some bryophyte species. *Citologiy* 16, 38–42.
- Bandelt, H., Forster, P. & Röhl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37–48.
- Bapna, K.R., Singh, R.P. & Chaudhary, B.L. (1984) Induction of Sex Organs in *Targionia hypophylla* L. *The Bryologist*, 87, 340-342.
- Barbulescu, V.I.E., Patzak, D.F.S., Feldberg, K., Schäfer-Verwimp A., Rycroft, D.S., Renner, A.M. & Heinrichs, J. (2017) Allopolyploid origin of the leafy liverwort *Plagiochila britannica* (Plagiochilaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 183, 250-259.
- Bates, J.W., Thompson, K. & Grime, P. (2005). Effects of simulated long-term climatic change on the bryophytes of a limestone grassland community. *Global Change Biology*, 11, 757-769.
- Bequaert, J. (1921) On the dispersal by flies of the spores of certain mosses of the family Splachnaceae. *The Bryologist*, 24, 1-4.
- Bischler-causse, H., Gradstein, S.R., Jovet-Ast, S., Long, D.G. & Salazar-Allén, N. (2005) Marchantiidae. *Flora Neotropica*, 97, 1-262.
- Boisselier-Dubayle, M.C. & Bischeler, H. (1997) Enzyme polymorphism in *Preissia quadrata* (Hepaticae, Marchantiaceae). *P1. Syst. Evol*, 205, 73-84.
- Boisselier-Dubayle, M.C. & Bischeler, H. (1999) Genetic Relationship between Haploid and Triploid *Targionia* (Targioniaceae, Hepaticae). *International Journal of Plant Sciences*, 160, 1163-1169.
- Buczowska, K., Sawicki, J., Szczecińska, M., Klama, H., Milewicz, M. & Czkiewicz, A. B. (2010) Genetic variation in the liverwort *Bazzania trilobata* inferred from ISSR markers. *Journal of Bryology*, 32.
- Chiang T.Y. & Schaal, B.A. (1999) Phylogeography of North American populations of the moss species *Hylocomium splendens* based on the nucleotide sequence of internal transcribed spacer 2 of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Ecology* 8, 1037–1042

- Consortium of North American Bryophyta Herbaria (CNALH). (2017). <http://bryophyteportal.org/portal/index.php>. Accessed on July 28.
- Corlett, T.R. & Westcott, D.A. (2013) Will plant movements keep up with climate change?. *Trends in Ecology & Evolution*, 28.
- Cronberg, N. (2000) Genetic diversity of the epiphytic bryophyte *Leucodon sciuroides* in formerly glaciated versus nonglaciated parts of Europe. *Heredity*, 84, 710-720.
- Darriba, D, Taboada, G.L, Doallo R. & Posada, D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods*: 9(8):772. Doi: 10.1038/nmeth.2109.
- Désamore, A., Laenen, B., Stech, M., Papp. B., Hedenäs, L., Mateo, R.G. & Vanderpoorten, A. (2012). How do temperate bryophytes face the challenge of a changing environment? Lessons from the past and predictions for the future. *Global Change Biology*.
- Deutsch, H. 1912. A study of *Targionia hypophylla*. *Botanical Gazette*, 53, 492-503.
- Dirckson, A., (1964) Vergleichende Untersuchungen zur Frost-, Hitz- und Austrocknungsresistenz einheimischer Laub- und Lebermoose unter besonderer Berücksichtigung jahreszeitlicher Veränderungen. Diss. Goettingen.
- Drummond A.J, Suchard M.A, Xie, D. & Rambaut, A. (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST v.2.1.3. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1969-1973.
- Excoffier, L. & Lischer, H.E.L. (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.
- Fantahun, A.A. 2013. Impacts of Climate Change on Plant Growth, Ecosystem Services, Biodiversity, and Potential Adaptation Measure. Master Thesis. Department of Biological and Environmental Sciences University of Gothenburg.
- Fuselier, L., Davison G.P., Clements, M., Shaw, B., Devos, N., Heinrichs, J., Hentschel, M.S., Szövényi P., Schuette, J., Wolfgang, H. & Shaw, J. (2009) Phylogeography analyses reveal distinct lineages of the liverworts *Metzgeria furcata* (L.) Dumort. and *Metzgeria conjugata* Lindb. (Metzgeriaceae) in Europe and North America. *Biological Journal of the Linnean Society*, 98, 745-756.

- Fuselier, C., Shaw, B., Engel, J.J., Von Konrat, M., Costa, P.D., Devos, N. & Shaw, A.J. (2011) The status and phylogeography of the liverwort genus *Apometzgeria* Kuwah. (Metzgeriaceae). *The Bryologist*, 114, 92-101.
- Grivet, D., Sebastian, F., González-Martínez, S. & Vendramin G.G. (2009) Patterns of polymorphism resulting from long-range colonization in the Mediterranean conifer Aleppo pine. *New Phytologist*, 184, 1016–1028.
- Grundmann, M., Ansell, S.W., Russell, S.J., Koch, M.A & Vogel, J. (2008) Hotspots of diversity in a clonal world – the Mediterranean moss *Pleurochaete squarrosa* in Central Europe. *Molecular Ecology*, 17, 825-838.
- Hansen, J., Sato, M., Ruedy, R., Lo, K., Lea, L.W & Medina-Elizade, M. (2006). Global temperature change. *PNAS*, 103, 14288-14293.
- He, X., He, K.S. & Hyvönen, J. (2016) Will bryophytes survive in a warming world?. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 19, 49–60.
- Jankowiak K, Rybarczyk A, Wyatt R, Odrzykoski I, Pacak A, & Szweykowska-Kulinska, Z. (2005) Organellar inheritance in the allopolyploid moss *Rhizomnium pseudopunctatum*. *Taxon*, 54, 383–388.
- Karlin, E.F., Boles, S.B., Ricca, M., Temsch, E.M, Greilhuber, J, & Shaw, A.J. (2009) Three-genome mosses: complex double allopolyploid origins for triploid gametophytes in *Sphagnum*. *Molecular Ecology*, 18, 1439–1454.
- Laenen B., Désamuré, A., Devos, N., Shaw, A.J., González-Mancebo, J.M., Carine, M.A & Vanderporten, A. (2011) Macaronesia: a source of hidden genetic diversity for post-glacial recolonization of western Europe in the leafy liverwort *Radula lindenbergiana*. *Journal of Biogeography*, 38, 631–639
- McDaniel, S.F. & Shaw, A.J. (2003) Phylogeographic structure and cryptic speciation in the trans-Antarctic moss *Pyrrhobryum mnioides*. *Evolution*, 57, 205-15.
- McDaniel, S.F., & Shaw, A. J. (2005) Selective sweeps and intercontinental migration in the cosmopolitan moss *Ceratodon purpureus* (Hedw.) Brid. *Mol. Ecol*, 14, 1121–1132.
- NASA (2018), último acceso el 20 de agosto de 2018 en: <https://www.nasa.gov/>
- Odrzykoski, I.J., Chudzinska, E. & Szweykowski, J. (1996) The hybrid origin of the polyploid liverwort *Pellia borealis*. *Genetica*, 98, 75–86.

- Parmeasan, C & Hanley, M. E. (2015) Plants and climate change: complexities and surprises. *Annals of Botany*, 116, 849–864.
- Patiño, J., Carine, M., Mardulyn, P., Devos, N., Mateo, R.G. González-Mancebo J.M., Shaw, A.J. & Vanderpoorten, A. (2015) Approximate Bayesian Computation Reveals the Crucial Role of Oceanic Islands for the Assembly of Continental Biodiversity. *Syst. Biol.* 0(0):1–11.
- Perold, S.M. (1993) Studies in the Marchantiales (Hepaticae) from southern Africa. 3. The genus *Targionia* and *T. hypophylla* with notes on *T. lorbeeriana* and *Cyathodium foetidissimum* (Targioniaceae). *Bothalia*, 23, 215–221.
- Pfeiffer, T., Schaumann, F., Hässel De Menéndez, G.G. & Frey, W. (2004) Inter- and infraspecific relationships in the Gondwanan liverwort genus *Hymenophyton* (Hymenophytaceae, Hepaticophytina). *Studies in austral temperate rain forest bryophytes* 23. *Australian Systematic Botany*, 17, 407–421.
- Pisa, S., Vanderpoorten, A., Patiño, J., Werner, O., Gonzalez-Mancebo, J.M. & Ros, R.M.. (2015) How to define nativeness in vagile organisms: lessons from the cosmopolitan moss *Bryum argenteum* on the island of Tenerife (Canary Islands). *Plant Biology*, 17, 1057–1065.
- Nei, M. (1987) *Molecular evolutionary genetics*. New York, USA: Columbia University Press.
- Pokorny, L., Oliván, G. & Shaw, A.J. (2011) Phylogeographic Patterns in Two Southern Hemisphere Species of *Calyptrochaeta* (Daltoniaceae, Bryophyta). *Systematic Botany*, 36, 542–553.
- Posada, D. & Crandall, K.A. (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817–818
- Reyma, K., Manoj, G.S. & Murugan, J.K. (2012) In vitro microbicidal potentiality of *Targionia hypophylla* l. and bryum species- bryophytes. *Int J Pharm Pharm Sci*, 2, 410–413.
- Rozas, J., Sánchez-Del Barrio, J.C., Messeguer, X. & R. Rozas. (2003) DnaSP, DNA polymorphism analysis by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 19, 2496–4496.
- Scott, G.A.M. & Price, D.C. (1988) *Targionia* in Australasia. *Beiheft zur Nova Hedwigia Stuttgart*, 90, 159–162.

- Schofield, W.B. (1992) Bryophyte distribution patterns. In Introduction to bryophytes, eds. A. Vanderpoorten & B. Goffinet. 2009. Cambridge University Press
- Shaw, A.J. & Goffinet, B. (2000) Bryophyte Biology. Cambridge University Press.
- Stech, M & Quandt, D. (2010) 20,000 species and five key markers: The status of molecular bryophyte phylogenetics. *Phytotaxa*, 9, 196–228.
- Szövényi, P., Terracciano, S., Ricca, M., Giordano, S., Shaw, A.J. (2008) Recent divergence, intercontinental dispersal and shared polymorphism are shaping the genetic structure of amphi-Atlantic peatmoss populations. *Mol Ecol*, 17, 5364–5377.
- Tan, C.B. & Pócs, T. (2000) Bryogeography and conservation of bryophytes. En: A.J. Shaw & Goffinet, B (eds.), *Bryophyte Biology*. Cambridge University Press.
- Tajima, F. (1983) Evolutionary Relationship of DNA-Sequences in Finite Populations. *Genetics*, 105, 437-460.
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 28 Jul 2017 <http://www.tropicos.org>
- Vanderpoorten, A. & Goffinet, B. (2009) Introduction to Bryophytes. Cambridge University Press.
- Van del Velde, M. & Bijlsma, R. (2003) Phylogeography of five *Polytrichum* species within Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* 78, 203-213.
- Wiklund, K. & Rydin, H. (2004) Ecophysiological constraints on spore establishment in bryophytes. *Functional Ecology*, 18, 907–13.
- Wright, S. (1931). Evolution in mendelian populations. *Genetics*, 16, 97-159.
- Wyatt R., Odrzykoski I.J. & Stoneburner A. (1992) Isozyme evidence of reticulate evolution in mosses: *Plagiomnium medium* is an allopolyploid of *P. ellipticum* × *P. insigne*. *Systematic Botany*, 17, 532–550.
- Vilnet, A., Konstantinova, N., Troitsky, A. (2012) Molecular phylogenetic data on reticulate evolution in the genus *Barbilophozia* Loeske (Anastrophyllaceae, Marchantiophyta) and evidence of non-concerted evolution of rDNA in *Barbilophozia rubescens* allopolyploid. *Phytotaxa*. 49, 6–22.

- Yuan, D., Cheng, H., Edwards, R.L., Dykoski, C.A., Kelly, M.J., Zhang, J.Q., Lin, Y., Wang, Y., Wu, J., Dorale, J.A., An, Z. & Cai, Y. (2004). Timing, Duration and Transitions of the Last Interglacial Asian Monsoon. *Science*, 304, 575-578.
- Zamora, P. G., R. M.a Ros. & Guerra, J. (1990) Taxonomía numérica en *Targionia* L. (Hepaticae). *Anales Jardín. Bot. Madrid*. 46, 393-404.

Cuadros y Figuras

Cuadro 1. Localidades de muestreo de los ejemplares de *Targionia hypophylla*, obtenidos para este estudio, así como la información de secuencia por marcador molecular.

Región	Población	Localidad	Número de secuencias por			Coordenadas		
			marcador					
			TrnK-					
Brioflorística			TrnL-F	psbA	rpoC1	Latitud	Longitud	Origen/Vaucher
Holantartica	Australia	Australia	1	1	1	29.15055556	99.939527778	Helsinki_34097_25.07.81
			1	1	1	35.33833333	33.165000000	CANB_572D_3.03.2010
			1	1	1	-32.84527778	137.99583330	CANB_13494A_23.08.2016
			1	1	1	-32.45111111	137.97666670	CANB_13065A_21.08.2016
			1	1	1	-31.31666667	148.91666670	CANB_580B_S/f
Holartica	Asia	Mugla	1	-	1	38.78333333	-121.0166667	DUKE_GH-1068D_16.10.1952
	Canada	Galiano	1	-	1	1.166666667	34.490000000	DUKE_17341_3.06.1962
		Harrison	-	1	1	1.007000000	34.706666667	DUKE_S/Vaucher_26.07.1966
		Shawanigan lake	1	-	1	16.18333333	-96.53333333	DUKE_4473_12.05.1970
		Sur Pender	1	-	1	18.36516667	73.760527778	DUKE_17169_2.06.1962
	Chipre	Cyprus	-	-	1	27.21666667	90.583333333	RBGE_S/Vaucher_28.04.1962
		Kyrenia	1	1		35.33833333	33.165000000	Herb. Schäfer-Verwimp_37989_21.01.2017
		Kyrenia	1	1	1	9.083333333	36.550000000	Herb. Schäfer-Verwimp_38043_25.01.2017
	España	Islas Canarias	1	1	1	40.62138889	14.528333333	RBGE_25_19.04.2000
		Prov. Jaen	1	-	1	37.61666667	-121.9	DUKE_8925_15.04.1980
	Estados Unidos	Alameda	-	-	1	19.538	-100.3780167	MEXU_4227_28.03.1993
		El Dorado	-	-	1	19.75581667	-100.2954167	MEXU_4343_2.04.1993
		Idaho	-	-	1	37.9136357	-3.004084	MO_17900_10.08.1941
		Multnomah	1	-	-	37.21807	28.3665	MO_622_23.08.62
		Puerto Rico	-	1	1	1.007	36.50033333	DUKE_1044_9.07.1934
		USA	1	1	-	19.10305556	-97.03666667	Helsinki_2184_5.05.1981
	Francia	Pyrénées Orientales	1	1	1	20.21666667	-98.55	Louis Thouvenot_4330_26.01.2017
		Voutezac	1	-	-	20.21666667	-98.55	I. Charissou / EBUM_19130_11.01.2017
	Italia	Parque Nacional Vesuvic	-	1	-	-8.62778	37.22778	RBGE_35522_27.02.2006
		Puglia Prov. Foggia	1	-	1	19.60638889	-100.2416667	DUKE_703_15.05.1997
		Silicia, Prov. Agrigento	1	-	1	16.18333333	-96.53333333	DUKE_627_11.05.1997
		Sorrento	1	1	1	-8.62778	37.22778	RBGE_35495_26.02.2006
	Japon	Saitama	1	1	1	-13.65333333	-73.38833333	RBGE_24711-b_4.09.1993
	Portugal	Algarve	1	1	1	-35.0075	-57.90972222	RBGE_15861_25.03.1989

	Alré	1	1	1	36.84444444	-117.1569444	RBGE_353_24.03.1989
	Braganca Bacal	1	1	1	-8.62778	37.22779	Herbario LISU_262585_31.01.2001
	Lisbon, Castelo	1	1	1	48.917	-123.417	RBGE_15680_20.03.1989
	Mesquita	-	-	1	-8.62778	37.22781	Herbario LISU_264568_27.03.2000
	Praia de Vittoria	1	1	1	35.33166667	33.1733333	Herb. Schäfer-Verwimp_33323_27.05.2012
	Sierra de Monchique	1	1	1	20.21666667	-98.55	Ron D. Porley_S/Vaucher_6.11-2014
Reino Unido	Exeter. UK.	-	-	1	50.717	-3.533	EBUM_346DGA_13.02.2002
	Exeter. UK.	1	1	1	50.717	-3.533	EBUM_348DGA_13.02.2002
Republica	N Bohemia						
Checa		1	1	1	16.32833333	-96.59527778	DUKE_12983_9.04.1999
Rusia	Khabarovskij	1	1	1	S/D	S/D	MNHN-FR_PC0728524_S/f
Turquía	Prov. Advin	1	-	1	-1.007	36.50033333	DUKE_334a/71_28.03.1971
Neotropical	Brazil						
	Mato Grosso	1	1	-	28.10111111	85.32888889	Inst.Bot.Brasil_1961_2009
	Chile						
	Antoffagasta	1	-	1	48.651179	-123.644996	MO_8598_12.09.1972
	Chacabuco	-	-	1	22.07388889	-159.4986111	MO_22918_2.08.1980
	Cordillera	-	-	1	37.2891	13.5898	MO_20367_22.08.1982
	Cordillera	1	-	1	37.84501	27.83963	MO_22957_17.09.1989
	Mexico						
	Anganguao	1	-	1	19.79766667	-100.1568	MEXU_3142_4.01.1989
	Camino a la mina,Tlalpujagua	1	1	1	21.49773333	-99.94851667	EBUM_MMKY_124_17.04.2016
	Carretera A-60, Villa Victoria	-	1	-	20.62678333	-104.7344833	EBUM_MMKY_104_15.04.2016
		1	1	1	20.62796667	-104.732	EBUM_MMKY_105_15.04.2016
		1	1	1	20.44081667	-104.7644	EBUM_MMKY_107_15.04.2016
	Chincua	1	1	1	17.31355	-96.48346667	EBUM_MMKY_114_16.04.2016
	Chupicuaro	1	1	1	19.67408333	-101.5775167	EBUM_MMKY_39_29.08.2015
		1	1	1	19.67383333	-101.5772833	EBUM_MMKY_42_29.08.2015
	Cuxtepeques	1	-	1	19.7979	-100.1568833	MEXU_67158_9.05.1988
	Desierto de los Leones	-	-	1	19.2612	-99.38883333	MEXU_S/Vaucher_26.11.1944
		-	-	1	19.2612	-99.38883333	MEXU_S/Vaucher_26.11.1944
	El Chico, Hidalgo	1	1	1	20.18206667	-98.71808333	EBUM_MMKY_63_15.11.2015
		1	1	1	20.18206667	-98.71808333	EBUM_MMKY_64_15.11.2015
		1	1	1	20.18211667	-98.71795	EBUM_MMKY_65_15.11.2015
		1	1	1	20.18288333	-98.7168	EBUM_MMKY_71_15.11.2015
		1	1	1	20.18288333	-98.7168	EBUM_MMKY_62B_15.11.2015
		1	-	1	20.1825	-98.717	EBUM_MMKY_70_15.11.2015
		1	1	1	20.18268333	-98.7267666666	EBUM_MMKY_66_15.11.2015
	Ichaqueo	1	1	1	19.67611111	-101.1538889	EBUM_MMKY_19C_22.08.2015
		1	1	1	19.58826667	-101.10765	EBUM_MMKY_21_22.08.2015
		1	1	1	19.5878	-101.1084667	EBUM_MMKY_26A_22.08.2015
		1	1	1	19.58258333	-101.1276683	EBUM_MMKY_59_17.10.2015

	Ixtlán de Juarez	1	1	1	41.85277778	-6.721388889	EBUM_MMKY136_21.08.2016
	Los Azufres	1	1	1	19.796	-100.6888333	EBUM_MMKY 77_16.12.2015
		1	1	1	19.796	-100.6888333	EBUM_MMKY 79_16.12.2015
		1	1	1	19.79633333	-100.68693333	EBUM_MMKY 85_17.12.2015
		1	1	1	19.79615	-100.6866833	EBUM_MMKY 88_17.12.2015
	Oaxaca	-	-	1	20.18288333	-98.7168	MEXU_2437_4.07.1966
	Ocampo,						
	Zitácuaro	1	1	1	17.31355	-96.48346667	EBUM_MMKY 109_15. 04.2016
		-	-	-	17.31355	-96.48346667	EBUM_MMKY 110_15. 04.2016
		1	1	1	17.31355	-96.48346667	EBUM_MMKY 111_15. 04.2016
	Ocuilán	1	1	1	19.33333333	-99.18333334	EGR-Pócs_9546/P_9.08.1995
	Queretaro	1	1	1	40.62916667	14.53972222	RBGE_29750_22.03.2001
	Rio Chiquito	1	1	1	19.5885	-101.1073333	EBUM_MMKY 15_16.08.2015
		1	-	1	19.67168333	-101.146816667	EBUM_MMKY 54_30.08.2015
	San Cristobal	-	-	1	19.80201667	-100.1613333	MEXU_HH42_13.05.1973
	San Juan del Rio	1	1	1	-7.092222222	39.72833333	EBUM_MMKY206_5. 11. 2016
	S. Tilapa - La						
	Marquesa	1	1	1	19.75576667	-100.29555	EBUM_MMKY 98_15. 04.2016
		1	1	1	19.79795	-100.1570667	EBUM_MMKY 99_15. 04.2016
		1	1	-	20.62678333	-104.7344833	EBUM_MMKY 100_15. 04.2016
	Sierra Mascota, Jal	1	1	1	21.49773333	-99.94851667	EBUM_MMKY 127_23.04.2016
	Uruapan	1	1	1	42.5	2.75	EBUM_MMKY226_11.02.2017
		1	1	1	42.5	2.76	EBUM_MMKY227_11.02.2017
	Villa Madero	1	-	1	19.29778333	-101.346816666	EBUM_MMKY 92_29.12.2015
		1	1	1	19.29778333	-101.346816667	EBUM_MMKY 93_29.12.2015
	Zirahuén	1	1	1	19.42128333	-101.7617	EBUM_Promep 15_21.03.2011
		1	1	1	19.42747222	-101.759777777	EBUM_Promep 37_14.07.2011
		1	-	1	19.42756667	-101.7574	EBUM_MMKY 27_28.08.2015
		1	-	1	19.42406667	-101.75873333	EBUM_MMKY 38_28.08.2015
Perú	Andahuylas	-	-	1	45.58931	-122.07641	MO_5764_9.05.1973
	Anta, Cuzco	-	-	1	37.851	15.285	MO_5674_8.05.1973
	Cajamarca	-	-	1	37.2891	13.5898	MO_6144_23.05.1973
	Jauju	-	-	1	9.416666667	34.41666667	MO_5393_28.04.1973
	Titicaca	1	1	1	27.61666667	87.36666667	RBGE_12205_21.04.2006
Puerto Rico	Pañuelas	-	-	1	19.36853333	-100.0228167	MEXU_1044_9.07.1939
Uruguay	Uruguay	1	1	1	9.083333333	36.55	CANB_2621_2.10.2010
Paleotropical	Africa						
	Etiopia	-	1	-	21.43	-99.701666667	Helsinki_12461_21.10.1982
	Jerid Sahara	1	1	1	19.58333333	-100.2166667	EGR-Pócs_03038/AW_2.04.2003
	Malawi	1	1	1	27.62833333	99.26083333	RBGE_M49352_30.06.1991
	Marruecos	1	1	1	-1.283333333	36.81666667	MO_11748_3,05,2001
	Uganda	1	-	-	S/D	S/D	RBGE_1175_23.03.1951

Arabia Saudita	Arabia Saudita	1	1	1	27.58333333	89.63333333	RBGE_6098_17.03.1987
Camerún	Mann's Spring	-	1	-	S/D	S/D	RBGE_351_25.03
China	China	1	1	1	37.11352778	102.880781	RBGE_40095_14.09.2010
		1	1	-	37.11352778	102.880781	RBGE_32179_12.10.2003
		1	1	1	40.82861111	14.39722222	RBGE_39996_9.09.2010
		1	1	1	36.9	30.68333333	RBGE_27273_25.07.1997
		1	1	1	-15.93611111	35.50805556	RBGE_32731_28.10.2003
India	Buthan	1	-	-	39.02055556	-122.4755556	RBGE_28696_18.09.1999
	India	1	1	1	24.93416667	98.78444444	RBGE_30950_2.02.2002
Kenia	Nairobi Shergarh	1	1	1	19.06666667	-99.31666667	EGR-Pócs_04052/A_20.04.2004
	Nyandarva	1	-	1	19.3	-99.55	EGR-Pócs_02030/M_17.03.2002
Malawi	Zomba Plateau, Kuchawe	1	-	1	19.08333333	-98.68333333	EGR-Pócs_9170/P_7.04.91
Nepal	Nepal	1	1	-	27.50641	-99.50754	RBGE_21243_15.10.1991
	Nepal	1	1	1	42.4245	-3.161055555	RBGE_30256_21.09.2001
	Rasuwa	-	1	-	-23.64416666	-70.41083333	RBGE_22051_24.04.1992
Nigeria	Nigeria	-	-	1	41.73108333	-8.162277778	RBGE_13487_10.1947
Tanzania	Kibakwe	1	-	1	40.25952	-123.84187	MO_4925_2.06.2005
Tunez	Tanzania	-	-	1	16.7376	-92.6367	EGR-Pócs_6988/B_2-03.1985

Cuadro 2. Índices de diversidad genética para las poblaciones de *T. hypophylla* utilizando datos de cADN.

Población	TrnL-F					TrnK-psbA					rpoC1				
	n	Hn	S	Hd ± SD	π ± SD	n	Hn	S	Hd ± SD	π ± SD	n	Hn	S	Hd ± SD	π ± SD
Holartántica	5	4	1	1.000 ± 0.177	0.06813 ± 0.0078	5	5	45	1.0000 ± 0.126	0.02367 ± 0.0014	5	3	11	0.7000 ± 0.21800	0.01267 ± 0.0345
Holártica	38	18	34	0.797 ± 0.067	0.21446 ± 0.0084	23	12	48	0.8740 ± 0.060	0.0074 ± 0.0124	35	14	32	0.8450 ± 0.04700	0.01487 ± 0.1257
Neotropical	48	12	236	0.890 ± 0.043	0.07933 ± 0.0104	38	8	95	0.3390 ± 0.100	0.0083 ± 0.0084	58	13	13	0.8160 ± 0.00845	0.00845 ± 0.0456
Paleotropical	15	15	151	0.978 ± 0.035	0.18113 ± 0.0100	8	8	66	1.0000 ± 0.063	0.0469 ± 0.0643	15	10	26	0.9700 ± 0.02267	0.02267 ± 0.0067
Todas	105	31	35	0.8495 ± 0.061	0.13956 ± 0.0042	78	24	139	0.7552 ± 0.043	0.0179 ± 0.0012	114	23	36	0.7053 ± 0.13356	0.13956 ± 0.0056

n: tamaño de muestra, **Hn:** número de haplotipos, **S:** número de sitios polimórficos, **Hd:** diversidad haplotípica, **π:** diversidad nucleotídica, **SD:** desviación estándar.

Cuadro 3. Análisis de varianza molecular (AMOVA) utilizando de cDNA por reinos brioflorísticos y población en EHW.

Grupos	Fuente de variación	TrnL-F			TrnK-psbA			rpoC1		
		% de variación	Índice de Fijación	P- valor	% de variación	Índice de Fijación	P- valor	% de variación	Índice de Fijación	P- valor
Reinos Brioflorísticos (Scholfield, 1992) (Cuatro grupos genéticos)	Entre Grupos	-4.24	F _{CT} : -0.04243	0.74389	-1.90	F _{CT} : -0.01897	0.33822	0.11367	F _{CT} : -0.12728	0.31152
	Entre Poblaciones dentro de los grupos	99.33	F _{SC} : 0.08946	0.4230	23.30	F _{SC} : 0.28758	0.3214	24.5680	F _{SC} : 0.10213	0.4206
	Dentro de las poblaciones	0.64504	F _{ST} : 0.05083	0.0904	72.59	F _{ST} : 0.27406	0.2456	75.3263	F _{ST} : 0.03815	0.2114
Población en Equilibrio H-W (Un grupo genético)	Entre poblaciones	2.96	F _{ST} : 0.02957	0.06843	27.93	F _{ST} : 0.27928	0.0000	3.03	F _{ST} : 0.03028	0.1564
	Dentro de las poblaciones	97.04			72.07			96.97		

Cuadro 4. Estimación de la demografía histórica utilizando las D de Tajima y las F de Fu.

Marcador	Reino Brioflorístico / Equilibrio H-W	D de Tajima	P valor	F de Fu	P valor
trnL-F	Holantártica	-0.86871	P>0.10	-0.81473	P>0.10
	Holártica	-2.07501	P<0.05*	-2.12371	P>0.10
	Neotropical	-2.56986	P>0.001*	-4.50820	P<0.02*
	Paleotropical	-1.82898	P<0.05*	-2.01002	P>0.10
	Total	-2.22285	P<0.01*	-2.15205	P>0.10
trnK-psbA	Holantártica	-0.81243	P>0.10	-0.84975	P>0.10
	Holártica	-1.95915	P<0.05*	-2.16300	P>0.10
	Neotropical	-5.79226	P<0.001*	-5.65291	P<0.002*
	Paleotropical	-1.86605	P<0.01*	-2.00275	P<0.02*
	Total	-2.75390	P<0.001*	-5.90293	P<0.002*
rpoC1	Holantártica	-0.92693	P>0.10	-0.92693	P>0.10
	Holártica	-1.62888	P>0.10	-0.46269	P>0.10
	Neotropical	-0.96558	P>0.10	-1.48133	P>0.10
	Paleotropical	-0.73181	P>0.10	-0.76087	P>0.10
	Total	-2.20511	P<0.01*	-2.33458	P<0.05*

*p < 0.01, **p < 0.001

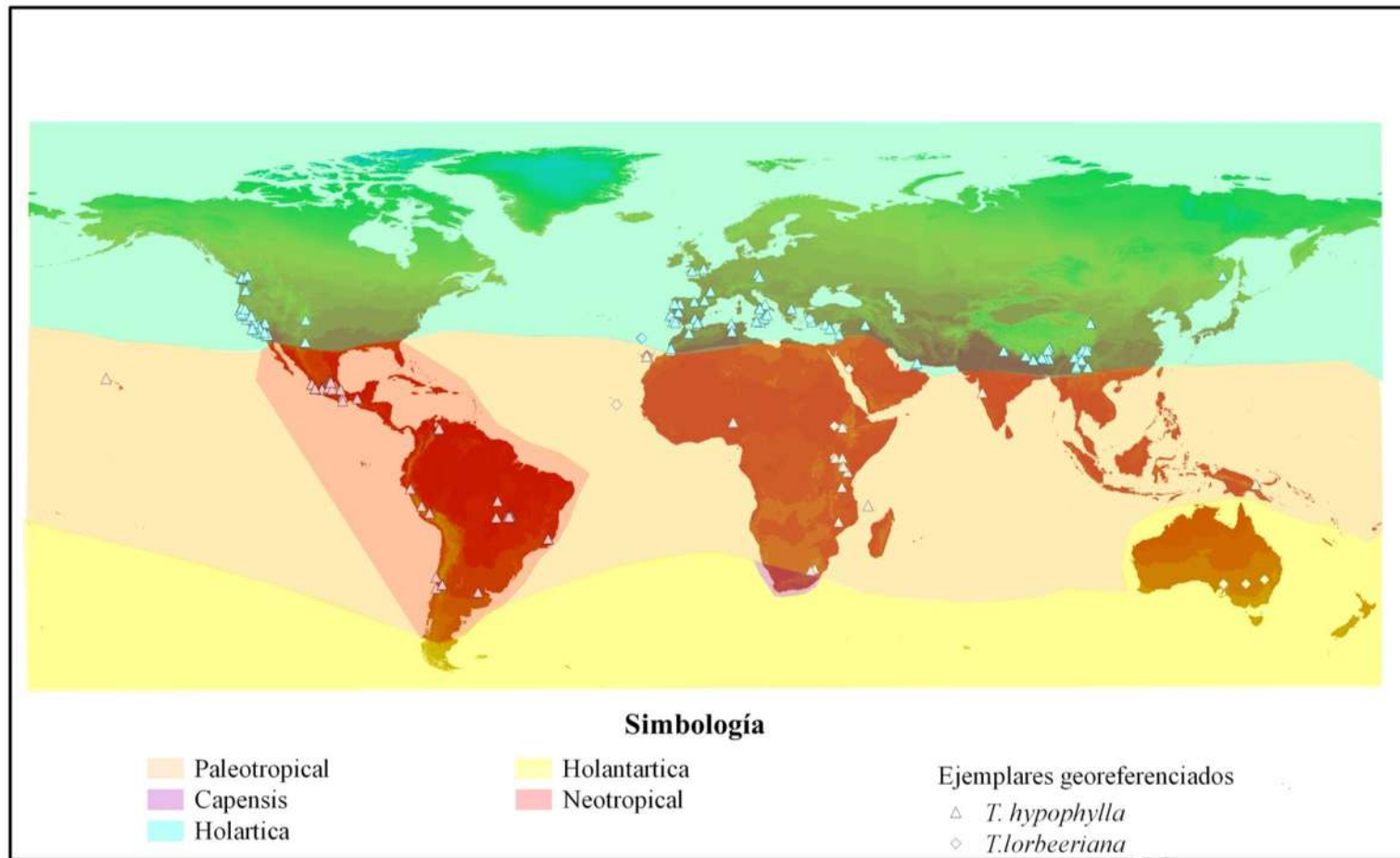


Figura 1. Sitios de muestreo y regiones brioflorísticas para los ejemplares registrados para este estudio.

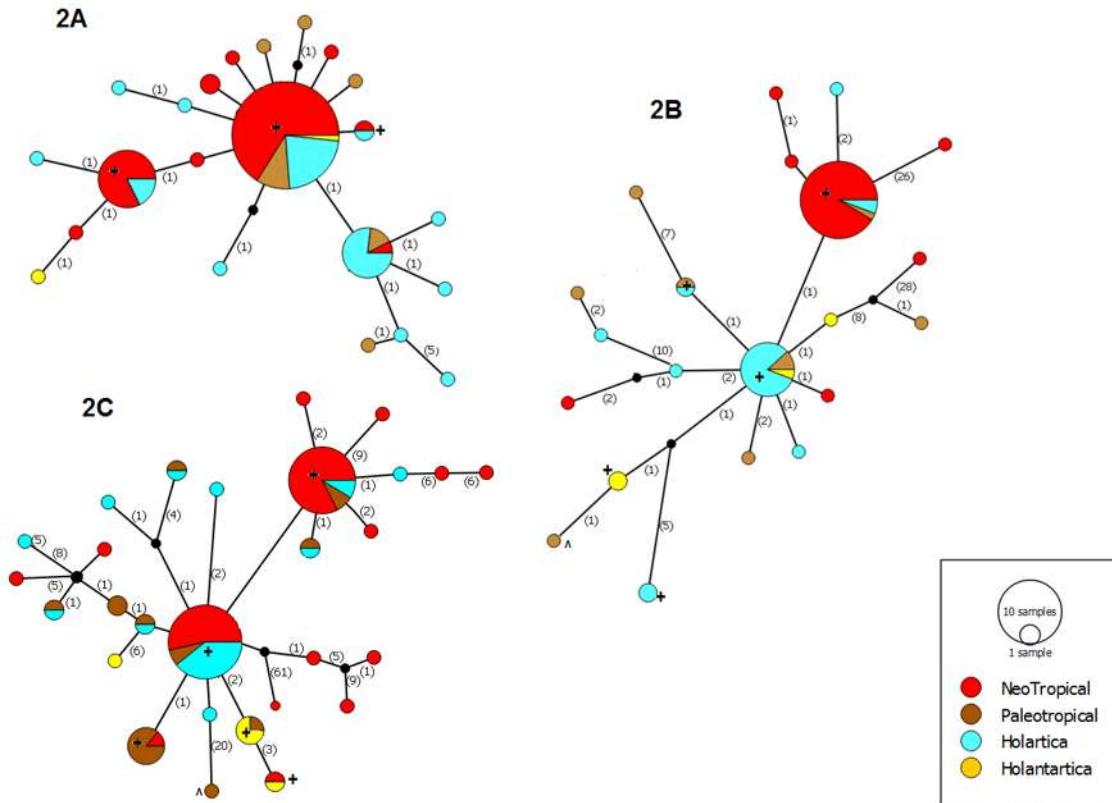


Figura 2. Redes de haplotipos para los marcadores de cADN (A) *rpoC1*, (B) *trnK-psbA*, (C) *trnL-F*. Los colores representan los reinos brioflorísticos (Schofield, 1992). Entre paréntesis () se encuentra el número de pasos mutacionales entre haplotipos. Haplotipos compartidos por *T. hypophylla* y *T. lorbeeriana* (+), Haplotipos privados de *T. elongata* (^).

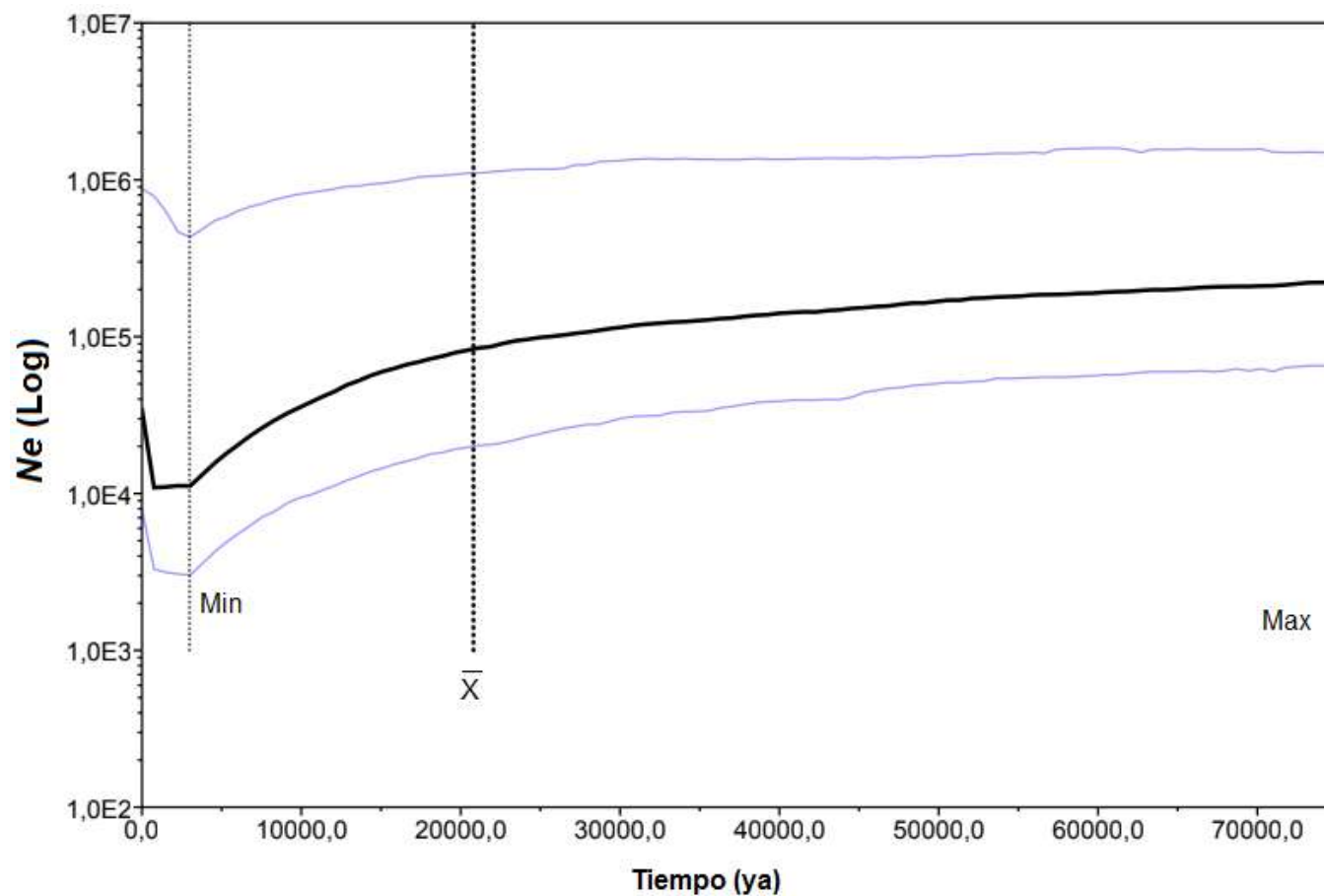


Figura 3. Historia demográfica de las poblaciones de *Targionia hypophylla* usando Extended Bayesian Skyline Plots (EBSP) para las secuencias concatenadas (rpoC1, trnK-psbA, trnL-F). Las líneas punteadas representan la ubicación del límite de confianza superior (Máx), la media ($\bar{X}$) y el límite inferior (Mín) del HPD = 95%.

Información complementaria

S1. Condiciones generales de PCR para los marcadores moleculares utilizados.

Condiciones específicas para la amplificación de productos de PCR.

rpoC1 369pb		
	Herbario 25 µl	Frescas 25 µl
Temperatura (°C)	53.1	57
MgCl ₂	4mMMgCl ₂	1.5mMMgCl ₂
Primers	0.2um	0.2um
DNA	1.5	1

trnL-F trnK-psbA		
	Herbario 25 µl	Frescas 25 µl
Temperatura	55	55
MgCl ₂	4mMMgCl ₂	4mMMgCl ₂
Primers	0.2um	0.3um
DNA	1.5	1

Para la amplificación de los genes se realizaron diluciones de cada muestra de 1/5, 1/10, 1/50 y 1/100 o algunas muestras sin diluir. Dependiendo de la concentración de ADN/µl se utilizaba la dilución correspondiente, de acuerdo a la siguiente tabla:

Cantidad de ng/ µl	Dilución
1-20	Sin diluir
20-30	1/5
30-49	1/10
50-80	1/50
Más de 80	1/100