

Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación

O. Domínguez–Domínguez & E. Vázquez–Domínguez

Domínguez–Domínguez, O. & Vázquez–Domínguez, E., 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32.1: 59–70.

Abstract

Phylogeography: applications in taxonomy and conservation.— Phylogeography is defined as the discipline that studies the principles and processes that determine the geographical distribution of genealogical lineages. Two of the study areas where phylogeographic approaches are used more and more frequently are taxonomy and conservation. In this review we first present a general description of phylogeography and then discuss how research in taxonomy and conservation has been addressed when using phylogeographic approaches, emphasising in particular the limitations that need to be considered. We include relevant examples of studies with animals in order to help readers acquire the sense and scope of such applications and select the appropriate study design to meet these objectives.

Key words: DNA, Biogeography, Genetic structure, Genealogy.

Resumen

Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación.— La filogeografía se define como la disciplina que estudia los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes genealógicos. Dos de las áreas de estudio donde se utilizan aproximaciones filogeográficas cada vez con mayor frecuencia son la taxonomía y la conservación. En esta revisión presentamos primero un resumen general sobre filogeografía y posteriormente discutimos cómo se han llevado al cabo estudios de taxonomía y conservación empleando aproximaciones filogeográficas, enfatizando sobre todo las limitaciones que deben considerarse. Incluimos ejemplos relevantes de estudios con animales que permitirán a los lectores conocer el sentido y alcance de dichas aplicaciones y diseñar adecuadamente estudios con estos objetivos.

Palabras clave: ADN, Biogeografía, Estructura genética, Genealogía.

(Received: 6 X 08; Conditional acceptance: 17 II 09; Final acceptance: 31 III 09)

Omar Domínguez–Domínguez, Lab. de Biología Acuática, Fac. de Biología, Edificio "R" planta baja, Ciudad Universitaria, Univ. Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.— Ella Vázquez–Domínguez, Depto. de Ecología de la Biodiversidad, Inst. de Ecología, Univ. Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70–275, Ciudad Universitaria, México DF, 04510, México.

Corresponding author: Ella Vázquez–Domínguez. E–mail: evazquez@ecologia.unam.mx

La filogeografía

La filogeografía parte de la idea de que la gran mayoría de las especies en la naturaleza exhiben cierto grado de estructura genética asociada con la geografía. Esta estructura puede ser muy compleja, como en especies que habitan áreas de fuerte actividad tecto–volcánica o paleoclimática, o de menor complejidad, como el caso de poblaciones con tasas altas de migración o cuyo aislamiento, hablando en tiempos geológicos, es relativamente reciente (e.g. última glaciación). De esta forma, es posible detectar la estructura filogeográfica entre poblaciones cuando la dimensión genealógica es analizada a la par de los eventos geológicos y geográficos. Es decir, la estructura filogeográfica refleja la interacción entre los procesos demográficos y genealógicos y la dinámica de los procesos de la tierra (geológicos o climáticos). Así, la filogeografía se define como la disciplina que estudia los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes genealógicos (Avise et al., 1987; Avise, 2000). Este análisis conjunto de aspectos filogenéticos, de genética de poblaciones y de biogeografía en poblaciones naturales, ha tenido repercusiones importantes en las áreas de biología evolutiva, ecología y conservación.

Dado que la filogeografía implica el estudio de los aspectos históricos de la actual distribución de los linajes genealógicos, es considerada como una subdisciplina de la biogeografía histórica, la cual integra conceptos y técnicas de biología molecular, genética de poblaciones, demografía, sistemática filogenética, etología y paleontología (Avise, 2000); o bien es mencionada como parte de la biología evolutiva, siendo un puente entre la microevolución (relaciones tocogenéticas) y la macroevolución (relaciones jerárquicas). Asimismo, dado que en filogeografía se analizan genealogías genéticas para determinar el impacto de los eventos históricos en la composición y estructura genética de poblaciones actuales, ha logrado revolucionar la interpretación conjunta de patrones y procesos de la ecología, la biogeografía y la genética de poblaciones. A pesar de que la filogeografía se ha utilizado comúnmente como una herramienta para esclarecer patrones históricos y evolutivos entre poblaciones de una misma especie, las aproximaciones filogeográficas también pueden ser útiles para inferir procesos demográficos históricos como flujo génico, tamaño efectivo poblacional, secuencias de colonización, cuellos de botella y también para determinar fronteras entre especies e identificar unidades de conservación (Avise et al., 1987; Avise, 2000, 2008; Freeland, 2005; Vázquez–Domínguez, 2002, 2007).

De esta forma, el estudio de la distribución geográfica de linajes genealógicos ha sido ampliamente usado para describir eventos históricos, como fragmentación de hábitats o expansión del rango de distribución de especies y poblaciones, eventos de migración, vicarianza, o extinción de linajes génicos, así como otros procesos que afectan la estructura de las poblaciones o que causan especiación en un contexto espacial y temporal (Hardy et al., 2002). Además, el estudio comparado de los patrones filogeográficos de

varias especies o poblaciones co–distribuidas permite plantear hipótesis sobre posibles eventos comunes, por ejemplo de vicarianza o dispersión, e identificar las causas geológicas, ecológicas o etológicas que pudieron haber influido en ellos (Arbogast & Kenagy, 2001; Zink, 2002; Lanteri & Confalonieri, 2003).

Actualmente los estudios filogeográficos en especies animales se basan principalmente en secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt), dado que presenta una alta tasa de mutación, no recombina y su herencia es casi exclusivamente materna (Lanteri & Confalonieri, 2003). Las variantes (secuencias) de ADNmt, conocidas como haplotipos, registran la historia matrilineal de eventos mutacionales, los cuales pueden conectarse de un modo filogenéticamente inteligible en un filograma o mejor llamado, árbol de genes (Avise, 2000, 2008). En los albores de la filogeografía, dicho filograma se superponía con la distribución geográfica de las poblaciones de estudio, lo que permitía hacer una descripción de la reconstrucción filogeográfica (Avise, 2000). Desde entonces se han desarrollado múltiples formas de análisis gráficos, los cuales incorporan los filogramas, el modelo evolutivo de coalescencia y valores estadísticos de probabilidad (Vázquez–Domínguez et al., en prensa y referencias incluidas). La coalescencia es un proceso estocástico que describe la forma en que los eventos genéticos poblacionales determinan la forma de la genealogía de las secuencias de genes muestreados, y se basa en la hipótesis de que todos los individuos de una población natural coalescen en un ancestro común (fig. 1). En esencia, es un modelo retrospectivo que traza todos los alelos de un gen dentro de una muestra poblacional hacia un ancestro común más reciente (Hudson, 1990, 1998; Nordborg, 2000). La teoría de coalescencia ha tenido la virtud de permitir la unión conceptual y analítica de la genética de poblaciones y la filogenia, haciendo que el foco de estudio de ambas áreas sea precisamente el árbol de genes (Nielsen & Beaumont, 2009).

Sin embargo, el uso exclusivo del ADNmt en algunos casos puede ser arriesgado, ya que implica un único locus, el cual puede estar ligado a selección, puede presentar introgresión o puede que no sea posible identificar su dispersión entre poblaciones como consecuencia de diferencias etológicas o ecológicas entre hembras y machos o entre especies (Avise, 2008; Vázquez–Domínguez et al., 2009); todo ello puede implicar limitaciones en el momento de hacer la reconstrucción de historias poblacionales (Avise, 2000). Por ello, cada vez con más frecuencia se aplica el uso combinado y comparativo de genealogías obtenidas de datos de ADNmt y ADN nuclear (ADNn). El uso de genes nucleares conlleva a su vez problemas, por ejemplo aquellos inherentes a la recombinación, así como el hecho de que cada locus (que en algunas especies suelen ser más de dos), muestre historias evolutivas independientes (Zhang et al., 2005). Para enfrentar este problema existen dos aproximaciones de análisis: 1) hacer reconstrucciones y comparaciones de más de un gen, con lo cual, en caso de existir congruencia en las historias filogeográficas tratadas, se incrementa la probabilidad de que la historia filogeográfica que se

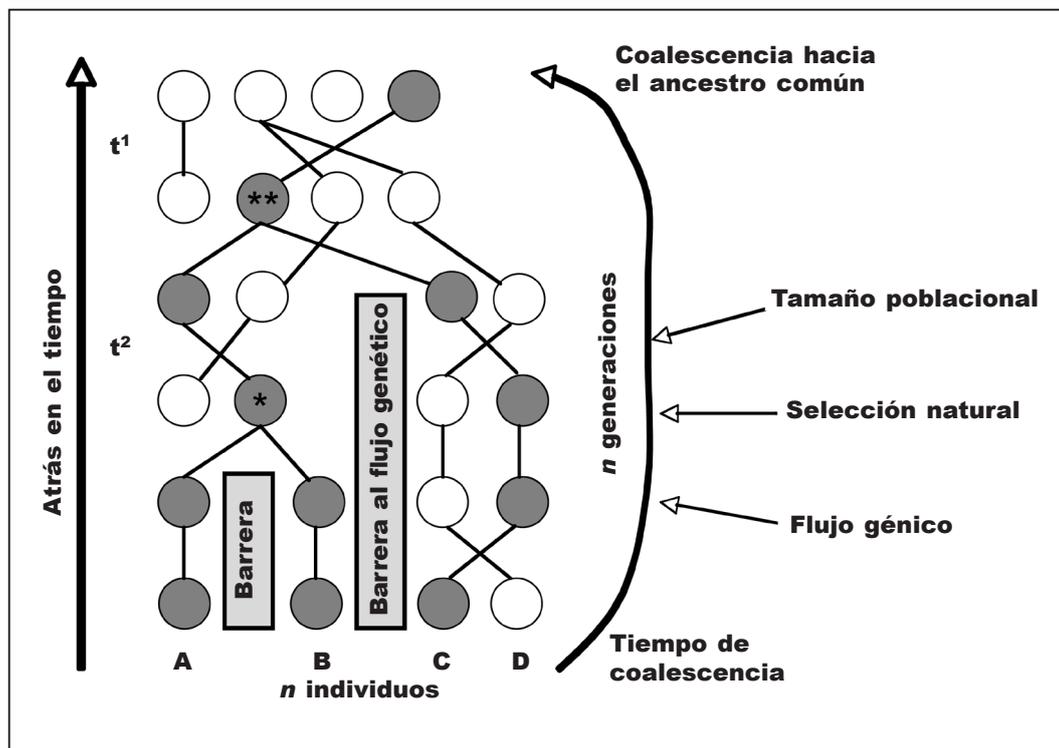


Fig. 1. Relación evolutiva (genealógica) de cuatro haplotipos (individuos) dentro de una población. Los linajes de los haplotipos pueden rastrearse hacia atrás en el tiempo y así identificar eventos coalescentes que sucedieron a diferentes tiempos (t^1 y t^2). Por ejemplo, los haplotipos A y B tienen su ancestro común más reciente (ACMR) dos generaciones atrás (primer evento coalescente; ancestro señalado con un asterisco), mientras que el ACMR de los haplotipos A, B y C (doble asterisco) se da cuatro generaciones atrás (segundo evento coalescente). Barreras físicas o cualquier factor que limita el flujo génico entre individuos o poblaciones, además de características como tamaño poblacional, selección natural y flujo génico, determinan en gran medida los patrones de coalescencia (modificado de Vázquez-Domínguez et al., en prensa).

Fig. 1. Evolutionary relationship (genealogical) of four haplotypes (individuals) within a population. Haplotype lineages can be traced back in time to identify coalescent events that occurred at different times (t^1 and t^2). For example, haplotypes A and B have their most recent common ancestor (MRCA) two generations back (first coalescent event; ancestor indicated with an asterisk), while the MRCA of haplotypes A, B and C (double asterisk) is four generations back (second coalescent event). Physical barriers or any factor that limits gene flow between individuals, together with parameters like population size, natural selection and gene flow, greatly determine the coalescent patterns (modified from Vázquez-Domínguez et al., in press).

obtiene sea de la especie y no del gen (Avise, 2000); y 2) realizar comparaciones filogeográficas entre más de una especie co-distribuida, con lo cual se evalúa si existen patrones filogeográficos concordantes (Avise, 2000, 2008; Arbogast & Kenagy, 2001; Zink, 2002; Vázquez-Domínguez et al., en prensa).

En términos analíticos, la filogeografía se concibe en general en dos áreas que difieren básicamente en la forma de análisis (Hey & Machado, 2003). La primera se basa fundamentalmente en una idea gráfico-descriptiva, donde las ramificaciones de un

árbol se analizan bajo una (o varias) hipótesis de la historia biogeográfica de los organismos, y que se sustenta en métodos de reconstrucción filogenética de árboles de genes; o bien, en la construcción de redes de haplotipos, las cuales se basan en la reconstrucción de árboles multibifurcados arreglados a manera de redes de haplotipos bajo métodos filogenéticos o métodos de coalescencia. En ambos casos las interpretaciones de eventos y procesos asociados a la distribución de los organismos se realiza después de que se tienen los árboles o redes

resultantes (Nielsen & Beaumont, 2009; Templeton, 2009). La segunda área descansa en fundamentos estadísticos y matemáticos de demografía y estructura poblacional, basados en teoría de coalescencia, fenómenos estocásticos y estadística computacional, donde los modelos de análisis incluyen hipótesis que se ponen a prueba, utilizando métodos basados en verosimilitud, particularmente de Inferencia Bayesiana (Knowles & Maddison, 2002; Nielsen & Beaumont, 2009). Ambas aproximaciones se utilizan cada vez con más frecuencia de forma combinada y complementaria, con las ventajas y desventajas propias de cada una; una revisión más detallada de estos métodos va más allá del objetivo del presente trabajo, pero existe amplia información en la literatura (e.g., ver Emerson et al., 2001; Knowles & Maddison, 2002; Hey & Machado, 2003; Avise, 2008; Nielsen & Beaumont, 2009; Templeton, 2009; Vázquez–Domínguez et al., en prensa). Cabe añadir que se ha señalado que una forma adecuada de evaluar historias de divergencia simultánea (filogeografía comparada), es a través del uso de métodos basados en simulaciones, e.g. aproximaciones de verosimilitud o bayesianas ya que, como éstos utilizan estadísticos de resumen, tienen mayor flexibilidad para manejar modelos complejos, por ejemplo como los esperados al analizar conjuntos de datos filogeográficos (para una explicación detallada ver Hickerson et al., 2006).

Hay dos áreas de estudio donde se utilizan aproximaciones filogeográficas cada vez con mayor frecuencia, pero que sin embargo no existe, hasta donde sabemos, una revisión publicada donde específicamente se aborden dichas aplicaciones de la filogeografía: por un lado en la taxonomía, básicamente en el uso de la filogeografía para el reconocimiento y establecimiento de límites entre especies y, por otro lado, su uso específico en biología de la conservación, sobre todo en la definición de unidades de conservación y manejo. Libros como el de Avise (2000) y el de Freeland (2006) incluyen ejemplos de estudios filogeográficos que han permitido sugerir la existencia de especies distintas; asimismo, en Avise (2000; pp. 268–276) se hace mención sobre Unidades Evolutivas Significativas (ver explicación más adelante) y da ejemplos de algunos estudios filogeográficos asociados a dicho concepto de conservación. Indudablemente numerosos estudios filogeográficos han reportado resultados taxonómicos o de conservación, y aquí presentamos una revisión de estas aplicaciones. Los ejemplos que presentamos son exclusivamente de fauna (vertebrados e invertebrados); debemos hacer notar que existen muchos casos donde se ha usado la filogeografía en plantas para resolver preguntas taxonómicas y de conservación, pero dichos ejemplos quedan fuera del alcance de la presente revisión.

La filogeografía en el ámbito de la taxonomía

La filogeografía puede también ser usada como una herramienta de análisis en estudios taxonómicos. En sistemática, los taxa son el punto de partida para la

clasificación biológica y los estudios filogenéticos. Sin embargo, cuando el taxón se convierte en la unidad para el estudio de entidades evolutivas, se complica poder encontrar las fronteras y atributos de la unidad evolutiva, es decir el taxón, más cuando la respuesta puede variar en el organismo o grupo de organismos de que se trate (Hey & Machado, 2003). Los conceptos de especie acuñados en los últimos 40 años son conflictivos y en ocasiones contradictorios, por lo que en realidad aun no existe un concepto único. En este sentido, la filogeografía, combinada con otros métodos usados en la taxonomía tradicional, puede aportar información de las fronteras entre especies o poblaciones.

El concepto filogenético de especie se define como el agrupamiento mínimo de individuos, de poblaciones o grupos de poblaciones que son diagnosticables por un número dado de caracteres compartidos, y dentro de los cuales hay un patrón claro de ancestría–descendencia (Cracraft, 1983; McKittrick & Zink, 1988; Nixon & Wheeler, 1990; Davis & Nixon, 1992); esto es, la unidad taxonómica mínima que puede ser analizada desde un punto de vista filogenético. Este concepto filogenético de especie puede ser analizado con cualquier tipo de caracteres homólogos, y bajo este concepto es donde recae el uso de caracteres moleculares en la delimitación de especies. Así, al delimitar una especie bajo el concepto filogenético es necesario poder identificar las fronteras por arriba de las cuales el arreglo filogenético representa entidades biológicas independientes (relaciones jerárquicas) y, por debajo de ellas, donde la jerarquización es inadecuada (relaciones tocogenéticas o genealógicas) (Goldstein et al., 2000). Actualmente se utilizan con más frecuencia caracteres moleculares como una herramienta importante, aunque no exclusiva, en la delimitación de especies (Avise & Ball, 1990). Sin embargo, este concepto filogenético de especie, utilizando caracteres moleculares, ha sido criticado por la problemática de distinguir la historia de los genes de aquella de las especies (Sites & Crandall, 1997). También por el hecho de que comúnmente en las reconstrucciones filogenéticas se usa un solo locus, lo cual puede arrojar reconstrucciones filogenéticas erróneas como resultado de los polimorfismos dentro de la especie (Templeton, 2001). Por ello, es común que con el uso de diferentes caracteres se obtenga un diagnóstico de unidades evolutivas diferentes dentro de una misma especie (ver Crother, 1990; Smith, 1992; Moore, 1995).

El concepto de especie utilizando caracteres moleculares se define como un grupo de organismos o poblaciones que presentan monofilia recíproca, los cuales son candidatos a ser identificados como unidades evolutivas independientes. Esta definición es prácticamente igual al concepto monofilético de especie acuñado por Donoghue (1985). Sin embargo, la monofilia recíproca, entendida en el contexto de árboles de genes, no es el único concepto implícito. El problema persiste en cuanto a en qué nivel jerárquico es aplicable la monofilia recíproca para la delimitación de especies, o si es una mera representación de unidades dentro de una especie. Así, se

ha señalado que el uso de relaciones filogenéticas intraespecíficas es inapropiado para la delimitación de especies (Goldstein et al., 2000). Es decir, una de sus mayores dificultades es delimitar la frontera entre las relaciones tocogenéticas y jerárquicas, lo cual es un tema debatido en todos los ámbitos donde la filogeografía es aplicable. Sin embargo, existen ejemplos donde han podido detectarse especies diferenciadas o crípticas evaluando relaciones filogenéticas intraespecíficas: Richlen et al. (2008) estudiaron el dinoflagelado *Gambierdiscus toxicus*, responsable del síndrome de la ciguatera; evaluaron filogenéticamente 28 aislados a lo largo de su distribución global (con varias regiones del DNA ribosomal además de caracteres morfológicos; tabla 1). Encontraron cuatro linajes diferentes separados por distancias genéticas considerables, uno de los cuales es morfológicamente diferente y más acorde con la especie *Gambierdiscus belizeanus*; los otros tres linajes son considerados especies crípticas. En otro estudio, métodos taxonómicos tradicionales no habían podido resolver la sistemática del complejo del insecto *B. rhodani* (Ephemeroptera). Utilizando el gen mitocondrial COI, Williams et al. (2006) obtuvieron dos grupos monofiléticos que consisten de un haplogrupo mayor y un segundo clado de seis haplogrupos más pequeños y diferentes entre sí. La divergencia de los haplogrupos es de 0,2–3% (dentro), mientras que entre éstos es de 8–9%, valores que superan por mucho el intervalo reportado para otros insectos, lo que consideraron como evidencia de la existencia de especies crípticas dentro del complejo (tabla 1).

Por otra parte, Templeton (2001) menciona que los árboles de genes tienen el potencial de encontrar los límites entre la evolución intra e interespecífica, con los cuales es entonces posible delimitar especies. Por ello, este autor acuñó el término de especie "cohesiva". Este concepto es descrito como un linaje evolutivo cuyas fronteras pueden ubicarse a partir de las fuerzas genéticas y evolutivas que crean una cohesión reproductiva en la comunidad (Templeton, 1999). Asimismo, Templeton (2001) denomina un linaje evolutivo como una población o grupo de poblaciones reproductivas con suficiente historia de relaciones de ancestría–descendencia, la cual presenta sus propias trayectorias y tendencias evolutivas. Por ello una especie es definida como un linaje o un grupo de linajes evolutivos que pueden presentar intercambio genético y/o cohesión ecológica. Un ejemplo de esto es el estudio con la serpiente *Hypsiglena torquata*, de la cual se reconocen 17 subespecies. Con métodos filogeográficos y ADNmt se evaluaron 178 individuos y se encontraron seis especies: una nueva, dos de las previamente reconocidas como subespecies y las otras tres son linajes polimórficos, ampliamente distribuidos, compuestos por múltiples especies (Mulcahy, 2008; tabla 1). Con base en dichos resultados se señala que deben mantenerse las subespecies encontradas como diferentes, dado que son geográficamente cohesivas, morfológicamente discretas y pueden representar especies incipientes (Mulcahy, 2008).

Templeton (2001, 2008, 2009) propone el uso del Análisis de Clados Anidados (NCA por sus siglas en inglés) como un método de análisis riguroso y con criterios adecuados para evitar confundir árboles de haplotipos con aquellos de poblaciones o especies, ya que con el NCA es posible identificar los efectos del flujo genético recurrente y los eventos históricos que han afectado a toda una población, los cuales pueden tener asociación geográfica en los árboles de genes. La prueba más fehaciente que arroja el NCA para inferir que las muestras en cuestión se derivan de linajes evolutivos independientes es cuando, a través del análisis, se infieren uno o más eventos de fragmentación. Otro atributo que Templeton (2001, 2009) menciona como útil del NCA es que incorpora aspectos de polimorfismo interespecífico, sorteo de linajes y eventos de hibridación, lo que representa una ventaja al momento de delimitar especies. Otro aspecto importante del NCA es que los linajes evolutivos se infieren de patrones filogenéticos que tienen un valor estadístico y no como un patrón absoluto (Templeton, 2001, 2009). El NCA ha sido criticado (Petit, 2008), en particular porque se presume resulta en un alto porcentaje de falsos positivos y de falsos negativos. Templeton (2008) ha demostrado que dichos porcentajes son mucho menores cuando se evalúan casos reales; también ha evaluado el uso del NCA con multilocus y otra propuesta de análisis conocida como método Computacional de Aproximación Bayesiana (ABC por sus siglas en inglés) para probar hipótesis filogeográficas, resaltando la ventaja de usar ambos métodos (Templeton, 2009). La polémica del NCA no se ha resuelto, por lo que se recomienda una revisión detallada de las opiniones a favor y en contra de su uso, para tener bases fundamentadas cuando se decida utilizar este método (ver Knowles, 2008; Petit, 2008; Nielsen & Beaumont, 2009; Templeton, 2004, 2008, 2009 y referencias incluidas).

Una crítica sobre el uso exclusivo de análisis filogeográficos para ubicar las fronteras entre especies está relacionado con uno de los conceptos básicos en la teoría de coalescencia que es la herencia uniparental y la no recombinación del gen utilizado (en caso de estar representado exclusivamente por ADNmt). Por ello, las relaciones de los árboles mitocondriales pueden representar equivocadamente las relaciones entre poblaciones o especies. Se ha sugerido que genes mitocondriales por sí solos no son suficientes para diagnosticar especies, ya que dichos caracteres se fijarán más rápido que los nucleares, por lo que pueden no reflejar la "verdadera" frontera entre especies (Avise & Ball, 1990). Con base en lo anterior, se recomienda también el uso de datos nucleares, los cuales permiten corroborar o rechazar la hipótesis obtenida con genes mitocondriales, o bien, la utilización de otro tipo de caracteres (e.g. morfológicos o etológicos). Farias & Hrbek (2008) realizaron un amplio estudio filogeográfico y de genética de poblaciones del género de peces *Symphysodon* del Amazonas, donde pudieron probar hipótesis sobre la relación entre unidades taxonómicas y los procesos que generaron diversificación dentro del género combinando análisis

Tabla 1. Ejemplos de aplicaciones de la filogeografía en taxonomía y conservación: P. Pregunta; Mm. Marcador molecular; Ma. Método de análisis; Ref. Referencia.

Table 1. Examples of phylogeographic applications in taxonomy and conservation: P. Question; Mm. Molecular marker; Ma. Analysis method; Ref. Reference.

Taxonomía	
<i>Acris</i> spp.	
P	Fronteras entre especies, biogeografía, evolución del comportamiento y conservación de la rana "cricket"
Mm	Fragmento del gen mitocondrial citocromo b, genes nucleares tyrosina, proopiomelanosin y el intón 4 de beta-cristalín
Ma	Árboles filogenéticos y <i>Fst</i>
Ref	Gamble et al., 2008
<i>Symphysodon</i> spp.	
P	Historia evolutiva y diversificación del género de peces disco
Mm	Región control y exón 3 del gen RAG1
Ma	Árboles filogenéticos, análisis de clados anidados (NCA), <i>Fst</i> , parámetros de diversidad genética, análisis de neutralidad, análisis de mismatch y prueba de Mantel
Ref	Farias & Hrbeck, 2008
<i>Hypsiglena torquata</i>	
P	Fronteras geográficas y taxonómicas dentro de la serpiente nocturna americana
Mm	Nad4 y tRNAs
Ma	Árboles filogenéticos, red de haplotipos y taxonomía
Ref	Mulcahy, 2008
<i>Baetis rhodani</i>	
P	Delimitación de especies crípticas de este complejo de insectos
Mm	Citocromo oxidasa subunidad I
Ma	Árboles filogenéticos
Ref	Williams et al., 2006
<i>Gambierdiscus toxicus</i>	
P	Generar una hipótesis robusta de clasificación del dinoflagelado
Mm	Región hipervariable D8–D10 del rDNA LSU y 18 rDNA SSU y morfológicos de la teca
Ma	Árboles filogenéticos, mapeo de caracteres morfológicos en la filogenia
Ref	Richlen et al., 2008

filogenéticos, NCA y demográficos. Identificaron tres grupos monofiléticos, que corresponden a dos grupos morfológicos de *Symphysodon aequifasciatus*, y a uno previamente no reconocido. Los procesos asociados con dicha diferenciación son fragmentación en el pasado entre grupos y flujo genético restringido dentro de los mismos (Farias & Hrbek, 2008; tabla 1). En otro ejemplo donde se utilizaron múltiples genes al evaluar los límites entre espe-

cies de las ranas "cricket" norteamericanas *Acris crepitans* y *A. gryllus* (tabla 1), Gamble et al. (2008) mostraron que la distribución actual de las subespecies de *A. crepitans*, definidas morfológicamente y por vocalizaciones, no coinciden con los linajes evolutivos encontrados en su análisis. Encontraron también grupos filogeográficos distintos dentro de ambas especies, pero además una especie diferente dentro de éstos, *Acris blanchardi*.

Tabla 1. (Cont.)

Conservación

Zapus hudsonius preblei

P	Comprobación de estatus taxonómico a través de análisis filogeográficos del roedor
Mm	ADNmt y microsatélites
Ma	Índices de diversidad genética y molecular, pruebas de agrupamiento, árboles de distancia, <i>Fst</i> , análisis molecular de varianza (AMOVA), árboles filogenéticos, NCA
Ref	King et al., 2006

Geochelone nigra

P	Reconstruir relaciones genealógicas de la tortuga gigante y su historia de colonización en dos islas de las Galápagos
Mm	ADNmt y microsatélites
Ma	Índices de diversidad genética y molecular, estimaciones de divergencia, análisis demográficos, distribución mismach, NCA, pruebas de asignación
Ref	Beheregaray et al., 2003

Elephas maximus

P	Evaluación de las ESU's y niveles taxonómico (subespecie) del elefante asiático
Mm	ADNmt
MA	Índices de diversidad molecular, árboles filogenéticos, AMOVA, estimación de divergencia, análisis de mismatch
Ref	Fleischer et al., 2001

Buteo jamaicensis

P	Determinar si el paisaje a escala regional influye en la diferenciación morfológica y genética en especies altamente vágiles como el halcón cola roja
Mm	Microsatélites y caracteres morfológicos
Ma	Índices de diversidad genética y molecular, pruebas de asignación, árboles de distancia, <i>Fst</i> , modelaje para estimación tiempo divergencia, componentes principales y prueba de Mantel
Ref	Hull et al., 2008

Bradypus torquatus

P	Estado de conservación, influencia de eventos históricos y recientes en la distribución geográfica y ubicación de unidades de conservación y manejo del perezoso del bosque atlántico brasileño
Mm	Región control y citocromo oxidasa subunidad I
Ma	Árboles filogenéticos, índices de diversidad genética y molecular, análisis de varianza molecular, <i>Fst</i> , red de haplotipos, análisis de clados anidados y prueba de Mantel
Ref	Lara-Ruiz et al., 2008

Zoogoneticus quitzeoensis

P	Identificación de unidades de conservación de pez dulceacuícola
Mm	Microsatélites
Ma	Diversidad genética, impacto relativo de la deriva y la mutación paso a paso, cuellos de botella, índice de endogamia
Ref	Domínguez-Domínguez et al., 2007

La filogeografía en el ámbito de la conservación

Lo mismo que en la taxonomía, la filogeografía es una herramienta importante en la biología de la conservación. La idea de proponer políticas de conservación en unidades por debajo del nivel de especie utilizando datos moleculares cobró importancia significativa cuando se acuñó el concepto de Unidades Evolutivas Significativas (ESU's por sus siglas en inglés; Ryder, 1986). A la fecha, el análisis de la diversidad genética por arriba del nivel de especie está más o menos bien definido con base en métodos filogenéticos, sin embargo, el representar adecuadamente la diversidad genética por abajo del nivel de especie es un tema aún en discusión, y es precisamente aquí donde la filogeografía puede ser una herramienta importante.

Esta idea de conservación a nivel infraespecífico pretende identificar de manera precisa unidades de manejo que reflejen la importancia evolutiva de los linajes dentro de las especies, para con ellos crear programas efectivos para la conservación de especies en riesgo (Avice & Hamrick, 1996). Por ello, la información genética heredable ofrece una forma de delinear dichas unidades de conservación, y provee un contexto evolutivo a partir del cual desarrollar estrategias y definir prioridades de conservación (King & Burke, 1999; Pertoldi et al., 2007). En este sentido, desde que se reconoció a la diversidad genética como el nivel basal de la biodiversidad (como fue recomendado en la Convención Sobre la Diversidad Biológica en Brasil, 1992), se ha desarrollado la genética de la conservación de manera exponencial. En la actualidad es común encontrar trabajos que usan caracteres moleculares para priorizar especies o poblaciones para su conservación.

La genética de la conservación, de forma general, trata de hacer inferencias de eventos genéticos que son relevantes para el conocimiento y conservación de la diversidad. Ello parte de la base de un conocimiento amplio de la diversidad biológica (incluyendo el reconocimiento de especies o unidades evolutivas independientes), hasta el conocimiento del tamaño efectivo de las poblaciones (el cual difiere del concepto de un tamaño poblacional censal usado en ecología), la depresión genética por endogamia o por exogamia, cuellos de botella, el efecto de la fragmentación y el flujo genético dentro y entre las poblaciones y la reducción en la adecuación de las especies. En esencia, la genética de la conservación pretende, con base en la información genética y evolutiva que conlleva, no sólo identificar aquellas especies en peligro de extinción, sino los eventos que han podido afectarlas y cómo revertirlos, pero sobre todo intenta aportar las bases para conservar no sólo las especies (con la problemática que implica su "correcta" identificación), sino las unidades evolutivas dentro de ellas, con lo que es posible preservar los procesos evolutivos —previamente no considerados en conservación— pero indispensables para la permanencia de las especies a largo plazo, y los factores evolutivos asociados (Crandall

et al., 2000; Moritz, 2002; Pertoldi et al., 2007). Sin embargo, existe una fuerte polémica en relación a cómo usar la información genética en la identificación de "grupos operativos" en conservación, la cual, de forma práctica, se enmarca dentro de tres grandes rubros: la viabilidad de las poblaciones a largo plazo (Loeschecke et al., 1994), la identificación de unidades biológicas para su protección (Moritz, 1994; Amato et al., 1995) y la identificación de las relaciones históricas entre poblaciones (Avice & Hamrick, 1996; Vázquez-Domínguez, 2002).

Se han acuñado diversas definiciones para nombrar estos "grupos operativos", dentro de las cuales la más usada en estudios filogeográficos enmarcados en un contexto de conservación es el ya mencionado concepto de las ESU's (Moritz, 1994, 2002). Este concepto ha sido incluso incorporado a la legislación ambiental de diversos países como una forma de identificar poblaciones distintas con fines de conservación, aunque su definición y operatividad no son universalmente aceptados (Pennock & Dimmick, 1997). El primer concepto de ESU fue acuñado por Ryder (1986), quien lo definió como un grupo de organismos que han estado aislados de otros grupos de la misma especie por un periodo de tiempo suficiente para haber desarrollado divergencias genéticas significativas entre ellos. Más tarde, Moritz (1994, 2002) define una ESU como un grupo de individuos o poblaciones que presentan monofilia recíproca para marcadores mitocondriales y divergencias significativas en frecuencias alélicas en loci nucleares, pudiéndose referir a poblaciones, especies o subespecies, y considerando también el tiempo de aislamiento de dichas poblaciones.

Algunas de las principales críticas mencionadas a estas aproximaciones es que ningún método filogenético es tan poderoso como para poder inferir una filogenia correcta, más cuando se trata de poblaciones dentro de una misma especie, y que por el contrario lo que se genera es una hipótesis con una cierta probabilidad de que lo sea. De igual forma, las variaciones estocásticas pueden generar arreglos erróneos en un árbol de poblaciones, por lo que la monofilia recíproca no siempre denota aislamiento histórico (Crandall et al., 2000; Domínguez-Domínguez et al., 2008). En este sentido, el tamaño poblacional es un factor importante para que se dé la monofilia recíproca; así, si imaginamos el ejemplo donde una especie es dividida en dos poblaciones por una barrera, si una de las poblaciones aisladas es pequeña, el tiempo que tiene que transcurrir para que califique como una ESU es mucho menor que en el caso de que la población aislada sea de mayor tamaño (Neigel & Avice, 1986). Esto es aún más marcado en términos genéticos, ya que la mayoría de las especies o poblaciones con importancia para la conservación son naturalmente pequeñas, han sufrido un declive en su tamaño poblacional, han sido fragmentadas o simplemente perturbadas (Pearse & Crandall, 2004).

También se considera que el concepto de ESU no hace suficiente énfasis en el potencial de las especies para maximizar el éxito evolutivo mediante

el mantenimiento de la diversidad adaptativa (Lynch et al., 1999), y que un planteamiento exclusivamente genético tiene graves riesgos en el reconocimiento del potencial adaptativo y la adecuación. Se ha mencionado también que si cualquier linaje evolutivo perfectamente diagnosticable tiene que ser elevado al nivel de especie, entonces el concepto de ESU está de más (Vogler & De Salle, 1994). Existen sin embargo muchos ejemplos donde se ha utilizado este concepto para propuestas y/o políticas de conservación. La fauna de las islas oceánicas ha sido una fuente importante de estudios genéticos y de conservación. Por ejemplo, las tortugas gigantes de las Galápagos (*Geochelone nigra*) comprenden una linaje que radió de manera rápida junto con la evolución del archipiélago, historia que se ha podido detallar utilizando ADNmt y microsátélites. Se ha observado que las poblaciones tienen marcada divergencia genética, historias demográficas contrastantes y estructura filogeográfica profunda, consistente con la historia geológica y biogeográfica de las islas. Dada la separación evolutiva tan antigua, se han propuesto cuatro ESU's (dos en Santa Cruz, una en Pinzón y una en San Cristóbal; Beheregaray et al., 2003). En otro ejemplo no insular, se conoce que el elefante asiático (*Elephas maximus*) presenta poblaciones muy reducidas y fragmentadas, tanto por factores históricos como por dispersión reciente mediada por el hombre. Un estudio filogeográfico muestra dos clados que se separaron hace cerca de 1,2 millones de años, donde los individuos de los dos clados están presentes en todas las localidades de estudio, excepto Indonesia y Malasia; éstos últimos están en linajes basales, por los que se les confiere estatus de ESU's (Fleischer et al., 2001).

El uso de marcadores moleculares altamente variables en la conservación de especies en peligro y su uso en planes de manejo ha llevado también a la implementación de nuevos conceptos en la biología de la conservación, por ejemplo las Unidades de Manejo (MU's por sus siglas en inglés). Estas unidades intentan integrar la diversidad genética y la demografía de distintas poblaciones, las cuales tienen que ser manejadas de manera independiente para asegurar la viabilidad de una ESU (Moritz, 2002). Un ejemplo que combina la propuesta de ESU's y MU's es el trabajo con la especie de perezoso del bosque atlántico brasileño, *Bradypus torquatus*, la cual está en grave peligro por la pérdida del 93% de su área de distribución original. En un estudio genético y filogeográfico de las poblaciones remanentes más grandes, se encontró que dichas poblaciones están aisladas reproductivamente y son altamente divergentes, resultado de fragmentación alopatrica. Así, se definieron al menos dos unidades evolutivas independientes, además de que poblaciones separadas por más de 100 km deben ser consideradas unidades de manejo diferentes (Lara-Ruiz et al., 2008; tabla 1).

Por otro lado, uno de los métodos más recientes que se han desarrollado dentro de la genética de poblaciones para fines de conservación es la combinación de análisis filogeográficos, la genética del

paisaje ("landscape genetics") y las aproximaciones estadísticas, que en conjunto permiten definir la estructura poblacional a lo largo de la distribución y la historia demográfica de las poblaciones, identificando las poblaciones que deben ser conservadas junto con su distribución geográfica (Manel et al., 2003; Storer et al., 2007). Bajo este enfoque, Hull et al. (2008) evaluaron los patrones de diferenciación y hábitat entre dos subespecies (oriental y occidental) del halcón cola roja *Buteo jamaicensis* (tabla 1). Utilizaron microsátélites y caracteres morfológicos y encontraron un patrón de aislamiento por distancia entre los sitios de anidación en el oeste. Dada la alta capacidad de dispersión de esta especie, dicho patrón sugiere que preferencias de hábitat específicas a las poblaciones —y no a la especie—, limitan la migración y resultan en estos patrones filogeográficos.

La diversidad biológica incluye la variación genética entre especies y dentro de las especies, tanto en poblaciones geográfica y genéticamente separadas como a nivel de individuos dentro de cada población. Sin embargo, el encontrar un método que permita la correcta identificación de dichas unidades es prácticamente imposible, dada la gran diversidad de posibilidades que hay en la naturaleza, e incluso, dada la carencia de métodos adecuados o la correcta aplicación de los existentes. Por ello, en el proceso de la identificación de unidades de conservación se debe tener clara la división de la diversidad biológica en dos componentes: aquella resultante del aislamiento histórico y aquella que tiene que ver con la evolución adaptativa (Moritz, 2002; Vázquez-Domínguez, 2002, 2007). Una historia peculiar a este respecto es el caso del roedor *Zapus hudsonius preblei*, subespecie considerada como amenazada en la legislación norteamericana, que en un momento fue cuestionada taxonómicamente y se propuso que se eliminara de la lista de especies en peligro. En un estudio filogeográfico reciente con microsátélites y dos regiones de ADNmt, el cual incluyó NCA, se concluyó que cada subespecie de *Zapus hudsonius* era distinta genéticamente y que sus haplotipos correspondían directamente con la distribución disyunta de cada una (King et al., 2006; tabla 1).

Es importante mencionar que el uso exclusivo de datos moleculares para definir las estrategias de conservación dentro de una especie puede ser altamente arriesgado. Para que los conceptos teóricos de la genética de la conservación puedan ser de utilidad en los planes de conservación, éstos tienen que ser prácticos en su aplicación. Los datos obtenidos de esta manera deben ser cuidadosamente evaluados junto con datos históricos, ecológicos, sociales y de distribución, con la finalidad de obtener una perspectiva más acertada y realista (Crandall et al., 2000). Recientemente se han incorporado otras fuentes de información a la identificación de grupos operacionales para conservación, como lo es la distribución espacial de la diversidad genética, datos taxonómicos y fenotípicos, los servicios ecológicos y ambientales, datos biogeográficos, aspectos socioeconómicos y datos etológicos (Doadrio et al., 1996; Dodson et al., 1998; Luck et al., 2003; Manel et al., 2003; Green,

2005; Domínguez-Domínguez et al., 2007, 2008). Por ejemplo, para la conservación de la diversidad de peces dulceacuícolas en particular, Doadrio et al. (1996) acuñaron el concepto de Unidad Operativa de Conservación (OCU por sus siglas en inglés), el cual es definido como una área continua limitada por fronteras geográficas bien definidas y habitada por una o más poblaciones que comparten el mismo patrón genético.

Conclusiones

Los estudios filogeográficos indudablemente han ayudado a la sistemática para reconocer y establecer límites entre especies, sobre todo a nivel de especie y de subespecie. Asimismo, la aplicación de métodos de análisis filogeográficos ha sido una herramienta muy poderosa en estudios de biología de la conservación, significativamente permitiendo evaluar el potencial evolutivo de las especies. En particular, con base en los resultados obtenidos a través de análisis filogeográficos, ha sido posible probar hipótesis biogeográficas, describir procesos demográficos y evolutivos que resultan en unidades poblacionales diferenciables, así como inferir procesos que han determinado el origen, distribución y mantenimiento de la biodiversidad, información indispensable en taxonomía y conservación. Es evidente que ello ha sido posible no sólo a través del uso de métodos tradicionalmente filogeográficos, sino que es necesario incorporar aquellos de la genética de poblaciones y genética del paisaje, de demografía y de coalescencia, además de la utilización de diversos genes y particularmente de ADNmt y ADNn, en combinación con caracteres morfológicos, etológicos, ambientales, etc. De esta forma, con estudios filogeográficos como los descritos, se ha logrado precisar la taxonomía de especies y subespecies de forma adecuada, y también se han podido hacer propuestas significativas en conservación y manejo de especies animales, indistintamente si éstas son de amplia distribución o restringidas y en peligro.

Referencias

- Amato, G., Wharton, D., Zainuddin, Z. Z. & Powell, J. R., 1995. Assessment of conservation units for the Sumatran rhinoceros (*Dicerorhinus sumatrensis*). *Zoo Biology*, 14: 395–402.
- Arbogast, B. S. & Kenagy, G. J., 2001. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography*, 28: 819–825.
- Avise, J. C., 2000. *Phylogeography*. Harvard Univ. Press, Cambridge.
- 2008. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36: 3–15.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, L. E., Reeb, C. A. & Saunders, N. C., 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review in Ecology and Systematics*, 18: 489–522.
- Avise, J. C. & Ball, Jr, R. M., 1990. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, 7: 45–67.
- Avise, J. C. & Hamrick, J. L., 1996. *Conservation genetics: case histories from nature*. Chapman & Hall, New York.
- Beheregaray, L. B., Ciofi, C., Caccone, A., Gibbs, J. P. & Powell, J. R., 2003. Genetic divergence, phylogeography and conservation units of giant tortoises from Santa Cruz and Pinzon, Galapagos Islands. *Conservation Genetics*, 4: 31–46.
- Cracraft, J., 1983. Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology*, 1: 159–187.
- Crandall, K. A., Bininda-Emonds, O. R. P., Mace, G. M. & Wayne, R. K., 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15: 290–295.
- Crother, B. I., 1990. Is "some better than none" or do allele frequencies contain phylogenetically useful information? *Cladistics*, 6: 677–281.
- Davis, J. I. & Nixon, K. C., 1992. Population, genetic variation, and delimitation of phylogenetic species. *Systematic Biology*, 41: 421–435.
- Doadrio, I., Perdices, A. & Machordom, A., 1996. Allozymic variation of the endangered killifish *Aphanius iberus* and its application to conservation. *Environmental Biology of Fishes*, 45: 259–271.
- Dodson, J. J., Gibson, R. J., Cunjak, R. A., Friedland, K. D., Garcia de Leaniz, C., Gross, M. R., Newbury, R., Nielsen, J. L., Power, M. E. & Roy, S., 1998. Elements in the development of conservation plans for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fish and Aquatic Sciences*, 55: 312–323.
- Domínguez-Domínguez, O., Alda, F., Pérez-Ponce de León, G., García-Garitaigoitia, J. L. & Doadrio, I., 2008. Evolutionary history of the endangered fish *Zoogoneticus quitzeoensis* (Bean, 1898) (Cyprinodontiformes: Goodeidae) using a sequential approach to phylogeography based on mitochondrial and nuclear DNA data. *BMC Evolutionary Biology*, 8: 161.
- Domínguez-Domínguez, O., Boto, L., Alda, F., Pérez-Ponce de León, G. & Doadrio, I., 2007. Human impacts on drainages of the Mesa Central of Mexico and its genetic effects on an endangered fish, *Zoogoneticus quitzeoensis*. *Conservation Biology*, 21: 168–180.
- Donoghue, M. J., 1985. A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. *Bryologist*, 88: 172–181.
- Farias, I. P. & Hrbek, T., 2008. Patterns of diversification in the discus fishes (*Symphysodon* spp. Cichlidae) of the Amazon basin. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49: 32–43.
- Fleischer, R. C., Perry, E. A., Muralidharan, K., Stevens, E. E. & Wemmer, C. M., 2001. Phylogeography of the Asian elephant (*Elephas maximus*) based on mitochondrial DNA. *Evolution*, 55: 1882–1892.
- Freeland, J. R., 2005. *Molecular ecology*. John Wiley

- & Sons, England.
- Gamble, T., Berendzen, P. B., Shaffer, H. B., Starkey, D. E. & Simons, A. M., 2008. Species limits and phylogeography of North American cricket frogs (*Acris*: Hylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48: 112–125.
- Goldstein, P. Z., DeSalle, R., Amato, G. & Voger, A. P., 2000. Conservation genetics at the species boundary. *Conservation Biology*, 14: 120–131.
- Green, D. M., 2005. Designable units for status assessment of endangered species. *Conservation Biology*, 19: 1813–1820.
- Hardy, M. E., Grady, J. M. & Routman, E. J., 2002. Intraspecific phylogeography of the slender madtom: the complex evolutionary history of the Central Highlands of United States. *Molecular Ecology*, 11: 2393–2403.
- Hickerson, M. J., Dolman, G. & Moritz, C., 2006. Comparative phylogeographic summary statistics for testing simultaneous vicariance. *Molecular Ecology*, 15: 209–223.
- Hey, J. & Machado, C. A., 2003. The study of structured populations—new hope for a difficult and divided science. *Nature Reviews Genetics*, 4: 53–543.
- Hudson, R. R., 1990. Gene genealogies and the coalescent process. In: *Oxford surveys in evolutionary biology*: 1–44 (D. Futuyma & J. Antonovics, Eds.). Oxford Univ. Press, Oxford.
- 1998. Island models and the coalescent process. *Molecular Ecology*, 7: 413–418.
- Hull, J. M., Hull, A. C., Sacks, B. N., Smith, J. P. & Ernest, H. B., 2008. Landscape characteristics influence morphological and genetic differentiation in a widespread raptor (*Buteo jamaicensis*). *Molecular Ecology*, 17: 810–824.
- King, T. L. & Burke, T., 1999. Special issue on gene conservation: identification and management of genetic diversity. *Molecular Ecology*, 8: S1–S3.
- King, T. L., Switzer, J. F., Morrison, C. L., Eackles, M. S., Young, C. C., Lubinski, B. A. & Cryan, P., 2006. Comprehensive genetic analyses reveal evolutionary distinction of a mouse (*Zapus hudsonius preblei*) proposed for delisting from the US Endangered Species Act. *Molecular Ecology*, 15: 4331–4359.
- Knowles, L. L., 2008. Why does a method that fails continue to be used? *Evolution*, 62: 2713–2717.
- Knowles, L. L. & Maddison, W. P., 2002. Statistical phylogeography. *Molecular Ecology*, 11: 2623–2635.
- Lanteri, A. & Confalonieri, V., 2003. Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. In: *Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía*: 185–194 (J. J. Morrone & J. Llorente, Eds.). CONABIO, México.
- Lara–Ruiz, P., Chiarello, A. G. & Fabrício, R. S., 2008. Extreme population divergence and conservation implications for the rare endangered Atlantic Forest sloth, *Bradypus torquatus* (Pilosa: Bradypodidae). *Biological Conservation*, 141: 1332–1342.
- Loeschcke, V., Tomiuk, V. J. & Jain, S. K., 1994. *Conservation genetics*. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
- Luck, G. W., Daily, G. C. & Ehrlich, P. R., 2003. Population diversity and ecosystem services. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 331–336.
- Lynch, M., Pfrender, M. K., Spitze, N., Lehman, J., Hicks, D., Allen, L., Latta, M., Ottene, F. & Bogue, J., 1999. The quantitative and molecular genetic architecture of a subdivided species. *Evolution*, 53: 100–110.
- Manel, S., Schwartz, M. K., Luikart, G. & Taberlet, P., 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 189–197.
- McKritrick, M. C. & Zink, R. M., 1988. Species concept in ornithology. *Condor*, 90: 1–14.
- Moore, W. S., 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial–gene trees versus nuclear–gene trees. *Evolution*, 49: 718–726.
- Moritz, C., 1994. Defining "evolutionarily significant units" for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 9: 373–375.
- 2002. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology*, 51: 238–254.
- Mulcahy, D. G., 2008. Phylogeography and species boundaries of the western North American Nightsnake (*Hypsiglena torquata*): Revisiting the subspecies concept. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46: 1095–1115.
- Neigel, J. E. & Avise, J. C., 1986. Phylogenetic relationships of mitochondrial DNA under various demographic models of speciation. In: *Evolutionary processes and theory*: 515–534 (E. Nevo & D. Karlin, Eds.). Academic Press, New York.
- Nielsen, R. & Beaumont, M. A., 2009. Statistical inferences in phylogeography. *Molecular Ecology*, 18: 1034–1047.
- Nixon, K. C. & Wheeler, Q. D., 1990. An amplification of the phylogenetics species concept. *Cladistics*, 6: 211–223.
- Nordborg, M., 2000. Coalescent theory. In: *Handbook of statistical genetics*: 1–37 (D. J. Balding, M. J. Bishop & C. Cannings, Eds.). John Wiley & Sons, London.
- Pearse, D. E. & Crandall, K. A., 2004. Beyond F_{ST} : Analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics*, 5: 585–602.
- Pennock, D. S. & Dimmick, W. D., 1997. Critique of the Evolutionary Significant Unit as a definition for "Distinct Population Segments" under the U.S. Endangered Species Act. *Conservation Biology*, 11: 611–619.
- Pertoldi, C., Bijlsma, R., Loeschcke, V., 2007. Conservation genetics in a globally changing environment: present problems, paradoxes and future challenges. *Biodiversity and Conservation*, 16: 4147–4163.
- Petit, R. J., 2008. The coup de grâce for the nested clade phylogeographic analysis? *Molecular Ecology*, 17: 516–518.
- Richlen, M. L., Morton, S. L., Barber, P. H. & Lobel, S. P., 2008. Phylogeography, morphological variation and taxonomy of the toxic dinoflagellate

- Gambierdiscus toxicus* (Dinophyceae). *Harmful Algae*, 7: 614–629.
- Ryder, O. A., 1986. Species conservation and systematic: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution*, 1: 9–10.
- Sites Jr., J. W. & Crandall, K. A., 1997. Testing species boundaries in biodiversity studies. *Conservation Biology*, 11: 1289–1297.
- Smith, G. R., 1992. Introgression in fishes: significance for paleontology, cladistics, and evolutionary rates. *Systematic Biology*, 41: 41–57.
- Storfer, A., Murphy, M. A., Evans, J. S., Goldberg, C. S., Robinson, S., Spear, S. F., Dezzani, R., Demele, E., Vierling, L. & Waits, L. P., 2007. Putting the "landscape" in landscape genetics. *Heredity*, 98: 128–142.
- Templeton A. R., 1999. Using gene trees to infer species from testable null hypothesis: cohesion species in the *Spalax ehrenbergi* complex. In: *Evolutionary theory and precesses: Modern perspectives papers in honor of Eviatar Nevo*: 171–192 (S. P. Wasser, Ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- 2001. Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. *Molecular Ecology*, 10: 779–791.
 - 2004. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology*, 13: 789–809.
 - 2008. Nested clade analysis: an extensively validated method for strong phylogeographic inference. *Molecular Ecology*, 17: 1877–1880.
 - 2009. Statistical hypothesis testing in intraspecific phylogeography: nested clade phylogeographical analysis vs. approximate Bayesian computation. *Molecular Ecology*, 18: 319–331.
- Vázquez-Domínguez, E., 2002. Phylogeography, historical patterns and conservation of natural areas. In: *Protected areas and the regional planning imperative in North America*: 369–378 (G. Nelson, J. C. Day, L. M. Sportza, J. Loucky & C. Vásquez, Eds.). Univ. of Calgary Press, Canada.
- 2007. Filogeografía y vertebrados. In: *La Ecología molecular de plantas y animales*: 441–466 (L. Eguiarte, V. Souza, & X. Aguirre, Eds.). INE, Mexico.
- Vázquez-Domínguez, E., Castañeda-Rico, S., Garrido-Garduño, T. & Gutiérrez-García, T. A. (en prensa). Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista Chilena de Historia Natural*.
- Vázquez-Domínguez, E., Hernández-Valdés, A., Rojas-Santoyo, A. & Zambrano, L., 2009. Contrasting genetic structure in two codistributed freshwater fish species inhabiting highly seasonal systems. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 80: 181–192.
- Vogler, A. P. & DeSalle, R., 1994. Diagnosing units of conservation management. *Conservation Biology*, 6: 170–178.
- Williams, H. C., Ormerod, S. J. & Bruford, M. W., 2006. Molecular systematics and phylogeography of the cryptic species complex *Baetis rhodani* (Ephemeroptera, Baetidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40: 370–382.
- Zhang, A. B., Kubota, K., Takami, Y., Kim, J. L., Kim, J. K. & Sota, T., 2005. Species status and phylogeography of two closely related *Coptolabrus* species (Coleoptera: Carabidae) in South Korea inferred from mitochondrial and nuclear gene sequences. *Molecular Ecology*, 14: 3823–3841.
- Zink, R. M., 2002. Methods in comparative phylogeography, and their application to studying evolution in the North American aridlands. *Integrative and Comparative Biology*, 42: 953–959.
-