

00078
12



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

" Estudio de la variación genética en poblaciones naturales de dos especies endémicas y amenazadas de *Thelocactus* spp. (Cactaceae)"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS
(ECOLOGIA Y CIENCIAS AMBIENTALES)

P R E S E N T A:

BIOL. FABIOLA RAMIREZ CORONA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MARLENE DE LA CRUZ MOLINA

MEXICO. D. F.

275988

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**A Israel González Cortés mi querido esposo
A Don Enrique Ramírez Herrada mi querido papá
A Doña Virginia Corona Pérez mi querida mamá
A Susy, Vale, Quique y Carlos mis queridos hermanitos
A Paulina por iluminarme y deslumbrarme.....**

ÍNDICE

Agradecimientos
Resumen
Abstract

Introducción general	-	1
Diversidad genética		3
Técnicas moleculares		5
RAPD's		6
Literatura consultada		8

Capítulo 1

Variación genética de *Thelocactus hastifer* (Cactaceae), una especie endémica y en peligro de extinción.

Introducción	11
Materiales y métodos	15
Trabajo de campo	15
Trabajo de laboratorio	16
Extracción de ADN	16
Amplificación de ADN	16
Registro de datos	16
Análisis estadístico	17
Resultados	19
Discusión y conclusiones	25
Diversidad genética	25
Flujo génico	28
Análisis fenético	30
Literatura consultada	31

Capítulo 2

Variación genética revelada por RAPD's de 3 subespecies endémicas y amenazadas de *Thelocactus tulensis* (Cactaceae)

Introducción	36
Materiales y métodos	44
Trabajo de campo	44
Trabajo de laboratorio	45
Extracción de ADN	45
Primer's	45

Amplificación de ADN	46
Electroforesis y fotografía	46
Registro de datos	46
Análisis estadístico	46
Resultados	47
Diversidad genética en las poblaciones de cada subespecie	49
Diversidad genética entre subespecies	52
Relaciones genéticas	53
Discusión y conclusiones	63
Diversidad genética	63
Flujo génico	66
Análisis fenético	67
Literatura consultada	68
Discusión general	71
Conclusiones	75

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Marlene de la Cruz por haber dirigido esta tesis y por introducirme a la magia de los marcadores moleculares. Al Dr. Daniel Piñero por todo su apoyo incondicional sobre todo en los tiempos más difíciles y por haber permitido que estuviera en su laboratorio trabajando. Al Dr. Ken Oyama por toda su ayuda y sugerencias durante el desarrollo de la tesis. Al Dr. Héctor Hernández por todo el apoyo de permisos de colecta, financiamiento y sugerencias del manuscrito. A los revisores de la tesis Dr. Alejandro Casas, Arturo Flores y a la M. en C. Nidia Pérez por sus comentarios y sugerencias al manuscrito que fueron realmente útiles y enriquecedores. Al la Dra. Marlene de la Cruz y al Dr. Héctor Hernández por el financiamiento de reactivos, material y equipo de biología molecular a través de su proyecto de DGAPA "Sistemática molecular de las cactáceas de México". A DGAPA UNAM por la beca otorgada para la realización de la maestría. Gracias a los biólogos Carlos Gómez y Rolando Bárcenas por su ayuda en el campo y para identificar las especies de cactus.

Gracias a los compañeros de laboratorio de genética y evolución, Oscar Flores por toda la ayuda logística, por las molidas en mortero etc.; al Dr. Eduardo Morales por las agradables pláticas y los chascarrillos, a la M. en C. Patricia Delgado por todo el apoyo moral y por aclararme dudas de genética de poblaciones y por su amistad incondicional, a Eileli Huerta por su amistad, solidaridad y apoyo. A Rodolfo Solano por las pláticas constructivas y relajantes, por utilizar tan correctamente el lenguaje de un biólogo y la ayuda con los términos taxonómicos. A la Dra. Ana Rosa Vázquez por todo el apoyo moral, por soportar todos mis arranques, por los apapachos cariñosos etc. A Angélica Cibrián por enseñarme que sí se puede!!, a Sonia Dávila por su amistad y sonrisas. A Carmen Sánchez por abrirme los ojos y tener siempre palabras de aliento y tiempo para escucharme. A mis amigos del laboratorio de al lado Gaby Jiménez por aclararme mis dudas de cómputo y por su amistad, a mi querido compañero y amigo Luis Mendoza (Lucho) y a Mónica por todo, desde los aventones al metro hasta por las dudas existenciales, a Alicia Callejas por su amistad incondicional, por preocuparse tanto por mi y por enseñarme lo que se puede lograr siendo tan ordenada y organizada; a Lety Ríos por las buenas pláticas y momentos, por tener siempre una sonrisa para mi aunque llegara de correr por el pedregal. A Rosaura Luna por enseñarme que todavía quedan personas honestas y super trabajadoras, a Alba Zarco y Leopoldo Galicia por su amistad incondicional y por todo el apoyo y cariño desde hace tanto tiempo.....

Un agradecimiento muy especial a Rosalinda Tapia por enseñarme y aclararme dudas de biología molecular, desde como se deben agitar los tubitos eppendorf hasta consolarme por las desaveniencias de la vida, por estar siempre pendiente de mi y preocuparse tanto.

Otro agradecimiento especial para la Dra. Ana Mendoza por darme trabajo cuando más lo necesitaba, por los apapachos y consuelos cariñosos e incondicionales, por revisar el resumen en inglés y porque sé que siempre puedo contar con ella

Por todo el apoyo administrativo muchas gracias a Alicia Cervantes, a Gloria y a Carolina secretarías del Instituto de Ecología, y a Verónica y Alicia del Instituto de Biología, también al C.P. Virgilio Lara por toda la ayuda.

Por todo el apoyo moral, por su amor incondicional, por ir al campo conmigo y espinarse tanto colectando cactus en medio de la sierra, por conducir por horas por las carreteras del norte, por soportar mi genio y mi cansancio, mis angustias y miedos y por todo a Isra.

A mis papás y hermanos, Enrique, Virginia, Susana, Valeria, Enrique y Carlos y a mi sobrinita Paulina por todos los fines de semana relajantes y entretenidos, por hacerme olvidar mis angustias académicas, por toda la ayuda moral, espiritual, financiera etc., por hacerme ver que no todo en la vida es ciencia y que Dios es muy grande!

Gracias también a mi cuñado Raúl González Cortés por su ayuda en las colectas de campo, por poner su experiencia militar en las salidas al campo y aguantar las caminatas y las horas de viaje, buscando cactus raros!!!.

A mis hermanos del alma, Arturo Pizano, Maleni y Eva por estar siempre virtualmente.. ..

No quisiera olvidar a nadie pero en estos momentos la memoria me falla, así que mil perdones por las omisiones involuntarias.

Resumen

Utilizando los marcadores moleculares denominados RAPD's se estudiaron 2 especies de cactáceas endémicas de México, *Thelocactus hastifer* endémica extrema y *Thelocactus tulensis* con sus 3 subespecies *T. tulensis ssp tulensis* de amplia distribución, *T. tulensis ssp buekii* de distribución estrecha y *T. tulensis ssp matudae* endémica extrema y especialista edáfica. Todas excepto *T. tulensis ssp tulensis* están consideradas en peligro de extinción. Las metas de este estudio fueron estimar los niveles de variación genética intra e interpoblacional de 3 poblaciones de *T. hastifer* y de 5 poblaciones de cada subespecie de *T. tulensis* y detectar la variación intra e inter-subespecie además evaluar el uso potencial del marcador molecular en estas cactáceas. *T. hastifer*, *T. tulensis ssp matudae* mostraron los niveles más altos de diversidad genética ($H_T=0.2025$ y $H_T=0.2297$ respectivamente), *T. tulensis ssp buekii* reveló un nivel más bajo ($H_T=0.1970$) y mostró el nivel más bajo de de variación genética ($H_T=0.01616$). Tanto las poblaciones de *T. hastifer* como de *T. tulensis* están genéticamente diferenciadas. Se discuten la distribución de la variación genética, la estructura y relaciones genéticas para cada especie. Se concluye que para las especies más amenazadas y de distribución muy restringida los niveles de diversidad genética son más altos en comparación con la especie menos amenazada y de distribución más amplia contradiciendo lo esperado teóricamente para especies endémicas y amenazadas y de pequeños tamaños poblacionales. Los RAPD's son un tipo de marcador molecular muy útil para detectar variación genética intra, e interespecífica para éstas cactáceas.

ABSTRACT

Two endemic species of cacti from México were studied using the molecular markers RAPD's: *Thelocactus hastifer* with an extremely restricted distribution and *T. tulensis* with 3 subspecies. *T. tulensis ssp. tulensis* widely spread, *T. tulensis ssp. buekii* narrowly distributed and *T. tulensis ssp. matudae* with an extremely restricted distribution. All, except *T. tulensis ssp. tulensis*, are considered in danger of extinction. The goals of this study were: 1) to estimate the levels of genetic variation among and between populations of 3 populations of *T. hastifer* and 5 populations of each subspecies of *T. Tulensis*; 2) to determine the variation among and between subspecies, and 3) to evaluate the potential use of the molecular markers in these cacti.

T. hastifer, and *T. tulensis ssp. matudae* showed the highest levels of genetic diversity ($H_T=0.2025$ y $H_T=0.2297$, respectively), *T. tulensis ssp buekii* showed an intermediate level ($H_T=0.1970$) and *T. tulensis ssp. tulensis* showed the lowest level of genetic variation ($H_T=0.1616$). Both, *T. hastifer* and *T. tulensis* are genetically differentiated. The distribution of the genetic variation, the structure and genetic relationships of each species was discussed. More threatened species with very restricted distribution had higher levels of genetic diversity compared to the less threatened species with wider distribution. These results contradict the expected theory for endemic and threatened species with small population sizes. The RAPD is a very useful molecular marker to detect inter- and intra-specific genetic variation for these cacti.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Se ha afirmado que el éxito en la conservación de la biodiversidad depende en gran medida del conocimiento de las especies o sistemas que se requieren conservar (Morse y Heniffin 1981 , Soulé 1986 , Falk y Holsinger 1991). Los biólogos de la conservación se enfrentan con la difícil tarea de identificar la información biológica necesaria para evaluar las causas de "amenaza " y asegurar la sobrevivencia de especies blanco en la naturaleza , así como desarrollar criterios para determinar cuando la recuperación se ha logrado (Schemske *et al.* 1994).

Decidir el curso apropiado de acción es más complicado por las opiniones contrastantes presentadas en la literatura de la conservación .Una controversia importante considera a la importancia relativa de los enfoques genéticos y demográficos en los esfuerzos de conservación (Lande 1988).

Falk (1992) puntualizó que la información sobre la distribución de la variación genética en especies de plantas raras es la consideración clave para planear estrategias de conservación. Holsinger y Gottlieb (1991) concluyeron que " el manejo activo de la estructura genética de una especie amenazada requerirá una enorme inversión de tiempo, dinero y de expertos".

Es claro que los estudios que exploren los niveles existentes de diversidad genética y su distribución son importantes y básicos como un aspecto clave además de los estudios

ecológicos y demográficos, sobre todo cuando se trata de diseñar estrategias de conservación.

Dentro de los grupos más amenazados del reino vegetal se encuentran las cactáceas, que forman un grupo natural de plantas con aproximadamente 1500 especies la mayoría confinadas al continente americano. México es la región donde se concentra la mayor parte de la diversidad de especies de esta familia con 48 géneros y 563 especies con un alto índice de endemismo a nivel genérico (73 %) y específico (78 %) (Hernández y Godínez 1994). Las poblaciones naturales de muchas de las especies han sido afectadas por las presiones del desarrollo humano, principalmente a la conversión de terreno para usos agrícolas y /o pecuarios y a las actividades de extracción de las plantas de su hábitat, para su venta como plantas de ornato en mercados nacionales e internacionales (Jarvis 1979, Sánchez-Mejorada 1982, Fuller y Fitzgerald 1987). Como una consecuencia de este uso intensivo, toda la familia Cactaceae ha sido incluida en el Apéndice II de la Convención sobre el tráfico internacional de especies silvestres de flora y fauna amenazadas (CITES Anónimo 1990). Esta situación hace urgente que se implementen medidas para proteger a estas plantas y a sus sistemas ecológicos asociados. Sin embargo, las acciones de conservación deben estar basadas en un conocimiento sólido de los organismos para generar y organizar un acervo de información básica indispensable que incluya aspectos genéticos, ecológicos, reproductivos y fitogeográficos de las especies a conservar.

Por otra parte, los estudios de especies de plantas raras son importantes no sólo porque conducen las prácticas inmediatas de conservación, sino porque también contribuyen al mejor entendimiento de los procesos ecológicos y evolutivos fundamentales

para toda la diversidad viviente. Cuando las plantas raras son poco entendidas, también lo son las comunes, por ejemplo, hasta recientemente era común suponer que las especies de plantas amenazadas o en peligro de extinción son raras porque son competidores ineficientes. Muchos estudios han mostrado que esta conclusión es errónea (Karron 1991, Hamrick 1996). Las especies de plantas raras son a menudo especialistas en un microhábitat raro, y sus características demográficas y competitivas pueden ser idénticas a aquellas de sus congéneres o parientes más ampliamente distribuidos (Karron 1991, Hamrick y Godt 1996).

Los estudios ecológicos y genéticos de poblaciones se complementan unos a otros, y sus contribuciones permiten que los biólogos de la conservación entiendan mejor la biología de especies amenazadas. Sin embargo, poco se conoce de la estructura genética de la mayoría de las especies de plantas y la información morfológica, fisiológica, reproductiva y demográfica no está disponible sobre todo para la mayoría de las especies amenazadas o en peligro de extinción. Así, muchos biólogos de la conservación han comenzado a usar marcadores bioquímicos y moleculares para describir la composición genética de las especies de plantas. Los criterios genéticos obtenidos de marcadores moleculares pueden ser útiles para seleccionar poblaciones de vida silvestre como candidatos con prioridad para su conservación (Falk y Holsinger 1991, Frankham 1996).

Diversidad genética

Frankel (1970) postuló que la variación genética es esencial para la sobrevivencia a largo plazo de las especies amenazadas. La variación genética es un prerequisite necesario

para algún futuro cambio adaptativo; especies que carecen de la adecuada variación genética tienen un gran riesgo de extinción.

En términos de conservación, el mantenimiento de la variación genética es esencial si las poblaciones son reintroducidas exitosamente en la naturaleza o introducidas en hábitats nuevos (Schaal *et al.* 1991). En suma, hay muchos datos que sugieren que la variación contribuye a la adecuación inmediata en especies de plantas que mantienen su adecuación por heterosis o ventajas heterocigóticas. La reducción de la variación genética resulta en una gran pérdida de heterocigosidad y consecuentemente de la adecuación.

En muchos casos, las medidas o estimaciones de los niveles de variación entre las especies, llega a ser crítica para su conservación y manejo. Se han usado tres tipos de caracteres para estimar los niveles de variación: los morfológicos, las aloenzimas y, más recientemente, secuencias de ADN. Los dos primeros tipos han sido comúnmente utilizados en muchas familias de plantas, sin embargo, ni las aloenzimas ni los métodos moleculares han sido implementados para el estudio de la variación genética de las cactáceas. Ya Gibson y Nobel (1986) mencionaron que existen muy pocos estudios donde se muestren los patrones de variación genética de las cactáceas. Uno de ellos es el de Parker y Hamrick (1992) donde exploraron los niveles de diversidad genética de un cactus columnar *Lophocereus schottii* utilizando aloenzimas, sin embargo, este trabajo ha sido el único encontrado como antecedente de este estudio.

Técnicas moleculares

Con el desarrollo de las tecnologías de ADN recombinante, ha sido posible examinar la variación en las secuencias de ADN en casi cualquier especie de planta. Un análisis de las secuencias de ADN evita muchos de los problemas de juicio de la herencia en estimaciones de la variación genética realizadas con morfología o con estudios de aloenzimas. Debido a que el ADN es directamente analizado, puede estimarse directamente la variación genética, en lugar de estimarla del fenotipo; incluso se puede analizar algún segmento del genoma de la planta. Las técnicas están disponibles para estudiar secuencias que están codificando o no, conservadas o hipervariables, nucleares o de organelos. Las diferentes secuencias de ADN tienen un rango de limitantes selectivas y son afectadas diferencialmente por mecanismos moleculares que generan la variación (Schaal *et al.* 1991).

Existen dos alternativas para el análisis de secuencias de ADN, la primera involucra el secuenciamiento directo de los alelos y una comparación directa de la secuencia de pares de bases, esta aproximación es extremadamente útil para hacer inferencias filogenéticas pero consume una gran cantidad de tiempo. Sin embargo, las innovaciones técnicas en biología molecular están ocurriendo tan rápido que se ha hecho posible realizar estudios poblacionales secuenciando muchos individuos. Esto ha sido posible gracias a la tecnología de la amplificación del ADN *in vitro* a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction) que reduce en mucho el tiempo de secuenciamiento de genes.

Las técnicas moleculares proporcionan métodos alternativos para evaluar la diversidad genética dentro y entre organismos (Russell *et al.* 1993). Los marcadores moleculares de ADN comparan cuantitativamente el material genético de las especies

proporcionando la información necesaria para determinar las bases moleculares del cambio evolutivo. Una ventaja de los marcadores moleculares sobre cualquier característica fenotípica es que los primeros no están sujetos a la influencia del ambiente y representan una enorme fuente de características cuantitativamente comparables (Avice 1994, Newbury y Ford-Lloyd 1993).

RAPD's

Williams y sus colaboradores (1990) describieron un novedoso tipo de marcadores genéticos que está basado en la amplificación del ADN a lo largo de todo el genoma de los organismos. Estos marcadores se denominan RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) y son generados por la amplificación de segmentos aleatorios de ADN utilizando primer's u oligonucleótidos de 10 pares de bases de longitud con un contenido de guanina y citosina superior al 50 % (Williams *op cit.*). El objetivo de esta técnica consiste en la identificación de polimorfismos entre y dentro de los grupos de organismos que se están estudiando. El polimorfismo se identifica mediante la presencia o ausencia de los productos amplificados. Se ha documentado que el nivel de variación genética detectado con RAPD's es mucho más elevado que el observado con aloenzimas o con RFLP's nucleares para distintas especies (Lanaud y Berthaud 1984, Atkinson *et al.* 1986, Wilde *et al.* 1992, Russell *et al.* 1993, de la Cruz 1994, de la Cruz *et al.* 1995). Los RAPD's pueden ser utilizados fácilmente como una técnica para seleccionar áreas de prioridad para la conservación, para diseñar y monitorear estrategias de manejo en áreas protegidas, y para planear estrategias de conservación para una amplia variedad de recursos genéticos de plantas y animales. Se ha visto que la técnica es apropiada tanto para poblaciones de mamíferos como para árboles de bosques tropicales o pastizales forrajeros (Newbury y

Ford-Lloyd 1993). Es importante señalar que para todo el grupo de las cactáceas, la metodología de los marcadores moleculares RAPD's no se había desarrollado hasta la elaboración de este trabajo.

En esta investigación se examinaron los niveles y la distribución de la diversidad genética de 2 especies de cactus endémicos y amenazados de México, implementando la técnica de marcadores moleculares denominados RAPD's.

En la primera parte de este trabajo se presenta el estudio de la variación genética intra e inter poblacional y la estructura genética de *Thelocactus hastifer*. En la segunda parte, se presentan la diversidad y estructura genética intra e inter poblacional de *T. tulensis* ssp. *matudae*, ssp. *buekii* y ssp. *tulensis* respectivamente, así como la diversidad y estructura genética intra e inter subespecie de *T. tulensis*.

LITERATURA CONSULTADA

- Anónimo. 1990. Appendices I,II and III to the Convention on International Trade in Endangered Species of wild Fauna and Flora (CITES). U.S. Fish and Wildlife, U.S. Department of the Interior. Washinton, D.C. 25 pp.
- Atkinson, M. D., Whintiers, L. A. and Simpson, M. J. A.. 1986. Characterization of cacao germoplasm using isozymes markers. *Euphytica* **035**:741-750.
- Avise, J. C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman & Hall New York, New York.
- de la Cruz, M. 1994. Origin and evolution of *Theobroma cacao* L. Ph. D. thesis, University of California, Riverside, U.S.A.
- de la Cruz, M., Whitkus, R., Gómez-Pompa, A. and Mota-Bravo, L.M. 1995. Origins of cacao cultivation. *Nature* **375**: 542-543.
- Falk, D.A. 1992. From conservation biology to conservation practice : strategies for protecting plant diversity. In : P.L. Fielder and S.K. Jain (eds.) Conservation biology ; the theory and practice of nature conservation, preservation and management. Chapman & Hall, New York, New York, U.S.A. pp. 397-431.
- Falk, D.A. and Holsinger, K.E. (eds.) 1991. Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press. New York 283 pp.
- Frankel, O.H. 1970. Variation, the essence of life. Sir William MacCleave Memorial Lecture Proc. Linn. Soc. **95**: 158-169.
- Frankham, R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Cons. Biol.* **10** (6): 1500-1508.
- Fuller, D. and Fitzgerald, S. 1987. Conservation and commerce of cacti and others succulents. World Wildlife Fund. Washington, D.C. 264 pp.
- Gibson, A. and Nobel, P. 1986. The cactus primer. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts. 286 pp.
- Hamrick, J.L. and M.J.W. Godt. 1996. Conservation genetics of endemic plant species. In: J.C. Avise and J.L. Hamrick (eds.) Conservation Genetics. Case histories from nature. Chapman and Hall, New York, Ny. Pp. 281-304.
- Hernández, H.M. and Godínez, H. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas

- Mexicanas amenazadas. *Acta Bot. Mex.* 26: 33-52.
- Holsinger, K. E. and Gottlieb, L.D. 1991. Conservation of rare and endangered plants : principles and prospects. In: D.A. Falk and K.E. Holsinger (eds.) Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press. New York, New York, U.S.A. pp. 195-208.
- Jarvis, C.E. 1979. Trade cacti and other succulent plants in the United Kingdom. *Cact. Succ. J. Gr. Brit.* 41: 113-118.
- Karron, J.D. 1991. Patterns of genetics variation and breeding systems in rare plant Species. In: D.A. Falk and K.E. Holsinger (eds.) Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press. New York, New York, U.S.A. pp.87
- Lanaud, C. and Berthaud, J. 1984. Mise en evidence de nouveaux marqueurs genetiques Chez *Theobroma cacao* L. Parties techniques d'electrophoresc. In: Proc. Int. Cocoa Res. Conf. Togo. pp. 249-253.
- Lande, R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science* 241: 1455-1460.
- Morse, L. and Henifin, M (eds). 1981. Rare plant conservation: geographical data organization. The New York Botanical Garden. New York. 377 pp.
- Newbury, H.J. and Ford-Lloyd, B. V. 1993. The use of RAPD for assesing variation in plants. *Plant Growth Regul.* 12: 43-51.
- Russell, J.R., Hosein, F., Johnson, E., Waugh, R. and Powell, W. 1993. Genetic differentiation of cacao (*Theobroma cacao* L.) populations revelcad by RAPD analysis. *Mol. Ecol.* 2: 89-97.
- Sánchez-Mejorada, H. 1982. México his problems and programmes monitoring trade in common and endangered cacti. *Cacct. Succ. J. Gr. Brit.* 44: 36-38.
- Schaal, A.B., Leverich, J.W. and Rogstad, S.H 1991. A comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation biology. In: Falk, A.D. and E.K. Holsinger (eds.) Genetic and conservation of rare plants. Oxford University Press. New York, New York, U.S.A. pp. 123-134.
- Schemske, W.D., Husband, C.B., Ruckelshaus, H.M., Goodwillie, C., Parker, M. I. and Bishop, J.G. 1994. Evaluating approaches to the conservation of rare and

endangered plants. *Ecol.* **75** (3): 584-606.

Soulé, M. 1986. Conservation biology : The science of scarcity and diversity. Sinauer. Sunderland, Massachusetts. 584 pp.

Wilde, J., Waufgh, R. and Powell, W. 1992. Genetic fingerprint of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* **83**: 871-877.

Williams, J. G., Kubelik, A.R., Livtak, K.J., Rafalski, J. A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids. Res.* **18**: 6531-6535.

CAPÍTULO I

VARIACIÓN GENÉTICA DE *Thelocactus hastifer* (Cactaceae), UNA ESPECIE ENDÉMICA Y EN PELIGRO DE EXTINCIÓN.

INTRODUCCIÓN

El género *Thelocactus* fue propuesto por Britton y Rose (1922, 1923); posteriormente, Anderson (1987) realizó una revisión del género en el que incluyó 11 especies 9 de las cuales son endémicas para México (Hunt 1992, Hernández y Godínez 1994). Poco se conoce de su distribución, tipos de vegetación, suelos, simpatria, características de hábitats y plantas asociadas para cada especie. No obstante, de manera general, el género *Thelocactus* presenta una distribución latitudinal de más de 1200 Km desde aproximadamente 20° C a 32° C latitud norte en el llamado Desierto Chihuahuense en matorral xerófito (Anderson 1987). La mayoría de las especies del género habitan en suelos de tipo calcáreo y suelos derivados de éstos, los cuales varían en textura. En cuanto a las características de hábitat, *Thelocactus* se encuentra en elevaciones que van desde 12 msnm hasta 2300 msnm, la precipitación varía desde 156.9 a 847.2 mm anuales y la s temperaturas máximas varían de 29.1° a 37.8° C mientras que las mínimas van desde 1.7° a 14.2° C (Anderson 1987).

Thelocactus hastifer es una de las especies más raras del género, es endémica de México y crece en el límite más sureño de la distribución del género, específicamente en Querétaro e Hidalgo (Anderson 1987, Pilbeam 1996, Hunt 1992, Hernández y Godínez 1994). Debido a su endemismo, a su baja densidad poblacional y a la sobrecolecta por su valor como planta de ornato, *T. hastifer* ha sido considerada como una especie en peligro de extinción (CITES, Anónimo 1990). Se describe como una planta solitaria, agrupada desde la base sólo después de muchos años, de crecimiento muy lento, los individuos son muy longevos y forman clones, tiene tallos cilíndricos con la base muy estrecha, mide de 10 a 30 cm de alto, a menudo se colapsan o se reclinan por su propio peso. Tiene de 12 a 18 costillas verticales o espiraladas ligeramente. Las areolas algunas veces presentan nectarios extraflorales. Presentan de 4 a 5 espinas centrales con una central muy larga de color

amarillo-café, la espina central llega a ser con la edad, erecta y de color café oscuro; el resto se presentan ligeramente radiales. Las espinas radiales se presentan de 20 a 25 de color blanco y se oscurecen con la edad. Las flores son rosáceas-magenta (Fig. 1a), crece en simpatria con *T. leucacanthus* en suelos calizos, en matorrales xerófitos espinosos o micrófilos a una latitud de 20° 30' a 21° N y una longitud de 99° 30' a 100° W en elevaciones que van de 1800 a 2000 msnm (Fig. 1b) (Anderson 1987, Pilbeam 1996).

Hernández y Bárcenas (1996) elaboraron un estudio en el que estimaron un índice de rareza para varios especies de cactáceas del Desierto Chihuahuense registrando a *T. hastifer* en un solo cuadrante de un total de 122 por lo que le correspondió un índice de rareza de 122. Hernández y Godínez (1994) asignaron a *T. hastifer* dentro de la categoría 2 de acuerdo al número de localidades conocidas. En esta categoría estos autores incluyeron taxa con distribuciones muy restringidas, pero que se conocen de otras áreas además de la localidad tipo (máximo 5 localidades).

Es claro que muchos factores que operan en un rango de escalas espaciales tal como la estocasticidad genética, demográfica y ambiental, las interacciones ecológicas, y los niveles existentes de variación genética de las poblaciones, pueden determinar la abundancia o rareza de las especies de plantas. La información biológica más crítica para conservar especies raras has sido sujeto de discusión en los últimos 20 años y no ha habido consenso (Falk y Holsinger 1991, Schemske *et al.* 1994). La mayoría de los científicos evocan algún tipo de aproximación ya sea con énfasis ecológico o genético o bien de tipo económico o ético (Franklin 1980). El enfoque de la genética de poblaciones menciona que el entendimiento de la organización de la diversidad genética es la clave para la sobrevivencia a largo plazo de las especies, debido a que la variación genética es un requisito para la adaptación evolutiva (Lande y Barrowclough 1987, Hamrick *et al.* 1991).

Las evaluaciones de la diversidad y la estructura genética de una población son de gran valor en la formulación de planes de manejo para especies amenazadas (Prior *et al.* 1997). Sin embargo, históricamente las plantas han sido más estudiadas utilizando aloenzimas pero los marcadores moleculares han abierto nuevas áreas de investigación

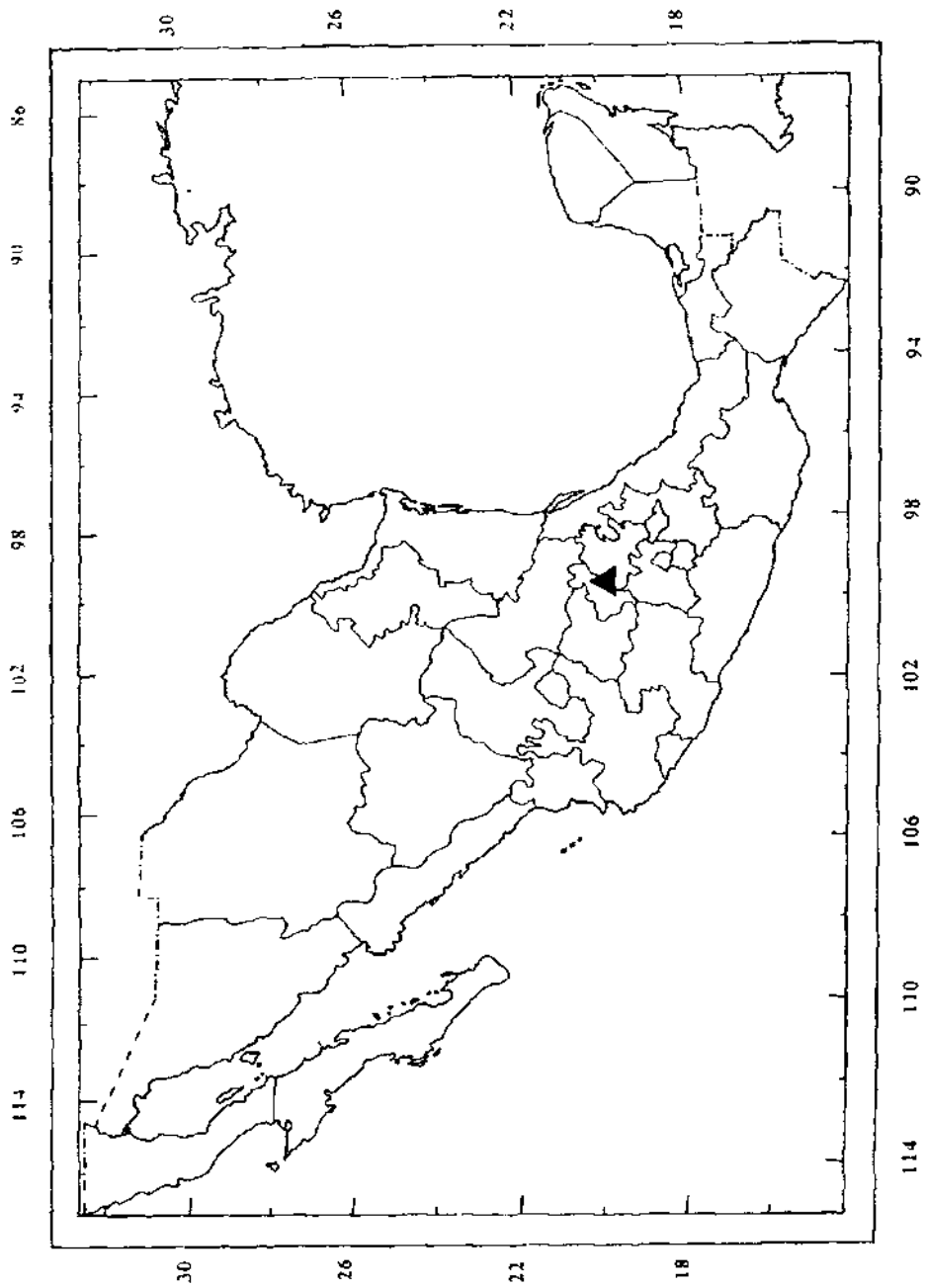


Fig. 1b. Zona de distribución de *T. hastifer*

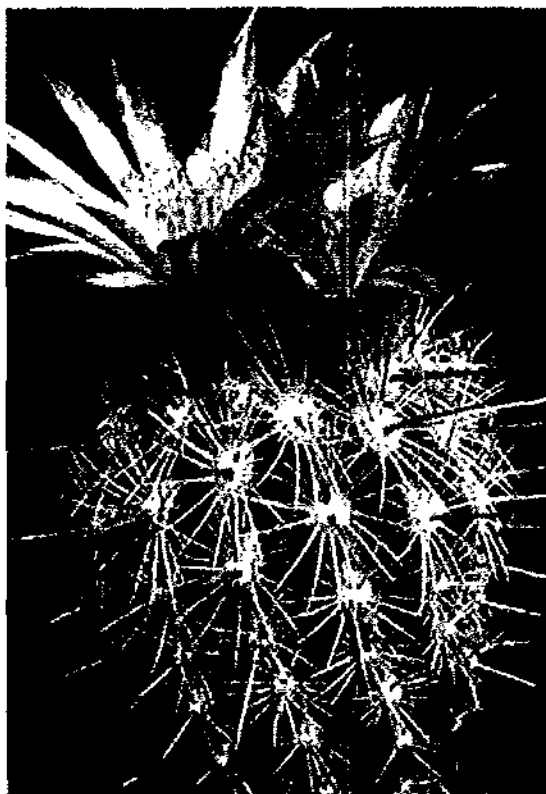


Fig. 1ª. Planta de *Thelocactus hastifer*

(Snow y Parker 1998) y han permitido ver con resolución sin precedentes la dinámica dentro de las poblaciones permitiendo un gran avance en el entendimiento de los procesos ecológicos de las poblaciones (Snow y Parker 1998). Además, el uso de técnicas de PCR (Polymerase Chain Reaction) ofrece en general la oportunidad de obtener información genética a partir de poco material orgánico para resolver problemas de conservación en poblaciones pequeñas (Amos y Hoelzel 1992).

Existen algunas especies en donde la variación detectada con isoenzimas es poca o incluso nula y utilizando marcadores moleculares como los RAPD's se ha podido detectar polimorfismos y describir su estructura genética (Mosseler *et al.* 1992).

Teniendo como marco lo anterior se elaboró el presente estudio con el fin de determinar los niveles de variación genética intra e inter poblacional de *T. hastifer* utilizando los marcadores moleculares denominados RAPD's.

MATERIALES Y MÉTODOS

Trabajo de campo

Se muestreó a lo largo del rango de coordenadas de la distribución de *T. hastifer* con el fin de ubicar y encontrar poblaciones diferentes de esta especie. Debido a su estrecha distribución, a sus bajas densidades poblacionales y a lo difícil de su acceso, se lograron coleccionar sólo tres poblaciones de las cuáles dos son registros nuevos en Querétaro. Se eligió un ejemplar representativo de cada población y fueron depositados en el Herbario Nacional de México del Instituto de Biología, UNAM. Los ejemplares depositados fueron: F. Ramírez y C. Gómez-Hinostrosa C-1608, F. Ramírez Fh-12, Fh-13, Fh-18 y Fh-23.

Se coleccionaron individuos pequeños pero cuando el ejemplar era grande, sólo se obtenía una muestra de tres gramos con un sacabocados para evitar la extracción de los ejemplares completos y reducir en lo posible la depredación por sobrecolecta. Se coleccionaron 10 individuos por población y las muestras se congelaron a -80°C hasta la extracción de

ADN. Algunos ejemplares se sembraron y se depositaron en el invernadero del Instituto de Ecología de la UNAM. Se analizaron un total de 30 plantas.

Trabajo de Laboratorio

Extracción de ADN. Se llevó al cabo siguiendo el protocolo desarrollado para la extracción de ADN de cactáceas (De la Cruz *et al.* 1997). Los extractos de ADN se analizaron en geles de agarosa al 0.8% y se cuantificaron sus concentraciones en un mini-fluorómetro DyNA Quant 200 (Hoefer Scientific Instruments). Posteriormente se diluyeron para tener una concentración uniforme de 5 ng/ml requerido para los RAPD's y se limpiaron con 1 ul de Ribonucleasa (Sigma).

Amplificación de ADN. Se probaron 23 decámeros de las series A,G y F de Operon Technologies Inc. (Alameda Calif. USA) como oligonucleótidos para la amplificación. Se seleccionaron 10 por producir bandas claras, diferenciables y reproducibles (Clark y Lanigan 1993). Los RAPD's (Williams *et al.* 1990) fueron generados en un volumen total de reacción de 25 ul. que consistieron de 10 ng de ADN genómico, 1X buffer de PCR sin cloruro de magnesio Gibco BRL (200mM Tris-HCl (pH 8.4), 500mM KCl); 2mM MgCl₂, 0.1mM de cada nucleótido dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Pharmacia), 0.2 uM del oligonucleótido (Operon) y 1.5 unidades de Taq DNA polimerasa (Gibco BRL). Las reacciones fueron amplificadas en un termociclador PTC-100 MJ Research, Inc.). El programa utilizado fue: 45 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min a 38°C, 30 seg. a 54°C, 2 min. a 72°C y una extensión final de 13 min. a 72°C.

Los productos amplificados fueron separados por tamaños en geles de agarosa al 1.4% con buffer 0.5X TBE corridos a 150 v por 3 hrs.. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio, se visualizaron con luz ultravioleta y se fotografiaron usando película Polaroid 667 blanco y negro. Se utilizó el marcador de peso molecular 1 Kb (Gibco BRL) en todos los geles.

Registro de datos. Una banda es definida aquí como un producto o fragmento amplificado de un tamaño particular, que puede ser identificado repetidamente. Las bandas fueron

identificadas por sus pesos moleculares con respecto al marcador de peso molecular 1 Kb en cada gel. Cada banda fue registrada como presente (1) o ausente (0). Los individuos que no dieron bandas claras, definidas y fácilmente registradas para el 90% o más del número total de bandas, no fueron incluidas en el análisis. Las bandas que no eran claras en un individuo fueron registradas como datos perdidos (missing data). Se asumió que cada banda se considera como un locus independiente con dos alelos (presencia, ausencia).

Análisis estadístico. Se efectuaron correlaciones pareadas de rangos de Spearman entre las bandas obtenidas con el fin de asegurar que un solo locus fuera muestreado, las bandas que formaron grupos de correlación perfecta (1 o -1) fueron eliminadas, salvo uno que representaba al grupo (Whitkus *et al.* 1998). Las bandas de RAPD's son típicamente heredadas de forma mendeliana y dominante (Williams *et al.* 1990), y existen varios métodos para calcular la diversidad genética. Suponiendo que los loci de RAPD's están en equilibrio Hardy-Weinberg, se pueden estimar las frecuencias de los dos alelos (presencia vs. ausencia) para las poblaciones. Se pueden calcular además las estadísticas estándar de la genética de poblaciones, aunque los RAPD's tienden a producir resultados sesgados (Lynch y Milligan 1994). Un análisis de varianza (AMOVA) de las frecuencias de las bandas puede asignar la estructura genética de poblaciones diploides en equilibrio Hardy-Weinberg o con un nivel alto de autofecundación (Steward y Excoffier 1996).

Una alternativa para estimar la diversidad genética sin la suposición de un equilibrio Hardy-Weinberg es calcularla con base en los fenotipos de las bandas y suponer que la estimación resultante de la diversidad fenotípica se aproxima a la diversidad genética (Lewontin 1972, King y Schaal 1989, Whitkus *et al.* 1998).

En el presente estudio se utilizó este último enfoque, la diversidad de las bandas de RAPD's dentro y entre poblaciones, se calculó con el índice de diversidad de Shannon-Weaver, usando la fórmula de Brillouin para eliminar el sesgo de tamaños de muestra finitas (Peet 1974). Para cada banda: $H = (1/N) \sum_{i=1}^k (n_i / N) \ln (N / n_i)$, donde N es el número total de individuos registrados para la banda, y n_i es el número de individuos en la categoría alternativa de bandas (n presente + n ausente = N). Estos cálculos se hicieron utilizando el programa RAPDDIV escrito por el Dr. Richard Whitkus (UCR).

La diversidad fue estimada para la diversidad en cada una de las poblaciones (H_p), la diversidad total de la muestra (H_T), la diversidad entre las poblaciones ($H_T - \bar{H}_p$), la proporción de la diversidad dentro de las poblaciones (\bar{H}_p / H_T) y finalmente la proporción de la diversidad entre las poblaciones ($(H_T - \bar{H}_p) / H_T$). La contribución relativa de cada población a la diversidad total fue calculada mediante el cociente

$$H_p / H_T.$$

La proporción de la diversidad entre las poblaciones $(H_T - \bar{H}_p) / H_T$ es un estimado equivalente al cálculo de la diferenciación entre las poblaciones G_{ST} . G_{ST} es equivalente a F_{ST} (Pérez 1990). La significancia de la diferenciación entre las poblaciones (G_{ST}) fue probada por calcular $X^2 = 2 N F_{ST} (k - 1)$, donde los grados de libertad están dados por $(k - 1)(s - 1)$, y donde k = al número de alelos por locus, s = al número de poblaciones, y N = tamaño total de la muestra (King y Schaal 1989). El flujo génico se estimó con $Nm = (0.5 (1 - G_{ST}) / G_{ST})$ (McDermott y McDonald 1993 en Yeh *et al.* 1997).

Para la reconstrucción de las relaciones de las poblaciones se generó una matriz de similaridad utilizando el coeficiente de DICE (Sokal y Michener 1958), posteriormente se agruparon mediante un UPGMA y se generó un dendograma utilizando el programa estadístico NTSYS-pc (Rohlf 1993). Además se realizó otro análisis de agrupamiento convirtiendo los fenotipos de bandas para cada individuo en una secuencia de dinucleótidos de a para la banda presente y t para la banda ausente. Esta conversión nos permitió importar los datos en el programa MEGA (Laurent *et al.* 1993) y calcular las distancias genéticas entre los individuos como una proporción de "a"s y "t"s compartidas sustraídas de 1. Se usaron distancias pareadas para construir un dendograma UPGMA y un árbol de Neighbor-joining y 1000 repeticiones de Bootstrap sobre los fenotipos de bandas de los datos originales para proporcionar valores de apoyo de las ramas en el árbol (Whitkus *et al.* 1998).

RESULTADOS

Obtuvimos 76 bandas de diferente peso molecular con 10 oligonucleótidos para 31 individuos (Tabla 1). Los datos perdidos (missing data) registrados fueron 54 de un total de 2356 (2.29% del total). La correlación de rangos de Spearman redujo el número de loci a 62, con ellos se calculó el número de loci polimórficos, el porcentaje de polimorfismo para cada subpoblación (Tabla 2).

Tabla 1. Oligonucleótidos (primer's) utilizados en el análisis de RAPD's para detectar polimorfismos en *T. hastifer* y bandas amplificadas.

Primer	Secuencia	No. bandas Amplificadas	No. bandas polimórficas	No. bandas monomórficas
OPA01	CAGGCCCTTC	12	11	1
OPA02	TGCCGAGCTG	8	6	2
OPA04	AATCGGGCTG	8	7	1
OPA05	AGGGGTCTTG	8	5	3
OPA06	GGTCCCTGAC	9	9	0
OPA10	GTGATCGCAG	6	5	1
OPA11	TTGGTACCCC	6	4	2
OPA12	TCGGCGATAG	10	7	3
OPA14	TCGTGCTGG	6	4	2
OPA15	TTCCGAACCC	3	2	1
Total		76	60	16

Tabla 2. Polimorfismos detectados en tres subpoblaciones de *T. hastifer* en Querétaro, México basados en 62 loci.

ID = subpoblaciones, n = tamaño de muestra, P = porcentaje de polimorfismo

L = No. de loci polimórficos

Subpoblación	altitud (msnm)	ID	n	L	P (%)
1. Kinder	1940	1	11	45	72.58
2. Cañada	2035	2	10	49	79.03
3. Cerro	1934	3	10	57	91.94

N= 31 L total = 60

La diversidad genética basada en el índice de Shannon-Weaver promediada para las tres poblaciones de *T. hastifer* fue de 0.1492. Los niveles de polimorfismo de bandas de RAPD fueron más bajos en la población No. 1 y los más altos en la población No. 3 (Tabla 3.). Un patrón similar se detectó en el número de loci polimórficos y el porcentaje de polimorfismo. La contribución relativa de la población No. 3 al total de la diversidad fue de cerca del 85 %. Mientras que para las otras dos fueron del 65 % y 72 % respectivamente. Todo lo anterior indica que la población No. 3 es la más diversa.

La mayor diversidad fue encontrada dentro de las poblaciones con el 73 % de la diversidad total mientras que el restante 27 % se debió a diferencias entre las poblaciones (Tabla 3.). Debido a que el cálculo de la proporción de la diversidad entre las poblaciones es equivalente al cálculo de G_{ST} utilizado por Linhart *et al.* (1981) y por Nei (1987) (Pérez 1990), y F_{ST} es equivalente a G_{ST} , al probar la significancia de ésta última indicó una diferencia significativa entre las poblaciones ($X^2 = 16.48$, 2 g.l., $P < 0.001$).

En el caso de la estructura espacial de las poblaciones se estimó una tasa efectiva de migración o flujo génico (Nm) de 1.38 individuos por generación entre las poblaciones (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de la diversidad dentro y entre las 3 subpoblaciones de *T. hastifer* en Querétaro, México basados en 62 loci de RAPD's.

ID	H_p	H_p / H_T	$H_T - \bar{H}_p$	\bar{H}_p / H_T	$(H_T - \bar{H}_p) / H_T$
1	0.1306	0.6449			
2	0.1453	0.7175			
3	0.1718	0.8486			
	$\bar{H}_p = 0.1492$		0.053254	0.737056	0.265914
	$H_T = 0.202529$				
	$G_{ST} = 0.265914 *$				
	$Nm = 1.38$				

* $P < 0.001$

Las relaciones genéticas de los individuos de las tres poblaciones de *T. hastifer* se resumieron en tres dendogramas; el primero está basado en el coeficiente de similitud de

DICE generado con el análisis de agrupamiento UPGMA (Ntsys) (Fig. 2). Los otros dos están basados en distancias pareadas (pair-wise) generados con el programa MEGA, uno es un UPGMA (Fig. 3) y el último es un árbol de neighbor-joining. (Fig. 4).

En todos los dendogramas, el análisis reveló un grupo constante, este fue la subpoblación No. 1 que se situó en un solo clado excepto por 3 individuos (los individuos 1, 4 y 11) pertenecientes a esa población que tuvieron un mayor grado de similitud con individuos de las poblaciones 2 y 3.

Las poblaciones 2 y 3 no formaron un solo grupo cohesivo en ningún análisis de UPGMA (Figs. 2 y 3). En ambos casos no parecen formarse clados para cada población sino más bien los individuos de estas 2 poblaciones parecen estar mezclados, es decir que pareciera que comparten un grado de similitud mayor en comparación con la población No. 1. No obstante se formó un clado cohesivo con 3 individuos de la población No. 3 (individuos 24, 27 y 30), éstos individuos parecen estar bien diferenciados del resto de su población. El análisis situó a otro clado diferenciado de 4 individuos de la población No. 3 (individuos 23, 25, 26 y 28) muy cerca de otro grupo cohesivo formado por individuos de la población No. 2 (14, 20 y 18). Los individuos 12, 13, 16 y 17 de la población No. 2 formaron un grupo cohesivo entre sí pero unido a un grupo constante formado por 2 individuos de la misma población 2 (15 y 19) que en todos los análisis aparecieron con un alto grado de similitud con un individuo perteneciente a la población No. 3 (individuo 29), éste individuo parece ser genéticamente similar al individuo número 15 de la población 2. Este no fue el único caso de similitudes compartidas entre individuos pertenecientes a poblaciones distintas, el análisis también reveló un clado constante formado por el individuo número 21 y el individuo número 31 pertenecientes a las poblaciones No. 2 y No. 3 respectivamente (Figs. 2 y 3 ver valores de apoyo de bootstrap). Estos dos casos nos revelan nuevamente que las poblaciones 2 y 3 parecieran tener un alto grado de similitud entre sí (Fig.3). Sin embargo, al probar la significancia de G_{ST} entre éstas dos poblaciones, resultó que si hay diferencias significativas entre ellas ($X^2 = 7.51$, $P < 0.01$) esto coincide claramente con lo mostrado en el árbol de neighbor-joining (Fig.4.). En él se situó a las 3 poblaciones de *T. hastifer* en tres grupos claramente diferenciados al contrario de lo mostrado en los análisis de UPGMA. No obstante, hubo 2 casos en los que se encontró a individuos de las tres poblaciones compartiendo similitudes altas y nuevamente fueron los

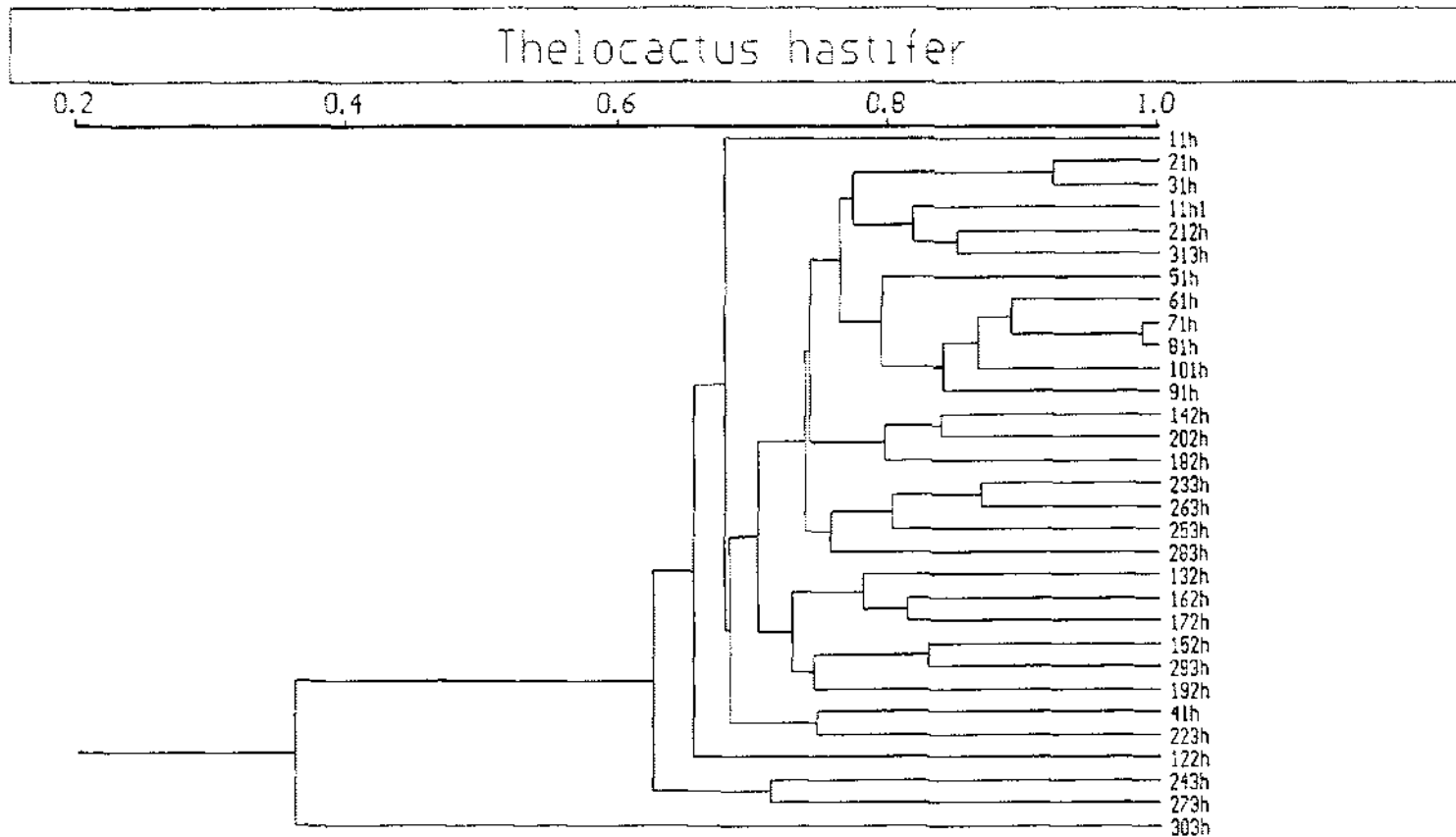


Fig. 2. Dendograma de UPGMA (Ntsys) de 3 poblaciones de *T. hastifer*

individuos 15 y 29 y 21 y 31 anteriormente descritos. En el caso del clado formado por los individuos 15 y 29 el valor de apoyo de bootstrap fue del 35 % y en el clado formado por los individuos 21 y 31 fue del 46 % (Fig. 4.).

Como se mostró en esta construcción de las relaciones genéticas mediante neighbor-joining realmente las poblaciones están diferenciadas ($G_{ST} = 0.2659$, $P < 0.001$).

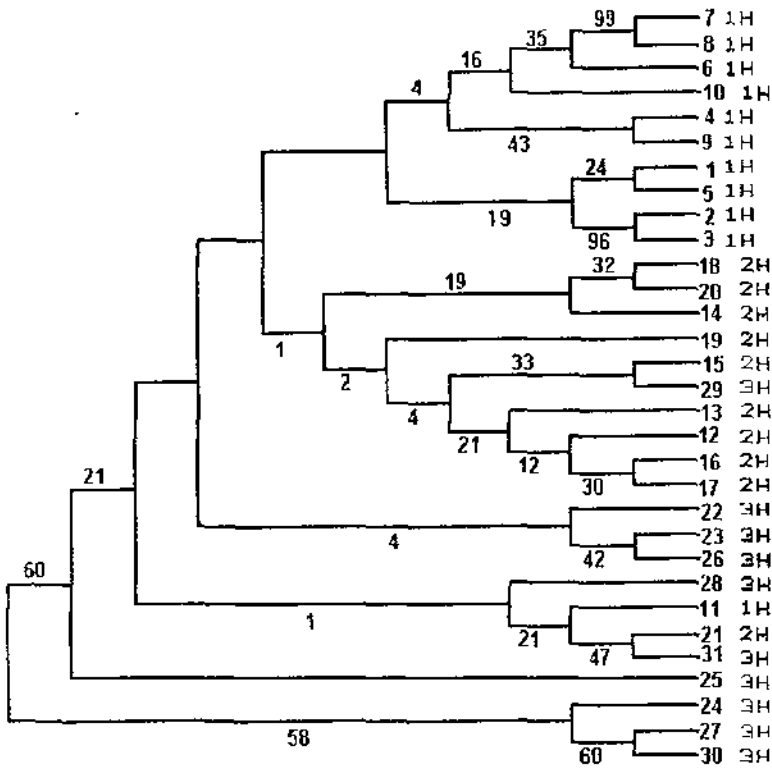


Fig. 4 Arbol no enraizado de neighbor-joining de *Thelocactus hastifer* población kinder (1H), población cañada (2H), población cerro (3H).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Diversidad Genética

La teoría genética predice que los niveles de variación genética se incrementan con el tamaño de la población efectiva. Esta hipótesis conduce entre otras predicciones a las siguientes: 1) especies ampliamente distribuidas deben tener mayor variación genética que especies de distribución restringida, 2) especies amenazadas deben tener menor variación genética que especies no amenazadas (Frankham 1996). Además, una generalización de la literatura de aloenzimas es que especies de plantas endémicas tienen menor variación genética que especies de mayor distribución. Pequeñas poblaciones endémicas a menudo pierden variación genética por deriva génica. Así en algunos casos, tamaños poblacionales actuales pueden estar estrechamente asociados con sus niveles de variación genética (Hamrick y Godt 1996). Las generalizaciones de la literatura de aloenzimas pueden usarse para predecir los niveles y la distribución de la diversidad genética en especies no estudiadas pero (aunque no en todos los casos) la exactitud de tales predicciones es baja como veremos más adelante. Estimaciones de alta diversidad genética entre especies con características similares de historia de vida, indudablemente se debe en parte a las historias filogenéticas, biogeográficas y evolutivas de las especies en particular puesto que el nivel de variación genética dentro de una especie representa el balance entre mutación, deriva génica y selección natural (Hamrick y Godt 1996, Frankham 1996).

Existen algunas especies en donde la variación detectada con enzimas es poca o nula y utilizando RAPD's se ha podido detectar polimorfismos y describir su estructura genética (Mosseker *et al.* 1992). Este es el caso de especies clonales, raras o de distribución

muy restringida o que han experimentado disminuciones drásticas en su distribución y abundancia (Karron 1987, Gustafsson y Gustafsson 1994, Rosseto *et al.* 1995, Stewart y Porter 1995, Friar *et al.* 1996, Tuskan *et al.* 1996). El caso de una especie rara en donde se encontró un nivel de variación menor que el de otros géneros endémicos de la misma región es *Lactoris fernandeziana* (Brauner *et al.* 1992). Esta planta es extremadamente rara y los análisis aloenzimáticos no revelaron variación genética (Crawford *et al.* 1991). En cambio usando RAPD's para esta misma especie (Brauner *et al.* 1992) el polimorfismo se detectó con 16 oligonucleótidos que produjeron 106 bandas de las cuales 26 fueron polimórficas para un total de 27 plantas.

Otro caso interesante es el estudio de *Allium naseae* (Alliaceae), una especie endémica de distribución restringida, en donde se detectaron niveles de variación genética con RAPD's comparables a especies de distribución amplia (Smith y Pham 1996). En otro estudio utilizando aloenzimas y RAPD's se examinó la diversidad genética de *Wyethia bolanderi* una especie endémica que tiene poblaciones grandes y la de su congénere también endémico *W. reticulata* que tiene tamaños poblacionales pequeños, y se encontró que *W. bolanderi* tuvo mayor diversidad genética (0.38) mientras que *W. reticulata* tuvo menor diversidad genética (0.28). Además, *Wyethia reticulata* mostró mayor diversidad entre sus poblaciones $F_{ST} = 0.25$ y *W. bolanderi* registró una $F_{ST} = 0.07$ (Ayres y Ryan 1999).

En el presente estudio los niveles de variación genética encontrados en los individuos de las tres poblaciones de *T. hastifer* ($H_T = 0.20$) son elevados en comparación con los reportados para otras especies endémicas mediante el uso de dos tipos de marcadores moleculares, aloenzimas y RAPD's (Tabla 4.). Además, si comparamos los resultados de la diversidad genética de *T. hastifer* con los obtenidos para su congénere de distribución mucho más amplia *T. tulensis* ssp. *tulensis* (ver capítulo 2) examinados con RAPD's también, encontramos que su nivel de diversidad genética fué menor ($H_T = 0.16$), contradiciendo lo esperado teóricamente.

En los estudios comparativos de congéneres de distribuciones estrechas y amplias se han encontrado diferencias más marcadas entre ellos (Tabla 4., Ayres y Ryan 1999, Hamrick y Godt 1996), aunque también se ha encontrado que pares de congéneres mantienen niveles

comparables de diversidad genética (Linhart y Premoli 1993, Purdy y Bayer 1996, Young y Brown 1996).

Como se ha mostrado existen varios casos en la literatura y como lo prueba este estudio en donde plantas raras o endémicas con distribuciones restringidas muestran mayor variación que sus congéneres con distribuciones más amplias. Estos resultados van en contra de lo esperado teóricamente por lo que resulta interesante la exploración de hipótesis alternativas. Fenómenos tales como procesos de especiación recientes, y cambios recientes en los patrones de distribución geográfica (Karron 1987, 1991); múltiples efectos de colonización (Ranker 1994) o refugios del Pleistoceno (Lewis y Crawford 1995) han sido planteados en la literatura.

En el caso de *T. hastifer* el nivel de variación genética es alto en consideración con el tamaño de las poblaciones y sugiere que la longevidad de la especie contribuye al mantenimiento de la diversidad. El tamaño de algunos individuos de *T. hastifer* conjuntamente con su lento crecimiento observado en el campo y en invernadero (Pilbeam 1996) sugiere que algunos individuos son extremadamente viejos. La deriva génica ocurrirá efectivamente sólo tras la muerte de la generación parental; por consiguiente, el mantenimiento de los relativamente altos niveles de variación genética pueden esperarse en poblaciones de individuos de vida larga, como es el caso de *T. hastifer*. Conclusiones similares han sido propuestas con respecto a la estructura de la población de *Erythronium propullans*, una especie clonal, endémica y de distribución restringida (Pleasants y Wendel 1989).

Tabla 4. Diversidad genética y estructura poblacional de especies endémicas y sus congéneres de distribución más amplia derivada de la literatura de aloenzimas y RAPD's.

Especie	H _T	F _{ST}	G _{ST}
Endémica			
<i>Wethia reticulata</i>	0.28	0.25	-----
<i>Achillea millefolium megacephala</i>	0.13	-----	0.08
<i>Aletes humilis</i>	-----	0.22	0.20
<i>Asclepias texana</i>	0.07	-----	0.07
<i>Daviesia suaveolens</i>	0.32	0.12	-----
<i>Echinacea tennesseensis</i>	0.07	0.09	-----
<i>Erythronium propullans</i>	0.18	-----	0.33
<i>Rhus michauxii</i>	0.10	-----	0.34
<i>Salix silicifolia</i>	0.11	0.16	0.16
<i>Stellaria arenicola</i>	0.09	-----	0.10
Distribución más amplia			
<i>W. bolanderi</i>	0.38	0.07	-----
<i>A.m. lanulosa</i>	0.12	-----	0.30
<i>A. acaulis</i>	-----	0.36	0.28
<i>A. perennis</i>	0.08	-----	0.08
<i>D. numisoides</i>	0.38	0.11	-----
<i>E. angustifolia</i>	0.16	0.07	-----
<i>E. albidum</i>	0.42	-----	0.02
<i>R. glabra</i>	0.23	-----	0.20
<i>R. copalina</i>	0.29	-----	0.30
<i>Salix alaxensis</i>	0.22	0.10	0.10
<i>S. longipes</i>	0.10	-----	0.18
Endémicas	0.10	-----	0.25 *
Endémicas	0.096	-----	0.248 **
Regionales	0.15	-----	0.216 **
Regionales	0.15	-----	0.22 *
Distrib. Amplia	0.202	-----	0.210 **

* Ayres y Ryan 1999

** Hamrick y Godt 1996

Flujo Génico

El análisis genético usando RAPD's proporciona estimaciones indirectas de flujo génico. La diferenciación entre las poblaciones de *T. hastifer* medida como G_{ST} fue de 0.2659 altamente significativa (P < 0.001) lo que indica que las subpoblaciones de *T.*

hastifer están genéticamente diferenciadas. Este resultado concuerda con los encontrados por Hamrick y Godt (1996) con respecto a especies de distribuciones geográficas amplias y restringidas. Ellos registraron que la diferenciación genética entre poblaciones (G_{ST}) de especies endémicas fue similar a aquellas que se encontraron entre poblaciones de especies con distribución más amplia. También concuerda con los resultados registrados para *W. reticulata* ($F_{ST} = 0.25$, Tabla 4) (Ayles y Ryan 1999) y algunas otras especies endémicas. Estos resultados ilustran una dificultad en la interpretación de tales datos. Debido a que la diferenciación entre las poblaciones se supone que es una función del flujo génico entre poblaciones (Slatkin y Barton 1989), la heterogeneidad interpoblacional debería reflejar aislamiento y escala espacial (Hamrick y Godt 1996).

En el presente estudio se registró un número de migrantes por generación (Nm) de 1.38 individuos por generación que es un valor intermedio y que está dentro del rango reportado para *W. reticulata* y *W. bolanderi* (Ayles y Ryan 1999). Desafortunadamente, no existen trabajos sobre la biología reproductiva de *T. hastifer* y a pesar de que no se ha documentado su tipo de polinización parece ser que se trata de polinización entomófila (Hernández com.pers.). No obstante se puede suponer que si $Nm = 1.38$ individuos por generación deben existir un mayor número de subpoblaciones de *T. hastifer* y no sólo las encontradas en este estudio. Y por el tipo y la morfología de la flor también se puede suponer que probablemente pudieran ser polinizadas por abejas. Estas flores tienen sólo un período de floración al año y esta ocurre en primavera (obs. personal). Se ha documentado que restricciones temporales en la floración, limitaciones en la producción de semillas así como la baja supervivencia de las plántulas podrían reducir la oportunidad del flujo génico entre las poblaciones y resultar en la divergencia genética de las poblaciones como en el caso de *T. hastifer*. El análisis de la similitud genética revelada por el árbol de neighbor-joining apoya esta conclusión. Del mismo modo el crecimiento clonal de *T. hastifer* puede reducir las tasas de flujo génico. Los clones grandes pueden dominar reproductivamente dentro de una población y reducir la diversidad genética del polen exportado a otras poblaciones.

Análisis Fenético

En los dos análisis de agrupamiento UPGMA realizados en los individuos de las 3 poblaciones de *T. hastifer* se formó un conjunto cohesivo que agrupó a los individuos de la población No. 1 en un solo clado (Figs. 2 y 3) concordando con el clado formado por esa misma población en el análisis de neighbor-joining (Fig.4). Sin embargo, los dendogramas generados mediante UPGMA no mostraron que las otras dos poblaciones de *T. hastifer* formaran grupos claramente diferenciados, sino por el contrario, se observó que las poblaciones 2 y 3 presentaron un grado de similitud mayor entre sí de manera gráfica que no coincide con la diferenciación G_{ST} discutida anteriormente. No obstante, al realizar el análisis de diversidad genética de Shannon-Weaver y calcular G_{ST} sólo para las subpoblaciones 2 y 3, resultó que efectivamente existe una diferenciación significativa ($X^2 = 7.51, P < 0.01$) entre esas 2 subpoblaciones, lo que coincide claramente con lo mostrado en el árbol de neighbor-joining (Fig. 4).

De todo lo anterior se puede concluir que probablemente en el pasado, las 3 subpoblaciones de *T. hastifer* analizadas aquí, formaban una sola población pero debido a la formación de un asentamiento humano que actualmente las separa por medio de caminos y una cañada de riego, esa población que probablemente fue continua, actualmente se esté comenzando a diferenciar como lo muestran nuestros resultados, a pesar de que sí se sigue manteniendo un moderado flujo génico entre ellas.

La longevidad de *T. hastifer* así como la probable dominancia de individuos muy longevos probablemente han permitido mantener los altos niveles de diversidad genética encontrados en esta especie endémica y amenazada a pesar de sus pequeños tamaños poblacionales.

LITERATURA CONSULTADA

- Amos, B. and Hoelzel, R. 1992. Applications of molecular genetic techniques to the conservation of small populations. *Biol. Cons.* **61**: 133-144.
- Anderson, E.F. 1987. A revision of the genus *Thelocactus* B. & R. (Cactaceae). *Bradleya* **5**: 49-76.
- Anónimo. 1990. Appendices I, II and III to the Convention on International trade in endangered species of wild fauna and flora (CITES). U.S. Fish and Wildlife, U.S. Department of the Interior. Washinton, D.C. 25 pp.
- Ayres, D.R. and Ryan, F.J. 1999. Genetic diversity and structure of the narrow endemic *Wyethia reticulata* and its congener *W. bolanderi* (Asteraceae) using RAPD's and allozyme techniques. *Am. J. Bot.* **86** (3): 344-362.
- Brauner, S., Crawford, D.J. and T.F. Stuessy. 1992. Ribosomal DNA and RAPD variation in the rare plant family Lactoridaceae. *Am. J. Bot.* **79**: 1436-1439.
- Britton, N.L. and J.N. Rose. 1922. Two genera of Cactaceae. In *Bull. Torrey Bot. Club* **49**: 251-252.
- Britton, N.L. and J.N. Rose. 1923. The Cactaceae. 4. Carnegie Inst. Washington, Washington, D.C.
- Clark, A.G. and C.M.S. Lanigan. 1993. Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPD's. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 1096-1111.
- Crawford, D.J., Wiens, D. and D.W. Haines. 1991. The Lactoridaceae on the Juan Fernández Islands: enzyme electrophoresis, a new observations on number and sizes of populations. *Am. J. Bot.* **78**: 176.
- de la Cruz, M., Ramírez, C. F. and H.M. Hernández. 1997. DNA isolation and amplification from cacti. *Plant. Mol. Biol. Rep.* **15**: 319-325.
- Falk, D.A. and K.E. Holsinger (eds.) 1991. Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press. New York pp. 283.
- Frankham, R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Cons. Biol.* **10** (6): 1500-1508.
- Franklin, I.R. 1980. Evolutionary change in small populations. In: Conservation biology: an evolutionary-ecological perspective. ed. M.E. Soulé and B.A.

- Wilcox. Pp. 135-155. Sinauer, Sunderland, Mass.
- Friar, E.A., Robichaux, R.H. and D.W. Mount. 1996. Molecular genetic variation following a population crash in the endangered Mauna Kea silversword, *Argyroxiphium sandwicense* ssp. *sandwicense* (Asteraceae). *Mol. Ecol.* **5**: 687-691.
- Gustafsson, L. and P. Gustafsson. 1994. Low genetic variation in Swedish populations of the rare species *Vicia pisiformis* (Fabaceae) revealed with RFLP (rDNA) and RAPD. *Plant Syst. Evol.* **189**: 133-148.
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., Muraski, D.A. and M.D. Loveless. 1991. Correlations between species traits and allozyme Diversity: Implications for Conservation Biology. In: D.A. Falk and K.F. Holsinger (eds.) Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press. New York, New York. U.S.A. pp.75-86.
- Hamrick, J.L. and M.J.W. Godt. 1996. Conservation genetics of endemic plant species. In: J.C. Avise and J.L. Hamrick (eds.) Conservation Genetics. Case histories from nature. Chapman and Hall, New York, Ny. Pp. 281-304.
- Hernández, H.M. and R.T. Bárcenas. 1996. Endangered cacti in the Chihuahuan desert II. Biogeography and conservation. *Cons. Biol.* **10** (4): 1200-1209.
- Hernández, H.M. and H. Godínez. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas Mexicanas amenazadas. *Acta Bot. Mex.* **26**: 33-52.
- Hunt, D. 1992. CITES cactaceae checklist. Royal Botanical Gardens. Kew, Surrey. 190 pp.
- Karron, J.D. 1987. A comparison of levels of genetic polymorphisms and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners. *Evol. Ecol.* **1**: 47-58.
- Karron, J.D. 1991. Patterns of genetics variation and breeding systems in rare plant Species. In: D.A. Falk and K.E. Holsinger (eds.) Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press. New York, New York. U.S.A. pp.87
- King, L.A.M. and B.A. Schaal. 1989. Ribosomal-DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis*. *Evol.* **43**: 1117-1119.

- Lande, R. and G.F. Barrowclough. 1987. Effective population size, genetic variation, and their use in population management. In: M.E. Soulé Ed. Viable populations for management. Cambridge University Press. pp. 87-124.
- Laurent, V., Risterucci, A.M. and C. Lanaud. 1993b. Chloroplast and mitochondrial DNA diversity in *Theobroma cacao*. *Theor. Appl. Genet* **87**: 81-88.
- Lewis, P.O. and D.J. Crawford. 1995. Pleistocene refugium endemics exhibit greater allozymic diversity than widespread congeners in the genus *Polygonella* (Polygonaceae). *Am. J. Bot.* **82**: 141-149.
- Lewontin, R.C. 1972. The apportionment of human diversity. *Evol. Biol.* **6**: 381-398.
- Linhart, Y.B., Milton, J.B., Sturgeon, K.B. and M.L. Davis. 1981. Genetic variation in space and time in population of ponderosa pine. *Heredity* **46**: 407- 426.
- Linhart, Y.B. and A.C. Premoli. 1993. Genetic variation in *Aletes acaulis* and its relative, the narrow endemic *A. humilis* (Apiaceae). *Am. J. Bot.* **80**: 598-605.
- Lynch, M. and B.G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD's markers. *Mol. Ecol.* **3**: 91-99.
- Mosseler, A., Egger, K.N. and G.A., Hughes. 1992. Low levels of genetic diversity in red pine confirmed by random amplified polymorphic DNA markers. *Can. J. For. Res.* **22**: 1332-1337.
- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. New York, U.S.A.
- Peet, R.K. 1974. The measurement of species diversity. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **5**: 285-307.
- Pérez, N.N. 1990. Biología reproductiva y estructura genética de *Psychotria faxlucens* (Rubiaceae) en Los Tuxtlas, Veracruz. Tesis de Maestría. Fac. de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pilbeam, J. 1996. The locactus. The cactus file handbook 1. Cirio Publishing Services Ltd. Southampton UK. pp. 56.
- Pleasants, J. M. and J.F. Wendel. 1989. Genetic diversity in a clonal narrow endemic, *Erythronium propullans*, and its widespread progenitor, *Erythronium albidum*. *Am. J. Bot.* **76**: 1136-1151.
- Prior, K.A., Gibbs, H.L. and P.J. Weatherhead. 1997. Population genetic structure in the

- Black Rat Snake: Implications for management. *Cons. Biol.* 11 (5): 1147-1158.
- Purdy, B.G. and R.J. Bayer. 1996. Allozyme variation in the Athabasca sand dune endemic, *Salix silicola*, and the closely related widespread species, *Salix alaxensis*. *Syst. Bot.* 20: 179-190.
- Ranker, T.A. 1994. Evolution of high genetic variability in the rare Hawaiian fern and *Adenophorus periens* and implications for conservation management. *Biol. Cons.* 70: 19-24.
- Rohlf, F.J. 1993. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.80. Exeter Software, Setauket, N.Y.
- Rossetto, M., Weaver, P.K. and K.W. Dixon. 1995. Use of RAPD analysis in devising conservation strategies for the rare and endangered *Grevillea scapigera* (Proteaceae). *Mol. Ecol.* 4: 321-329.
- Schemske, D.W., Husband, B.C., Ruckelshaus M.H., Goodwillie C., Parker, I.M. and J.C. Bishop. 1994. Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants. *Ecol.* 75 (3): 584-606.
- Slatkin, M. and N.H. Barton. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evol.* 43: 1349-1368.
- Smith, J. F. and T.V. Pham. 1996. Genetic Diversity of the narrow endemic *Allium uuseae* (Alliaceae). *Am. J. Bot.* 83: 717-726.
- Snow, A.A. and P.G. Parker. 1998. Molecular markers for population biology. *Ecol.* 79 (2): 359-360.
- Sokal, R.R. and C.D. Michener. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin* 38: 1409-1438.
- Steward, C.N. Jr. and D.M. Porter. 1995. RAPD profiling in biological conservation: An application to estimating clonal variation in rare endangered *Iliamna* in Virginia. *Biol. Cons.* 74: 135-142.
- Steward, C.N. and L. Excoffier. 1996. Assessing population genetic structure and variability with RAPD data: application to *Vaccinium macrocarpon* (American Cranberry). *J. Evol. Biol.* 8: 153-171.
- Tuskan, G.A., Francis, K.E., Russ, S.L., Romme, W.H. and M.G. Turner. 1996. RAPD

- markers reveal diversity within and among clonal and seedling stands of Aspen in Yellowstone National Park, U.S.A. *Can. J. For. Res.* **26**: 2088-2098.
- Whitkus, R.M., De la Cruz, M., Mota-Bravo, L. and A. Gómez-Pompa. 1998. Genetic diversity and relationships of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Southern México. *Theor. Appl. Genet.* **96**: 621-627.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K. J. Rafalski, J.A. and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6531-6535.
- Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, B.J.T., Ye, Z.H. and J.X. Mao. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.
- Young, A.G. and A.H.D. Brown. 1996. Comparative population genetic structure of the rare woodland shrub *Daviesia suaveolens* and its common congener *D. mimosiodes*. *Cons. Biol.* **10**: 1220-1228.

CAPÍTULO 2

VARIACIÓN GENÉTICA REVELADA POR RAPD'S DE 3 SUBESPECIES ENDÉMICAS Y AMENAZADAS DE *Thelocactus tulensis* (Cactaceae)

INTRODUCCIÓN

Una meta de la biología de la conservación es preservar especies de la extinción. Las especies con niveles bajos de variabilidad genética son más vulnerables a los cambios ambientales y tienen una mayor riesgo de extinción que las especies que tienen una alta variabilidad genética (Barret y Kohn 1991, Huenneke 1991, Brussard y Ehrlich 1992). El conocimiento de la magnitud y los patrones de distribución de la variabilidad genética es considerado como parte necesaria del manejo de especies raras (Hamrick *et al.* 1991, Lande 1988). Fréville (*et al.* 1998) argumentó que con el fin de entender cómo las especies raras han llegado a serlo, sería útil estudiar la estructura poblacional de parientes de amplia distribución con poblaciones restringidas y diferenciadas geográficamente que tendrían mayor probabilidad de generar nuevas especies raras por aislamiento y adaptación local. Las decisiones de manejo pueden ser hechas por tomar en cuenta no sólo a las especies amenazadas o en peligro sino también tomando en cuenta algunas poblaciones de especies progenitoras de amplia distribución. Éstas últimas pueden ser consideradas como fuentes de nuevas especies o fuentes de variabilidad genética (a través de hibridización) para especies amenazadas o en peligro (Fréville *et al.* 1998).

Po otro lado, los estudios ecológicos y genéticos de poblaciones se complementan unos a otros, y sus contribuciones hacen posible que los biólogos de la conservación entiendan mejor la biología de especies amenazadas. Sin embargo, poco se conoce de la estructura genética de la mayoría de las especies de plantas y la información morfológica, fisiológica, reproductiva y demográfica no está disponible sobretudo para la mayoría de las especies amenazadas o en peligro de extinción (Hamrick y Godt 1996). Así muchos biólogos de la conservación han comenzado a usar marcadores bioquímicos y moleculares para describir la composición genética de las especies de plantas. Los criterios genéticos

obtenidos del estudio de marcadores moleculares pueden ser útiles para seleccionar poblaciones de vida silvestre como candidatos con prioridad para su conservación (Petit *et al.* 1998). Una de las metas de muchos programas de conservación, además de la preservación del hábitat, es mantener los niveles existentes de variación genética en especies que son raras o que están amenazadas (Fraenkel y Soulé 1981, Simberloff 1988 Barrett y Khon 1991). Tal es el caso de *Thelocactus tulensis*, que es una especie endémica de México y se distribuye al este del Desierto Chihuahuense en Nuevo León, Tamaulipas y San Luis Potosí, desde 22° 15' a 25° N y 99° 30' a 100° 55' W en elevaciones desde 750 a 1400 msnm. (Anderson 1987). Está considerada por la IUCN como vulnerable que es definida como la categoría donde los taxa se creó que se moverán a la categoría “en peligro” en un futuro cercano si los factores causales continúan operando. En ella se incluyen taxa que la mayoría o todas sus poblaciones están disminuyendo por sobre-explotación, destrucción extensa del hábitat u otros disturbios ambientales; taxa con poblaciones que han sido seriamente disminuídas y cuya seguridad no está asegurada; y taxa con poblaciones que todavía son abundantes pero están bajo amenaza por varios factores adversos en su hábitat (Walter y Gillet 1998 IUCN , Hernández y Godínez 1994). *Thelocactus tulensis* crece en suelos limosos y se describe como solitaria o cespitosa, de 2.5 a 25 cm de alto y 18 cm de diámetro con costillas presentes o ausentes según la subespecie, los tubérculos son muy variables en forma y tamaño, areolas de 2 a 9 mm de longitud y de 2 a 6 mm de ancho con un crecimiento parcialmente desarrollado, sin nectarios extraflorales (Anderson 1987, Pilbeam 1996). *Thelocactus tulensis* es una especie altamente variable e incluye 3 subespecies geográficamente distintas: subespecie *tulensis*, subespecie *buekii* y subespecie *matudae*. Estas subespecies tienen una distribución geográfica Norte-Sur a lo largo de la orilla oeste de la Sierra Madre Oriental dentro del Desierto Chihuahuense. La subespecie más sureña es la ssp. *tulensis* con distribución amplia y tamaños poblacionales grandes, la ssp. *buekii* apareciendo inmediatamente al norte su distribución es menos amplia y sus tamaños poblacionales son menores. Y la ssp. *matudae* se encuentre al norte de la ssp. *buekii* sólo en Nuevo León restringida a un pequeño valle y sus tamaños poblacionales son muy pequeños (hasta 10 plantas por población, observ. personal. (Fig. 5). En la caja 1 se presenta una breve descripción de cada subespecie.

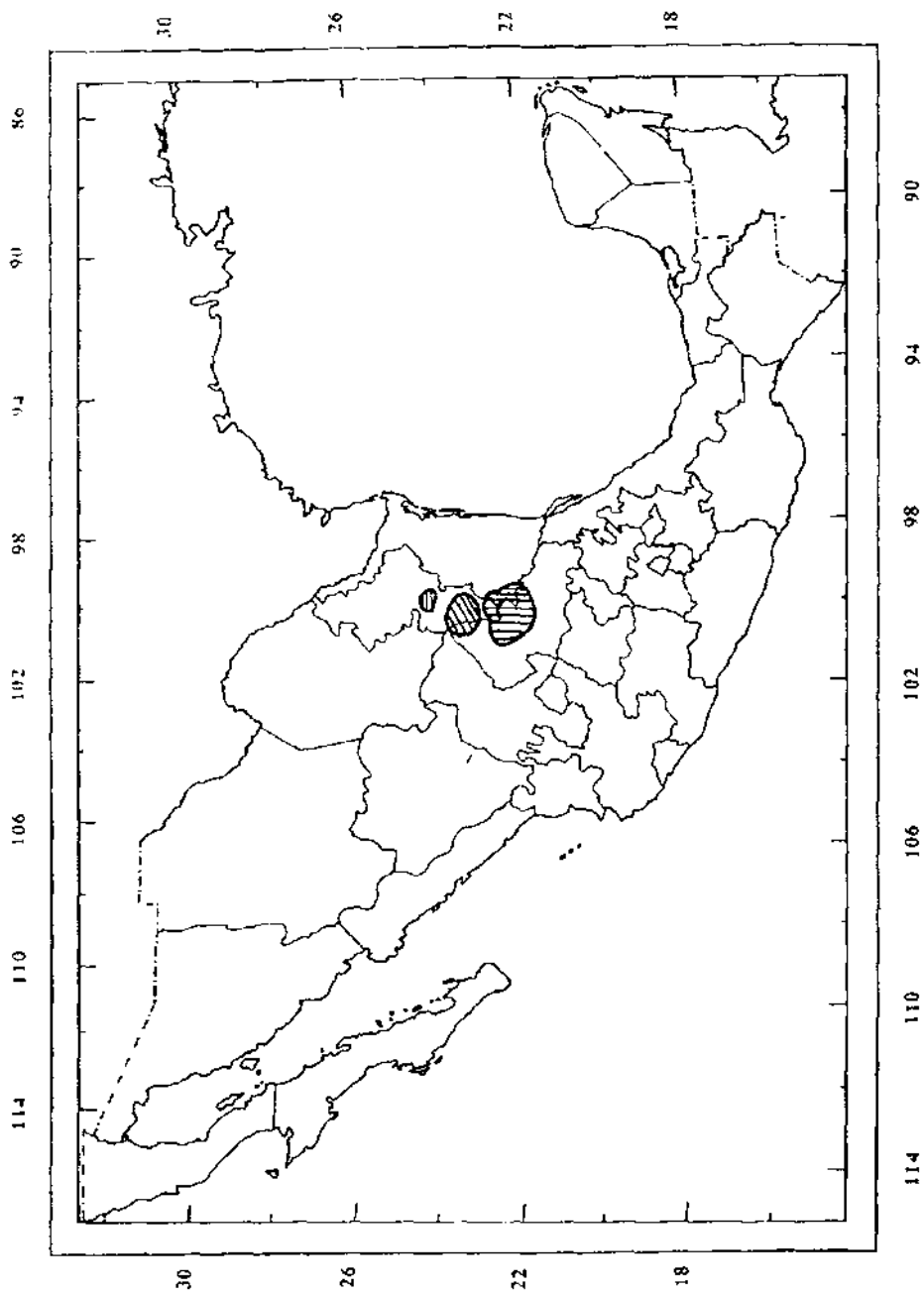


Fig. 5. Zona de distribución de *T. tulensis*, ssp. *matudae* (líneas horizontales), ssp. *baekii* (líneas diagonales), ssp. *tulensis* (líneas verticales). Tomado de Anderson 1987.

CAJA 1

T. tulensis ssp. *tulensis*

Se distribuye en San Luis Potosí y Tamaulipas (Fig. 5) en elevaciones de 1100 a 1400 msnm, se distingue de las otras subespecies porque tiene flores blancas rosáceas y a veces amarillas, costillas presentes, tubérculos de 10 a 12 mm de longitud, es globosa o elongada globosa, espinas centrales de 1 a 4 y espinas radiales de 5 a 12. Hernández y Godínez (1994) la incluyeron en la categoría 3 del estado de conservación de cactáceas amenazadas, en esta categoría se encuentran plantas que tienen de 6 a 10 localidades conocidas además de la localidad tipo (Fig. 6).

T. tulensis ssp. *buekii*

Se distribuye en San Luis Potosí y Nuevo León (Fig. 5) en elevaciones de 1200 a 1800 msnm, se distingue de las otras subespecies porque presenta flores magenta-púrpura de 3.5 a 4.5 cm de diámetro, costillas pobremente desarrolladas o ausentes, tubérculos cónicos, es globosa o subglobosa, a veces de color rojizo, tiene de 1 a 4 espinas centrales y de 4 a 5 (raramente 8) espinas radiales. Hernández y Godínez (1994) la incluyeron dentro de la categoría 2 del estado de conservación de cactáceas amenazadas; en esta categoría se encuentran plantas que tienen distribuciones muy restringidas pero que se conocen de otras áreas además de la localidad tipo (máximo 5 localidades) (Fig. 7).

T. tulensis ssp. *matudae*

Esta es la subespecie más noroeste de la distribución de la especie, aparentemente restringida al Valle de Rayones en Nuevo León en elevaciones de 800 a 1000 msnm. Presenta flores magenta más grandes (7.5 a 8 cm de diámetro), costillas indistintas, tubérculos altamente variables, cónicos que llegan a parecer costillas. Es globosa y tiene 3 a 7 espinas centrales y de 7 a 12 espinas radiales; es especialista edáfica en suelos de tipo "gypsum" (Pulbeam 1996). Hernández y Godínez (1994) la incluyeron en la categoría 1 del estado de conservación de cactáceas amenazadas, en esta categoría se encuentran especies con áreas de distribución extremadamente restringida (Fig. 8).

Como se mencionó anteriormente. Las evaluaciones de la estructura y diversidad genética pueden ser de gran valor en la formulación de planes de manejo para especies amenazadas (Prior *et al.* 1997). Para propósitos de conservación, la información puede obtenerse por determinar el nivel y la distribución de la variación genética por características morfométricas y fisiológicas, por loci detectados con aloenzimas y secuencias de ADN. Sin embargo, muy pocas especies amenazadas o en peligro han sido estudiadas y los recursos para tales estudios son frecuentemente limitados (Hamrick *et al.* 1991). Todas las especies sean raras o comunes, tienen un perfil genético único que define

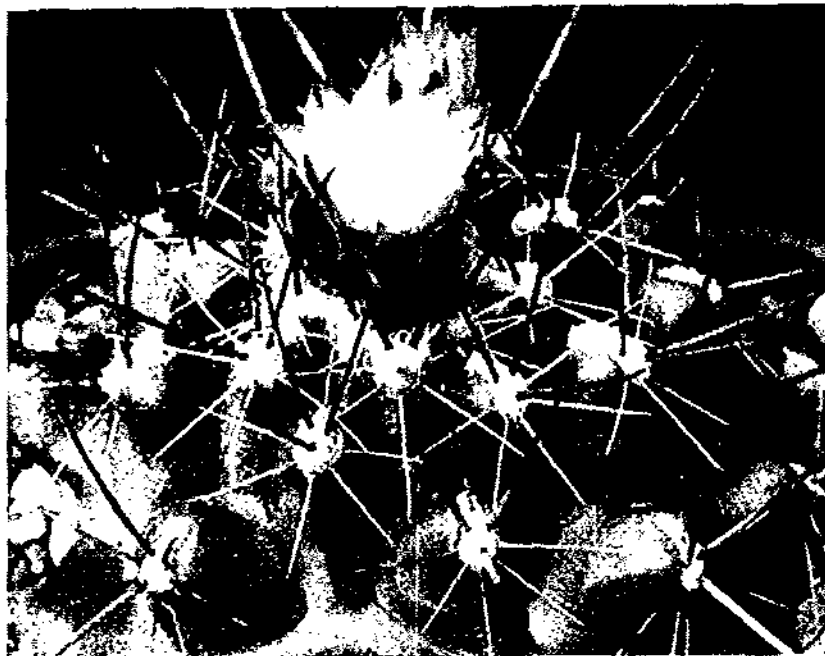


Fig. 6. Planta de *T. tulensis* ssp. *tulensis*

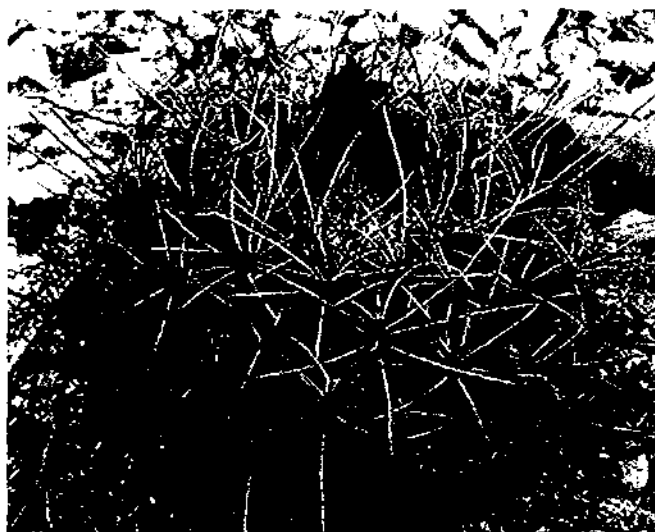


Fig. 7. Planta de *T. tulensis* ssp. *buekii*

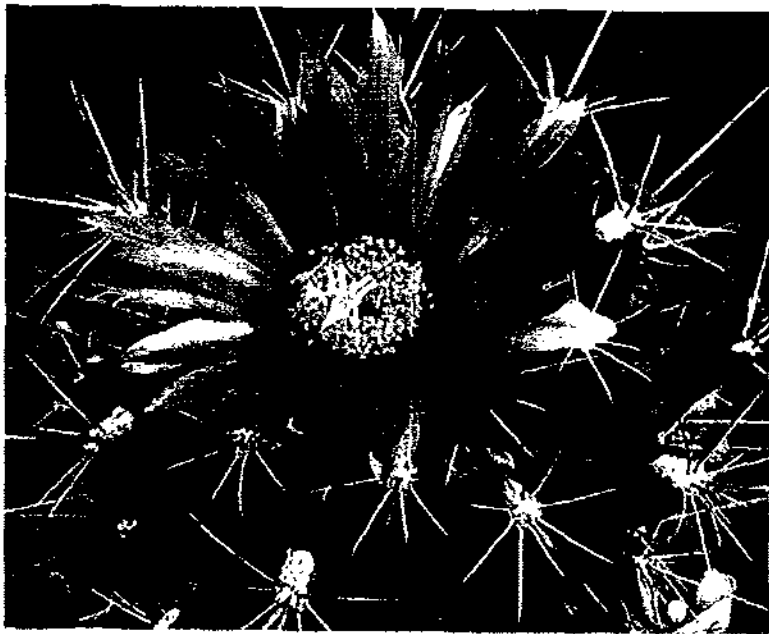


Fig. 8. Planta de *T. tulensis* ssp. *matudae*

la estructura jerárquica de la variación o la arquitectura genética de sus características. La existencia de niveles intraespecíficos de variación tiene profundas implicaciones para la conservación de las especies. En cada nivel, la variación puede afectar la adecuación y viabilidad. A nivel de individuos, la pérdida de variación puede conducir a depresión por *endogamia*; a nivel de poblaciones donde la variación se relaciona a menudo con la adaptación a ambientes locales, la reducción de la variación puede disminuir las oportunidades de la población a adaptarse a condiciones cambiantes. A nivel de especies, la pérdida de diversas poblaciones reduce el potencial de las especies para responder a cambios ambientales en escalas regionales y globales (Millar y Libby 1991). La distribución y las cantidades de diversidad genética dentro y entre poblaciones de plantas raras son probablemente dependientes de si una especie ha sido siempre rara o si recientemente ha llegado a serlo como resultado de la influencia humana (Barret y Kohn 1991). Muchas especies de plantas raras probablemente mantienen cantidades considerables de variación genética ecológicamente significativa. No obstante, Karron (1991) sugirió que muchas especies raras localmente comunes son genéticamente menos diversas que sus congéneres de mayor distribución, aún si son localmente comunes. Como Barret y Kohn (1991) puntualizaron, tamaños poblacionales pequeños incrementan la probabilidad de cuellos de botella poblacionales. Como un resultado se puede esperar que las plantas raras tengan menos diversidad genética que las comunes (Holsinger y Gottlieb 1991).

Bajo este contexto, se elaboró el presente estudio con el fin de determinar los niveles existentes de variación genética intra e inter poblacional de cada una de las 3 subespecies de *T. tulensis* y detectar la variación genética dentro y entre las subespecies utilizando los marcadores moleculares denominados RAPD's.

MATERIALES Y MÉTODOS

Trabajo de campo

Se muestreó a lo largo del rango de coordenadas de la distribución de cada subespecie de *T. tulensis* con el fin de ubicar y encontrar poblaciones diferentes de cada una de las subespecies. Se colectaron 5 poblaciones de cada subespecie con 10 individuos por población. En total se analizaron 50 individuos de cada subespecie dando un total de 150 individuos analizados

De cada subespecie se eligió un ejemplar representativo por población y fueron depositados en el Herbario Nacional de México del Instituto de Biología de la UNAM. Los ejemplares depositados fueron : F. Ramírez F-4, F-62, F-17, F-30, F-40, F-52 de la ssp. *mutudae*; F-50, F-22, F-34, F-402, F-48 de la ssp. *buekii*; y F-2, F-23, F-61, F-69 de la ssp. *tulensis*. Se colectaron individuos pequeños pero cuando el ejemplar era grande sólo se obtenía una muestra de 3 gramos con un sacabocados para evitar la extracción de los ejemplares completos y reducir en lo posible la sobrecolecta.

Por experimentos previos a la colecta, se observó que al extraer una muestra de parénquima con el sacabocados no se producían lesiones severas al individuo y la herida cicatrizaba rápidamente si producirse infecciones.

Trabajo de Laboratorio

Extracción de ADN. Se molieron 3 gr. De material vegetal con nitrógeno líquido y se siguió el protocolo de extracción de ADN total de cactáceas de de la Cruz (*et al.* 1997). Se cuantificaron las concentraciones por fluorometría, se uniformaron las concentraciones a 5 ng/ml requerido para los RAPD's y se limpiaron con 1 ul de Ribonucleasa (Sigma).

Primer's. Se probaron 23 decámetros de las series A,G y F de Operon Technologies Inc. (Alameda Calif. USA), se seleccionaron 10 que fueron A01, A02, A04, A05, A06, A10, A11, A12, A14, y A15 porque produjeron bandas claras, diferenciables y reproducibles (Clark y Lanigan 1993).

Amplificación de ADN. Los RAPD's (Williams *et al.* 1990) fueron generados en un volumen total de reacción de 25 μ l. que consistieron de 10 ng de ADN genómico, 1X buffer de PCR sin cloruro de magnesio Gibco BRL (200mM Tris-HCl (pH 8.4), 500mM KCl); 2mM MgCl₂, 0.1mM de cada nucleótido dATP, dCTP, dGTP, dTTP (Pharmacia), 0.2 μ M del oligonucleótido (Operon) y 1.5 unidades de Taq DNA polimerasa (Gibco BRL). Las reacciones fueron amplificadas en un termociclador PTC-100 MJ Research, Inc.), programado por : 45 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min a 38°C, 30 seg. a 54°C, 2 min. a 72°C y una extensión final de 13 min. a 72°C.

Electroforesis y fotografía. Los productos amplificados se separaron por tamaños en geles de agarosa al 1.4% con buffer 0.5X TBE. Se corrieron 150 v durante 3 hrs. usando el marcador de peso molecular 1 Kb (Gibco BRL) en todos los geles.

Los geles se tiñeron con bromuro de etidio, se visualizaron con luz ultravioleta y se fotografiaron usando película Polaroid 667 blanco y negro.

Registro de datos. Una banda es definida aquí como un producto o fragmento amplificado de un tamaño particular, que puede ser identificado repetidamente. Las bandas fueron identificadas por sus pesos moleculares con respecto al marcador de peso molecular 1 Kb en cada gel. Cada banda fue registrada como presente (1) o ausente (0). Los individuos que no dieron bandas claras, definidas y fácilmente registradas para el 90% o más del número total de bandas, no fueron incluidas en el análisis. Las bandas que no eran claras en un individuo fueron registradas como datos faltantes (missing data). Se asumió que cada banda se considera como un locus independiente.

Análisis estadístico. Se efectuaron correlaciones pareadas de rangos de Spearman entre las bandas obtenidas con el fin de asegurar que un solo locus fuera muestreado, las bandas que tomaron grupos de correlación perfecta (1 o -1) fueron eliminadas, salvo uno que representaba al grupo (Whitkus *et al.* 1998). Las bandas de RAPD's son típicamente heredadas de forma mendeliana y dominante (Williams *et al.* 1990), y existen varios métodos para calcular la diversidad genética. Suponiendo que los loci de RAPD's están en equilibrio Hardy-Weinberg, se pueden estimar las frecuencias de los dos alelos (presencia

vs. ausencia) para las poblaciones. Se pueden calcular además las estadísticas estándar de la genética de poblaciones, aunque los RAPD's tienden a producir resultados sesgados (Lynch y Milligan 1994). Un análisis de varianza (AMOVA) de las frecuencias de las bandas puede asignar la estructura genética de poblaciones diploides en equilibrio Hardy-Weinberg o con un nivel alto de autofecundación (Steward y Excoffier 1996).

Una alternativa para estimar la diversidad genética sin la suposición de un equilibrio Hardy-Weinberg es calcularla con base en los fenotipos de las bandas y suponer que la estimación resultante de la diversidad fenotípica se aproxima a la diversidad genética (Lewontin 1972, King y Schaal 1989, Whitkus *et al.* 1998).

En el presente estudio se utilizó este último enfoque, la diversidad de las bandas de RAPD's dentro y entre poblaciones, se calculó con el índice de diversidad de Shannon-Weaver, usando la fórmula de Brillouin para eliminar el sesgo de tamaños de muestra finitas (Peet 1974). Para cada banda: $H = (1/N) \sum_{i=1}^n (n_i / N) \ln (N / n_i)$, donde N es el número total de individuos registrados para la banda, y n_i es el número de individuos en la categoría alternativa de bandas ($n_{\text{presente}} + n_{\text{ausente}} = N$). Estos cálculos se hicieron utilizando el programa RAPDDIV escrito por el Dr. Richard Whitkus (UCR).

La diversidad fue estimada para la diversidad en las poblaciones (H_p), la diversidad total de la muestra (H_T), la diversidad entre las poblaciones ($H_T - \bar{H}_p$), la proporción de la diversidad dentro de las poblaciones (\bar{H}_p / H_T) y finalmente la proporción de la diversidad entre las poblaciones ($(H_T - \bar{H}_p) / H_T$). La contribución relativa de cada población a la diversidad total fue calculada mediante el cociente H_p / H_T .

La proporción de la diversidad entre las poblaciones ($(H_T - \bar{H}_p) / H_T$) es un estimado equivalente al cálculo de la diferenciación entre las poblaciones G_{ST} . G_{ST} es equivalente a F_{ST} (Pérez 1990). La significancia de G_{ST} fue probada por calcular $X^2 = 2 N F_{ST} (k - 1)$, donde los grados de libertad están dados por $(k-1)(s-1)$, y donde $k =$ al número de alelos por locus, $s =$ al número de poblaciones, y $N =$ tamaño total de la muestra (King y Schaal 1989). El flujo génico se estimó con $Nm = (0.5 (1 - G_{ST}) / G_{ST})$ (McDermott y McDonald 1993 en Yeh *et al.* 1997).

Para la reconstrucción de las relaciones de las poblaciones se generó una matriz de similitud utilizando el coeficiente de DICE (Sokal y Michener 1958) posteriormente se

agruparon mediante un UPGMA y se generó un dendograma utilizando el programa estadístico NTSYS-pc (Rohlf 1993). Además se realizó otro análisis de agrupamiento convirtiendo los fenotipos de bandas para cada individuo en una secuencia de dinucleótidos de "a" para la banda presente y "t" para la banda ausente. Esta conversión nos permitió importar los datos en el programa MEGA (Laurent *et al.* 1993) y calcular las distancias genéticas entre los individuos como una proporción de "a"s y "t"s compartidas sustraídas de 1. Se usaron distancias parcadas para construir un dendograma UPGMA con 1000 repeticiones de bootstrap y un árbol de Neighbor-joining y 500 repeticiones de bootstrap sobre los fenotipos de bandas de los datos originales para proporcionar valores de apoyo de las ramas en el árbol (Whitkus *et al.* 1998).

RESULTADOS

Obtuvimos 84 bandas de diferente peso molecular con 10 oligonucleótidos (primer's) para 146 individuos (Tabla 5). Los datos faltantes (missing data) registrados fueron 685 de un total de 12264 datos (5.58 % del total).

La correlación por rangos de Spearman redujo el número de loci a 83 loci informativos y con ellos se calculó el número de loci polimórficos, el porcentaje de polimorfismo para cada población y la diversidad de bandas de RAPD's (Tabla 6). La subespecie *matudae* fue la que presentó el mayor número de loci polimórficos (83) y el mayor porcentaje de polimorfismo (98.81 %, Tabla 6). Seguida por la subespecie *buekii* con 79 loci polimórficos y un 95.18 % de polimorfismo y por último la subespecie *tulensis* con 61 loci polimórficos y 96.83 % de polimorfismo.

Tabla 5. Primer's usados en el análisis de RAPD's para detectar polimorfismos en 3 subespecies de *T. tulensis*.

Primer	Secuencia	No. de bandas amplificadas <i>matudae</i>	No. de bandas amplificadas <i>buekii</i>	No. de bandas amplificadas <i>tulensis</i>	No. de bandas polimórficas <i>matudae</i>	No. de bandas polimórficas <i>buekii</i>	No. de bandas polimórficas <i>tulensis</i>
OPA01	CAGGCCCTTC	7	7	4	7	6	3
OPA02	TGCCGAGCTG	9	13	6	9	12	6
OPA04	AATCGGGCTG	10	6	7	10	5	7
OPA05	AGGGGTCTTG	8	7	4	8	6	4
OPA06	GGTCCCTGAC	8	11	7	8	11	7
OPA10	GTGATCGCAG	9	10	11	9	10	11
OPA11	TTGGTACCCC	11	11	8	11	11	8
OPA12	TCCGCGATAG	10	6	9	10	6	9
OPA14	TCTGTGCTGG	7	8	4	6	8	4
OPA15	TTCCGAACCC	5	4	3	5	4	2
TOTAL		84	83	63	83	79	61

Tabla 6. Polimorfismos detectados en las poblaciones de las 3 subespecies de *T. tulensis* en los estados de SLP, Tamaulipas y Nvo. León en México basados en 233 loci. n = tamaño de muestra, L = No. de loci polimórficos, P = porcentaje de polimorfismo, U = bandas únicas para la subespecie.

Subespecie <i>tulensis</i>					
Población	individuos	n	L	P (%)	U
1T	101 - 110	10	48	76.19	
2T	111 - 120	10	46	73.02	
3T	121 - 130	10	44	69.84	
4T	131 - 140	10	49	77.78	
5T	141 - 146	6	51	80.95	
		46	$\bar{x} = 61$	$\bar{x} = 96.83$	2
Subespecie <i>buekii</i>					
1B	51 - 60	10	57	68.67	
2B	61 - 70	10	44	53.01	
3B	71 - 80	10	51	61.45	
4B	81 - 90	10	62	74.70	
5B	91 - 100	10	56	67.47	
		50	$\bar{x} = 79$	$\bar{x} = 95.18$	9
Subespecie <i>matudae</i>					
1M	1 - 10	10	70	83.33	
2M	11 - 20	10	76	90.48	
3M	21 - 30	10	69	82.14	
4M	31 - 40	10	81	96.43	
5M	41 - 50	10	64	76.19	
		50	$\bar{x} = 83$	$\bar{x} = 98.81$	6

Diversidad genética en las poblaciones de cada subespecie.

La diversidad genética basada en el índice de Shannon-Weaver en las poblaciones de cada subespecie se presenta en la Tabla 7. Para la subespecie *matudae* la diversidad genética promediada para las 5 subpoblaciones muestreadas fue de 0.1501, la subpoblación 4 fue la más diversa contribuyendo con un 85 % a la diversidad total de esta subespecie ($H_T = 0.22$). La

mayor diversidad para *matudae* se encontró dentro de las poblaciones (65 %) mientras que la proporción de la diversidad entre las subpoblaciones fue menor (34 %). El cálculo de la diferenciación entre las subpoblaciones de la subespecie *matudae* fue $G_{ST} = 0.3464$ altamente significativa ($X^2 = 34.64$, $P < 0.001$) indicando que sí hubo una diferenciación entre las subpoblaciones de esta subespecie. En el caso de la estructura espacial de las subpoblaciones se estimó un nivel de flujo génico (Nm) de 0.94.

Para la subespecie *buekii* la diversidad genética promediada para las 5 subpoblaciones muestreadas fue de 0.1134 (Tabla 7), la subpoblación 4 fue la más diversa ($H_p = 0.13$) contribuyendo con el 68.5 % de la diversidad total de esta subespecie ($H_T = 0.1993$). La mayor diversidad genética para *buekii* se encontró dentro de las poblaciones con el 56.90 % de diversidad total mientras que el restante 43.09 % se debió a diferencias entre las poblaciones. El cálculo de la diferenciación entre las subpoblaciones de *buekii* fue $G_{ST} = 0.4309$ y fue altamente significativa ($X^2 = 43.09$, $P < 0.001$) lo que indicó que sí hay diferencias significativas entre las subpoblaciones de la subespecie *buekii*. En el caso de la estructura espacial de las subpoblaciones se estimó un nivel de flujo génico (Nm) de 0.66.

Finalmente, para la subespecie *tulensis*, la diversidad genética promediada para las 5 subpoblaciones muestreadas fue de 0.1030 (Tabla 7). La subpoblación 4 fue la más diversa con un $H_p = 0.1243$ y contribuye con el 76.91 % de la diversidad total para la subespecie que fue de $H_T = 0.1616$. La mayor diversidad genética se encontró dentro de las subpoblaciones con un 63.73 % de la diversidad total y el restante 34.47 % se encontró entre las subpoblaciones. El valor de G_{ST} para esta subespecie fue de 0.3447 (Tabla 7) y también fue significativo ($X^2 = 31.71$, $P < 0.001$), indicando que para la subespecie *tulensis* también se encontraron diferencias significativas entre las subpoblaciones. En el caso de la estructura espacial se estimó un nivel de flujo génico (Nm) de 0.95 para esta subespecie.

**Tabla 7. Análisis de la diversidad dentro y entre las poblaciones de las 3 subespecies de *T. tulensis* en los estados de SLP, Tamaulipas y Nvo. León en México.
ID = población.**

Subespecie <i>matudae</i>						
ID	H _p	H _p /H _T	H _T - \bar{H}_p	\bar{H}_p /H _T	(H _T - \bar{H}_p)/H _T	
1M	0.1275	0.555				
2M	0.1672	0.7279				
3M	0.1537	0.6691				
4M	0.1969	0.8572				
5M	0.1052	0.4579				
$\bar{H}_p = 0.1501$			0.0796	0.6534	0.3464	
$H_T = 0.2297$						
$G_{ST} = 0.3464^*$						
$Nm = 0.9433$						
$X^2 = 34.6425$						$P < 0.001$
Subespecie <i>baekii</i>						
ID	H _p	H _p /H _T	H _T - \bar{H}_p	\bar{H}_p /H _T	(H _T - \bar{H}_p)/H _T	
1B	0.1125	0.5644				
2B	0.0904	0.4535				
3B	0.1103	0.5534				
4B	0.1367	0.6859				
5B	0.1172	0.5880				
$\bar{H}_p = 0.1134$			0.0858	0.5690	0.4309	
$H_T = 0.1993$						
$G_{ST} = 0.4309^*$						
$Nm = 0.6603$						
$X^2 = 43.0905$						$P < 0.001$
Subespecie <i>tulensis</i>						
ID	H _p	H _p /H _T	H _T - \bar{H}_p	\bar{H}_p /H _T	(H _T - \bar{H}_p)/H _T	
1T	0.1102	0.6819				
2T	0.1037	0.6417				
3T	0.1059	0.6553				
4T	0.1243	0.7691				
5T	0.0713	0.4412				
$\bar{H}_p = 0.1030$			0.0586	0.6373	0.3447	
$H_T = 0.1616$						
$G_{ST} = 0.3447^*$						
$Nm = 0.9505$						
$X^2 = 31.7124$						$P < 0.001$

ver explicación en el texto

Diversidad genética entre subespecies.

La diversidad genética basada en el índice de Shannon-Weaver de las subespecies de *T. tulensis* se presenta en la Tabla 8. La diversidad en las poblaciones de la subespecie *matudae* fue la más alta ($H_p = 0.22$), seguida de la subespecie *buekii* ($H_p = 0.19$) y en último lugar la subespecie *tulensis* ($H_p = 0.16$), éste mismo patrón de orden descendente de la diversidad genética se observó en el número de bandas polimórficas amplificadas con RAPD's para cada subespecie (Tabla 5) y el porcentaje de polimorfismo detectado (Tabla 6). Se obtuvo una diversidad promedio para la especie de 0.19 y una diversidad total para la especie de 0.26. La subespecie *matudae* es la más diversa y contribuye más a la diversidad total con un 85.52 % seguida de la subespecie *buekii* con 73.35 % y la subespecie *tulensis* con 60.17 % de la diversidad total.

La mayor diversidad genética se encontró repartida dentro de las subespecies con el 73.01 % de la diversidad total. El restante 26.63 % se encontró entre las subespecies de esta especie. El valor significativo obtenido para la proporción de la diversidad entre las subespecies (equivalente al cálculo de G_{ST}) indicó que existe una diferenciación substancial entre ellas. Con respecto al cálculo del valor de flujo génico (N_m) fue de 1.37 individuos por generación lo que indica que a pesar de que las subespecies se estén diferenciando todavía existe un nivel de flujo génico entre ellas.

Tabla 8. Análisis de la diversidad genética de las 3 subespecies de *T. tulensis* en los estados de SLP, Tamaulipas y Nvo. León en México
ID = subespecie

ID	H_p	H_p/H_T	$H_T - \bar{H}_p$	\bar{H}_p/H_T	$(H_T - \bar{H}_p) / H_T$
<i>matudae</i>	0.2297	0.8552			
<i>buekii</i>	0.1970	0.7335			
<i>tulensis</i>	0.1616	0.6017			
	$\bar{H}_p = 0.1961$		0.0724	0.7301	0.2663
	$H_T = 0.2685$				
	$G_{ST} = 0.2663 *$				
	$\chi^2 = 79.90$	$P < 0.0001$			
	$N_m = 1.37$				

Relaciones Genéticas

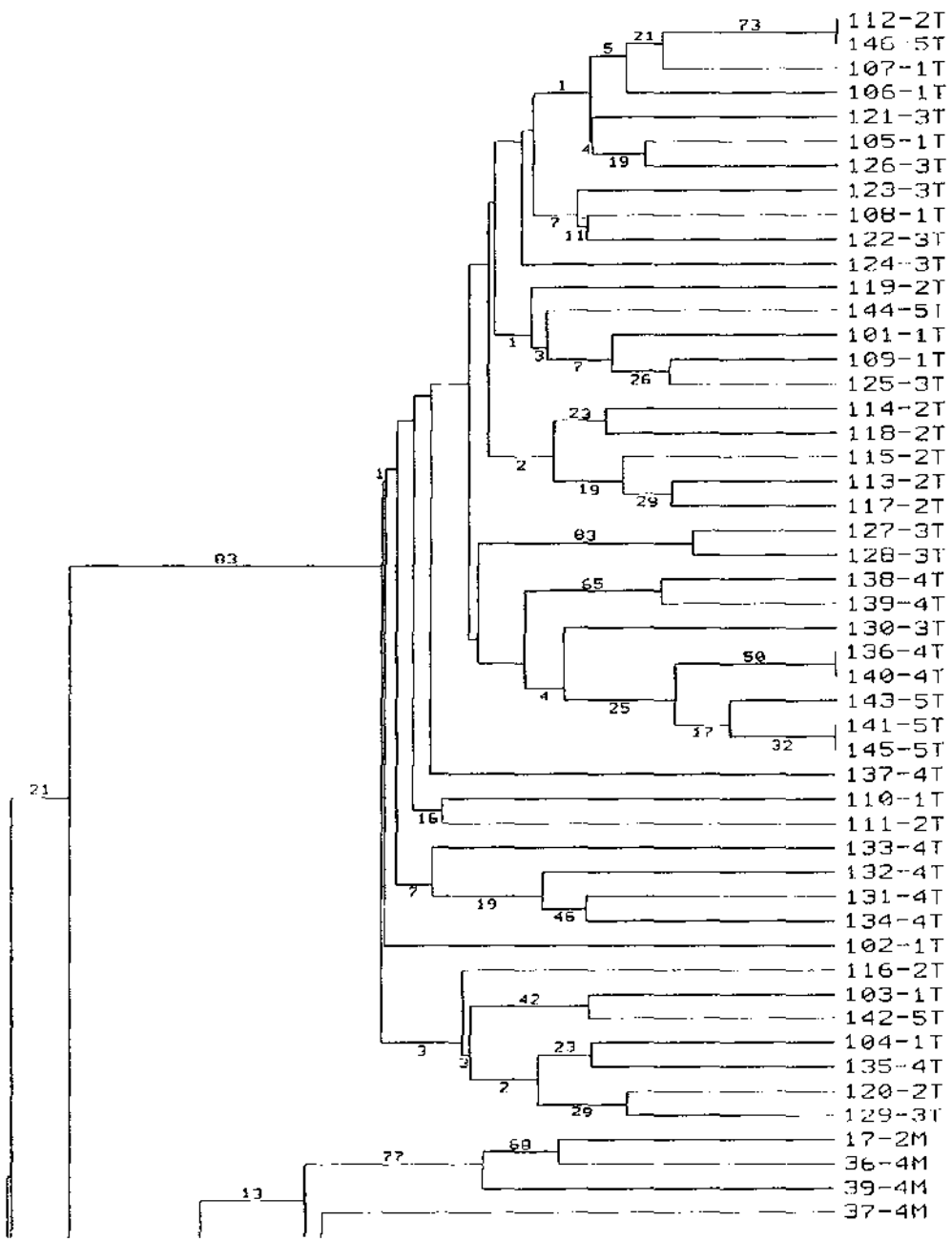
Las relaciones genéticas entre los individuos de las diversas poblaciones analizadas de las subespecies *tulensis*, *buekii* y *matudae*, se resumieron en 2 dendogramas el primero está basado en el cálculo de distancias pareadas (pair-wise) generado con el análisis de agrupamiento UPGMA con 1000 repeticiones de bootstrap con el programa MEGA (Fig. 9), y el segundo es un árbol no enraizado de neighbor-joining con 500 repeticiones de bootstrap también generado con el programa MEGA (Fig. 10).

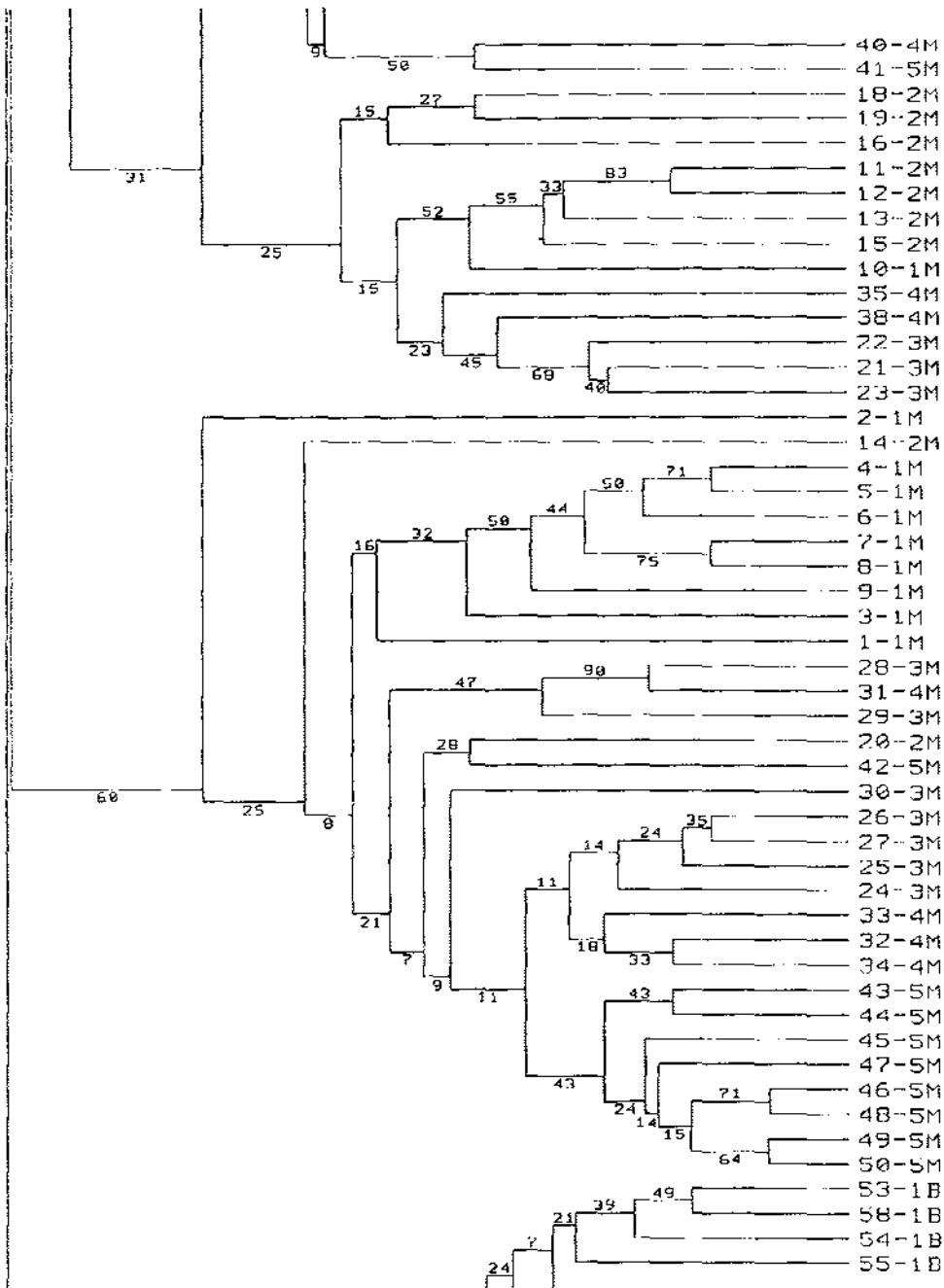
El análisis de UPGMA (Fig. 9) reveló claramente 3 grupos bien diferenciados entre sí, separando perfectamente a las subespecies de *T. tulensis* en subespecie *tulensis* (T), *matudae* (M) y *buekii* (B) (ver valores de apoyo de bootstrap en las ramas del dendograma). Se observó que las subespecies *tulensis* y *matudae* se encuentran genéticamente más cercanas entre sí que con respecto a la subespecie *buekii*.

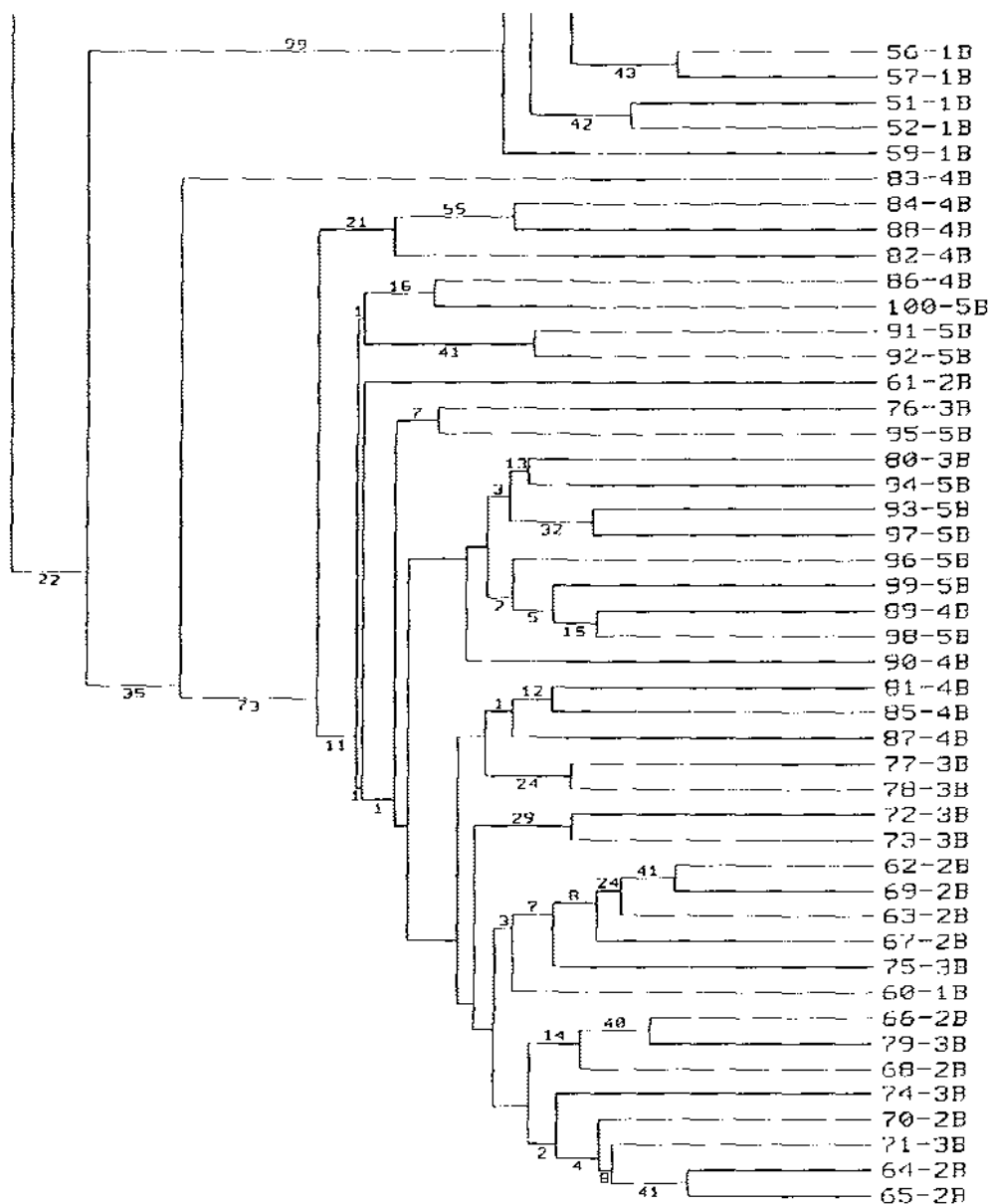
Dentro del grupo formado por los individuos de la subespecie *tulensis* (marcados con T en la Fig. 9) se formaron clados cohesivos agrupando cierto número de individuos pertenecientes a las diferentes poblaciones de *tulensis* por ejemplo, el grupo formado por los

individuos 114, 118, 115, 113 y 117 todos pertenecientes a la subpoblación 2 T (ver tabla 6). En otro clado se agruparon 4 individuos genéticamente similares entre sí que pertenecen a la subpoblación 4 T (individuos 133, 132, 131, y 134). Hubo otros 2 grupos de 2 individuos genéticamente similares que fueron los individuos 138, 139 y 136, 140, los cuatro son de la población 4 T. Y el último grupo formado fueron los individuos 143, 141 y 145 que son de la población 5 T y que compartieron similitudes entre sí. El resto de los individuos de las poblaciones restantes parecen estar mezclados entre sí, es decir, comparten un grado de similitud alto; sin embargo, se diferencian de las subespecies restantes. Esto claramente concuerda con los valores significativos obtenidos para la proporción de la diversidad genética entre las poblaciones de la subespecie *tulensis* y de la diferenciación entre las subespecies. Las relaciones genéticas mostradas para los individuos de las diferentes poblaciones de *tulensis* (T) concuerdan también con el valor obtenido de flujo génico entre ellas ($N_m = 0.95$) y con la diferenciación significativa de las poblaciones ($G_{ST} = 0.34$, $P < 0.001$).

Dentro del grupo formado por los individuos de la subespecie *matudae* (marcados con M en la Fig. 9) se formaron clados o grupos cohesivos bien diferenciados. Primero, se formó un clado con los individuos 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 todos de la subpoblación 1 M (ver Tabla 6 también), sólo un individuo de esta subpoblación no se agrupó en este clado sino que pareció compartir una similitud genética mayor con los individuos de la subpoblación 2 M que también formaron un grupo. Además se formó otro grupo con los individuos de la subpoblación 5 M (individuos 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, y 50). En cambio el análisis reveló que las subpoblaciones 3 M y 4 M comparten un grado mayor de similitud entre sí y con individuos de las otras poblaciones. Todo esto concuerda con los valores obtenidos de flujo génico y de diferenciación entre las subpoblaciones obtenidos en el análisis de la diversidad genética (Tabla 7) para la subespecie *matudae*. Además de estos agrupamientos, en un nivel mayor se asociaron algunos individuos de las subpoblaciones 2 M, 3 M y 4 M y en otro grupo los restantes individuos de todas las subpoblaciones *matudae*, en este nivel el primer grupo se asoció más cercanamente al grupo de la subespecie *tulensis* lo que indicó que comparten similitudes mayores entre sí.







0 0.01
 Fig. 9 UPGMA *T. tulensis* 3 subspecies

El último grupo mayor se formó con los individuos de la subespecie *buekii* (marcados con B en la Fig. 9). Dos grupos se formaron con los individuos de la población 1 B (53, 58, 54, 55, 56, 57, 51, 52) y otro con la mayoría de los individuos de la población 5 B (95, 94, 93, 97, 96, 99, 98) aunque en este agrupamiento se mezclaron algunos individuos de las poblaciones 4 B y 3 B. Otros grupos menores se formaron como los individuos 83, 84, 88 y 82 de la subpoblación 4 B y los individuos 62, 69, 63 y 67 de la subpoblación 2 B. Pero el resto de los individuos parecen tener un alto grado de similitud genética.

Sin embargo el análisis de agrupamiento concuerda con los resultados obtenidos en el análisis de diversidad genética, es decir, si existe un nivel de flujo génico para las subpoblaciones de *buekii* pero también existe una diferenciación significativa entre las subpoblaciones.

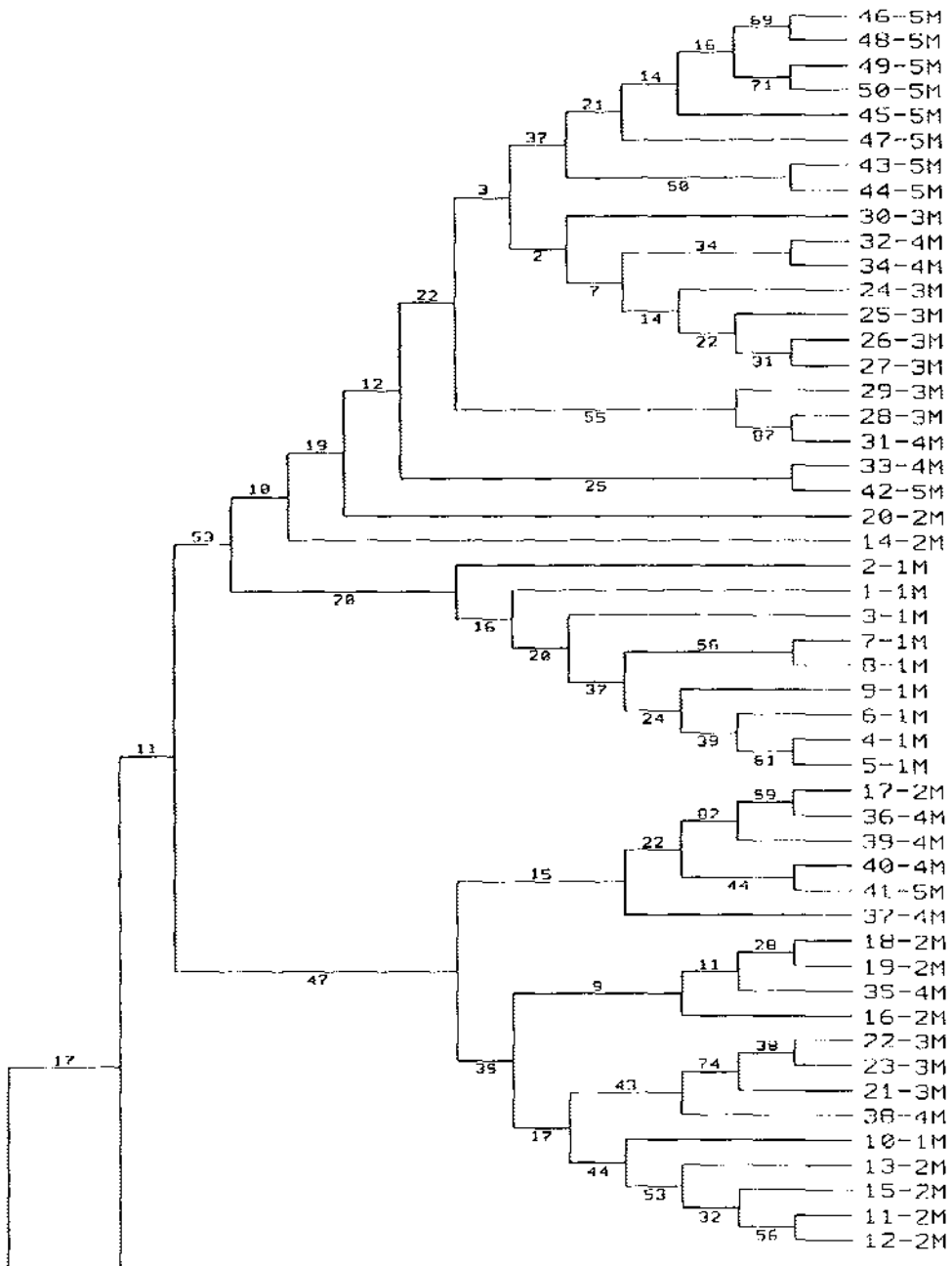
En el análisis de Neighbor-joining (Fig. 10) se corroboró la diferenciación entre subespecies debido a que se formaron 3 grupos cohesivos y bien diferenciados (ver valores de apoyo de bootstrap). Primeramente se formó el grupo de las poblaciones de la subespecie *matudae* (marcados con M en la Fig.10). En una primera asociación se segregaron los individuos de la población 5 M (46, 48, 49, 50, 45, 47, 43, 44) como se segregaron en el análisis de UPGMA. Lo mismo ocurrió con los individuos de la población 1 M que conformaron un grupo cohesivo.

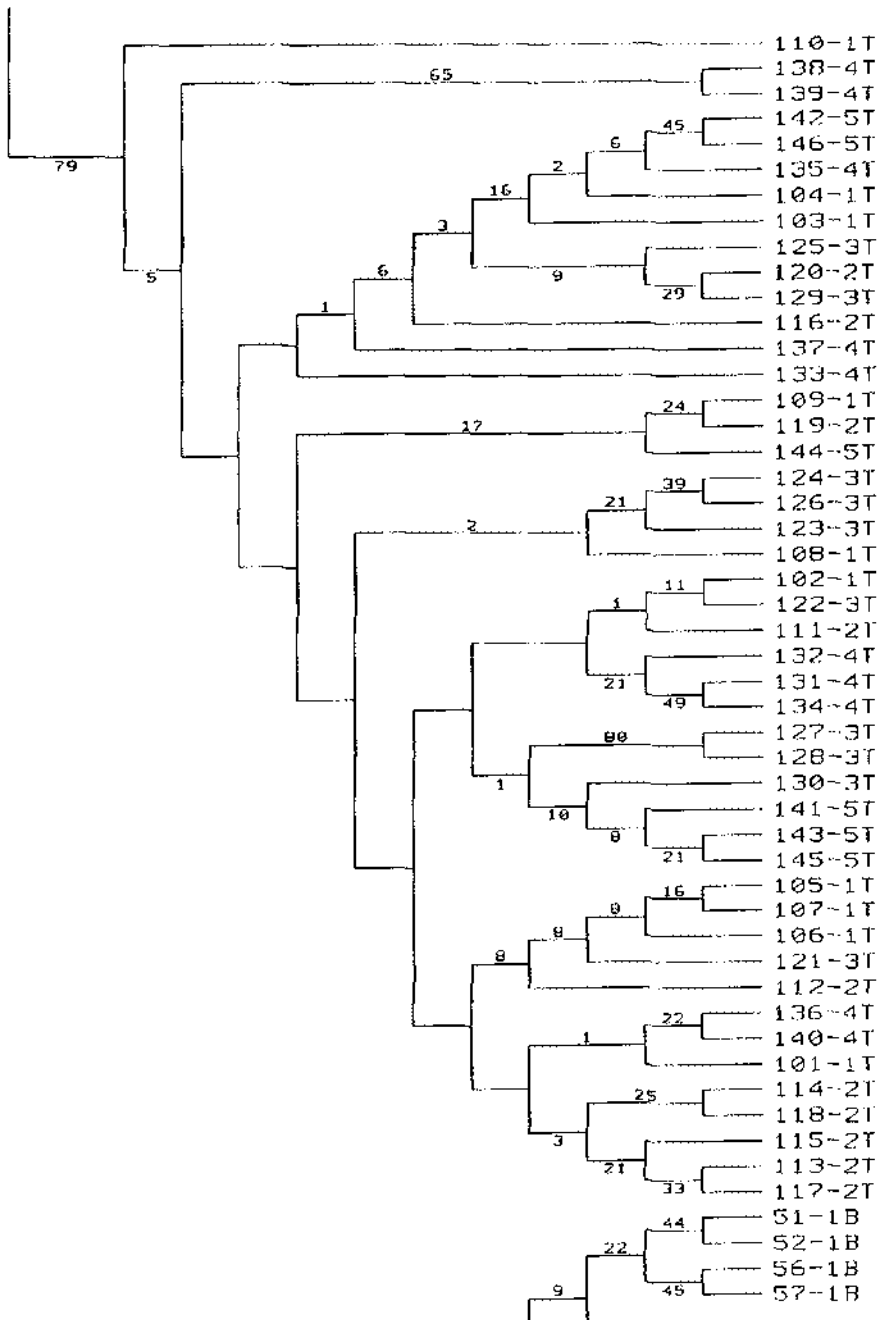
En general, al igual que en el análisis de agrupamiento, las relaciones genéticas entre los individuos de las distintas poblaciones de la subespecie *matudae* siguieron formando los mismos grupos en el análisis de Neighbor-joining, y en este caso también se formaron 2 subgrupos mayores.

En segundo lugar, el otro grupo cohesivo principal fue el formado por los individuos de las poblaciones de la subespecie *tulensis* (Marcados con T en la Fig. 10). En este análisis de Neighbor-joining se siguieron conservando los grupos formados en el análisis de UPGMA, segregándose algunos individuos de las poblaciones 4 T, 5 T y 2 T y el resto de los individuos tienen un alto grado de similitud genética, lo que concuerda también con los resultados de

diferenciación entre poblaciones pero también el nivel de flujo génico entre las poblaciones de la subespecie *tulensis*.

Y el último grupo cohesivo importante se formó por individuos de las poblaciones de la subespecie *buekii* (Marcados con B en la Fig. 10). Se conservaron los mismos clados e incluso se asociaron de forma más cohesiva los individuos de la población 5 B, se observó además la asociación de los individuos de la población 1 B claramente diferenciados. Los demás individuos comparten similitudes altas por lo que las poblaciones restantes están mezcladas en un cierto grado. Esto concuerda con los resultados obtenidos de la diferenciación significativa entre las poblaciones de la subespecie *buekii* y del flujo génico entre ellas.





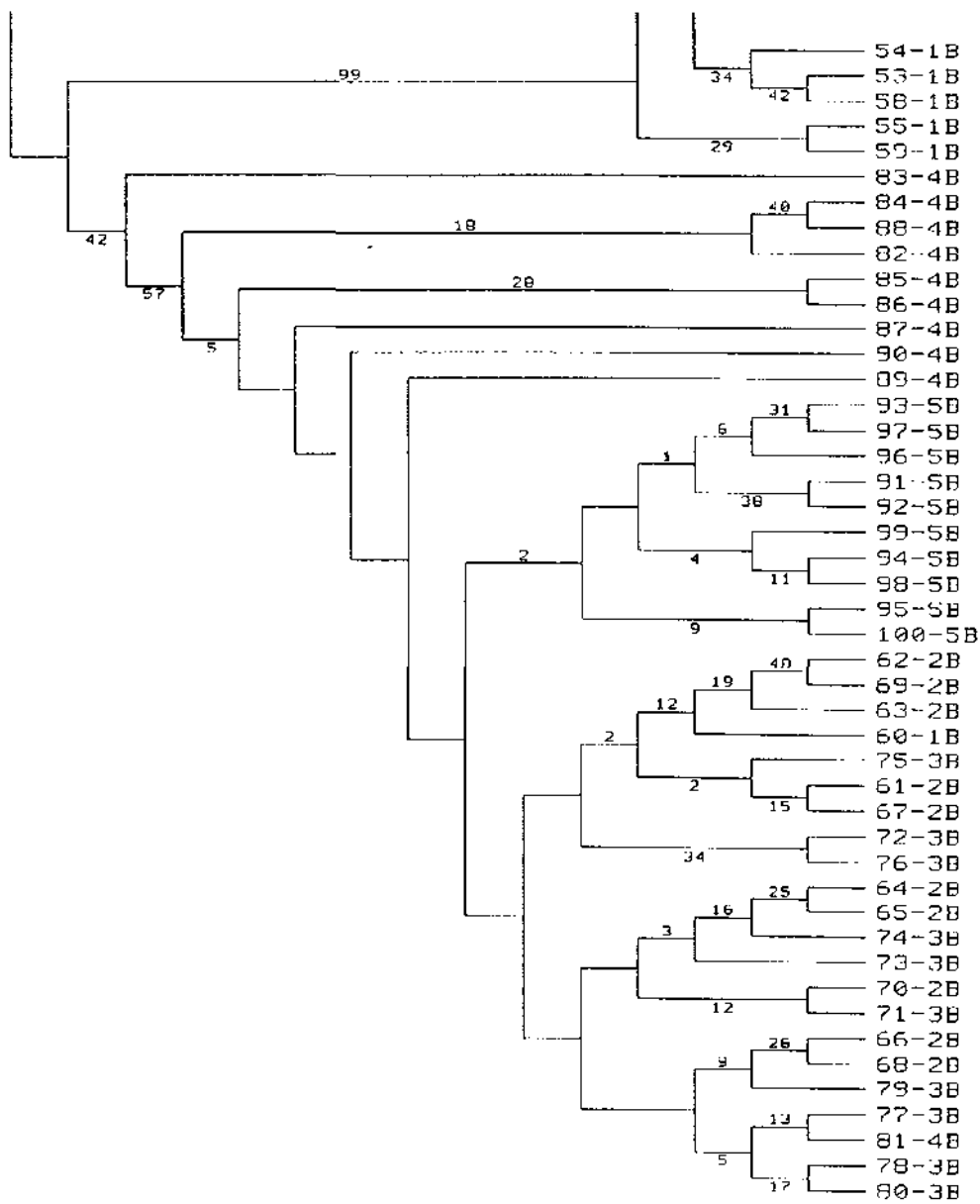


Fig.10 Neighbor-Joining *T. tulensis* 3 ssp.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Diversidad Genética

En el presente estudio, los niveles de diversidad genética encontrados en los individuos de las 3 subespecies de *T. tulensis* ($H_T = 0.26\%$) son altos comparados con los encontrados en otras especies endémicas (Tabla 4). Esto contradice lo esperado teóricamente puesto que la teoría genética a partir de estudios de aloenzimas, predice que los niveles de variación genética son elevados sólo en las especies que tienen distribuciones amplias, que son perennes, polinizadas por viento y que se entrecruzan (Hamrick, Godt, Murawski y Loveless 1991). Además se ha documentado que las especies endémicas tienen menos de la mitad de la diversidad genética ($\bar{H}_e = 0.096$) que las especies de distribuciones amplias ($\bar{H}_e = 0.202$), y especies estrecha o regionalmente distribuidas tienen valores intermedios (Hamrick *et al.* 1991, Hamrick y Godt 1989).

A nivel de la diversidad genética dentro de las poblaciones, en este estudio se encontró que la subespecie *matudae* que es la que tiene la distribución más restringida, es especialista edáfica, endémica y tiene densidades poblacionales muy bajas (aproximadamente 10 individuos por población, obs. personal), fue la que mantiene la diversidad genética promedio más alta ($\bar{H}_p = 0.1501$) y una diversidad total también muy grande ($H_T = 0.2297$ Tabla 7) contradiciendo lo esperado teóricamente. La mayor proporción de la diversidad genética se encontró repartida dentro de las 5 poblaciones analizadas. Esta subespecie también fue la que tuvo el mayor porcentaje de loci polimórficos ($\bar{P} = 98.81\%$ Tabla 6). Hamrick y sus colaboradores (1991) registraron que dentro de las poblaciones, las plantas son polimórficas, en promedio en el 34 % de sus loci. La diversidad genética media dentro de 468 taxa que ellos revisaron fue de 0.113, claramente menor a lo encontrado en este estudio. También documentaron que las especies endémicas tienen mucho menor diversidad genética dentro de las poblaciones ($\bar{H}_e = 0.063$) que las especies de distribución estrecha o restringida ($\bar{H}_e = 0.105$) o las especies regionalmente distribuidas ($\bar{H}_e = 0.118$). Las poblaciones de especies de amplia distribución tienen la mayor diversidad genética ($\bar{H}_e = 0.159$) según estos autores.

Cabe señalar que estos datos proceden de otro tipo de marcador, es decir provienen de la literatura de isoenzimas. En este estudio el marcador molecular empleado (RAPD's), reflejó claramente que es un marcador mucho más útil para encontrar polimorfismos y determinar con certeza los niveles de variación genética en poco tiempo y utilizando bajas cantidades de ADN crudo extraído de poco material vegetal con un método no destructivo.

De las 3 subespecies aquí analizadas, *T. tulensis* ssp. *matudae* fue la más diversa manteniendo niveles elevados de diversidad genética como ya se mencionó, probablemente debido a que se trata de una especie perenne de vida larga que tal vez tenga mecanismos reproductivos que le permitieran mantener esos niveles elevados de diversidad genética a pesar de ser una especie endémica, rara y en peligro de extinción. La distribución y cantidades de diversidad genética dentro y entre las poblaciones de plantas raras son probablemente dependientes de si las especies siempre han sido raras o si lo han llegado a ser recientemente como un resultado de la influencia humana (Barret y Kohn 1991) o bien como resultado de cambios climáticos recientes. Mecanismos tales como la especialización edáfica que presenta la subespecie *matudae*, quizás sea el responsable del tipo de rareza de esta especie y probablemente nos proporcione un indicio de que tal vez la subespecie siempre ha sido rara y se haya adaptado y evolucionado bajo esas condiciones de tal forma que se presenten dichos niveles de diversidad genética. Y que a pesar de la sobrecolecta y la presión humana ejercida sobre las poblaciones naturales de *T.t.* ssp. *matudae* (obser. Pers. (IUCN 1998) y su hábitat no se han presentado efectos o eventos como el estrés genético que erosionen la diversidad genética de la especie. Especies que existen naturalmente en distribuciones poco densas, pueden poseer sistemas genéticos ajustados a estrecha endogamia, también como adaptaciones que compensen la desventaja de rareza – por ejemplo durante el apareamiento-. En contraste, especies que han experimentado severas reducciones en sus poblaciones, debido a la destrucción de su hábitat o al pastoreo, pueden ser más susceptibles a estrés genético impuesto por tamaños poblacionales pequeños. Estas consideraciones subrayan o resaltan la importancia de considerar la ecología de especies raras y las diversas formas que la rareza puede alcanzar. Esas diferencias tendrán importantes implicaciones para la estructura genética de la población, el muestreo del material genético, y los tipos específicos de programas de reproducción que sean planeados (Barret y Kohn 1991).

Para la subespecie *buekii* los niveles de diversidad genética fueron menores a los encontrados para la subespecie *matudae*, no obstante también son elevados en comparación a lo reportado en otros estudios (Tabla 4). En este caso se encontró una diversidad total para la subespecie de 0.1993 y una diversidad promedio de 0.1134 contrastando con lo reportado en la literatura para especies endémicas y de distribución restringida (Hamrick y Godt 1996). Además, la mayor diversidad genética se encontró repartida dentro de las poblaciones de *buekii* (56 %). Para esta subespecie, el nivel de polimorfismo detectado con RAPD's fue mucho mayor ($\bar{P} = 95.18\%$) puesto que se ha registrado que las especies endémicas tienen significativamente menos loci polimórficos ($\bar{P} = 26\%$) que especies de distribución amplia ($\bar{P} = 43\%$) (Hamrick *et al.* 1991). Probablemente esta subespecie también tenga algunos mecanismos reproductivos que le permitan mantener elevados niveles de diversidad genética puesto que también se trata de una especie perenne, de vida muy larga, de crecimiento lento y suponemos que tenga algún tipo de mecanismo reproductivo ya sea a través de un tipo de polinización (tal vez por abejas) eficiente que contrarreste la desventaja de rareza, mantenga elevados niveles de diversidad genética y mantenga un nivel intermedio de flujo génico como más adelante se discutirá.

Finalmente, *T. tulensis ssp. tulensis* la última de las subespecies analizadas en este estudio y que es la de distribución más amplia con densidades poblacionales mucho más grandes que las otras dos, encontramos el nivel más bajo de diversidad genética ($H_p = 0.1030$ y $H_T = 0.1616$) en comparación a las dos variedades anteriormente discutidas. Estos resultados también contrastan y contradicen lo predicho por la teoría genética para especies endémicas y amenazadas. Sin embargo éste nivel de diversidad genética está dentro del rango registrado en la literatura (Tabla 4). Para esta variedad el marcador molecular sólo detectó 63 loci de los cuales 61 fueron polimórficos (96.83 %), y nuevamente fue el nivel más bajo en comparación a los 79 y 83 loci polimórficos de las subespecies *buekii* y *matudae* encontrados (Tabla 6).

En cuanto a la proporción de la diversidad genética entre las poblaciones (G_{ST}) en los 3 casos fue menor que la diversidad genética dentro de éstas, sin embargo en los 3 casos fue mayor al reportado en la literatura. Es decir, para las 3 subespecies (Tabla 7) el valor de G_{ST} fue mayor al 22 % promedio reportado para los 406 taxa analizados por Hamrick (*et al.* 1991).

También fueron mayores a los registrados por Ayres y Ryan (1999) para especies endémicas y regionales (Tabla 4).

Flujo Génico

En este estudio para las 3 subespecies la diferenciación entre sus subpoblaciones fue significativa (Tabla 7) y elevada como se discutió anteriormente, por lo tanto se esperaría que los niveles de flujo génico fueran bajos puesto que encontramos que las subpoblaciones se están diferenciando. Esto concuerda con lo encontrado en este estudio puesto que los niveles de flujo génico (Nm) encontrados son bajos (Tabla 7) en ningún caso se llegó a 1 que indicaría que por lo menos 1 individuo estaría migrando por generación entre las subpoblaciones. El nivel más bajo de Nm fue el de la subespecie *buekii* (0.66) que corresponde bien a la relación inversamente proporcional entre Nm y G_{ST} puesto que para la misma subespecie correspondió el valor más alto de G_{ST} (0.43).

A nivel de la diferenciación de las subespecies, ésta fue altamente significativa y el análisis fenético de similitud genética y de Neighbor-joining apoyan esta diferenciación entre las 3 subespecies de *T. tulensis*. Sin embargo, todavía existe un nivel de flujo génico entre ellas que tal vez permita que existan esos altos niveles de diversidad genética y la esté manteniendo; así mismo, la literatura indica claramente que estas subespecies son 3 subespecies alopátricas (Anderson 1987). No obstante, sería importante explorar en los límites de las zonas de distribución de las 3 subespecies si existen zonas donde coexistan las subespecies *tulensis* - *buekii* y *buekii-matudae* y detectar híbridos. También sería importante explorar la biología reproductiva de cada subespecie, debido a que se desconoce el tipo de polinización de cada una, la época de floración, la cantidad de semillas producidas, la viabilidad de éstas, la distancia de dispersión de polen y de las semillas y lo que es aún más importante, cual tipo de reproducción sexual o asexual (por medio de la producción de clones) es la que se da con mayor frecuencia en cada subespecie, para que con esta información junto con la información genética aquí presentada se pudieran tener explicaciones más precisas del flujo génico y sus implicaciones.

Análisis Fenético

El análisis fenético de los individuos de las subespecies de *T. tulensis* mostró en ambos casos, UPGMA y Neighbor-joining, una diferenciación entre algunas poblaciones de cada subespecie pero sobre todo una clara diferenciación entre las subespecies puesto que en ambos análisis se segregaron la subespecie *tulensis* en un clado, la subespecie *matudae* en otro clado bien diferenciado y por último la subespecie *buekii* en otro clado separado. Estas relaciones concuerdan perfectamente con lo registrado por Anderson (1987), es decir no hay duda de que éstas son subespecies geográficas bien delimitadas tanto geográfica como morfológicamente, aunque cabe señalar que con el marcador molecular (RAPD's) empleado en este estudio, se descubrieron bandas únicas de cada subespecie que sirven perfectamente para diferenciar entre subespecies.

Los análisis también revelaron que las subespecies *tulensis* y *matudae* son genéticamente más cercanas entre sí que con respecto a *buekii*, que claramente se segregó aparte. Lo raro de este hecho es que *tulensis* y *matudae* geográficamente están separadas por *buekii*, además *matudae* es una especie especialista edáfica, restringida al Valle de Rayones y sus densidades poblacionales son muy bajas, y por el contrario, *tulensis* tiene mayor distribución y densidades poblacionales altas. Por lo que es necesario examinar más detalladamente la biología reproductiva de estas subespecies y determinar la probable existencia de individuos híbridos entre ellas.

Las subespecies *buekii* y *matudae* fueron las que presentaron mayor estructura genética al tener más poblaciones cuyos individuos se segregaron en clados diferenciados tal y como lo indicó el valor significativo de G_{ST} . Y los individuos que no se agruparon en clados diferenciados parecen tener mayor grado de similitud que concuerda claramente con los valores obtenidos de flujo génico para cada subespecie (Tabla 7).

LITERATURA CONSULTADA

- Anderson, E.F. 1987. A revision of the genus *Thelocactus* B. & R. (Cactaceae). *Bradleya* **5**: 49-76.
- Ayres, D.R. and Ryan, F.J. 1999. Genetic diversity and structure of the narrow endemic *Wyethia reticulata* and its congener *W. bolanderi* (Asteraceae) using RAPD's and allozyme techniques. *Am. J. Bot.* **86** (3): 344-362.
- Barret, S.C.H., and J.R., Kohn. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: Implications for conservation. In: D.A. Falk and K.E. Holsinger (eds.) Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press. New York, New York. U.S.A. pp.3-30.
- Brussard, P.F. and P.R. Ehrlich. 1992. The challenge of conservation biology. *Ecol. Appl.* **2** : 1-2.
- Clark, A.G. and C.M.S. Lanigan. 1993. Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPD's. *Mol. Biol. Evol.* **10**: 1096-1111.
- De la Cruz, M., Ramírez, C. F. and M.H. Hernández. 1997. DNA isolation and Amplification from Cacti. *Plant. Mol. Biol. Rep.* **15**: 319-325.
- Fraenkel, O.H. and M.E. Soulé. 1981. Conservation and Evolution. Cambridge University Press. Cambridge.
- Fréville, H., Colas, B., Ronfort J, Riba, M. and I. Olivieri. 1998. Predicting endemism from population structure of a widespread species : Case study in *Centaurea maculosa* Lam. (Asteraceae). *Conservation Biology* **12** (6): 1269-1278.
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., Muraski, D.A. and M.D. Loveless. 1991. Correlations between species traits and alloenzyme diversity: Implications for Conservation Biology. In: D.A. Falk and K.E. Holsinger (eds.) Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press. New York, New York. U.S.A. pp.75-86.
- Hamrick, J.L. and M.J.W. Godt. 1989. Allozyme diversity in plant species. In: Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources, eds. A.H.D. Brown M.T. Clegg, A.L. Kahler and B.S. Weir. pp. 43-63. Sinauer, Sunderland, MA.

- Hamrick, J.L. and M.J.W. Godt. 1996. Conservation genetics of endemic plant species. In: J.C. Avise and J.L. Hamrick (eds.) Conservation Genetics. Case histories from nature. Chapman and Hall, New York, Ny. Pp. 281-304.
- Hernández, H.M. and H. Godínez. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas Mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana*, 26: 33-52.
- Holsinger, K. E. and L.D. Gottlieb. 1991. Conservation of rare and endangered plants : principles and prospects. In: D.A. Falk and K.E. Holsinger (eds.) Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press. New York, New York. U.S.A. pp. 195-208.
- Huenneke, L. 1991. Ecological implications of genetic variation in plant populations. In: D.A. Falk and K.E. Holsinger (eds.) Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press. New York, New York. U.S.A pp. 31-44.
- Karron, J.D. 1991. Patterns of genetics variation and breeding systems in rare plant Species. In: D.A. Falk and K.E. Holsinger (eds.) Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press. New York, New York. U.S.A. pp.87
- King, L.A.M. and B.A. Schaal. 1989. Ribosomal-DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis*. *Evol.* 43: 1117-1119.
- Laurent, V., Risterucci, A.M. and C. Lanaud. 1993b. Chloroplast and mitochondrial DNA diversity in *Theobroma cacao*. *Theor. Appl. Genet* 87: 81-88.
- Lewontin, R.C. 1972. The apportionment of human diversity. *Evol. Biol.* 6: 381-398.
- Lynch, M. and B.G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD's markers. *Mol. Ecol.* 3: 91-99.
- Millar, C.I. and W.J. Libby. 1991. Strategies for conserving clinal, ecotypic, and disjunct Population diversity in widespread species. Pages 149-170. In: D.A. Falk and K.E. Holsinger (eds.) Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press. New York, New York. U.S.A.
- Peet, R.K. 1974. The measurement of species diversity. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 5: 285-307.
- Pérez, N.N. 1990. *Biología reproductiva y estructura genética de Psychotria fuxlucens (Rubiaceae) en Los Tuxtlas, Veracruz*. Tesis de Maestría. Fac. de Ciencias,

Universidad Nacional Autónoma de México.

- Petit, R.J., El Mousadik, A. and Pons O. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* **12** (4): 844-855.
- Pilbeam, J. 1996. Thelocactus. The cactus file handbook 1. Cirio Publishing Services Ltd. Southampton UK. pp. 56.
- Prior, K.A., Gibbs, H.L. and P.J. Weatherhead. 1997. Population genetic structure in the Black Rat Snake: Implications for management. *Conservation Biology* **11** (5): 1147-1158.
- Rohlf, F.J. 1993. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.80. Exeter Software, Setauket, N.Y.
- Simberloff, D. 1988. The contribution of population and community biology to conservation science. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **19**: 473-512.
- Sokal, R.R. and C.D. Michener. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin* **38**: 1409-1438.
- Steward, C.N. and L. Excoffier. 1996. Assessing population genetic structure and variability with RAPD data: application to *Vaccinium macrocarpon* (American Cranberry). *J. Evol. Biol.* **8**: 153-171.
- Walter, K.S. and H.J. Gillet. (eds). 1998. 1997 IUCN Red List of Threatened Plants. Compiled by the World Conservation Monitor Centre. IUCN – The World Conservation Union, Gland, Switzerland Cambridge, UK. lxiv + 862 pp.
- Whitkus, R.M., de la Cruz, M., Mota-Bravo, L. and A. Gómez-Pompa. 1998. Genetic diversity and relationships of cacao (*Theobroma cacao* L.) in Southern México. *Theor. Appl. Genet.* **96**: 621-627.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K. J. Rafalski, J.A. and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6531-6535.
- Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, B.J.T., Ye, Z.H. and J.X. Mao. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.

DISCUSIÓN GENERAL

En este estudio los niveles encontrados de variación genética en las 2 especies examinadas, son elevados en comparación con los registrados para otras especies raras y endémicas. En ambos casos se encontró que las poblaciones están estructuradas genéticamente; y presentan en el caso de *T. hastifer*, un flujo génico moderado ; mientras que para cada subespecie de *T. tulensis* el flujo génico registrado fue bajo, lo que concuerda con el nivel de diferenciación genética entre las poblaciones de cada una de las subespecies. También se encontró que la variación genética se distribuye diferencialmente, es decir, la mayor cantidad de variación genética se encontró repartida dentro de las poblaciones tanto de *T. hastifer* como de *T. tulensis* ssp. *matudae*, ssp. *buekii* y ssp. *tulensis*.

A nivel de la diversidad genética entre las subespecies de *T. tulensis*, se encontró que la ssp. *matudae* presentó el nivel más alto de variación genética, seguida de la ssp. *buekii* y por último la ssp. *tulensis*; también en este caso la mayor variación genética se encontró repartida dentro de las subespecies. Además, en este nivel también se registró una marcada diferenciación genética entre las subespecies, lo que indica que verdaderamente se trata de subespecies bien delimitadas genética y geográficamente. Aunque cabe señalar que se desconoce la existencia de híbridos entre éstas.

Al contrastar los niveles de diversidad genética encontrados para *T. hastifer* y *T. tulensis* ssp. *matudae* por cuyas características de rareza, endemismo, estado de conservación y distribución, se esperarían que presentaran niveles muy bajos de diversidad genética como lo predice la teoría para especies con distribuciones restringidas, raras y / o endémicas, amenazadas y con tamaños poblacionales pequeños; se encontró que los niveles

de diversidad genética de estas dos especies son muy altos y contradicen lo esperado teóricamente. Y al comparar la variación genética de estas dos especies con la de su congénere de distribución más amplia, que tiene tamaños poblacionales grandes y que probablemente no esté amenazada *T. tulensis* ssp. *tulensis*, encontramos nuevamente que *T. hastifer* y *T. tulensis* ssp. *matudae* presentaron los niveles más altos de diversidad genética contrastando y contradiciendo de nueva cuenta lo predicho por la teoría genética.

Suponemos primeramente que en el caso de *T. hastifer* el nivel más alto de variación genética se mantenga debido que se trata de una especie perenne muy longeva. En la literatura se han planteado hipótesis alternativas que expliquen la variación genética elevada para algunas plantas raras o endémicas con distribuciones restringidas, una de estas hipótesis es la referente a cambios recientes en los patrones de distribución geográfica (Karron 1987, 1991). Y suponemos que tal hipótesis sea válida y explique el proceso que esté manteniendo la diversidad genética y la estructuración de las poblaciones de *T. hastifer*.

Sospechamos que probablemente en el pasado, las 3 subpoblaciones de *T. hastifer* analizadas, formaban una sola población continua., pero debido a la formación de un asentamiento humano que actualmente las separa por medio de caminos y una cañada de riego, actualmente se estén comenzando a diferenciar. Suponemos además por la morfología floral, que esa antigua población grande mantenía un elevado flujo génico que le permitiera tener una alta diversidad genética como le correspondería a una especie perenne de vida larga tal y como lo es *T. hastifer*.

En lo referente a *T. tulensis* ssp. *matudae* argumentamos que la alta diversidad genética encontrada se deba probablemente a que se trata de una especie perenne de vida larga y que tenga algún mecanismo reproductivo que le permita mantener elevados niveles de variación genética a pesar de que se trata de una especie rara, endémica en peligro de extinción y restringida a un pequeño valle. Barret y Kohn (1991) han planteado que la distribución de las cantidades de diversidad genética dentro y entre las poblaciones de plantas raras probablemente dependan de si las especies siempre han sido raras o si lo han llegado a ser recientemente como consecuencia de la influencia humana ó como consecuencia de cambios climáticos recientes.

En el caso de *T. tulensis* ssp. *matudae*, sospechamos que al ser una especie con una marcada especialización edáfica (crece sólo en suelos de tipo gypsum y en laderas verdaderamente escarpadas), se trata de una especie que siempre ha sido rara y se haya adaptado de esa forma a un hábitat también raro y que a pesar de la sobrecolecta y a la presión humana ejercida sobre sus poblaciones naturales y en su hábitat, no se han presentado efectos o eventos que erosionen su alta diversidad genética.

El mismo argumento se utiliza en el caso de *T. tulensis* ssp. *buekii* que reveló también alta diversidad genética pero menor a la hallada en *T. hastifer* y en *T. tulensis* var *matudae*. Sin embargo, también contradijo lo esperado teóricamente para una especie endémica, restringida y amenazada. Esta especie también sospechamos que tenga algún mecanismo reproductivo que le permita mantener una alta diversidad genética además de que existe un nivel (aunque bajo) de flujo génico que tal vez también esté manteniendo los niveles de diversidad genética encontrados.

Finalmente, los RAPD's como marcadores moleculares utilizados en esta investigación, revelaron niveles elevados de polimorfismo dentro y entre poblaciones y

mostraron ser marcadores moleculares muy adecuados para estudios poblacionales y en el caso de especies en peligro de extinción, raras y endémicas; son muy apropiados y convenientes puesto que no requieren de cantidades elevadas de ADN genómico y permiten obtener muchos resultados en poco tiempo.

CONCLUSIONES

- Los niveles de variación genética encontrados en *T. hastifer* y en *T. tulensis* son altos comparados a los encontrados para otras especies endémicas y/o raras.
- *T. hastifer* y *T. tulensis* ssp. *matudae* tienen la diversidad genética más alta a pesar de ser taxa raras, endémicas, con distribución muy restringida y densidades muy bajas.
- G_{st} indicó que las subpoblaciones de *T. hastifer* están genéticamente diferenciadas y existe un moderado flujo génico.
- Los niveles de diversidad genética encontrados para la especie de mayor distribución, con poblaciones grandes y que probablemente no esté amenazada *T. tulensis* ssp. *tulensis* fueron los más bajos en comparación a las ssp. *buekii* y *matudae*.
- El análisis de agrupamiento y G_{st} indicaron que existe una diferenciación genética para las poblaciones de cada una de las variedades de *T. tulensis* aunque todavía se mantiene un nivel de flujo génico.
- Existe una marcada diferenciación genética entre las subespecies de *T. tulensis*.
- Los RAPD's mostraron ser marcadores moleculares muy adecuados en estudios poblacionales y de especies cercanas de cactáceas.