

**de la variabilidad
genética poblacional
del cactus columnar
Neobuxbaumia tetetzo
en el Valle de
Zapotitlán de las Salinas,
Puebla, México.**

Tesis de licenciatura que para
obtener el título de Bióloga, presenta

Blanca Estela Chávez Sandoval

Dra. Martha Martínez García
Directora de Tesis

Universidad Nacional Autónoma de México
Campus Iztacala
Los Reyes Iztacala, Estado de México; octubre del 2000.

287403



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

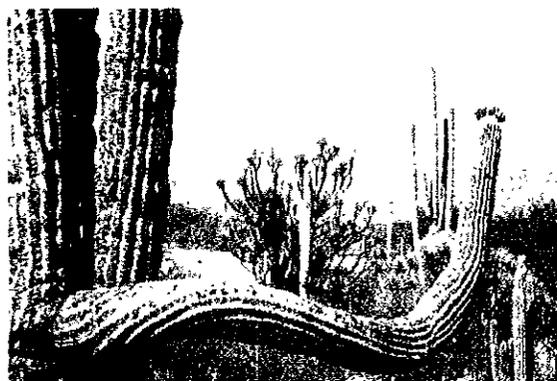


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.



Neobuxbaumia tetetzo

Foto: Blanca E. Cisneros Gandarez



de la variabilidad

genética poblacional

del cactus columnar

Neobuxbaumia tetetzo

en el Valle de

Zapotitlán de las Salinas,

Puebla, México.

Este trabajo se ha realizado en su parte experimental en el laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales (ENEP) Iztacala, y en el laboratorio 6 de CINVESTAV Unidad Irapuato, bajo la dirección de la *Dra. Martha Martínez García.*

Los científicos son gente de muy disímil temperamento que hacen cosas en muy diferentes caminos. Entre los científicos hay colectores, clasificadores y ordenadores compulsivos, muchos son detectives por temperamento y muchos son exploradores, algunos son artistas y otros artesanos. Hay científicos poetas y científicos filósofos, todos un poco místicos".

Peter B. Medawar. The art of the soluble, London: Methuen, 197, P 32.

(Tomado de Ayala et al., 1989)

A Dios, por todos los beneficios que he recibido siempre de su infinita protección, sin la cual tal vez no habría logrado nada de esto.

A mi familia, por todo el amor que siempre me han dado, por el apoyo económico y moral, por su comprensión y confianza

A Ulises Guzmán y Salvador Arias, por su generosa ayuda al comienzo de este trabajo.

A Gerardo Zúñiga y Fabián Vargas, por su ayuda desinteresada, por sus comentarios y enseñanzas sin los cuales este trabajo no hubiese podido ser completo.

A Martha Martínez y Jorge E. Campos, por la dirección y revisión de este trabajo.

A los demás profesores encargados de la revisión: *María del Coro Arizmendi, Diego Arenas y Daniel Tejero*.

A Rafael Lira Sade, por su amistad, el apoyo y la preocupación que siempre mostró para la realización y culminación de este trabajo.

A Azucena Mendoza, por su invaluable ayuda en el trabajo experimental, por su amistad y confianza.

A mis compañeros, del Laboratorio de Bioquímica Molecular:

Laura Patricia Alejos Velázquez, Wendy Cano Domínguez, Liliana Maruri Avidal, Alejandro Juárez López

Del laboratorio de Variación y Evolución Biológica
Beatriz Adriana Coyote Hidalgo,

Rubén Cortés Cruz, Hermilo Sánchez Sánchez, Omar Mejía Guerrero, Prof. Ramón Cisneros Barrios, Profa. Yolanda Salinas Moreno, Profa. Blanca Estela Rodríguez Martínez.

Del laboratorio 6 de CINVESTAV, Unidad Irapuato.

Miguel Paniagua, Silvestre, Novia de "Silver"

Porque han hecho siempre agradable el lugar de trabajo.

DEDICATORIA

A mi mamá, Profa. Estela Sandoval Gómez, te dedico este trabajo porque me has dado la oportunidad de vivir y me has educado siempre en una atmósfera de amor, comprensión y alegría.

A mi papi, Sr. José Manuel Chávez García, te dedico este trabajo porque me has enseñado a caminar por la vida, a ser fuerte y valiente, a tener decisión y seguridad, porque nunca me has negado nada y me has permitido vivir siempre en abundancia.

*A mis hermanos,
Raphael Ulises
Homero
María Magdalena
Teodora Flor de María
Aura Ameyali*

Por todos los momentos de alegría que hemos compartido, por todo el tiempo y el cariño que me han dado siempre.

Al amor de mi vida, Francisco García Franco (PEPY), que me has dado una ilusión, un mundo de innumerables maravillas, de tiernas sonrisas y dulces momentos; que me has hecho sentir la mujer más feliz del mundo, porque a tu lado lo voy descubriendo y

a cada paso que doy junto a ti sé que soy libre y feliz, que estoy viva y completa.

Gracias por tanto amor.

A mis amigos,

*Lilia Salazar Marcial
Roxana Carola
Mario Alberto de la C. Páez,
Karla Argelia
Lety*

Porque juntos hemos aprendido muchas cosas, entre tantas a compartir y a seguir siempre adelante.

*A la memoria de
Magdalena Zúñiga Chalico*

*En el instante preciso del suspiro
estás conmigo.*

*Mi alma se desliza fugazmente
y se filtra en tu sonrisa.*

*Vagamente recuerdo tu presencia
en el laberinto de la vida,
fuimos tan fugaces.*

*Poco a poco se alejaron nuestros
pasos y el llanto inundó los ojos, el
eco en los peñascos y el tibio
amanecer.*

*Me presentí en la soledad más
perfecta y aun estabas conmigo,
estás conmigo.*

*Siempre detrás del frágil cristal de
la vida que nos separa.*

*Tu lo atravesaste sutilmente y yo
quisiera quebrarlo para que me
devuelva la luz de tus ojos y tu
sonrisa...*

Mi felicidad

RAPD: Amplificación al azar del DNA polimórfico.

DNA: Ácido desoxirribonucleico

UPGMA: Análisis de agrupación por promedio aritmético no ponderado.

PCA: Análisis por componentes principales.

MST: Análisis de ordenación por componentes principales con árbol de tendido mínimo.

Cz: *Cephalobuxbaumia zapotitlana*.

N. tetetzo: *Neobuxbaumia tetetzo*.

CONABIO: Comisión nacional para el uso y conocimiento de la biodiversidad.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

AFLP: Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados.

OTUs: Unidades taxonómicas operativas.

AMOVA: Análisis de Varianza Molecular.

C I: Componente principal uno.

C II: Componente principal dos.

C III: Componente principal tres.

ONG: Organizaciones no gubernamentales.

Nm: Número de inmigrantes por generación.

M: Marcador molecular λ **HindIII**

n nuestro país aproximadamente el 60% del territorio está conformado por zonas áridas y semiáridas, es en estas zonas donde está representado el mayor número de endemismos de la flora mexicana. Las cactáceas ocupan del 42.5 al 45% de la diversidad de plantas vasculares en México, lo que hace necesario conocer su diversidad genética para así establecer estrategias de conservación eficientes.

La estructura genética de las plantas ha sido estudiada principalmente en términos de isoenzimas y polimorfismo morfológico, sin embargo estas descripciones no distinguen genotipos individuales como lo hacen los métodos moleculares. El método *RAPD* ha simplificado el estudio de la variabilidad genética poblacional y es uno de los más utilizados en diferentes campos de la Biología.

Los primeros estudios en la familia *Cactaceae* fueron iniciados a principios de los noventa, sin embargo pocas especies han sido analizadas desde el punto de vista de la genética de poblaciones, por lo que los resultados de la determinación de la estructura genética, el flujo génico y la variabilidad en poblaciones naturales de la cactácea columnar *Neobuxbaumia tetetzo* son pioneros en su tipo y permiten conocer la diversidad genética de la especie.

En cuanto a los resultados, el número total de marcadores obtenidos fue de 133 a partir de 7 cebadores y 40 organismos. El método de agrupación (UPGMA) combinado con los métodos de ordenación por componentes principales PCA y MST

indican patrones de variación comparables, donde se observa que los organismos no se agrupan a la zona de muestreo a la que pertenecen y donde *Cephalobuxbaumia zapotitlana*, híbrido entre los géneros *Cephalocereus* y *Neobuxbaumia* se encuentra relacionado con organismos de la zona C, que es la zona donde fue colectado, lo que nos hace suponer que el tiempo de floración y la alimentación de los murciélagos que actúan como polinizadores de estas plantas pueden estar implicados.

El resultado de la diversidad genética debe ser comparado con otras especies de cactáceas columnares en las que además se haya utilizado la misma técnica, con el análisis de varianza molecular se observa que la mayor parte de la varianza está dentro de las zonas y revela que hay un alto flujo génico, lo que explica el que los organismos no se relacionen con los individuos de su misma localidad de muestreo, por lo que en el Valle de Zapotitlán de las Salinas, *N. tetetzo* no presenta una estructuración, sino más bien una sola población no subdividida en la que los procesos de interacción común entre las especies pueden tener gran relevancia. Por lo cual sería importante el evaluar la efectividad de la participación de los murciélagos polinizadores en el flujo génico, a través del diseño de un análisis que permita correlacionar los tiempos de floración de las localidades con la ruta de forrajeo de los murciélagos del Valle de Zapotitlán de las Salinas.

In Mexico, approximately 60% of the territory is conformed by arid and semi arid zones. In these zones, it is represented the mayor number of endemism of the Mexican flora. The cacti represent from 42.5, to 45% of the diversity of vascular plants in Mexico; for that reason it is important to know its genetic diversity in order to establish efficient conservation strategies.

The plants genetic structure has been studied mainly using isozymes and morphologic polymorphism; nevertheless these descriptions do not distinguish individual genotypes as the molecular methods does. *RAPD* has simplified the study of the genetic population's variability and is one of the most used in the different Biology fields. The first studies in the cactaceae families were initiated at the early nineties nevertheless, few species have been analyzed from the point of view of the population genetics, reason why the results of the determination of the genetic structure, the gene flow and the variability in natural populations of the columnar cacti *Neobuxbaumia tetetzo* are pioneering in their kind.

The total number of markers obtained were 133 from 7 primers and 40

individuals. UPGMA was used as a method of grouping combined with other methods of arrangement like principal components PCA and MST, which indicates comparable patterns of variation, and it was observed that individuals did not group to their zone of sampling to where they belong and where the hybrid between *Cephalocereus* and *Neobuxbaumia* (*Cephalobuxbaumia zapotitlana*) is related to individuals of the zone where it was collected. This makes us suppose that the differences in the flowering time and feeding of the bats that act as pollinators of these plants can be implied.

These results must be compared with other from species of columnar cacti in which the same method has been used. The analysis of molecular variance shows that there is a high gene flow, which explains that the individuals are not related to the individuals of their same locality of sampling, this is the reason why in the Valley of Zapotitlán de las Salinas, *N. tetetzo* it is not structured, but rather is a single population not subdivided in which the process of common interaction among the species can have great relevance.

A b r e v i a t u r a s	I	7	A P É N D I C E	2 5
R e s u m e n	II	7.1	Método de Extracción del DNA	25
A b s t r a c t	III	7.2	Método de amplificación al azar del DNA Polimórfico (RAPD)	25
I n d i c e	IV			
1	I N T R O D U C C I Ó N	1	L I T E R A T U R A C I T A D A	27
 			Í N D I C E D E F I G U R A S	
2	O B J E T I V O S	5	Figura 1 Localización del área de estudio	7
 			Figura 2 Análisis Estadístico de los resultados	11
3	M A T E R I A L E S Y M É T O D O S	6	Figura 3 Gráfica de comparación de matrices	14
3.1	Área de estudio	6	Figura 4 Dendograma (UPGMA)	14
3.2	<i>Neobuxbaumia</i> Backeb	6	Figura 5 PCA	17
3.3	Método de Campo	8	Figura 6 A MST	18
3.4	Método de laboratorio	9	Figura 6 B MST	18
3.5	Análisis estadístico	9	Figura 7 DNA obtenido de <i>N. tetetzo</i>	26
	Índice de similitud	9	Figura 8 Amplificación <i>RAPD</i>	26
	Análisis de agrupación	9		
	Matriz cofenética	9		
	Análisis de ordenación	10		
	Análisis de varianza molecular	10		
	Diversidad genética	10		
 			Í N D I C E D E C U A D R O S	
4	R E S U L T A D O S	12	Cuadro 1 Estudios de variación genética en plantas	5
4.1	Extracción de DNA	12	Cuadro 2 Organismos colectados y analizados	12
4.2	Amplificación	12	Cuadro 3 Secuencia de cebadores número y peso molecular de los marcadores analizados	12
4.3	Análisis Estadístico de los datos	13	Cuadro 4 Diversidad genética	15
	Análisis de agrupación	13	Cuadro 5 Análisis de Varianza Molecular	15
	Matriz cofenética	13	Cuadro 6 Componentes principales del análisis de ordenación	15
	Análisis de varianza molecular (AMOVA)	15		
	Análisis de ordenación	15		
5	D I S C U S I Ó N	19		
6	P E R S P E C T I V A S	24		

as cactáceas columnares tienen su centro de diversificación en la región central de México. En esta región, la zona semiárida del Valle de Tehuacán y la zona tropical seca de la cuenca del río Balsas son las más ricas, ya que ahí se encuentran 45 de las 70 especies presentes en todo el país (Valiente-Banuet et al., 1996).

Dentro de la familia *Cactaceae*, la tribu *Pachycereeae* es un grupo de cactáceas columnares altamente especializado que ha evolucionado principalmente en el hemisferio norte. Se distribuye al sur de los Estados Unidos, México, las Antillas y el norte de Sudamérica (Cody, 1998). Esta tribu incluye 13 géneros y 58 especies, siendo *Stenocereus* el género más diverso con 20 especies seguido de *Neobuxbaumia* y *Pachycereus* con 9 especies respectivamente. A pesar de su amplia distribución, la principal riqueza florística de la tribu se encuentra en México, donde 9 géneros (64%) y 47 especies (81%) son endémicas al país (Dávila y Arias, 1998).

La subfamilia *Cactoeidea* engloba aproximadamente al 85% de la diversidad de las especies y muestra los más grandes

extremos morfológicos en hábitat y estructura. Estudios sistemáticos previos de esta subfamilia realizados por Buxbaum en 1958, Gibson y Nobel en 1986, Bartilott y Hunt en 1993, permiten dividirla en 10 tribus, basados en características morfológicas, estructura vegetativa, reproductiva y afinidad biogeográfica (Cota y Wallace, 1995).

En particular en la reserva de la Biosfera de Tehuacán la especie *Neobuxbaumia tetetzo* es de particular interés ya que tiene un papel ecológico-biológico importante. Es dominante en algunas zonas, especialmente en el norte de la reserva, formando lo que los habitantes denominan tetecheras. Además se sabe que es un recurso material importante para los pobladores de la región ya que de esta especie obtienen frutos y flores que son comestibles, incluso en casos extremos, los tallos secos se utilizan como leña.

Desde el punto de vista ecológico, las tetecheras juegan un papel fundamental ya que varios organismos (larvas de insectos y aves) utilizan sus tallos como lugares de nidación o reproducción. Asimismo se sabe que tienen interacciones muy estrechas con los murciélagos, con los

cuales se denotan procesos coevolutivos que apenas se empiezan a entender (Rojas-Martínez et al., 1999).

Dada la importancia biológica-ecológica de *N. tetetzo*, se propone este estudio con el fin de estudiar la estructura genética poblacional de la misma.

La diversidad genética de las especies silvestres en México es muy poco conocida (CONABIO, 1998), por lo que es urgente realizar estudios encaminados a documentar la variabilidad genética de los organismos que componen el ecosistema, ya que al conocer el potencial genético de las especies y la organización de los genes en las poblaciones se pueden establecer estrategias de conservación integrales.

La disciplina que estudia la forma en que se organiza la composición genética de las poblaciones, es la genética de poblaciones; esta área del conocimiento explica la continuidad de las poblaciones a través de las generaciones y la variación en espacio y tiempo como resultado de la acción de distintos factores como son: la selección natural, migración, sistemas reproductivos y deriva génica (Puertas, 1992).

Esta disciplina se ha desarrollado

según dos líneas principales. Una de ellas es teórica la cual, partiendo del conocimiento de los mecanismos de la herencia, desarrolla modelos matemáticos aplicables a situaciones específicas; otra es experimental, la cual parte de la observación y el análisis de las poblaciones en la naturaleza y del desarrollo de experimentos en el laboratorio (Prevosti, 1984).

En los estudios experimentales de la genética de poblaciones se han utilizado varios tipos de marcadores morfológicos y moleculares, siendo algunos de ellos más adecuados para ciertas aplicaciones que otros (Hsiao y Lee, 1999).

La estructura genética poblacional de plantas ha sido estudiada principalmente en términos de enzimas y polimorfismo morfológico. Sin embargo, estas descripciones a veces no son lo bastante variables para distinguir genotipos individuales (Hsiao y Lee, 1999).

Nuevas técnicas han sido diseñadas para comprender mejor la complejidad biológica, procesos evolutivos y relaciones filogenéticas en diferentes grupos de organismos (Cota y Wallace, 1996). Uno de los métodos más utilizados es la amplificación al azar del DNA polimórfico conocida

como *RAPD* (*Random Amplified Polymorphic DNA*) el cual ha simplificado el estudio de la variación genética y la estructura genética poblacional.

Las ventajas de este método en términos de costo y tiempo han hecho de este método molecular uno de los más utilizados en diversos campos de la biología (Otero *et al.*, 1997).

El *RAPD* es una modificación de la técnica de PCR básica, donde en vez de utilizar un par de oligonucleótidos cuidadosamente diseñados y de tamaño adecuado para una secuencia específica, se utiliza un solo oligonucleótido de diez bases, el cual es capaz de unirse a diferentes regiones del genoma, lo que producirá la amplificación de secuencias aleatorias de un complejo de DNA utilizado como templado (Breyne *et al.*, 1997).

Los productos de amplificación individuales representan un alelo por locus, los cuales son transmitidos como marcadores dominantes. (Breyne *et al.*, 1997).

El polimorfismo es resultado de cambios tanto en el sitio de unión del oligonucleótido (ej. mutaciones puntuales) o cambios que alteran el tamaño o evitan la amplificación del DNA (ej. Inserciones,

deleciones, translocaciones) (Breyne *et al.*, 1997).

El criterio genético permite identificar y evaluar poblaciones de especies particulares dignas de conservación prioritaria, ya que las poblaciones no son iguales en cuanto a su capacidad para responder adaptativamente a condiciones ambientales cambiantes y al considerar que la pérdida de variabilidad reduce la capacidad de las poblaciones para adaptarse a cambios en el ambiente, los marcadores moleculares resultan ser una herramienta útil para el análisis de la diversidad de las poblaciones vegetales, por lo que diversas técnicas de Biología Molecular se han utilizado para llevar a cabo estudios detallados de la constitución genética (Conduit y Hubell, 1991; Hoelzel y Green 1992; Kijas *et al.*, 1995; Chase *et al.*, 1996; Harrison *et al.*, 1997; De Greef y Triest, 1997) y flujo de genes entre poblaciones (Assmussen y Schnabel, 1991; Ennos, 1994).

Con el desarrollo de estrategias generales en la detección de polimorfismos moleculares, basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como los *RAPD* y *AFLP* (*Amplified Fragment Length*

Polimorphism) (Becker *et al.*, 1995), como está indicado en las referencias del cuadro 1, se ha podido dilucidar si existe aislamiento reproductivo entre poblaciones, estimar niveles de entrecruzamiento (Fritsch y Rieseberg, 1992), estudiar relaciones de parentesco (Philbrick, 1993), relacionar distancias genéticas con características geográficas (De la Cruz *et al.*, 1995) o funcionales (Whitty *et al.*, 1994). En estudios sobre identificación de características de interés, como son la determinación del sexo en híbridos (Hormaza *et al.*, 1994 y Mulcahy *et al.*, 1992), resistencia a hongos (Lawson *et al.*, 1996, Procinier *et al.*, 1995, Dweikat *et al.*, 1994), resistencia a nemátodos (Klein-Lankhorst *et al.*, 1991), resistencia a virus (Ohmori *et al.*, 1995, 1996), morfología de polen (Gambier y Mulcahy, 1996), en estudios sobre mapeo genético (Mouzeyar *et al.*, 1995, Robbins *et al.*, 1994; Maisonneuve *et al.*, 1994; Hombergen y Bachmann, 1995; Camargo *et al.*, 1997) en estudios de variación y estructura genética de poblaciones, como por ejemplo los trabajos de Martín y colaboradores (1997) acerca de la diversidad genética en poblaciones de *Erodium paularense*, el

análisis de la variabilidad genética de una población de arroz silvestre de Sudamérica *Oryza glumaepatula* con isoenzimas y RAPD (Buso *et al.*, 1998), la estructura genética poblacional de *Yushania niitakayamensis* (Bambusoideae, Poaceae) en Taiwán (Hsiao y Rieseberg., 1999), la variación genética en *Fitzroya cupressoides* (alerce), una conífera endémica del sureste de Chile que se encuentra amenazada (Allnut *et al.*, 1999) y en estudios con implicaciones evolutivas (Peakall *et al.*, 1995) entre otros.

Sin embargo, la genética de las poblaciones de cactáceas ha sido poco estudiada (Hamrick, 1998); la gran mayoría de estudios han estado basados en aspectos morfológicos de taxonomía clásica y biogeografía, otros pocos han empleado otras herramientas tales como citología y bioquímica, o una combinación de ambas con caracteres morfológicos (Cota y Wallace, 1996), pero los datos acerca de la variabilidad genética en el ámbito molecular, para esta familia, no existen, por lo que los resultados obtenidos en este trabajo, son pioneros en su tipo y permiten conocer la diversidad intragenética existente en la especie estudiada.

FAMILIA	ESPECIE	REFERENCIA	FAMILIA	ESPECIE	REFERENCIA
Alstroemeriaceae	<i>Alstroemeria</i> spp	Anastassopolus y Kei. (1996)	Moraceae	<i>Humulus lupulus</i>	Pillay y Keni (1996) et al., (1996)
Graminae	<i>Buechloe dactyloides</i> , <i>Panicum virgatum</i> , <i>Poa annua</i> , <i>Sorghum bicolor</i> y <i>Oryza glumepatula</i>	Peakall et al., (1995). Gunter et al., (1996), Sweeny y Danneberg (1995), Menkir et al. (1997), Buso et al., (1998)	Myrtaceae	<i>Eucalyptus globulus</i> , <i>Picea abies</i>	Nesbitt et al., (1995), Bucchi y Menozzi, (1995)
Palmae	<i>Elaeisis guineensis</i>	Shah et al., (1994)	Polygonaceae	<i>Fagopirum esculentum</i>	Kump y Javornik., (1996)
Cruciferae	<i>Brassica napus</i>	Hallden et al. (1994)	Proteaceae	<i>Grevillea scapigera</i>	Rosseto et al., (1995)
Diperocarpaceae	<i>Shorea</i> spp	Harada et al., (1994) y Novy et al (1996)	Rosaceae	<i>Prunus americana</i>	Gogorcena y Partiff (1994)
Ericaceae	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	Steward y Excoffier (1996)	Rubiaceae	<i>Coffea arabica</i>	Lasheimes et al., (1996)
Gesneriaceae	<i>Orobancha aegyptica</i> y <i>O. Crenata</i>	Paran et al. (1997)	Salicaceae	<i>Populus tremulaoides</i> y <i>P grandidentata</i>	Tusken et al., (1996), Yeh et al., (1995) Liu y Fianier., (1993), Chong et al., (1994)
Geraniaceae	<i>Erodium paularense</i>	Martin et al., (1997)	Sapindaceae	<i>Simmondsia chinensis</i>	
Leguminosae	<i>Glicine max</i> , <i>Glicicidia sepium</i> y <i>G Maculata</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Tribolium pratense</i> y <i>Vicia pisiformis</i>	Helms et al., (1997) Cnalmers et al., (1992) Liu (1996), Bonnin et al., (1996), Haley et al (1994), Skroch y Nienhuis (1995)	Sterculiaceae	<i>Theobroma cacao</i>	Amarger y Mercier., (1995)
Malvaceae	<i>Iliamna corei</i> y <i>I. Remota</i>	Steward y Porter (1995)	Pinaceae	<i>Pinus</i> spp., <i>P sylvestris</i> y <i>Pseudotsuga mensiezii</i>	Whitkus et al., (1997) Mosseier et al., (1992), Szmidt et al., (1996), Ageard et al., (1995)

Estudio de variación y estructura genética de poblaciones de plantas en las que han utilizado RAPD (tomado de Otero et al., 1997)

En el Valle de Tehuacán se han realizado diversos trabajos de tipo ecológico y demográfico que describen aspectos florísticos de las comunidades vegetales (Cota y Wallace, 1996; Godínez-Álvarez y Valiente-Banuet, 1998; Valiente-Banuet y Bolongaro-Cervena, 1991; Valiente-Banuet y Ezcurra, 1991; Valiente-Banuet et al. 1996; Valiente-Banuet et al., 1997; Valiente-Banuet et al., 1991; Harper, 1977; Godínez-Álvarez, en prensa; Godínez-Álvarez y Valiente-Banuet, 1998), en los que se ha visto entre otras cosas, que los murciélagos juegan un papel importante tanto en la polinización como en la dispersión de las semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* (Valiente-Banuet et al., 1991).

Por lo que si los principales factores ecológicos que influyen en la demografía de las poblaciones de *N. tetetzo* en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán están ejerciendo una acción homogenizadora de las poblaciones, entonces podríamos esperar la ausencia de una estructura poblacional subdividida a nivel genético entre las poblaciones de *N. tetetzo* del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

Los objetivos para el presente trabajo de investigación son:

Caracterizar genéticamente las poblaciones de la Cactácea Columnar *Neobuxbaumia tetetzo* y determinar la estructura genética, el flujo génico y la variabilidad en poblaciones naturales de *N. tetetzo*, mediante marcadores RAPD.

3.1 Área de Estudio

El Valle de Tehuacán-Cuicatlán se localiza en el sudeste del Estado de Puebla y el noroeste de Oaxaca entre los 17°39' y 18°53' de latitud norte y 96°55' y 97°44' de longitud oeste (Dávila *et al.*, 1993).

Las cactáceas columnares ocupan amplias extensiones en el Valle de Tehuacán formando "bosques" suculentos de abundancia sorprendente, se presentan en densidades de aproximadamente 1,200 a 1,800 individuos por hectárea (Valiente-Banuet *et al.*, 1995). Los suelos son rocosos y arcillosos, se derivan principalmente de roca sedimentaria y metamórfica. La vegetación está clasificada como matorral xerófilo (Rzedowsky., 1978; Zavala-Hurtado., 1982).

El clima del área puede clasificarse dentro de los tipos semi áridos a los áridos con precipitación media anual de 400 mm (Valiente-Banuet *et al.*, 1995) y temperatura media anual de 21°C (García., 1988).

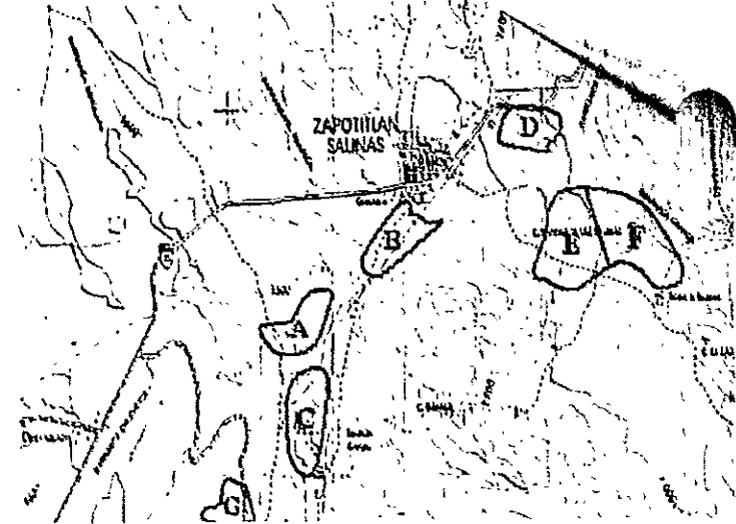
Para el presente estudio se eligió una área en el noroeste de este Valle, conocida como Zapotitlán de las Salinas

(Fig.1). El área tiene una superficie aproximada de 3000 hectáreas y se encuentra situada entre los 18°10' y 18°23' de latitud norte y los 97°25' y 97°35' de longitud Oeste.

Zapotitlán de las Salinas está limitada al Oeste por los cerros Yerba, Ometepec, Campanario, La Mesa, Xentile y Yolotepec, así como por el Paso Agua del Burro; al noroeste, por la Sierra Miahuatepec, al este por la Sierra de Atzingo. Al sur por la Mesa Buena Vista y el Cerro Yistepec; y al sudoeste por la Sierra de Santiago (Dávila *et al.*, 1993).

3.2 *Neobuxbaumia* Backeb

En este Valle se han realizado diversos trabajos de tipo ecológico y demográfico que describen aspectos florísticos de las comunidades vegetales (Cota y Wallace., 1996). Como la germinación y crecimiento temprano de las semillas tomando en cuenta el papel de los suelos, la ingestión de las semillas para su dispersión por aves y murciélagos, el efecto de la sombra y el nivel de nutrientes en los suelos sobre el crecimiento de las plántulas, las modificaciones micro ambientales producidas por las plantas nodriza (Godínez-Álvarez y Valiente-



El área de estudio se localiza en el sudeste del estado de Puebla. Las zonas A a la G, se colectaron en el Valle de Zapotitlán, las zonas H, I y J se encuentran en la localidad de San Rafael Coxcatlán que está en las cercanías del estado de Oaxaca.

Banuet., 1998) y de las relaciones ecológicas de las cactáceas columnares y murciélagos nectívoros para cuantificar las características generales del síndrome de quiropterofilia en la tribu Pachycereeae (Valiente-Banuet. et al., 1996), entre otros. ***Neobuxbaumia Backeb.*** Es uno de los géneros más interesantes de cactáceas columnares. Perteneciente a la tribu Pachycereeae, es endémico de México y se distribuye en las regiones semi áridas y cálido secas del noroeste, centro y sur del territorio. Un miembro de este género es *Neobuxbaumia tetetzo* (Coulter) Backeberg, la cual es una cactácea columnar endémica de los estados de Oaxaca y Puebla. En el Valle de Zapotitlán es el elemento dominante del tipo de vegetación, alcanza más de 12 m. de altura y ocupa aproximadamente 400 Kms² en este Valle (Valiente-Banuet et al. 1996).

Valiente-Banuet et al.,(1997) ha estudiado la biología de la polinización de las cactáceas columnares gigantes con floración invernal, ya que en el Valle 36 especies de cactáceas columnares, en las que está incluida *Neobuxbaumia tetetzo*, tienen un pico de floración casi simultáneo entre abril y junio, no obstante dos especies, *Pachycereus weberii* y *Pilosocereus chrysacanthus* florecen en invierno y a principios de primavera cuando hay una escasez aparente de murciélagos, encontrando que hay una pequeña población de murciélagos nectívoros residente en el Valle. Valiente-Banuet y Ezcurra (1991) estudiaron el efecto de la sombra como una causa de asociación entre *Neobuxbaumia tetetzo* y la leguminosa *Mimosa luisana* quien está actuando como planta nodriza, así como la interacción entre estas dos especies. Los autores

indican que el efecto del nodricismo es principalmente resultado de una mayor supervivencia de las plántulas en micro sitios sombreados con menos radiación solar directa, con menor temperatura durante el día y con menor evaporación. Valiente-Banuet y Bolongaro-Cervena (1991) estudiaron las relaciones espaciales de las cactáceas y las plantas nodrizas, los resultados muestran que el fenómeno de nodricismo en las comunidades áridas y semi áridas dominado por las cactáceas, como en el Valle de Zapotitlán, puede ser considerado esencial para el desarrollo de una estructura dinámica fragmentada en estas comunidades. Valiente-Banuet *et al.* (1996) sugiere que las grandes distancias que migran los murciélagos nectarívoros están determinadas por la secuencia de floración de sus plantas preferidas, de tal forma que si los murciélagos desaparecen del Valle de Tehuacán, la polinización de las plantas más comunes y abundantes podría suspenderse propiciando que el reclutamiento de semillas no ocurra, situación que podría provocar grandes cambios en la estructura y composición de la comunidad desértica. De aquí que se proponga que la germinación y el establecimiento de las

semillas son las fases más críticas del ciclo de vida de estas plantas.

Godínez-Álvarez (1998), estudió las interacciones bióticas y la dinámica poblacional de *Neobuxbaumia tetetzo* para determinar los estadios críticos del ciclo de vida de esta especie. Sus resultados muestran que los pájaros y murciélagos juegan un papel primario en la dispersión de las semillas al acarrearlas a sitios seguros, generando así un patrón de distribución no aleatorio.

3.3 Método de campo

Para la colecta se determinaron 10 zonas de muestreo. Siete localizadas en la cuenca de Zapotitlán y tres en la región de San Rafael Coxcatlán, Puebla (Fig.1), las cuales se establecieron con base a criterios geomorfológicos y fisonómicos de la vegetación, mediante método preferencia y utilizando fotografías aéreas escala 1:20 000 y con verificación de campo. En cada zona se trazaron cuadrantes de 20 X 20 m. en los que se seleccionaron al azar de 5 a 13 organismos (Arias *et al.*, 1997). De los organismos se colectó 10 cm del tallo, las muestras se trasladaron al laboratorio donde se almacenaron a -70°C hasta su procesamiento.

3.4 Método de laboratorio

Para la extracción del DNA se utilizó la técnica de Dellaporta y Wood (1983) que consiste en macerar los tejidos en mortero con vidrio molido y nitrógeno líquido, posteriormente se realizaron las amplificaciones (Apéndice).

3.5 Análisis Estadístico de los datos

En el presente estudio, los marcadores moleculares (bandas) se codificaron como datos de presencia/ausencia (Fig. 2), el alelo dominante representa la presencia de la banda en la que los individuos $+/+$ y $+/-$ tienen el fenotipo (1) y los individuos $-/-$ tienen el fenotipo (0) (Crisci, 1983), de esta forma se construyó una matriz binaria de 40 OTU's por 133 marcadores y a partir de ella se obtuvieron las distancias genéticas mediante el índice de similitud de Jaccard.

Índice de Similitud de Jaccard

La elección del índice está supeditada al tipo de datos que contiene la matriz, el índice de Jaccard es el mejor cuando se trabaja con datos de presencia/ausencia y como la matriz de similitud es insuficiente para expresar las relaciones entre todos los individuos, con el fin de sintetizar la información y permitir el

reconocimiento de las relaciones entre individuos, se utiliza el análisis de agrupamiento y el método de ordenación (Crisci, 1983).

Análisis de agrupación

El análisis de agrupamiento se realizó con el método **UPGMA** (Análisis de ligamiento por promedio aritmético no ponderado). Como es imposible que el dendograma sea una representación exacta de la matriz de similitud, es necesario medir que tanto la representación gráfica representa a la matriz original.

Para ello se construyó una nueva matriz a partir de los valores del dendograma que se denomina **matriz cofenética** y se procedió a la comparación de matrices, para lo cual se calculó el coeficiente de correlación mediante la prueba de Mantel, entre la matriz que dio origen al dendograma y la matriz cofenética. Una alta correlación es señal de escasa distorsión y viceversa, finalmente se obtiene la gráfica de dispersión correspondiente, a partir de esos mismos datos, figura 2 (Crisci, 1983).

A pesar de su uso común en el tratamiento de datos genéticos los métodos de agrupamiento tienen desventajas ya que finalmente tienen que unir todos los

datos y a veces se ven incluso forzados a hacer uniones arbitrarias, por lo que en ocasiones este procedimiento es inapropiado, sobre todo cuando se pretende resumir las relaciones en conjunto de los individuos.

Análisis de ordenación

Por tal motivo, se realizó también un análisis de relación espacial de los individuos, que provee una representación gráfica de las relaciones entre organismos.

La configuración de los datos que resulta de los métodos de ordenación se proyecta en gráficas bidimensionales (**PCA**) y tridimensionales (**MST**), además en muchas ocasiones los métodos de ordenación dan un mejor agrupamiento de los datos (Guiller, 1998).

El análisis de estos parámetros poblacionales se llevó a cabo con el programa Ntsys (Versión 2).

Análisis de Varianza Molecular

Un Análisis de varianza molecular (AMOVA) de las frecuencias de las bandas puede estimar la estructura genética de poblaciones diploides en equilibrio Hardy-Weinberg o con un nivel alto de autofecundación (Steward y Excoffier, 1996). Sin embargo, una alternativa para estimar la

estructura genética sin la suposición de un equilibrio Hardy-Weinberg, es considerar la diversidad genotípica de las bandas de cada individuo como un genotipo distinto y estimar las similitudes y diferencias con base en las mismas (Huff *et al.* 1993, Whitkus *et al.* 1997).

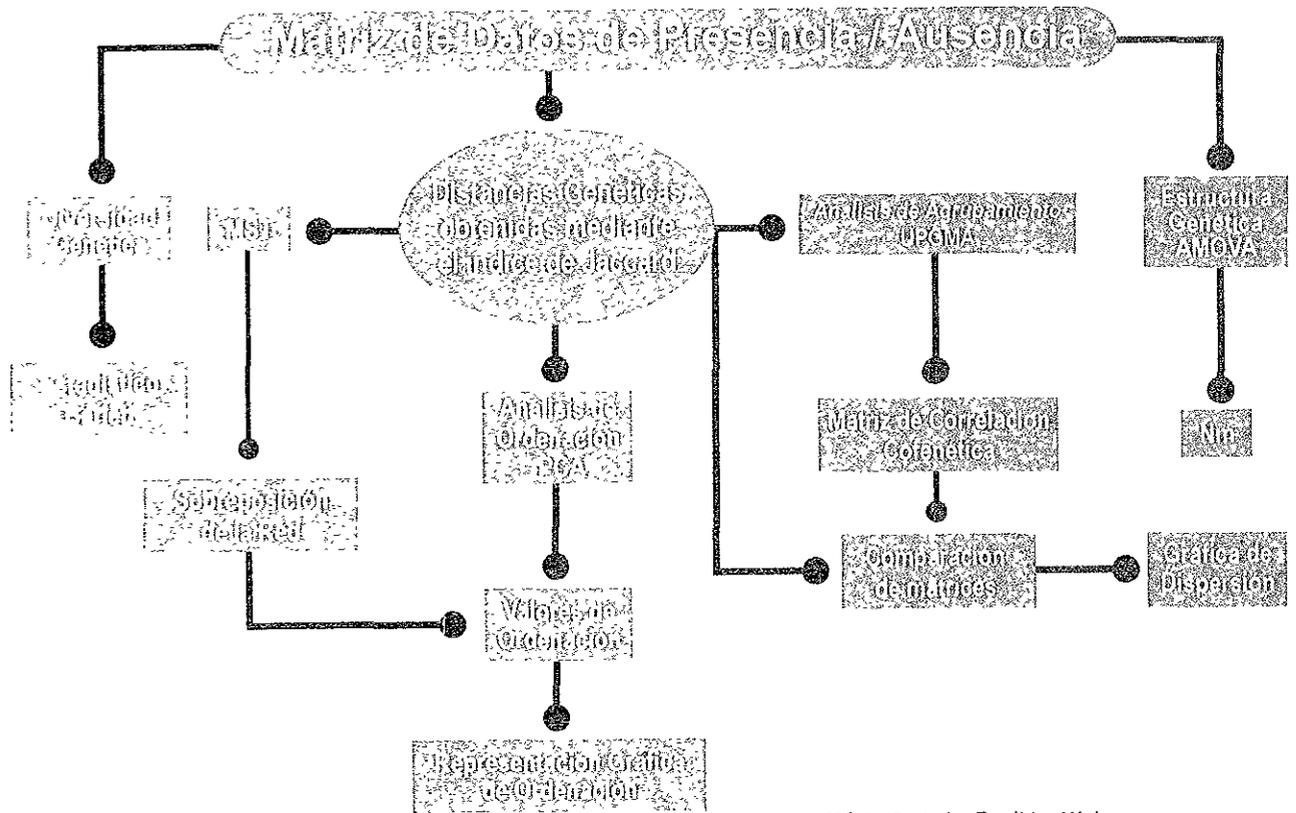
De esta última manera fue como se realizó el AMOVA para los datos de *Neobuxbaumia tetetzo*. El programa AMOVA genera una Φ estadística, análoga a la F_{ST} de Wright, y a partir de la cual se puede deducir el número de inmigrantes por generación (Nm). La estadística de Excoffier *et al.* (1992) es idéntica a la de Weir y Cockerham (1984), excepto que son estimadas mediante procedimientos diferentes.

Diversidad Genética

La diversidad genética para *N. tetetzo* se estimó por medio del índice de Shannon a partir de la relación $H_0 = - \sum P_i \log_2 P_i$, donde P_i es la frecuencia del haplotipo (presencia o ausencia de cada marcador, tratando cada marcador *RAPD* como un locus simple), con el objeto de proveer una estimación relativa del grado de variación entre cada localidad (Hartl, 1994).

Estadístico de Barlett

Se aplicó el estadístico de Barlett, que es una prueba no paramétrica de varianza molecular, para probar si el resultado de la diversidad genética para N . tetetzo es estadísticamente significativo.



MST: Red de Tendido Mínimo.
AMOVA: Análisis de Varianza Molecular.
UPGMA: Método de Ligamento del Promedio Arimético no Ponderado.
PCA: Análisis de Componentes Principales.
Nm: # de Inmigrantes por Generación

Diagrama de flujo utilizado para la realización del análisis estadístico de los resultados, partiendo de la matriz de datos de presencia/ausencia.

4.1 Extracción de DNA.

el aislamiento de DNA, que se realizó a 39 organismos de *N. tetetzo* y uno de *Cephalobuxbaumia zapotitlana* se obtuvo una concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ que va de 0.2463 como valor mínimo hasta un valor máximo de 2.939 (Cuadro 2).

4.2 Amplificación

Se utilizaron 7 cebadores: OPE 09, OPA 11, OPC 07, OPC08, OPJ05, PG18 y OPD 13, de los cuales se presenta su secuencia, el número de marcadores identificados para cada uno y el peso molecular de los mismos (Cuadro 3).

Al separar los fragmentos obtenidos de las amplificaciones mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.2%, se obtuvieron 18 marcadores para el cebador OPE 09, 24 para el OPA 11, 16 para el OPC 07, 17 con el OPC08, 22 con el OPJ 05, 14 para el OPG 18 y 22 para el OPD 13, por lo que se obtuvieron un total de 133 marcadores polimórficos para los 40 organismos analizados.

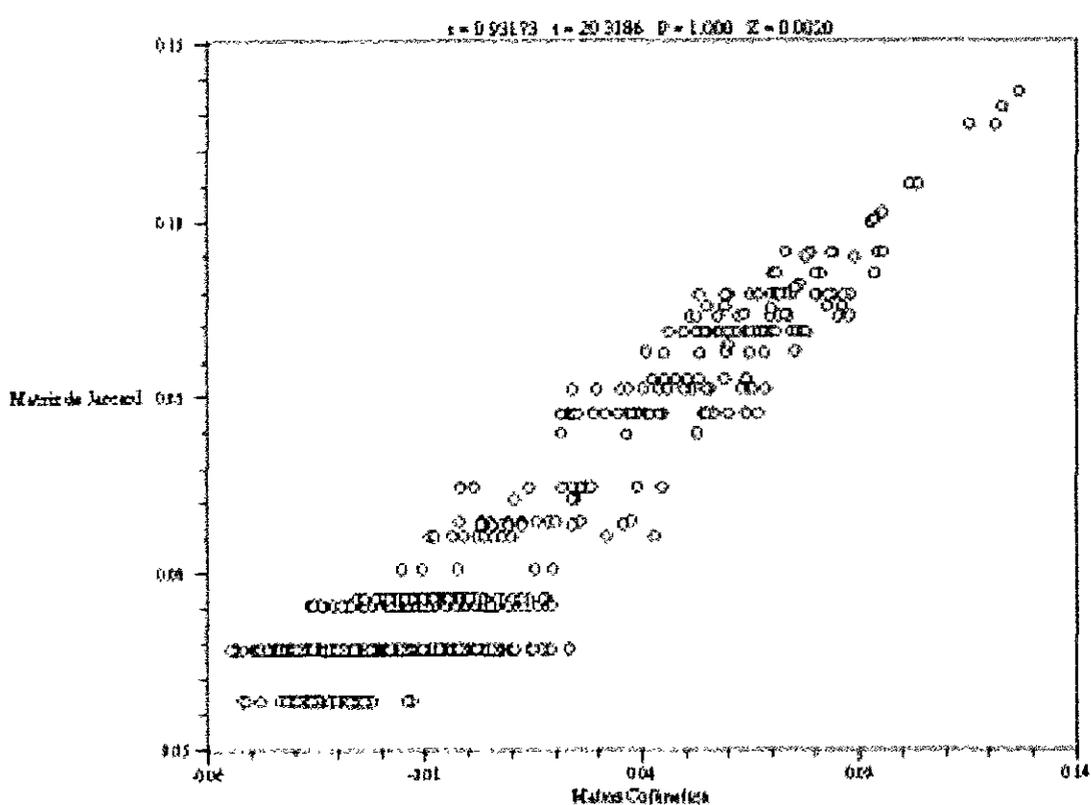
Cuadro 2. Número de organismos analizados por zona.

ZONA	Organismos Analizados
<i>Neobuxbaumia tetetzo</i>	
A	3
B	2
C	4
D	3
E	7
F	9
G	5
H	2
I	2
J	2
<i>Cephalobuxbaumia zapotitlana</i>	
C	1
Total de organismos 40	

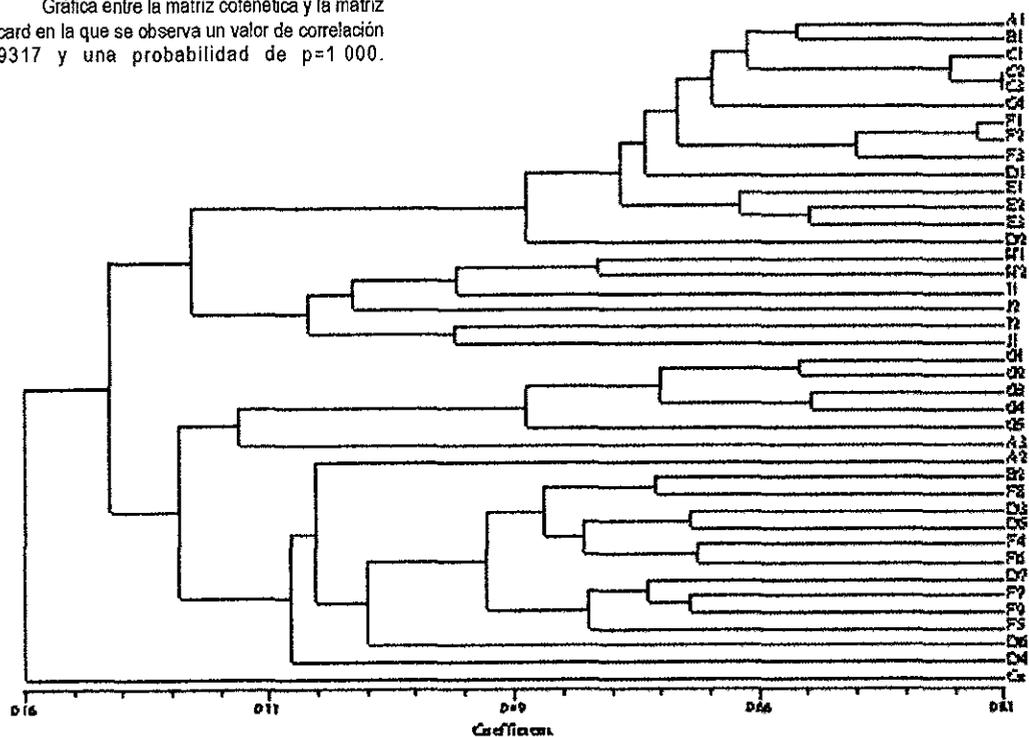
Cuadro 3. Secuencia de los 7 cebadores utilizados, número de marcadores identificados y peso molecular de los mismos.

Cebador	Secuencia	Número de Marcadores	Rango Molecular (Pb)
OPE09	^{5'} CTTCACCCGA ^{3'}	18	3517, 2744, 2597, 2526, 2201, 2083, 1717, 1377, 1200, 989, 772, 751, 619, 510, 444, 377, 278, 184
OPC07	^{5'} GTCCCCGAGGA ^{3'}	16	3165, 1700, 1650, 1590, 1415, 1251, 1041, 921, 867, 638, 515, 455, 415, 306, 297, 239
OPC08	^{5'} TGGACCGGTG ^{3'}	17	2439, 2212, 2049, 1835, 1798, 1770, 1657, 1637, 1562, 1325, 1264, 1000, 889, 737, 667, 556, 506
OPJ01	^{5'} CCCGGCATAA ^{3'}	24	2759, 2640, 2584, 2493, 2404, 1975, 1886, 1662, 1469, 1323, 1196, 1080, 930, 882, 758, 603, 545, 502, 462, 434, 423, 345, 289, 162
OPJ05	^{5'} CTCCATGGGG ^{3'}	22	2601, 2582, 2555, 2482, 2301, 2254, 2246, 2214, 2175, 2121, 1602, 1444, 1205, 1174, 1006, 907, 797, 599, 487, 348, 242, 224
OPG18	^{5'} GGCTCATGTG ^{3'}	14	3521, 2919, 2586, 2352, 1899, 1855, 1164, 1239, 1100, 868, 735, 608, 503, 474
OPD13	^{5'} GGGGTGACGA ^{3'}	22	2795, 2455, 2430, 2392, 2331, 2101, 1995, 1846, 1798, 1752, 1580, 1461, 1387, 1251, 1218, 965, 784, 688, 637, 605, 574, 491

Total 133



Gráfica entre la matriz cofinética y la matriz de Jaccard en la que se observa un valor de correlación $r=0.9317$ y una probabilidad de $p=1.000$.



Análisis de agrupación mediante el método UPGMA, obtenido a partir de 39 organismos de *N. tetetzo* y uno *Cephalobuxbaumia zepotitlana* (C.z) usado como referencia externa.

Diversidad Genética

La diversidad genética para *Neobuxbaumia tetetzo* se obtuvo por cebador y por sitio los cuales variaron entre los primeros de 1.0 a 2.74, y entre los segundos de 1.17 a 2.74 respectivamente. El sitio D es el que presenta el mayor valor de diversidad que es de 2.74, seguido por el sitio F con un valor de 2.58 posteriormente se encuentra el sitio E con 1.38 y el sitio C con 1.33 y por último el sitio A que tiene una diversidad de 1.17, obteniéndose así una diversidad promedio para la especie de 1.52 (Cuadro 4).

Cuadro 4. Diversidad genética para *N. tetetzo* obtenida, por cebador y por sitio, con el índice de Shannon.

Cebador	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	S16	S17	S18	S19	S20	Media
OPC08	1.58	1.0	1.5	2.80	1.58	1.58	3.16	2.32	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.52
OPJ05	0.15	1.0	1.5	2.80	1.58	1.58	3.16	1.52	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.52
OPC07	0.15	1.0	1.5	2.92	0.15	0.15	3.16	2.32	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.52
OPD13	1.58	1.0	1.0	2.80	1.58	1.58	2.64	2.32	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.52
OPE09	1.58	1.0	0.81	2.80	1.58	1.58	2.94	0.97	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.52
OPG18	1.58	1.0	1.5	2.23	1.58	1.58	1.53	1.92	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.52
OPJ01	1.58	1.0	1.5	2.80	1.58	1.58	1.43	2.32	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.52
Media	1.17	1.0	1.33	2.74	1.38	1.38	2.58	1.95	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.52

Estadístico de Barlett

La prueba no paramétrica de homogeneidad basada en el estadístico de Barlett dio un resultado de 1.2952 con una probabilidad $P = 0.0010$ después de 1000 permutaciones, lo cual indica que no hay diferencias significativas de diversidad genética entre las diez poblaciones analizadas.

Análisis de Varianza Molecular

El Análisis de varianza molecular revela que la mayor parte de la variabilidad genética (73.13%) está dentro de las zonas y que solo una parte (26.87%) está distribuida entre las zonas (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para *N. tetetzo*, obtenida a partir de 39 organismos colectados en 10 sitios del Valle de Zapotitlán de las Salinas.

Varianza entre Poblaciones	V(A) (26.87%)
Varianza dentro de las Poblaciones	V(B) (73.13%)

Análisis de Ordenación

Componentes principales (PCA)

Los primeros tres componentes del análisis de ordenación explican el 18.37%, 8.81 % y 6.82% respectivamente, de la variación total (Cuadro 6).

Cuadro 6. Porcentaje de los componentes principales empleados en el análisis de ordenación.

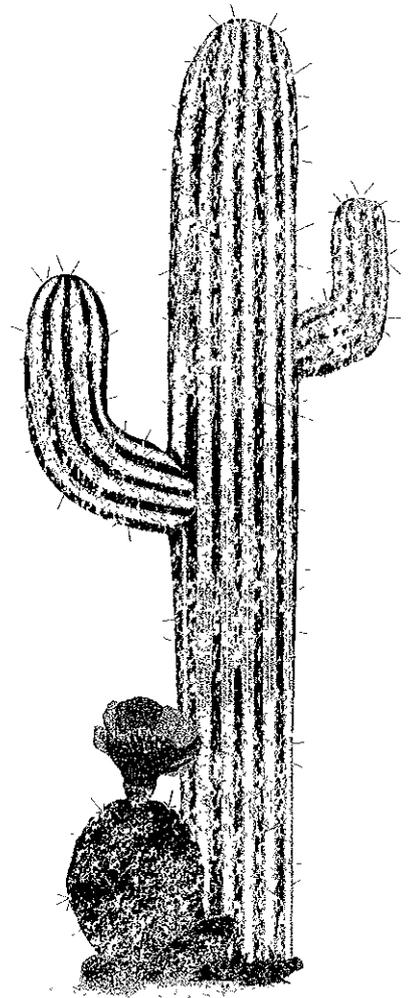
Componente	Porcentaje	Acumulación	Acumulación
1	15.0139	18.3794	18.3794
2	2.4057	8.8184	27.1978
3	1.8627	6.8280	34.0258
4	1.18787	4.3543	38.3801
5	1.0534	3.8615	42.2416
6	1.0043	3.6815	45.9231
7	0.9264	3.3960	49.3191
8	0.8326	3.0521	52.3712
9	0.7885	2.8906	55.2618
10	0.7442	2.7280	57.9897
11	0.7206	2.6417	60.6314
12	0.6668	2.4444	63.0759
13	0.6481	3.3758	65.4516
14	0.6124	2.2451	67.6967
15	0.5789	2.1222	69.8189
16	0.5747	2.1070	71.9258
17	0.5253	1.9257	73.8515
18	0.5137	1.8831	75.7346
19	0.4871	1.7857	77.5203
20	0.4622	1.6944	79.2146

La representación gráfica del PCA (Fig. 6) muestra que los individuos de las zonas A, B, C, D, E, F y G forman un grupo compacto entre ellos, diferente al conformado por los individuos correspondientes a las zonas H, I, J, que se encuentra muy cercano al grupo de individuos correspondientes a las zonas A y G y diferente al que conforman los individuos de las zonas A, B, D y F.

El individuo *C. zapotitlana* (Cz) se localiza en el centro de la gráfica, con una asociación más cercana a los individuos de las zonas A, B, C, D y E.

Análisis de Ordenación Con árbol de tendido mínimo sobrepuesto (MST)

En el árbol de tendido mínimo (Fig. 7 A y B) se observa que los individuos de las zonas A, B, C, D, E y F, se unen con el grupo integrado por los individuos de las zonas H, I y J; además los individuos de este primer grupo se encuentran estrechamente relacionados en el espacio con individuos de las zonas G y A, que a su vez se relacionan con individuos correspondientes a las zonas A, B, D, E, y F. *C. zapotitlana* se encuentra relacionado con individuos de las zonas A, B, C, D y F.



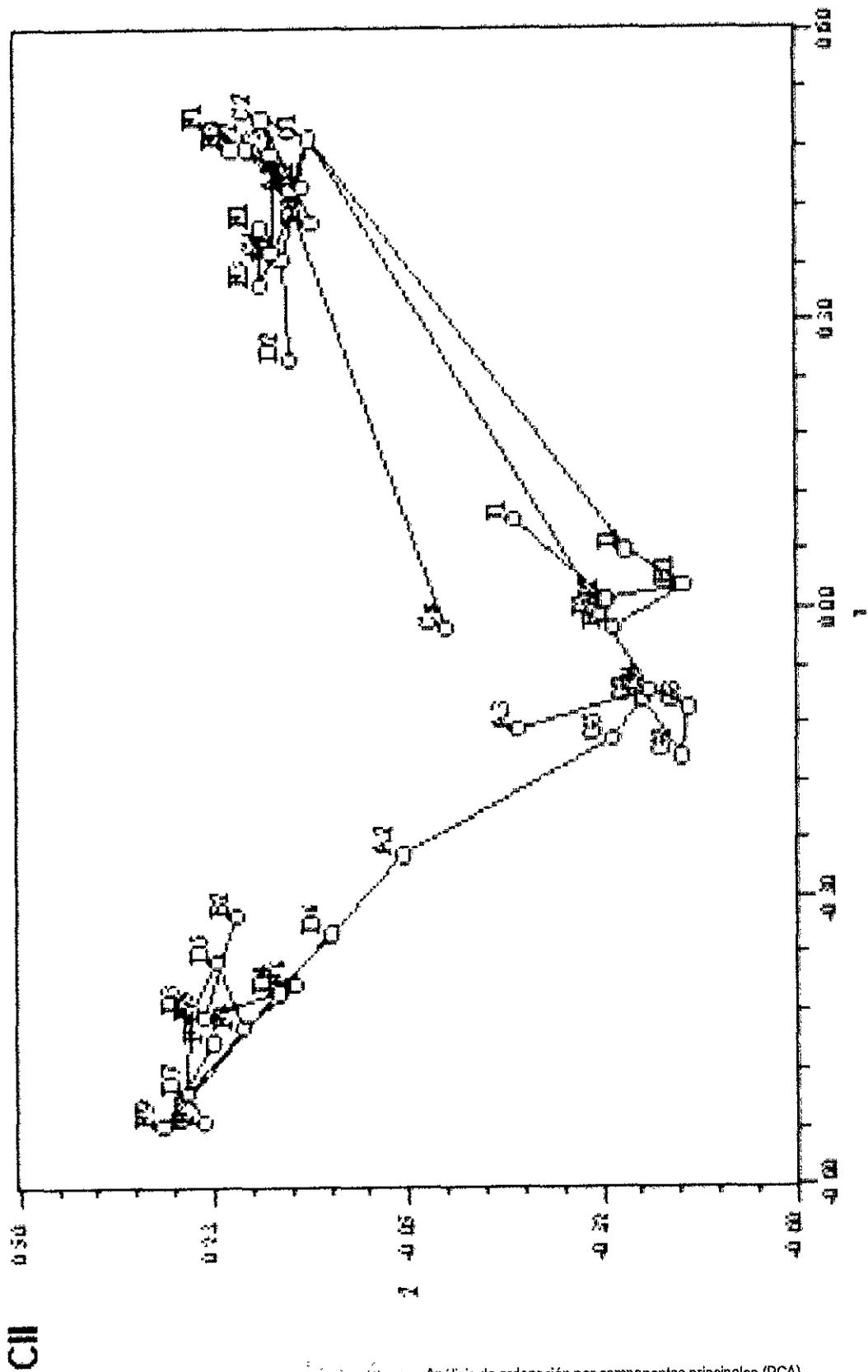
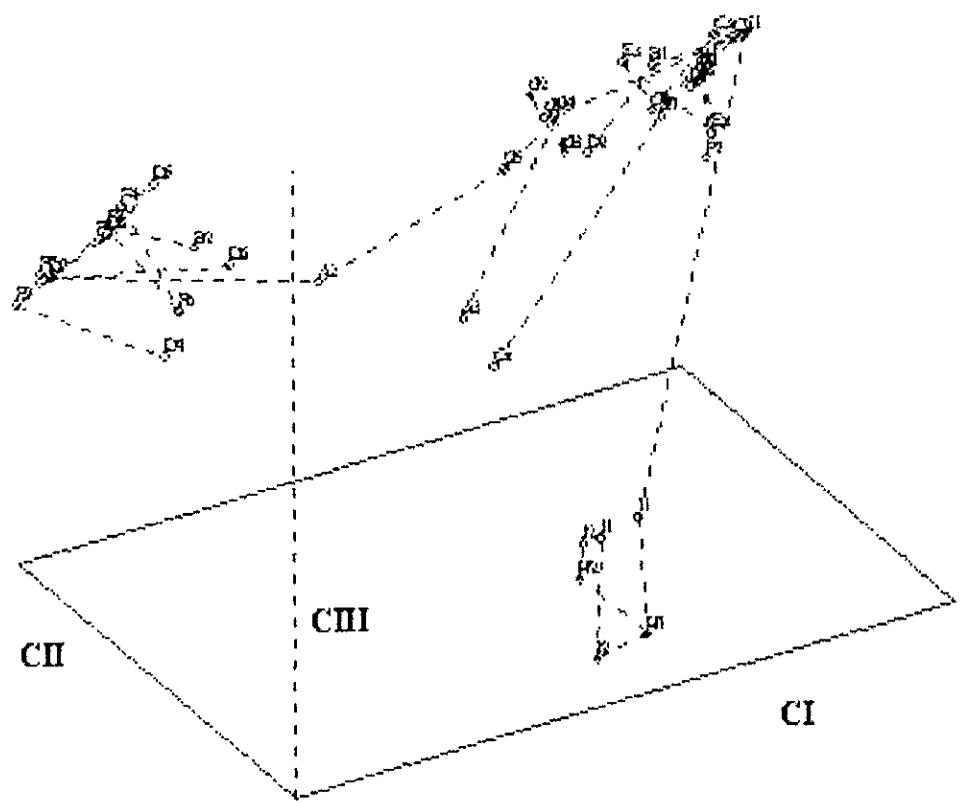


Fig. 1. (b) - Análisis de ordenación por componentes principales (PCA) este análisis provee una representación gráfica en dos dimensiones de las relaciones en el espacio que se dan entre los organismos

A)



B)

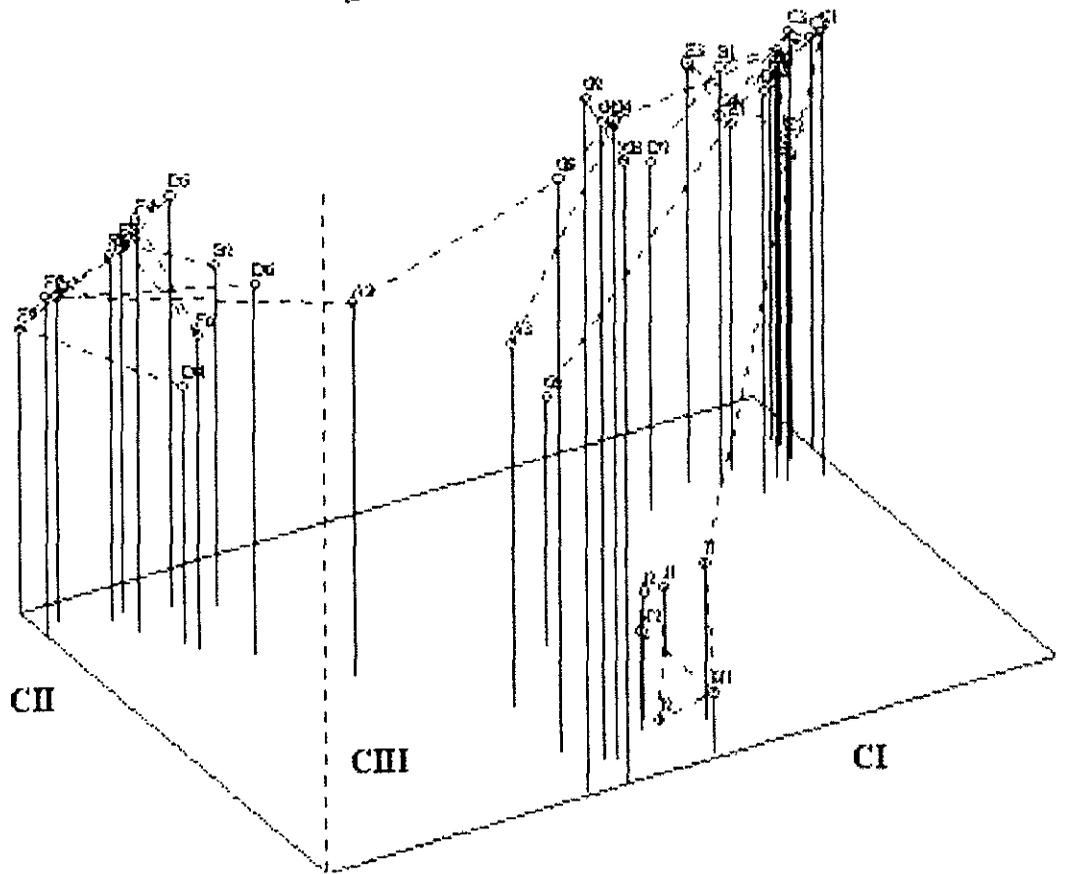


Fig. 2. Análisis de ordenación con árbol de tendido mínimo sobrepuesto (MST), este análisis provee una representación gráfica en 3 dimensiones de las relaciones entre los organismos, las figuras A y B son iguales solo que en la primera (A) no están representados los ejes que completan el sentido de la tercera dimensión, como en la segunda (B).

a familia *cactaceae* tiene una alta diversidad de especies y por tanto muestra una gran variedad morfológica y un alto intervalo de distribución. Estas son características muy importantes que pueden ser indicadores de una alta variabilidad genética. La cual provee a las poblaciones de las herramientas necesarias para adaptarse a los cambios ambientales ya que la migración o flujo génico entre las poblaciones garantiza una mayor capacidad de adaptación al aumentar la variabilidad genética que determina el potencial evolutivo de las poblaciones.

De los trabajos ecológicos realizados en la zona de estudio, Villa señor *et al.*, (1990) indican que muchos factores como por ejemplo su posición geográfica, su clima, su fisiografía así como el gran número de endemismos intervienen en la riqueza florística del Valle de Tehuacán-Cuicatlán,. Sin embargo, el Valle ha sufrido perturbación y fragmentación, por lo que se pueden apreciar islas de vegetación. Estos acontecimientos pueden deberse a factores naturales o antropogénicos que favorecen en cierta manera la diferenciación, principalmente de las zonas que

quedan más alejadas. Es bajo estas circunstancias cuando entra en juego la estrategia reproductiva, junto con los caracteres morfológicos, ya que las poblaciones con sistemas reproductivos que favorecen la autofecundación o que presentan proporciones inusuales de apareamiento suelen presentar una variabilidad genética muy baja, esta es una situación crítica ya que hace muy vulnerable a la población llegando incluso a provocar la extinción.

En el Valle de Tehuacán los trabajos realizados para conocer las relaciones de las cactáceas columnares y los murciélagos nectívoros, con el fin de estudiar la estrategia reproductiva, así como las relaciones espaciales de las cactáceas columnares y las plantas que les sirven de nodriza, entre muchos otros, provee un panorama amplio de las interacciones ecológicas en la zona, sin embargo para tener un estudio completo y detallado del estado actual de *N. tetetzo* es muy importante contar con los datos demográficos como son, el grado de variabilidad genética y el flujo génico con que cuenta la especie.

Se sabe que *Neobuxbaumia* es un género muy interesante dentro de las cactáceas columnares ya que produce semillas solo después de que la planta fue visitada por un murciélago, ya que durante el día las partes reproductoras de la flor no están activas y no producen néctar, además los mismos murciélagos que polinizan las flores son los dispersores primarios de las semillas, por lo que juegan un papel muy importante al conducir las semillas a sitios seguros donde existen las condiciones ambientales necesarias para su germinación y desarrollo, generando así un patrón de distribución no aleatorio. Todas estas observaciones conducen a dilucidar que si los murciélagos desaparecen del Valle de Tehuacán-Cuicatlán la polinización y el reclutamiento de semillas no ocurriría, ocasionando la extinción de las cactáceas lo que provocaría cambios importantes en la composición de este tipo de comunidad desértica.

Por todo esto, la germinación y el establecimiento de las semillas son las fases más críticas del ciclo de vida de estas plantas.

En muchas especies las distancias de dispersión de las semillas están determi-

nadas por los animales o agentes externos que las acarrearán, por ejemplo, hay reportes de que algunas aves después de comer el fruto regurgitan las semillas en una distancia aproximada de 20 a 200m (Levin, 1979), sin embargo, Rojas-Martínez *et al.*, (1999) reportan que los murciélagos, polinizadores y dispersores primarios, pueden volar hasta 60 Kms en una sola noche. Bonnin *et al.*, (1996) sugieren que el nivel de entrecruzamiento entre individuos, ya sea por semillas o polen dispersado por animales, es suficiente para generar altos niveles de polimorfismo en algunas poblaciones. Por otro lado, Valiente-Banuet y Ezequiel Ecurra, (1991) refieren que el establecimiento y dispersión de las semillas ocurre principalmente debajo del dosel de varias especies de arbustos, lo que produce un patrón de distribución agregado con respecto a éstos. En el caso de *N. tetetzo* se ha visto que la principal asociación es con el arbusto *Mimosa luisana* la cual actúa como planta nodriza, esta interacción es principalmente resultado de una mayor supervivencia de las plántulas en micro sitios sombreados con menor radiación solar directa, con menor temperatura durante el día y con menor

Evaporación. También es en estos y otros arbustos que se encuentran en el Valle de Tehuacán, donde los murciélagos se perchan para comer los frutos de las cactáceas, lo que propicia la germinación de las semillas en estos sitios que les brindan las características necesarias para su desarrollo.

El alto flujo génico encontrado, debe estar siendo ocasionado por la eficiencia de los murciélagos, que actúan como polinizadores y como dispersores primarios y además depositan las semillas en lugares seguros para su germinación.

La estrategia reproductora de *N. tetetzo* también es un factor importante ya que esta relacionada con la ruta de forrajeo de los murciélagos polinizadores y con los tiempos en que las localidades florecen (Rojas-Martínez *et al.*, 1999) ya que como se ha mencionado anteriormente, las flores son de una sola noche y solo son polinizadas por los murciélagos *Leptonycteris curasoae* y *Choeronycteris mexicana*, cuyas distancias de migración están determinadas por la secuencia de floración de sus plantas preferidas (Rojas-Martínez *et al.*, 1999). Al respecto Levin (1979) señala que el depositario del polen a

grandes distancias depende tanto de las características de la atmósfera como del tamaño y forma de la población con la que el polen se relaciona, por ello la presencia de polen extranjero en una población puede ser muy raro, ya que aunque el polen puede ser dispersado a cientos de kilómetros y viajar durante varios días, este polen no es viable. Diversos estudios han mostrado que el polen de maíz, frijol y el avena, entre otras gramíneas, no sobrevive por más de 24 horas, por lo que el tiempo puede ser un límite para que el polen viaje largas distancias. No obstante la probabilidad de que el polen llegue viable de una población a otra, es inversamente proporcional al nivel de autofecundación, pero *N. tetetzo* no es auto compatible y tanto el polen como las semillas pueden ser transportados a varias zonas en una sola noche por los murciélagos que polinizan esta especie, ya que como se menciono anteriormente los murciélagos pueden desplazarse distancias considerables al estarse alimentando. Además Rojas-Martínez *et al.*, (1999) indica, en un reporte reciente de la distribución estacional de *Leptonycteris curasoae*, que la migración latitudinal de este murciélago en Norte

América solo ocurre en latitudes cercanas a los 30 °N, mientras que los murciélagos son residentes en latitudes menores a los 21 °N, por lo que la presencia de este murciélago esta asociada siempre a la existencia de recursos florales tanto a nivel geográfico como local.

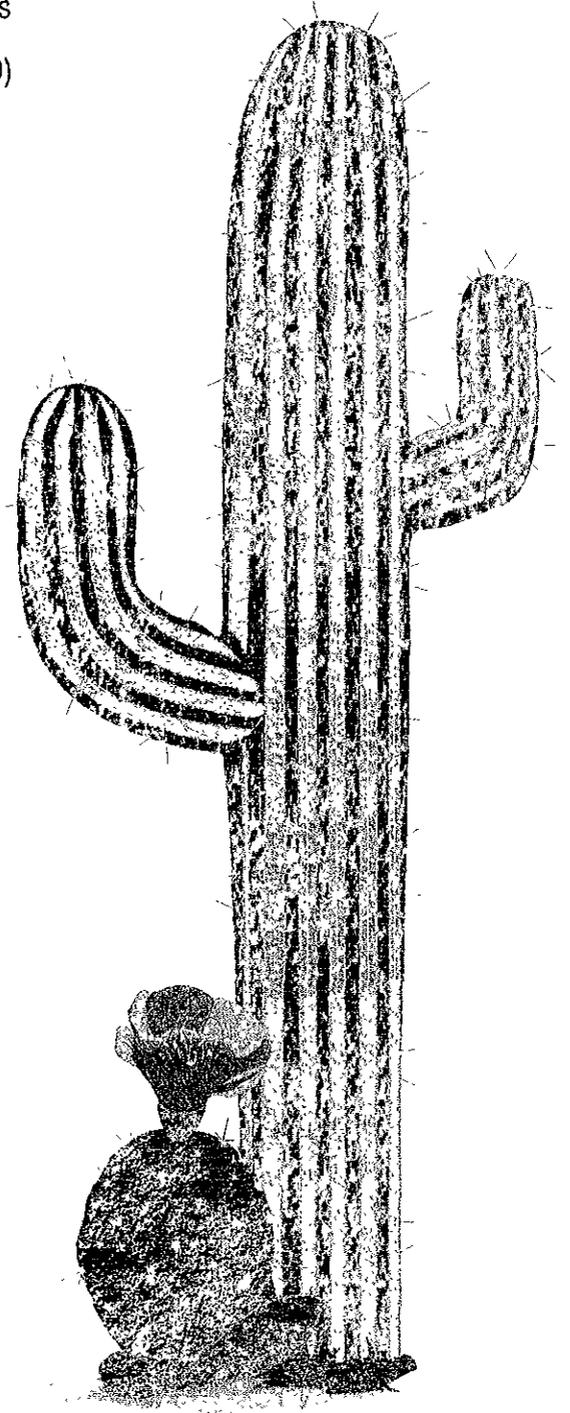
Todos estos factores han contribuido a que en el Valle de Tehuacán la distribución de la variabilidad genética dentro y entre las zonas estudiadas para la especie sea muy parecida. Por lo que *N. tetetzo* no presenta una estructuración, si no una sola población no subdividida o no estructurada, lo que en pocas palabras indica que las diez diferentes zonas estudiadas en el Valle de Tehuacán son en realidad una sola población, la cual hasta el momento presenta una diversidad genética comparable a la de otras especies vegetales y un alto flujo génico.

En estudios genéticos con enzimas para cactáceas columnares (*Carnegiea gigantea*, *Lophocereus schottii*, *Pachycereus pringlei* y *Stenocereus thurberi*) indican que estas especies de cactus tienen niveles de diversidad algo mayores que otras plantas leñosas de larga vida, por lo cual no resulta sorprendente

que *Neobuxbaumia tetetzo* y *Fitzroya cupressoides* (alerce, Cupressaceae) muestren una variación poblacional muy similar con valores de 73.13% y 26.87% de variación entre y dentro de la población para *N. tetetzo* y de 85.6% y 14.4% para *F. Cupressoides*.

Por otra parte Parker y Hamrick (1992) observaron que la reproducción del cactus columnar *Lophocereus schottii* es predominantemente asexual, pero la población estudiada muestra relativamente altos niveles de diversidad y exceso de heterocigotos, lo cual es indicativo de un alto nivel de entrecruzamiento, lo cual no es extraño ya que aunque en estudios previos acerca del sistema de apareamiento de *Lophocereus schottii* se reporta que muchos miembros de la familia Pachycereeae son autocompatibles, se han encontrado otros, como *Carnegiea gigantea*, *Stenocereus thurberi* y *Stenocereus stellatus* que requieren entrecruzamiento ya que son auto incompatibles y son polinizados únicamente por murciélagos, lo cual constituye un mecanismo fuerte de flujo génico que es importante para el mantenimiento de la diversidad genética en las poblaciones, y es precisa-

mente este mecanismo el que ha provocado que en el Valle de Tehuacán *N. tetetzo* presente una estructura genética poblacional panmictica, ya que los procesos de interacción común entre las especies tienen gran relevancia (Levin, 1979)



as áreas naturales protegidas, como es el caso del Valle de Tehuacán-Cuicatlán que ha sido decretado como reserva de la biosfera, son instrumentos para la protección de la biodiversidad, pero también deben tomarse como proyectos de desarrollo sustentable, ya que la regulación del uso de vida silvestre da lugar para la introducción legal de muchas especies en el mercado económico lo cual aunado con otras prácticas como el ecoturismo beneficia en gran medida a los habitantes de estas zonas.

Se puede aumentar el conocimiento de las áreas naturales protegidas y los apoyos mediante convenios con ONG y con la participación ciudadana.

Se sabe que en el Valle de Zapotitlán de las Salinas los habitantes aprovechan las cactáceas como ornato, forraje, combustible o alimento, por ejemplo en la época de floración masiva utilizan las flores de *N. tetetzo* para prepararlas en vinagre, quitan las espinas de los cactus para que estos sirvan de forraje al ganado, preparan dulces, licores, congela-

das etc. con los frutos de las cactáceas. Por lo que si estamos seguros de que la especie no se encuentra en procesos que conlleven a la degradación o a la extinción, es conveniente que se haga uso de estos recursos naturales, y si por el contrario sabemos que es una especie que se debe mantener bajo protección especial, entonces hacer todo lo necesario para asegurar su conservación.

En el caso de la especie estudiada para tener un panorama más amplio que nos conduzca a la elaboración de conclusiones completas acerca de su estado actual, se puede diseñar un análisis por el cual se muestren los sitios mas representativos de todo el valle y por medio del cual se puedan comparar los caracteres morfológicos y los caracteres genéticos de los organismos. Así mismo un análisis que permita correlacionar los tiempos en que las localidades florecen con la ruta de forrajeo de los murciélagos del Valle de Zapotitlán para evaluar la efectividad de la participación de estos polinizadores en el flujo génico de la especie.

7.1 Método de Extracción De DNA para *N. tetetzo*.

e utilizó la técnica de Dellaporta y Wood (1983), que consiste en macerar los tejidos en mortero con vidrio molido y nitrógeno líquido. Posteriormente se coloca 1 gr. de tejido en tubos eppendorf de 1.5 ml y se agregan 500 μ l de mercaptoetanol y 34 μ l de SDS al 20%. La solución se coloca en agua a 65°C durante 10 minutos. Al término, se agregan 167 μ l de acetato de potasio 5 M y se mantiene en hielo, o, a -20°C durante 20 minutos. Se centrifuga a 14000 r.p.m. durante 20 minutos, se decanta el sobrenadante a otro tubo que contiene 350 μ l de isopropanol y se mantiene en hielo durante 30 minutos para después volver a centrifugar a 14000 r.p.m. durante 15 minutos. La pastilla así obtenida se deja secar en papel, se resuspende en 600 μ l de agua estéril y se agregan 500 μ l de Fenol Cloroformo 1:1, la mezcla se agita por inversión y se deja reposar de 2 a 3 minutos, se vuelve a agitar y se centrifuga a 14000 r.p.m. durante 20 minutos, al término de los cuales se recupera la fase acuosa, sin traer la fase fenólica. A la fase acuosa se le agregan 50 μ l de Acetato de Sodio, se agita y se agrega 1 ml de

etanol absoluto, se mantiene en hielo durante 60 minutos, se centrifuga a 14000 r.p.m. durante 30 minutos. Finalmente la pastilla se lava con etanol al 70%, se seca en papel y se resuspende en 50 μ l de agua estéril. El DNA así obtenido se guarda a 4°C.

Visualización del DNA obtenido

Por medio de electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta, se observó la cantidad de DNA obtenido (Fig. 7). Posteriormente se cuantifico la concentración de ácidos nucleicos en un espectro de luz ultravioleta, con el factor óptico de extensión 0.50 y con celda de cuarzo.

7.2 Amplificación al azar del DNA polimórfico (RAPD)

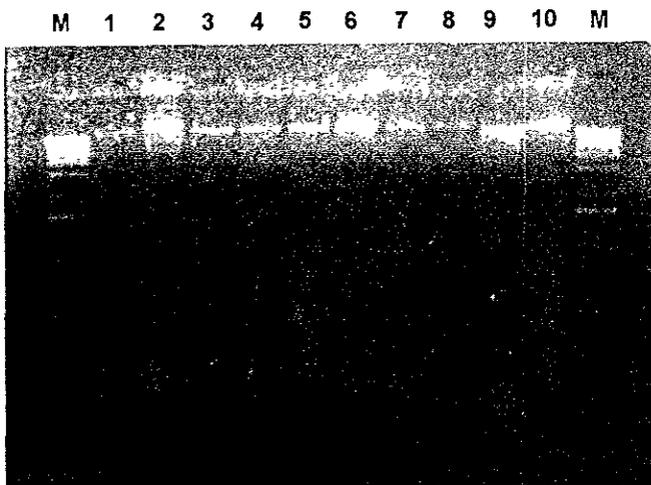
Las reacciones de amplificación se desarrollaron utilizando condiciones estándar, se utilizó un amortiguador de tris HCl 10 mM (pH 7.6) KCl 50 mM, MgCl₂ 1.5 mM así como 10 mM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP); 0.25 mM de primer Operon Technology, de 50 a 200 ng de DNA genómico y 1 unidad de taq polimerasa Boehringer Mannheim. Se probaron al azar 10 cebadores decanucleo-

tidos, cuyas secuencias se diseñaron cuidando la proporción Guanina Citosina. Es importante probar con diferentes temperaturas de alineación y extensión, además del número de ciclos por reacción. La amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9600 programado a 40 ciclos bajo las siguientes condiciones: 94°C para la desnaturalización durante 1 minuto. 37° C para el alineamiento durante 2 minutos. 72°C para la polimerización o extensión durante 2 minutos. En el último ciclo, la temperatura de polimerización a

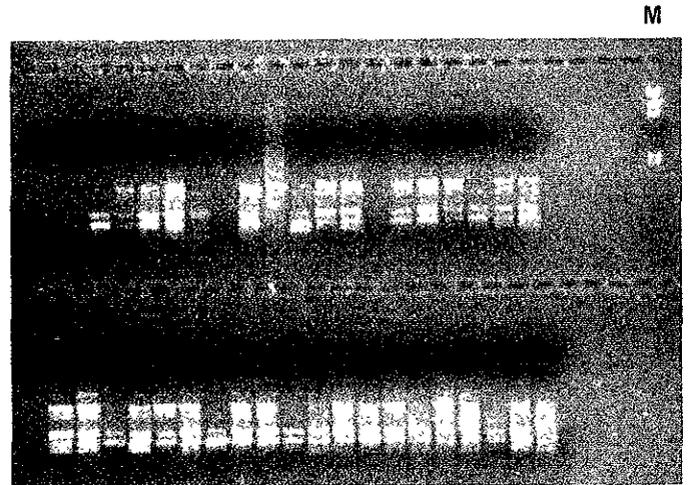
72°C se mantiene por 7 minutos y posteriormente se lleva a 4°C.

Visualización de los productos de la amplificación

Una vez realizado el RAPD-PCR a todas las muestras la separación de los productos obtenidos de la Amplificación se llevó a cabo por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1.2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultra violeta (Fig. 8). La interpretación de los patrones de las bandas se realizó en el analizador de imágenes Alpha Imager™2000.



DNA *Neobuxbaumia tetetzo*, M representa el marcador molecular λ Hind III, los números del 1 al 10 representan el DNA de 10 organismos.



Amplificación RAPD de organismos *N. tetetzo* con el cebador OPC 08, M representa el marcador molecular λ Hind III.

- Allnut T.R., Newton A.C., Lara A., Premoli A., Armesto J.J., Vergara R., and Gardner M. (1999)** Genetic Variation in *Fitzroya cupresoides* (alerce), a threatened South American conifer *Molecular Ecology* 8, 975-987.
- Assmusen M.A. and Schnabel A. (1991)** Comparative effects of pollen and seed migration on the citonuclear structure of plant populations. I. Maternal cytoplasmic inheritance. *Genetics* 128:639-654.
- Arias M., Gama S. y Guzmán I. U. (1997)** Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 14 *Cactaceae* A.L. Juss. Instituto de Biología UNAM. 95-96
- Ayala F., McCormick R., Chilton M., Holton G. (1989)** On Being a Scientist. National Academy Press. Washington D.C.
- Becker J. Vos P. Kuiper M., Salamini F. ad Heun M. (1995)** Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Genetics*. 249:65-73.
- Bonnin I., Huguer T., Gherardi M., Proserpi M., Olivieri I. (1996)** High level of polymorphism and structure in a selfing plant species, *Medicago truncatula* (Leguminosae) show using *RAPD* markers. *American Journal of Botany* 83: 843-855.
- Breyne P., Boerjan W., Gerats T. (1997a)** Applications of AFLP in plant breeding molecular biology and genetics. *Belgian Journal of Botany*. 129:107-117.
- Breyne P., Buyschaert C., Kremer A., Van Montagu M. and Van Gysel A. (1997b)** Distribution of genetic diversity within pilot species of the tropical forest. *Belgian Journal of Botany*. 129:160.
- Buso G. S., Rangel P.H., Ferreira M.E. (1998)** Análisis of genetic variability of South American rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and *RAPD* markers. *Molecular Ecology* 7, 107-117.
- Buth D.G. (1984)** The application of electrophoretic data in systematic studies. *Ecological Systems*. 15:501-522.

- Camargo L.E.A., Savides L., Jung G.,**
Nienhuis J. y Osborn T.C. (1997)
Location of the self-incompatibility
locus in and RFLP and *RAPD* map
of Brassica oleraceae. *Journal of*
Heredity 88:57-60.
- Conabio 1998.** La diversidad biológica de
México: Estudio de país, 1998.
Comisión Nacional para el uso de
la Biodiversidad. México. 341 pp.
- Conduit R. And Hubbell S.** (1991)
Abundance and DNA sequence of
two-based repeat regions in
tropical tree genomes. *Genome*
34:66-71.
- Cota H. y Wallace R.S.** (1995) Karyotypic
studies in the genus *Echinocereus*
(*Cactaceae*) and their taxonomic
significance. *Caryologia*. 48 105-
122.
- Cota H. y Wallace R.S.** (1996) La citología
y sistemática molecular en la
familia *Cactaceae*. *Cactáceas*
Suculentas de México. XLI: 27-43.
- Cody M.L.** (1998) Nichos estructurales de
especies de cactáceas columna-
res. *Memorias del Taller*
Internacional de la Evolución,
Ecología y Conservación de
cactáceas columnares. Del 28 de
- junio al 3 de julio de 1998,
Tehuacán, Puebla.
- Chakaborty R. and Bogemans J.** (1997)
Determination of relatedness of
different ecotypes of *Aster tripoli-*
lium germplasm by *RAPD* analy-
sis. *Belgican Journal of Botany*.
83:51-57.
- Chase M., Kesseli R. and Bawa K.** (1996)
Microsatellite markers for popula-
tion and conservation genetics of
tropical trees. *American journal of*
botany 83:51-57.
- Crisi J.V., M.F. López-Armengól,**
Introducción a la teoría y practica
de la Taxonomía Numérica, serie
de Biología, Monografía (Secreta-
ría General de la Organización de
los Estados Americanos,
Washington, D.C., 1983) vol. 26.
132 pp.
- Dávila P. y Arias S.** (1998). *Fitogeografía*
de las cactáceas columnares
(Pachycereae) en México.
Memorias del Taller Internacional
de la evolución, ecología y
conservación de cactáceas
columnares. Del 28 de junio al 3 de
julio de 1998, Tehuacán, Puebla.

- Dávila P., Villaseñor J.L., Medina R., Ramírez A., Salinas A., Sánchez-Ken J. y Tenorio P. (1993) Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Listados florísticos de México X. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
- De Greef B. and Triest L.** (1997) Genetic diversity assessment in *Primula* populations. Belgian Journal of Botany. 129:161.
- De la Cruz M., Whitkus R., Gómez-Pompa A. y Mota-Bravo L.** (1995) Origins of cacao cultivation. Nature 375:542-543.
- Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks.** (1983) A plant DNA minipreparation: Version II. Plant Molecular Biology Reproduction. 1:19-21.
- Dweikat Y., Ohm H., Mackenzie S., Patterson F., Cambrón S. y Ratcliffe R.** (1994) Association of a DNA marker with Hessian fly resistance gene H9 in wheat. Theoretical and Applied Genetics 89:964-968.
- Dobzhansky, T.** 1983. Evolución. Omega. Barcelona, España. PP 558.
- Ennos R.A.** (1994) Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. Heredity 72:250-259.
- Fritsch P. y Rieseberg L.H.** (1992) High outcrossing rates maintain male and hermaphrodite individuals in populations of the flowering plant *Datisca Glomerata*. Nature 359:633-636.
- Gambier R.M. y Mulcahy D.L.** (1996) The association between pollen size and Renner complex in *Oenothera Villaricae* and *O. Picensis* ssp. *Picensis* and their hybrids: evidence for preanthesis pollen competition. Theoretical and Applied Genetics. 92:140-144.
- García E.** (1988) Modificaciones al sistema de clasificación climática de Kopen. Instituto de Geografía, UNAM, México. 153.
- Godínez -Álvarez H. and Valiente-Banuet, A.** (1998) Germination and early seedling growth of Tehuacan Valley cacti species: the role of soils and seed ingestion by dispersors on seedling growth. Journal of arid environments 39: 21-31.

- Godinez-Álvarez H., Valiente-Banuet, A., Valiente-Banuet, L.** (En prensa para Canadian Journal of Botany) Biotic interactions and the population dynamics of the long-lived columnar cactus *Neobuxbaumia tetetzo* in the Tehuacan Valley, Mexico.
- Guiller A., Bellido A. and Madec L.** (1998) Genetic distances and Ordination: The land snail *Helix aspersa* in North Africa as test case. *Syst. Biol.* 47:208-227
- Hamrick J.L. Nason Jhon D. y Fleming Theodore H.** (1998) Memorias del Taller Internacional de Evolución, Ecología y Conservación de cactáceas columnares. Del 28 de junio al 3 de julio de 1998, Tehuacán, Puebla.
- Harper, J.L.** (1977) *Population Biology of Plants*. New York. Academic Press.
- Harrison R.E., Luby J.J., Furnier G.R. and Hancock J. F.** (1997) Morphological and molecular variation among populations of octoploid *Fragaria virginiana* and *F. chiloensis* (Rosaceae) from North America. *American journal of botany* 84:612-620.
- Hartl L. Daniel and Clark C. Andrew.** (1989) *Principles of population genetics*. Sinauer Associate, Inc. Sunderland Massachusetts. Pp. 576.
- Hartl G.B., Willing R., Nadlinger K.** (1994) Allozymes in Mammalian Population genetics and systematics: Indicative function of a marker system reconsidered. *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*. Ed. B. Schierwater. Switzerland.
- Hoelzel A.R. and Green A.** (1992) Analysis of population-level variation by sequencing PCR-amplified DNA: 159-188. En :Hoezel A.R. (De) *Molecular Genetic Analysis of Population. A practical approach*. IRL Press, Oxford.
- Hombergen E.J. y Bachmann K.** (1995) *RAPD* mapping of three QTLs determining trichome formation in *Microseris* hybrid H27 (Asteraceae: Lactucaceae). *Theoretical and Applied Genetics* 90:853-858.
- Hormaza J.L., Dollo L. y Polito V.S.** (1994) Identification of a *RAPD* marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segre-

- gant análisis. Theoretical and Applied Genetics 89:9-13.
- Hsiao J.K. and Lee M.** (1999) Genetic diversity and microgeographic differentiation of Yushan cane (*Yushania niitakayamensis*, Poaceae) in Taiwán. *Molecular Ecology* 8, 263-270.
- Huff D.R., Peakal R. y Smouse P.E.** (1993) RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss (*Buclöë dactyloides* (Nutt) Engelm). *Theoretical and Applied Genetics* 86: 927-934.
- Kijas J., Fowler J. and Thomas M.**(1995) An evaluation of sequences tagged microsatellites site markers for genetic analysis within citrus and related species. *Genome* 38:349-355.
- Klein-Lankhorst R.M., Vermunt A., Weide R., Liharska T. y Zabel P.** (1991) Isolation of molecular markers for tomato (*L. Esculentum*) using *random amplified polymorphic DNA (RAPD)*. *Theoretical and Applied Genetics* 83: 108114.
- Lande R. and Barrowclough G.F.** (1987) Effective population size, genetic variation and their use in population management. En Soule M. E. (Ed.) *Viable populations for conservation*. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 87-123.
- Lawson W.R., Goulter K.C., Henry R.J., Kong G.A. y Kochman J.K.** (1996) RAPD markers for a sunflower rust resistance gene. *Australian Journal of Agricultural Research* 47:395-401.
- Levin D.A.** (1979) The nature of plant species. *Science* 204. 381-384.
- Lin J.J. and Kuo J.** (1995) AFLP™ A novel PCR-based assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. *FOCUS* 17:66-70
- Lynch M. and Milligan B.G.** (1994) Analysis of Population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*. 3:91-99.
- Mackill D., Zhang E., Redona E. and Colowit P.** (1996) Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome* 39: 969-977.

- Martín C., González-Benito M. E. and Iriondo J. M.** (1997) Genetic Diversity Within and among populations of a threatened species: *Erodium paularense* Fern. Gonz. and Izco *Molecular Ecology*. 6, 813-820.
- Maughan P., Shagay Maroof M., Buss G. and Hustis G.** (1996) Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near isogenic line analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 93:392-401.
- Márquez, F.** 1985. *Genotecnia Vegetal* Tomo I. AGT Editor, S.A. México D.F. 357pp.
- Maisonneuve B., Bellec y., Anderson P. y Michelmore R.W.** (1994) Rapid mapping of two genes for resistance to downy mildew from *Lactuca scariolata* to existing clusters of resistance genes. *Theoretical and Applied Genetics* 89:96-104.
- Mitton J.B. y Grant M.C.** (1984) Associations among protein heterozygosity, growth rate, and developmental homeostasis. *Ecological Systems*. 15: 479-499.
- Mitton J.B. y Grant M.C.** (1984) Associations among protein heterozygosity, growth rate, and developmental homeostasis. *Ecological Systems*. 15: 479-499.
- Mostafa K.T. Osama A., El-Kholi, E. El-hinnawi, Holdgate M.V., McMichael D.F. and MUNN R.E.** (1992) *The World Environment 1972-1992: Two Decades of Challenge*. Chapman and Hall. pp 884.
- Mouzeyar S., Rockel-Drevet P., Gentzbitel L., Philippon J., Tourvieille De Labrouhe D., Vear F., y Nicolas P.** (1995) RFLP and RAPD mapping of the sunflower *P1* locus for resistance to *Plasmopara halstedii* Race 1. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 733-737
- Mulkahi D.L. Weeden N.F., Kesseli R. y Carrolls B.** (1992) DNA probes for The Y chromosome of *Silene latifolia*, a dioecious angiosperm. *Sex Plant Reproduction* 5:86-88.
- Nason, J., Hamrick, J., Fleming, T.** 1998. *Fitogeografía de una cactácea columnar del desierto Sonorense*. *Memorias del Taller Internacional*

- de la evolución, ecología y conservación de cactáceas columnares. Del 28 de junio al 3 de julio de 1998, Tehuacán, Puebla.
- Ohmori T. Murata M. y Motoyoshi F.** (1995) Identification of *RAPD* makers linked to the *Tm-2* locus in tomato. *Theoretical and Applied Genetics* 90:307-311.
- Otero A., De la Cruz M y Oyama K.** (1997) El uso de los *RAPDs* como marcadores moleculares en plantas. Instituto de Ecología UNAM. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 60:85-117.
- Peakall R., Smouse P. E., and Huff D. R.** (1995) Evolutionary implications of allozyme and *RAPD* variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloë dactyloides*. *Molecular Ecology* 4, 135-147.
- Philbrick C.T.** (1993) Underwater cross-pollination in *Callitriche hermaphrodítica* (*Callitrichaceae*): evidence from random amplified polymorphic DNA markers. *American Journal of Botany* 80:391-394.
- Prevosti A.** (1984) La genética de poblaciones hoy. *Mundo Científico* 4: 316-323.
- Puertas M. J.** (1992) *Genética Fundamentos y Perspectivas*. Mc. Graw-Hill, Interamericana de España.
- Procunier J.A., Towely-Smith T.F., Foxs., Prashars., Gray M., Kim W.K. And Ducky P.L.** (1995) PCR-based *RAPD-DGGe* markers linked to leaf rust resistance genes *Lr29* and *Lr25* in wheat (*Triticum aestivum* L.) *Journal of Genetics and Breeding*. 49:87-91.
- Robbins M.A., Witsenboer H., Michelmore R.W., Lailberte J. F. y Fortin M.G.** (1994) Genetic mapping of turnip mosaic Virus resistance in *Lactuca Sativa*. *Theoretical and Applied Genetics*. 89:583-589.
- Rojas-Martínez A. y Valiente-Banuet, A.** (1996) Análisis Comparativo de la quiropterofauna del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla-Oaxaca. *Acta Zoológica Mexicana*. (n.s) 67: 1-23.
- Rojas-Martínez A., Valiente-Banuet, A., Arizmendi M., Alcántara A., and Arita T.** (1999) Seasonal distribu-

- tion of the long-nosed bat (*Leptonycteris curasoae*) in North America: does a generalized migration pattern really exist. *Journal of Biogeography*. 26. 1065-1077.
- Rzedowsky J.** (1962) Contribuciones a la fitogeografía florística de México y Algunas consideraciones acerca del elemento endémico en la flora de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 27:52-65
- Rzedowsky, J.** (1978) Vegetación de México. México, D. F. Limusa, S.A. 432 pp.
- Sharma S., Knox M. and Ellis T.**(1996) AFLP analysis of the diversity and phylogeny of lens and its comparison with *RAPD* analysis. *Genetics*. 93:751-758.
- Scheepers D. Eloy M.C. and Briquet M.** (1997) Use of *RAPD* for clones verification and in studying relationships among provenances in Norway spruce (*Picea abies*). *Belgican Journal of Botany*. 129:158.
- Steward C.N. Jr. y Excoffier L.** (1996) Assesing population genetic structure and variability with *RAPD* data: Application to *Vaccinium macrocarpon* (American cranberry). *Journal of Evolutionary Biology*9: 153-171.
- Valiente-Banuet, A., Dávila, P., Arizmendi.P.C.Rojas, A. y Casas A.**(1995) Bases Ecológicas del Desarrollo Sustentable en Zonas áridas: El caso de los bosques de cactáceas columnares en el Valle de Tehuacán y Baja California Sur, México. En: G.M. Anaya y C. Díaz Editores. Memorias del IV Curso sobre desertificación y desarrollo Sustentable. PNUMA, FAO. Colegio de postgraduados, Chapingo, México. Pp. 20-36.
- Valiente-Banuet, A., Arizmendi M., Rojas-Martínez A. and Domínguez-Canseco L.** (1996) Ecological relationships between columnar cacti and nectar-feeding bats in Mexico. *Journal of Tropical Ecology*.12:103-119.
- Valiente-Banuet, A., Bolongaro-Cervenna, A., O., Ezcurra, E., Rosas M., Nuñez, H., Barnard, G. and Vazquez, E.** (1991) Spatial

- relationships between cacti and nurse shrubs in a semi arid environment in central Mexico. *Journal of Vegetation Science* 2: 15-20.
- Valiente-Banuet, A., Rojas –Martinez, A., Casas, A., Arizmendi M., and Dávila P.** (1997) Pollination biology of two winter-blooming giant columnar cacti in the Valley, central Mexico. *Journal of arid environments* 37: 331-341.
- Valiente-Banuet, A. and Escurra E.,** (1991) Shade as a cause of the association between the cactus *Neobuxbaumia tetetzo* and the nurse plant *Mimosa luisana* in the Tehuacan Valley, Mexico. *Journal of Ecology* 79: 961-971.
- Valiente-Banuet, A., Vite F., And Zavala-Hurtado J.** (1991) Interaction between the cactus *Neobuxbaumia tetetzo* and the nurse shrub *Mimosa luisana*. *Journal of Vegetation Science* 2: 11-14.
- Valiente-Banuet, A., Flores-Hernández N., Verdú M., and Dávila P.** (1998) The chaparral vegetation in Mexico under nonmediterranean- Tethyan Hypotheses reconsidered. *American Journal of Botany* 85 (10): 1398-1408.
- Van Eck H.J., Rouppe vander Voort J., Draaistra J., van Zandvoort P., van Enckevoort E., Segers B., Pelman J., Jacobsen E., Helder J. and Bakker J.** (1995) The inheritance and cromosomal localization of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Molecular Breeding* 1:397-410.
- Weir B.S. y Cockerham C.C.** (1984) Estimating F-statics for the analysis of population structure: *Evolution* 38: 1358-1370.
- Welsh J. y McClelland M.** (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers *Nucleic Acids Research* 18:7213-7218.
- Whitkus R. De la Cruz M., Mota-Bravo L. y Gómez-Pompa A.** (1997) Genetic diversity of tropical crops maintained by ancient cultures: An example in Cacao. *Theoretical and Applied Genetics (en prensa)*.
- Whitty P.W., Powell W. and Sprent J. I.** (1994) Molecular separation of genera in *Cassiinae (Legumino-*

sae), and analysis of variation in the nodulating species of Chamaecrista. *Molecular Ecology* 3:507-515.

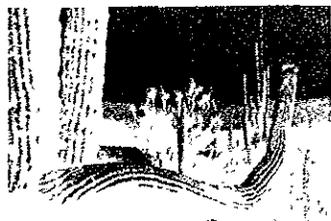
Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K.

J. Rafalski J. A., Tingey S. V.

(1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18, 6531-6535.

Zavala-Hurtado, J. A. (1982) Estudios

ecológicos en el Valle semiárido de Zapotitlán, Puebla. I. Clasificación numérica de la vegetación basada en atributos binarios de presencia o ausencia de las especies. *Biótica (México)*, 7: 99-120.



noobu / abanama / el'otzo

Este trabajo se imprimió
el día 6 de octubre del 2000
en la Ciudad de México.



*Diseñador
del 2000 a 8000
Moisés Torrescano Ballesteros*