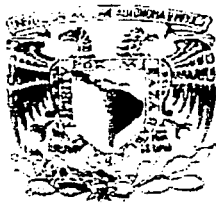


58



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

"Caracterizacion morfologica y molecular de un posible hibrido entre *Escontria chiotilla* y *Polaskia chichipe* (Cactaceae)"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
YURIDIA CRUZ GONZALEZ ZAMORA



Director de Tesis:
DRA. SONIA VAZQUEZ SANTANA

2002



FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



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.



M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
 Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
 Facultad de Ciencias
 Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Caracterización morfológica y molecular de un posible híbrido entre *Escontria chiotilla* y *Polaskia chichi*pe (Cactaceae)

realizado por Yuridia Cruz González Zamora

con número de cuenta 097553469, quien cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
 Propietario

Dra. Sonia Vázquez Santana

Propietario

Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán

Propietario

Dr. Sergio Zamudio Ruiz

Suplente

Dr. Felipe Cruz García

Suplente

Biol. Citlali Yuriria Núñez Mariel

FACULTAD DE CIENCIAS
 UNAM

Consejo Departamental de Biología

Dra. Patricia Ramos Morales



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

La parte morfológica de esta tesis se desarrolló en el Laboratorio del Desarrollo en Plantas dentro del taller titulado "Desarrollo y Fisiología de las Estructuras Reproductoras en la familia Cactaceae" impartido por los profesores:

Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán

Dra. Margarita Collazo Ortega

Dra. Sonia Vázquez Santana

M. C. Silvia Espinosa Matías

M. C. José Gonzalo Ricardo Wong

Biól. Citlali Yuriria Núñez Mariel

Biól. Jerónimo Reyes Santiago

La parte molecular se llevó a cabo en el laboratorio 104 del Dpto. de Bioquímica de la Facultad de Química.

Esta tesis contó con el apoyo de la beca PROBETEL

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis **padres**, por el apoyo que me han brindado toda la vida y a las siguientes personas por haberme brindado su tiempo, conocimiento y paciencia:

a **Sonia**, una excelente persona y directora de tesis, a **Felipe**, quien brindó buenas ideas a este trabajo, así como su apoyo incondicional, a **Ulises** por ayudarme en todas las salidas al campo y por proporcionar varias de las fotografías presentadas en este trabajo, a **Mague** y **Gregorio** por su ayuda con el trabajo de campo, a **Raymundo**, un gran amigo que también me apoyó con el trabajo de campo y con la impresión de esta tesis, a **Citlatli** por su apoyo en la parte estadística y de interpretación de datos, a **Silvia** quien me ayudó en la realización de las observaciones en MEB y a **Rosalinda** quien me apoyó con la elaboración del ejemplar de herbario.

Además, quiero agradecer a mis compañeros y amigos del laboratorio 104 del Dpto. de Bioquímica, **Javier Andrés**, **Grethel** y **Gaby** por haberme ayudado siempre que lo necesité, gracias.

INDICE

INDICE DE FIGURAS.....	3
INDICE DE TABLAS.....	3
RESUMEN	4
I. INTRODUCCIÓN.....	6
II. ANTECEDENTES.....	9
III. OBJETIVOS	16
IV. MATERIAL Y METODOS	17
IV.1 SITIO DE ESTUDIO	17
IV.2 UNIDADES DE ESTUDIO.....	17
IV.3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.....	23
IV.3.1 Toma de datos.....	23
IV.3.2 Medición de caracteres.....	24
IV.3.3 Análisis fenético	24
IV.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	25
IV.4.1 Purificación de DNA genómico.....	25
IV.4.2 Obtención de caracteres moleculares (DNA) por medio de AFLP's.....	26
IV.4.3 Análisis de datos moleculares.....	29
IV.5 HÍBRIDOS ARTIFICIALES	30
IV.5.1 Poinizaciones manuales.....	30
IV.6 FERTILIDAD DEL HÍBRIDO.....	31
IV.6.1 Pruebas de germinación de semillas.....	31
IV.6.2 Pruebas de viabilidad de polen.....	31
IV.7 HÍBRIDOS VIRTUALES	32
V. RESULTADOS.....	33
V.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.....	33
V.1.1 Análisis de componentes principales.....	33
V.1.2 Análisis de conglomerados.....	34
V.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	41
V.2.1 Análisis de coordenadas principales (PCOORD).....	42
V.2.2 Análisis de conglomerados.....	43
V.3 HÍBRIDOS ARTIFICIALES	44
V.4 HÍBRIDOS VIRTUALES	45
VI. DISCUSIÓN.....	50

VII. CONCLUSIONES.....	55
LITERATURA CITADA.....	56
APENDICE I.....	60
APENDICE II.....	63
APENDICE III.....	67

Índice de figuras

- Figura 1. Localización de los posibles híbridos naturales.
- Figura 2. Filogenia de cactáceas columnares propuesto por Cornejo y Simpson (1997).
- Figura 3. Individuo adulto de *Escontria chiotilla*
- Figura 4. Individuo adulto de *Polaskia chichipe*
- Figura 5. Características generales del posible híbrido
- Figura 6. Corroboración por PCR de la eficiencia de ligado de los adaptadores
- Figura 7. Caracteres morfológicos principales de los taxones involucrados
- Figura 8. Proyección de los dos primeros componentes principales de los caracteres morfológicos
- Figura 9. Fenograma construido a partir de caracteres morfológicos
- Figura 10. Malformación en la cubierta seminal del posible híbrido.
- Figura 11. Tétrada de microspora del posible híbrido unida por calosa.
- Figura 12. Micromorfología de polen
- Figura 13. Micromorfología de semilla
- Figura 14. Separación electroforética de DNA
- Figura 15. Visualización de marcadores moleculares generados por AFLP's.
- Figura 16. Proyección de los taxa involucrados en los primeros dos componentes principales.
- Figura 17. Fenograma construido a partir de caracteres moleculares de todos los individuos analizados.
- Figura 18. Fruto formado a partir de polinizaciones manuales en el campo.

Índice de tablas

- Tabla 1. Lista de híbridos intergenéricos en la familia Cactaceae
- Tabla 2. Lista de híbridos interespecíficos en la familia Cactaceae
- Tabla 3. Caracteres morfológicos analizados en los supuestos híbridos
- Tabla 4. Combinación de pares de primers para la obtención de AFLPs
- Tabla 5. Polinizaciones manuales realizadas en el campo
- Tabla 6. Eigenvectores en los primeros dos componentes principales
- Tabla 7. Valores del coeficiente de correlación de los caracteres morfológicos
- Tabla 8. Niveles de polimorfismo de los marcadores moleculares
- Tabla 9. Valores del coeficiente de correlación de los caracteres moleculares
- Tabla 10. Resultados de polinizaciones manuales en el campo
- Tabla 11. Probabilidad de asignación a las tres categorías

RESUMEN

La hibridación es un evento biológico que ocurre con frecuencia en la naturaleza de forma natural; es uno de los principales mecanismos capaces de generar innovaciones evolutivas, que en algunos casos, llevan a la creación de nuevas especies. Este fenómeno se presenta cuando dos especies genéticamente relacionadas se cruzan produciendo descendencia fértil, semifértil o estéril. Se puede presentar entre un par de especies, entre un complejo de especies o incluso, aunque en menor medida, entre géneros. Generalmente los híbridos se caracterizan por presentar caracteres morfológicos intermedios entre ambos progenitores.

En la familia Cactaceae, la hibridación es un fenómeno que ocurre muy a menudo, siendo en gran parte responsable de la riqueza y diversidad biológica presente en ella. Dada la gran importancia que tiene la hibridación en la evolución, es importante conocer y caracterizar a los híbridos que se encuentren en la naturaleza; es por ésto que el presente trabajo tomó como sistema de estudio un posible híbrido entre *Escontria chiotilla* y *Polaskia chichipe*, dos géneros de cactáceas pertenecientes a la tribu Pachycereeae, subtribu Stenocereinae. Este posible híbrido fue localizado en la Mixteca Baja de Oaxaca; su identificación fue posible porque que se encontraba en etapa reproductiva, fase única en la que se puede distinguir de sus posibles progenitores. Esta planta presenta en el fruto escamas como las de *E. chiotilla* y espinas como las de *P. chichipe*; el tallo puede ser fácilmente confundido con cualquiera de los dos progenitores putativos; la flor es color blanca con los tépalos muy extendidos sin llegar a ser revolutos como en *P. chichipe*, cuya flor es verde amarillenta; en cambio, en *E. chiotilla* los tépalos permanecen más cerrados y son de color amarillo.

Los estudios sobre hibridación se han basado principalmente en criterios morfológicos, de distribución y experimentos de cruce. Sin embargo, estas aproximaciones no siempre permiten discriminar entre complejos taxonómicos. Para resolver lo anterior, se han hecho comparaciones a nivel del genoma, mediante técnicas de genética molecular, que involucran un análisis directo del DNA. En este trabajo la caracterización del posible híbrido incluyó tanto la parte morfológica como la molecular. Dentro de la parte morfológica, se tomaron en cuenta 12 caracteres cuantitativos y 2 cualitativos. Por otro lado, los caracteres moleculares fueron generados por la técnica de AFLP, la cual es altamente reproducible y permite analizar un gran número de loci polimórficos a la vez, generando por lo tanto, un alto índice de diversidad.

Para el análisis estadístico se llevó a cabo un análisis de conglomerados y uno de componentes principales para los caracteres morfológicos y para los moleculares, un análisis de coordenadas principales y uno de conglomerados. Además de estos análisis, se realizaron

polinizaciones manuales en el campo entre ambos géneros, así como retrocruzas de los híbridos con los posibles progenitores. Estas polinizaciones fueron exitosas dado que se obtuvieron frutos con semillas viables.

Finalmente, a partir del patrón de bandeo (frecuencia alélica) de cada taxa y mediante un programa de cómputo, se generaron híbridos y progenitores virtuales para verificar cuales son las posibilidades de que los genomas de los híbridos naturales tengan mayor similitud con los híbridos virtuales que con sus posibles progenitores.

Los resultados de este trabajo sugieren fuertemente la existencia de un híbrido entre estos dos géneros de cactáceas.

I. INTRODUCCIÓN

La hibridación se presenta cuando dos taxa genéticamente distintos se cruzan produciendo una descendencia que puede ser fértil, estéril o parcialmente fértil (Rieseberg, 1997). Muchos de estos nuevos individuos no llegan a florecer ni a fructificar y algunas veces se reproducen vegetativamente. Este mecanismo se puede presentar entre un par de especies, entre complejos de especies o incluso entre géneros (Niklas, 1997), aunque este último ocurre con menor frecuencia.

Puede ser que las especies de distintos géneros sean genética y fenotípicamente más divergentes que las especies dentro de un mismo género, por lo tanto es raro que los híbridos intergenéricos sean fértiles. Incluso entre los híbridos interespecíficos se pueden encontrar individuos semifértiles y otros completamente estériles, lo cual depende en gran medida de la distancia genética que exista entre los progenitores (Rieseberg, 1997). Por otro lado, la esterilidad en los híbridos también puede deberse al inadecuado desarrollo y funcionamiento de las estructuras reproductoras y/o al apareamiento y segregación anormal de los cromosomas durante la meiosis (Jones, 1988; Lester y Kang, 1998).

La hibridación aumenta la diversidad genética, puede dar origen a variaciones adaptativas por medio de la transferencia y mezcla de genotipos. Los genotipos recombinantes pueden resultar igual o menos adaptados que los progenitores, todos sujetos a ser probados por la selección natural. Es así que el papel evolutivo más obvio e importante que tiene la hibridación en plantas es que a través de ella se pueden generar nuevas especies cuando los híbridos son fértiles, o bien, especies alopoliploides, cuando el híbrido es estéril y su reproducción es vegetativa o agamospérmica (Mummenhoff y Hurka, 1995).

Además de su importancia evolutiva, la hibridación también tiene consecuencias en otros tipos de investigación, como en las reconstrucciones filogenéticas donde la hibridación es un factor que puede confundir dado que es difícil ubicar las especies que surgieron a partir de híbridos, cambiando hasta cierto grado la topología de los árboles filogenéticos (van Raamsdonk *et al.*, 2000). También se ha hecho énfasis en la utilidad de los híbridos naturales y de las zonas híbridas como sistema modelo para estudiar el proceso evolutivo, particularmente aquellos que conllevan a la especiación (Rieseberg y Ellstrand, 1993; Rieseberg, 1997).

El éxito de la generación de nuevas especies depende de las condiciones ecológicas, de la distancia genética de los taxones involucrados y de la capacidad que tengan los diversos genotipos híbridos para adaptarse a diversos hábitats; dichos fenotipos que nunca antes habían

sido probados por la selección natural pueden generar diversos picos adaptativos (Rieseberg, 1997; Barton, 2001).

Las características típicas que presenta un híbrido de la primera generación filial (F1) son por lo regular intermedias entre ambos progenitores. Cuando estos individuos maduran lo suficiente como para producir flores, pueden llevarse a cabo nuevas cruza entre los híbridos y los progenitores. Algunas de éstas serán entre las plantas del híbrido ($F1 \times F1$), otras entre un híbrido y un progenitor ($F1 \times P_A$) y otras entre un híbrido y el otro progenitor ($F1 \times P_B$) (Gibson y Nobel, 1986). Estas cruza producen una gran variabilidad genética, lo que hace posible que algunos de estos genotipos nuevos puedan ser seleccionados y fijados en la población, constituyendo una nueva especie (Naudin, 1863 citado en Rieseberg, 1997; Barton, 2001).

La hibridación prueba que la especiación entre los taxa que se cruzan es incompleta porque no han acabado de divergir y por lo tanto no apoya el concepto de especie biológica propuesto por Mayr (1963 en Rieseberg, 1997): "las especies estan formadas por grupos de poblaciones naturales que se inter cruzan y se encuentran reproductivamente aislados de todos los demás grupos de otras especies" ya que en el caso de hibridación entre dos taxa no existen mecanismos de aislamiento reproductivo.

La manera más simple en donde se puede llevar a cabo la hibridación natural es cuando dos poblaciones se sobrelapan (simpatría) y comparten periodos de reproducción (Barton, 2001).

La hibridación es un fenómeno que se presenta de manera natural y también se promueve de forma artificial entre taxa de importancia económica como en gramíneas, cactáceas y orquídeas (Gibson y Horak, 1978; Cota y Wallace, 1996; Caputo *et al.*, 1997). Extrapolando la frecuencia de hibridación interespecifica de la flora inglesa a la flora de angiospermas, Stace (1989, citado en Hughes y Harris, 1994) estimó que existen aproximadamente 78,000 híbridos interespecificos. Sin embargo, el indicador más acertado en cuanto a la frecuencia de hibridación es la proporcionada por Ellstrand *et al.* (1996), dando un total de 27,500 combinaciones híbridas entre 250,000 especies de plantas descritas. Lo anterior puede tomarse como un subestimado ya que muchos híbridos aún no se han detectado debido al inadecuado tratamiento sistemático de algunos grupos en ciertas floras.

La hibridación en plantas parece estar concentrada en un 16-34% de familias, con híbridos distribuidos en 6-16% de géneros, en los cuales se presenta al menos un caso de hibridación entre sus especies (Rieseberg, 1997).

Las cactáceas son plantas que se distinguen por sus caracteres anatómicos y fisiológicos, tales como sus tallos crasos, reducción del limbo de las hojas, hipertrofia del peciolo

hasta su transformación en un podario o tubérculo, modificación de los meristemas hasta su conformación en aréolas, diferentes formas de espinas y un metabolismo de tipo ácido de las crasuláceas. Son una familia que comprenden entre 1500 y 2000 especies (Anderson, 2001), lo que demuestra una gran diversidad genética. Este alto índice de polimorfismo se ha atribuido a varios fenómenos, entre los cuales se encuentra la hibridación, la que ha jugado un papel muy importante en el desarrollo de nuevas especies (Rieseberg, 1997; Cota y Wallace, 1996).

II. ANTECEDENTES

El estudio del fenómeno de hibridación comienza con una buena y clara identificación de los individuos en cuestión. Según Hughes y Harris (1994) se deben de tomar en cuenta 5 criterios:

(1) que el fenotipo del híbrido sea intermedio entre los padres putativos; (2) que la fertilidad del híbrido sea reducida; (3) que exista segregación de la progenie de la segunda generación de un híbrido fértil; (4) que se de un solapamiento de la distribución de los híbridos con los posibles padres; y (5) que se pueda dar la resíntesis artificial del híbrido. Estos criterios pueden ser probados utilizando métodos biométricos tales como el análisis de componentes principales y el análisis de conglomerados.

Sin embargo, la expresión de los caracteres intermedios en los híbridos depende de la naturaleza del control genético de un determinado carácter, así como de las interacciones con el ambiente, es por ésto que los híbridos no siempre presentan un estado intermedio de caracteres, algunas veces se observan caracteres extremos o novedosos, o más aún, un mosaico de caracteres intermedios y extremos, dependiendo si se trata de generaciones híbridas tempranas o ya avanzadas (Rieseberg y Ellstrand, 1993; Rieseberg, 1995).

En general, los criterios que se han utilizado para la identificación y caracterización de híbridos son de origen cromosómico y morfológico, como los antes mencionados. Sin embargo, debido a la gran importancia evolutiva atribuida a la hibridación y por lo tanto a la gran necesidad de presentar la mayor y mejor evidencia posible, se han utilizado técnicas moleculares que involucran un examen directo del DNA. La posibilidad de identificar híbridos molecularmente es una herramienta poderosa que ha ayudado a apoyar fuertemente los estudios realizados con caracteres morfológicos (Rosabelles, 1999); también se puede llegar a elucidar el mecanismo genético y ecológico responsable del origen de los taxa superiores (Niklas, 1997). Algunos ejemplos de hibridación resueltos con marcadores moleculares son: RFLPs en *Leucaena* (Hughes y Harris, 1994), AFLPs en *Allium* (van Raamsdonk *et al.*, 2000) y *Berberis* (Bottini *et al.* (2002), RFLPs en *Orchis* (Caputo *et al.*, 1997), DNA de cloroplasto y RAPDs en *Cardamine* (Urbanska *et al.*, 1997), RAPDs en *Quercus* (Sainuel, 1999), AFLPs en *Oryza* (Aggarwal *et al.*, 1999), RFLPs en *Rhododendron* (Milne *et al.*, 1999) RAPDs en *Opuntia prolifera* (Mayer *et al.*, 2000).

La ventaja de los marcadores moleculares sobre los morfológicos en el estudio de la hibridación incluyen; (1) el gran número de marcadores moleculares independientes disponibles para el análisis; (2) los niveles generalmente bajos de variaciones moleculares no heredables; (3) la aparente selección neutral de muchos marcadores moleculares. En contraste, el número de

caracteres morfológicos heredables que diferencian a los taxa híbridos de los parentales es muy escaso como para realizar un análisis detallado de híbridos complejos. Finalmente, la expresión de los caracteres morfológicos en híbridos es relativamente impredecible debido a la variación en el control genético de estos caracteres, así como a los factores no heredables (Rieseberg y Ellstrand, 1993).

Muchas de las técnicas que se han desarrollado se basan en marcadores generados por aloenzimas o en loci de DNA nuclear como genes ribosomales. Ambas técnicas son confiables, pero aportan poca información o requieren de condiciones muy específicas, por ejemplo, en el caso de las aloenzimas la detección dependerá de la etapa de desarrollo de la planta y de la influencia que tenga el medio ambiente sobre ésta. Es por esto que, para la identificación de híbridos se ha preferido la utilización de metodologías más prácticas y funcionales que involucran la generación de marcadores moleculares, como son RAPDs, AFLPs y RFLPs, las cuales se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Powell *et al.*, 1996). De las técnicas antes mencionadas, la más empleada para la identificación de híbridos e incluso de cultivares ha sido la de AFLP (Liu *et al.*, 1998; Albertson *et al.*, 1999; Loh *et al.*, 1999; van Raamsdonk *et al.*, 2000; Congiu *et al.*, 2001; Mayer *et al.*, 2000). La ventaja de utilizar esta técnica es que proporciona un nuevo nivel de precisión en el genotipo y ofrece un estupendo potencial en estudios de diversidad genética. En comparación con las otras técnicas aquí mencionadas, los AFLP's permiten mapear un gran número de loci a la vez, generando por lo tanto el más alto índice de diversidad (Russell *et al.*, 1997), además, es una técnica altamente reproducible, menos laboriosa y más rápida que las demás.

La técnica de AFLP se basa en el principio de amplificar seleccionadamente un conjunto de fragmentos restringidos a partir de una mezcla de fragmentos de DNA que fue obtenida a partir de la digestión del DNA genómico con endonucleasas de restricción (Vos *et al.*, 1995; Liscum, 1999).

La familia Cactaceae está considerada como un grupo natural que ha evolucionado en los últimos 80 a 60 millones de años (Gibson y Nobel, 1986; Leuenberger, 1986, citado en Gibson y Horak, 1978); se ha diversificado en un considerable número de especies y formas de vida y se ha establecido en varios ecosistemas. La diversificación se vio favorecida por la aparición de zonas áridas y semiáridas, manifestándose en varias adaptaciones morfológicas, fisiológicas y reproductivas, por lo que se cree que los procesos de hibridación y poliploidía también han jugado un papel importante en la evolución de la familia (Cota y Wallace, 1996; Bravo-Hollis, 1997).

En esta familia, los híbridos naturales representan un reto para los taxónomos, pues a diferencia de otras familias de angiospermas, la ocurrencia de hibridación interespecífica es muy frecuente y la intergenérica es más frecuente que en otras familias (Gibson y Horak, 1978; Cota y Wallace, 1996; Caputo *et al.*, 1997).

Hawkes (1983) reporta un listado extenso de híbridos para la familia Cactaceae son híbridos tanto interespecíficos como intergenéricos, sin embargo, no hace la aclaración sobre cuales son de origen natural y cuales de origen artificial. El menciona también que los japoneses han generado varios híbridos con fines comerciales. Dentro de los intereses de los horticultores sobre los híbridos se encuentran la cruce entre especies de ciclos de vida largos con especies de ciclos de vida corto, sobre todo aquellas con flores vistosas. Un gran número de híbridos reportados de la familia Cactaceae se enlistan en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Lista de híbridos intergenéricos en la familia Cactaceae.

HIBRIDO	PROGENITORES	FUENTE
x <i>Cleistocana mirabilis</i>	<i>Cleistocactus fieldianus</i> x <i>Matucana supertexta</i>	Rowley (1994 citado en Hunt, 1999)
x <i>Espostocactus</i>	<i>Cleistocactus icosagonus</i> x <i>Espostoa lanata</i>	Mottram (1990 citado en Hunt, 1999)
x <i>Hangespostoa albisetata</i>	<i>Haageocereus pseudomelanosteles</i> x <i>Espostoa melanosteles</i>	Rowley (1982a) Hunt (1999) Anderson (2001)
x <i>Helioclia vandessi</i>	<i>Heliocereus speciosus</i> x <i>Nopalxochtia phyllanthoides</i>	Hawkes, (1982)
x <i>Hangespostoa climaxantha</i>	<i>Espostoa melanosteles</i> x <i>Haageocereus albispinus</i>	Rowley (1982a) Hunt (1999) Anderson (2001)
x <i>Myrtillocactus lindsayi</i>	<i>Bergerocactus emoryi</i> x <i>Myrtillocactus cochal</i>	Moran (1962) Hunt (1999) Anderson (2001)
x <i>Pacherocactus orcuttii</i> (nombrado así por Moran, 1962, 1963)	<i>Pachycereus pringlei</i> x <i>Bergerocactus emoryi</i>	Rowley (1982b) Hunt (1999)
(x <i>Pachycereus orcuttii</i>)		Anderson (2001)
Híbrido estéril	<i>Neobuxbaumia tetetzo</i> x <i>Cephalocereus columna-trajani</i>	Vite <i>et al.</i> (1996)

Tabla 2. Lista de híbridos interespecíficos de la familia Cactaceae.

HIBRIDO	PROGENITORES	FUENTE
<i>Arrojadoa</i> × <i>albiflora</i>	<i>A. diinae</i> spp. <i>diinae</i> × <i>A. rhodantha</i>	Hunt (1999)
<i>Cleistocactus</i> × <i>crassispinus</i>	<i>A. diinae</i> × <i>A. rhodantha</i> <i>C. serpens</i> × <i>C. icogagonius</i>	Anderson (2001) Hunt (1999)
<i>Disocactus</i> × <i>hybridus</i>	<i>D. phyllanthoides</i> × <i>D. speciosus</i>	Anderson (2001)
<i>D. smallisonii</i>	<i>D. flagelliformis</i> × <i>D. speciosus</i>	Anderson (2001)
<i>D. xviolaceus</i>	<i>D. ckermannii</i> × <i>D. speciosus</i>	Anderson (2001)
<i>Echinocereus</i> × <i>xroetteri</i>	<i>E. coccineus</i> × <i>E. dasycanthus</i>	Hunt (1999)
<i>Echinopsis</i> × <i>xcabrerae</i>	<i>E. strigosa</i> × <i>E. terscheckii</i>	Anderson (2001) Hunt (1999)
<i>Hatiora</i> × <i>xgraeseri</i>	<i>H. gaertneri</i> × <i>H. rosea</i>	Anderson (2001) Hunt (1999)
<i>Melocactus</i> × <i>albicephalus</i>	<i>M. ernestii</i> × <i>M. glaucescens</i> .	Hunt (1999)
<i>M. xhorridus</i>	<i>M. ernestii</i> × <i>M. zehlneri</i>	Taylor (1991, citado en Anderson, 2001) Hunt (1999)
<i>Opuntia</i> × <i>aequatorialis</i>	<i>O. pubescens</i> × <i>O. soederstromiana</i>	Hunt (1999)
<i>O. xbakeri</i>	<i>O. pubescens</i> × <i>Opuntia soederstromiana</i>	(Madsen (1989, citado en Anderson, 2001)-
<i>O. xberchiana</i>	<i>O. humifusa</i> × <i>O. stricta</i>	Hunt (1999)
<i>O. xcolumbiana</i>	<i>O. fragilis</i> × <i>O. polyacantha</i>	Hunt (1999)
<i>O. xcongesta</i>	<i>O. fragilis</i> × <i>polyacantha</i> var. <i>polyacantha</i> <i>O. acanthocarpa</i> × <i>O. whipplei</i>	Anderson (2001)- Hunt (1999)
<i>O. xcubensis</i>	<i>O. acanthocarpa</i> var. <i>thornteri</i> × <i>O. whipplei</i>	Anderson (2001)*
<i>O. xcursispina</i>	<i>O. dillemii</i> × <i>O. militaris</i> <i>O. militaris</i> × <i>O. stricta</i>	Hunt (1999) Anderson (2001)-
<i>O. xdeserta</i>	<i>Opuntia chlorotica</i> × <i>O. phaeacantha</i>	Hunt (1999)
<i>O. xfosbergii</i>	<i>O. acanthocarpa</i> var. <i>coloradensis</i> × <i>O. echinocarpa</i>	Anderson (2001)*
<i>O. xkelvinensis</i>	<i>O. bigelovii</i> × <i>O. echinocarpa</i> u. <i>O. phaeacantha</i> <i>O. bigelovii</i> × <i>O. echinocarpa</i>	Hunt (1999) Anderson (2001)*
<i>O. xluayanu</i>	<i>O. fulgida</i> × <i>O. spinosior</i>	Hunt (1999) Anderson (2001)*
<i>O. xmultigeniculata</i>	<i>O. dillemii</i> × <i>O. nashii</i> <i>O. echinocarpa</i> × <i>O. whipplei</i>	Hunt (1999) Anderson (2001)- Hunt (1999)

<i>O. xneorbuscula</i>	<i>O. arbuscula</i> x <i>O. spinosior</i>	Anderson (2001) [*] Hunt (1999)
<i>O. xoccidentalis</i>	<i>O. littoralis</i> x <i>O. engelmannii</i> x <i>O. phaeacantha</i>	Anderson (2001) [*] Hunt (1999)
<i>O. prolifera</i>	<i>O. engelmannii</i> x <i>O. phaeacantha</i>	Anderson (2001) [*]
<i>O. xquiya</i>	<i>O. alcahes</i> x <i>A. cholla</i>	Mayer <i>et al.</i> (2000)
<i>O. xspinosibacca</i>	<i>O. inamoena</i> x <i>O. palmadora</i>	Hunt (1999)
<i>O. xtetracantha</i>	<i>O. aureispina</i> x <i>O. phaeacantha</i>	Hunt (1999)
<i>O. xvaseyi</i>	<i>O. acanthocarpa</i> x <i>O. leptocaulis</i>	Anderson (2001) [*] Hunt (1999)
<i>O. xviridiflora</i>	<i>O. acanthocarpa</i> var. <i>major</i> x <i>O. leptocaulis</i>	Anderson (2001) [*]
<i>O. xvivipara</i>	<i>O. littoralis</i> x <i>O. phaeacantha</i>	Hunt (1999)
<i>O. xwootonii</i>	<i>O. imbricata</i> x <i>O. whipplei</i>	Anderson (2001) [*] Hunt (1999)
<i>Pilosocereus xsubsimitis</i>	<i>O. arbuscula</i> x <i>O. versicolor</i>	Anderson (2001) [*] Hunt (1999)
<i>Schlumbergera xbuckleyi</i> ^(a)	<i>O. engelmannii</i> x <i>O. phaeacantha</i>	Anderson (2001) [*]
	<i>P. magnificus</i> x <i>P. floccosus</i> spp. <i>quadricostatus</i>	Anderson (2001) [*] Hunt (1999)
	<i>S. russelliana</i> x <i>S. truncata</i>	Hunt (1999)
<i>S. xexotica</i> ^(a)		McMillan y Horobin (1995, citado en Anderson, 2001)
	<i>S. opuntioides</i> x <i>S. truncata</i>	Hunt (1999)
<i>S. xreginae</i> ^(a)		McMillan y Horobin (1995, citado en Anderson, 2001)
	<i>S. orssichiana</i> x <i>S. truncata</i>	Hunt (1999)
<i>Tacinga xquiya</i>		McMillan y Horobin (1995, citado en Anderson, 2001)
	<i>T. inamoena</i> x <i>T. palmadora</i>	Struppy y Taylor (citado en Anderson, 2001)
<i>T. xmonbergii</i>		Anderson (2001)
<i>Trichocereus xmendocinus</i>	<i>T. lavix</i> x <i>T. seudopctinatus</i>	Méndez (2000)
<i>Turbincarpus xmonbergeri</i>	<i>T. candicans</i> x <i>T. strigosus</i>	Hunt (1999)
	<i>T. laui</i> x <i>T. pseudopectinatus</i>	Hunt (1999)

x= La x antes del epíteto genérico indica hibridación intergenérica. El epíteto genérico se forma de la combinación de cada uno de los progenitores genéricos, mientras que el epíteto específico puede variar.

La x entre el epíteto genérico y el específico representa una hibridación interespecífica. El epíteto genérico representa al género involucrado en la hibridación y el epíteto específico puede variar.

^{*} *Opuntia* para Anderson (2001) y Hunt (1999)

^{*} *Cylindropuntia* para Anderson (2001) y *Opuntia* para Hunt (1999)

^(a) híbridos artificiales

De acuerdo con Bartolo (2000) y Cruz (2000), en el estado de Puebla es común encontrar "injertos" de *Polaskia chichiye* con *Polaskia chende*, *Myrtillocactus schenkii* y *Escontria chiotilla*. Estos injertos son al parecer híbridos interespecíficos pues no son en realidad injertos en el sentido agronómico, sino más bien individuos que combinan características morfológicas de las especies mencionadas. Sin embargo, estos híbridos aún no han sido estudiados (Bartolo, 2000). También se menciona que puede haber hibridación interespecífica en el género *Stenocereus* (Casas *et al.*, 1999).

El alto porcentaje de hibridación interespecífica e intergenérica exitosa dentro de la familia Cactaceae es realmente impresionante, comparado con otras familias en donde nunca se han reportado individuos híbridos (con excepción de las orquídeas y de algunas gramíneas), lo que indica que en Cactaceae se da un escaso desarrollo de barreras reproductivas precigóticas (sistemas de incompatibilidad, polinizadores, floración diferencial) y/o postcigóticas (degeneración temprana del endospermo, fruto mal desarrollado, bajo porcentaje de semillas y granos de polen viables) que limiten el intercambio de genes (Jones, 1988).

Dentro de las cactáceas, los caracteres que comúnmente se han empleado para diferenciarlas son morfológicos (Moran 1962, 1963; Grant y Grant, 1979, 1980; Vite *et al.*, 1996) y citogenéticos (Pinkava y Parfitt, 1982). El único estudio que incluye marcadores moleculares en Cactaceae es el de *Opuntia prolifera* (Mayer *et al.*, 2000).

Escontria chiotilla y *Polaskia chichiye* son dos especies de cactáceas columnares genéricamente distintas que coinciden en su distribución en los estados de Puebla y Oaxaca. En una región de la Mixteca Baja de Oaxaca, se identificaron cuatro individuos que se presume son híbridos entre estos dos géneros dado que reúnen características morfológicas de ambos géneros. El carácter más distintivo de estos individuos y que de hecho fue tomado para su identificación en el campo, es el fruto dado que presenta escamas como en *E. chiotilla*, y espinas como en *P. chichiye*.

El posible híbrido bajo estudio fue detectado por el biólogo Jerónimo Reyes Santiago en las cercanías de Huajuapam de León Oaxaca. Reyes consideró que se trataba de un híbrido intergenérico entre *Polaskia chichiye* y *Escontria chiotilla* porque presenta características morfológicas de ambos géneros y además, son cactáceas columnares muy abundantes en esta región, aunque también pueden encontrarse algunos individuos de *Myrtillocactus geometrizans*, pero al comparar el híbrido con *Myrtillocactus* no existen características morfológicas con las que se le pueda relacionar con este último. Las características presentes de *E. chiotilla* en el posible híbrido son escamas en la flor y fruto y de *P. chichiye* las espinas en el fruto. En cambio, en *M. geometrizans* el fruto carece de espinas y escamas; además, las flores son totalmente diferentes.

Se decidió tomar como sistema de estudio a este posible híbrido en el taller “Desarrollo y fisiología de las estructuras reproductoras en la familia Cactaceae” en el año 2000. No existe ningún reporte publicado de este posible híbrido ni tampoco ejemplares de respaldo en ningún herbario. Es por esto que se realizaron varias salidas al campo en los siguientes dos años, durante los cuales, se realizó una búsqueda extensa del posible híbrido, encontrando únicamente cuatro individuos en etapa reproductiva con tales características. La búsqueda abarcó el área que va de Huajuapam de León hasta Tamazulapan, adentrándose en varios cerros (El Mirador y La Culebra,) así como en áreas circunvecinas como Corral de Piedra.

El presente trabajo comprende la caracterización e identificación morfológica y molecular de estos individuos que se proponen como híbridos producto de la cruce entre dos géneros de cactáceas: *Escontria chiotilla* y *Polaskia chichipe*.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Comprobar la existencia de un híbrido intergenérico entre *Escontria chiotilla* y *Polaskia chichipe* por sus relaciones morfológicas y genéticas con los progenitores.

Objetivos particulares

- ▶ Describir y comparar morfológicamente al posible híbrido entre *E. chiotilla* y *P. chichipe*.
- ▶ Estudiar la micromorfología del polen y semilla tanto del posible híbrido como de *E. chiotilla* y *P. chichipe*.
- ▶ Determinar la viabilidad de las semillas y de los granos de polen de los taxa involucrados.
- ▶ Determinar las relaciones genéticas entre el supuesto híbrido y los progenitores por medio de marcadores de DÑA y cruza artificiales.
- ▶ Predecir las posibles combinaciones genómicas de los supuestos híbridos derivados entre *E. chiotilla* y *P. chichipe* mediante la generación de híbridos virtuales.

IV. MATERIAL Y METODOS

IV.1 Sitio de estudio

El presente trabajo se llevó a cabo con plantas que habitan en la Mixteca Baja de Oaxaca, a 10 km del municipio de Huajuapán de León (Fig. 1) en los linderos de la carretera que va hacia Tamazulapán (190 Mex.). En general, el clima de la Mixteca Baja es árido y semiárido con una precipitación promedio anual de 300 mm; la vegetación varía de matorral espinoso y bosque tropical caducifolio en las partes bajas secas y cálidas, a bosques de pino en las partes altas húmedas y templadas (Villaseñor et al., 1990).

De acuerdo con la morfología descrita por Bravo-Hollis (1978), en la región se identificaron poblaciones simpátricas de *Escontria chiotilla* y de *Polaskia chichi*. Además de estos dos cactus columnares, en esta parte de la Mixteca Baja de Oaxaca habitan también, aunque en muy poca proporción, *Myrtillocactus geometrizans* y *Stenocereus stellatus*. Para llevar a cabo el estudio, se seleccionaron 3 localidades diferentes comprendidas dentro de esta región. La primera se ubica en las coordenadas N 17° 45.155' W 097° 44.73' donde habita uno de los posibles híbridos; la segunda en N 17° 44.947' W 097° 44.458' en la cual se localizan dos posibles híbridos; la última localidad se encuentra en N 17° 45 114' W 097° 44.732' (Fig. 1).

IV.2 Unidades de estudio

Los géneros *Escontria* y *Polaskia* han sido taxonómicamente colocados en diferentes subtribus de la tribu Pachycereeae. Leuenberger (1976, citado en Gibson y Horak, 1978), ubica a *Escontria* en la subtribu Pterocereinae y a *Polaskia* en la subtribu Myrtillocactinae (Fig. 2a).

Posteriormente, Gibson y Horak (1978) con base en caracteres anatómicos, en la química del tallo, pigmentación del funículo, morfología de semilla, forma de crecimiento, morfología y anatomía de costilla y morfología floral, subdividen a la tribu Pachycereeae en la subtribu Pachycereinae y Stenocereinae incluyendo a *Escontria* y a *Polaskia* en esta última junto con *Myrtillocactus* y *Stenocereus* (Fig 2b), lo cual sigue siendo apoyado por Cornejo y Simpson (1997) quienes realizaron un análisis de la forma y función del tallo de la tribu Pachycereeae, así como por el Grupo Internacional de Sistemática de Cactáceas (Anderson, 2001). *Escontria* cuenta con una sola especie: *E. chiotilla* y *Polaskia* con dos: *P. chichi* y *P. chende*.

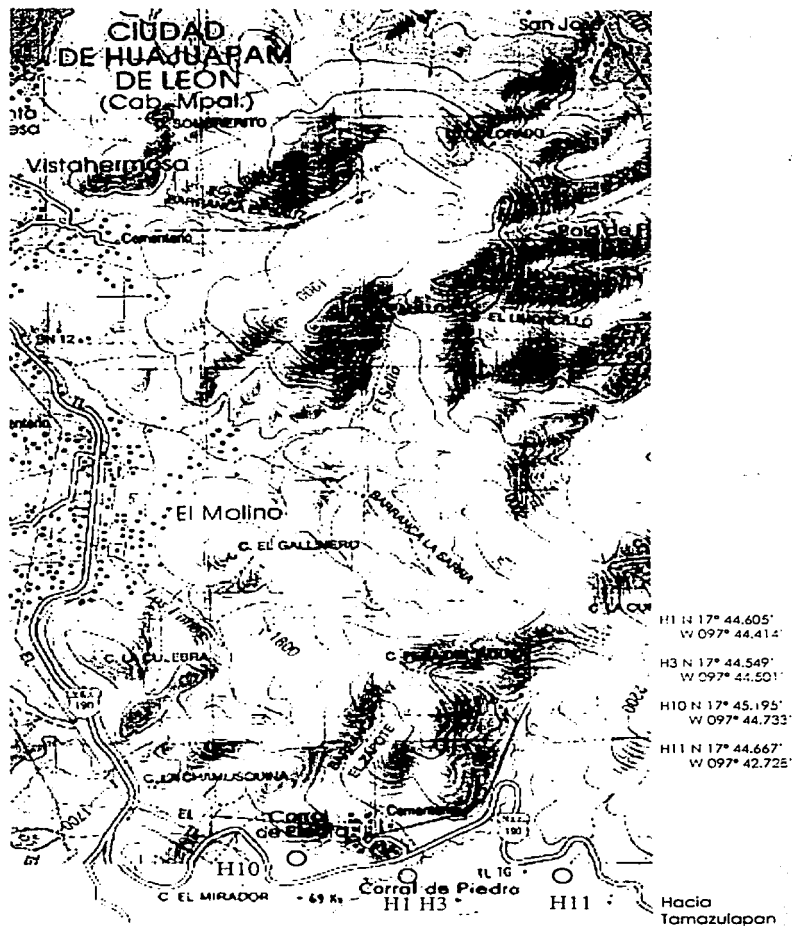
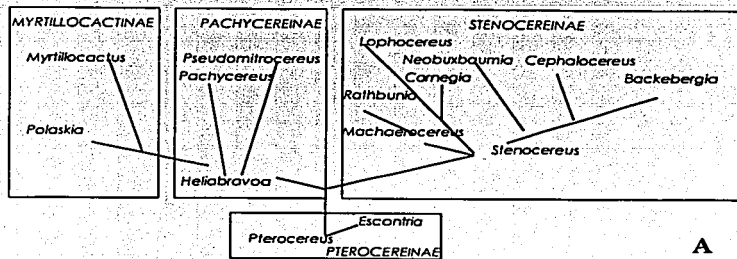
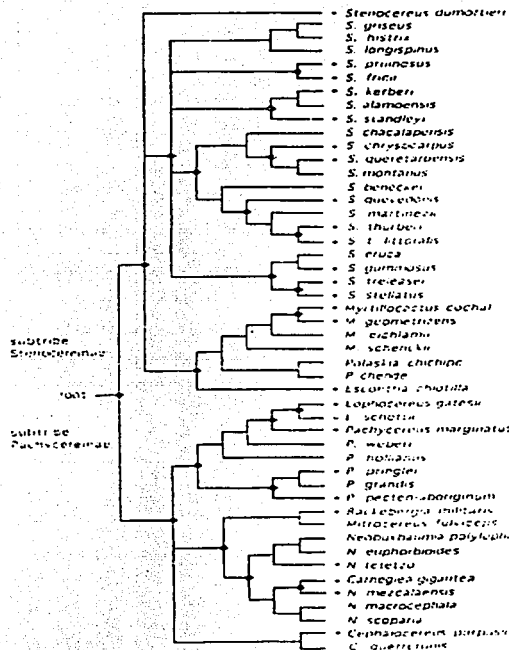


Figura 1. Localización de los individuos híbridos naturales encontrados en el campo, en el estado de Oaxaca, México.



A



B

Figura 2. Relaciones filogenéticas de la tribu Pachycereae. A. Filogenia propuesta por Buxbaum (en Gibson y Horak, 1978) basada por la presencia de triterpenos en el tallo, pigmentos fúngicos y morfología de la semilla. B. Filogenia propuesta por Cornejo y Simpson (1997), basada en la morfología y la arquitectura del tallo.

Escontria chiotilla (F.A.C. Weber) Rose, Contr. U.S. Nat. Herb. 10:126. 1906.

Subfamilia Cactoideae, tribu Pachycereeae, subtribu Stenocereinae

Nombre común: chiotilla, jiotilla, quiotilla.

Planta arborescente de 3 a 4 m de altura, con tronco corto y grueso. Tiene ramas muy numerosas de color verde oscuro, cada una con 7 u 8 costillas prominentes (Fig. 3). Presenta aréolas muy próximas, elípticas, con fieltro grisáceo. En promedio, cada aréola tiene de 10 a 15 espinas radiales, rectas, a veces dirigidas hacia abajo, de 1 cm de longitud. Por lo general tiene de 1 a 3 espinas centrales que miden de 7 a 15 cm de largo. Las flores se localizan en la terminación de las ramas, una por aréola; miden incluyendo el ovario 3 cm de longitud; presentan segmentos internos del perianto amarillos; el pericarpelo y el tubo presentan grandes escamas papiráceas translúcidas, brillantes, acuminadas, triangulares y membranosas. El fruto es globoso, escamoso de color café rojizo, de 3.5 cm de diámetro; la pulpa es purpurina semiamarga, comestible. Las semillas son negras de 15 mm de diámetro, con la testa rugosa.

Distribución: Puebla, Oaxaca, Guerrero y Michoacán (Bravo-Hollis, 1978; Arias y Guzmán, 1997).



Figura 3. Individuo adulto de *Escontria chiotilla*.

Delaskia chuchiye (Roland-Gosselin) Backeberg, Blatt. Sukk. 1:4 1949.

Subfamilia Cactoideae, tribu Pachycereae, subtribu Stenocereinae.

Nombre común: chichibe, chichipe, chichitun, chichituna, dichituna (Anderson, 2001).

Planta arborescente de 3 a 5 m de alto, profusamente ramificado. Tallo principal corto, con ramas color verde claro, cada una presenta de 9 a 12 costillas agudas (Fig. 4). Las areólas se encuentran separadas entre sí de 1 a 1.5 cm. En promedio cada areóla tiene de 6 a 7 espinas radiales de 3 a 10 mm de largo y una sola espina central un poco más larga. Las flores son diurnas, pequeñas que se encuentran en las terminaciones de las ramas, una por areóla, de 3 cm de largo incluyendo el pericarpelo; los segmentos del perianto son de color blanco amarillento. Cuando se encuentran abiertas, los segmentos del perianto son revolutos y los estambres exertos. El fruto es globoso color rojo púrpura, con areólas caducas que presentan espinas; la pulpa es jugosa y dulce, comestible. Las semillas miden 1.3 mm de largo, son negras con grandes puntuaciones hundidas, que se hacen más pequeñas hacia el hilo.

Distribución: Puebla y Oaxaca (Bravo-Hollis, 1978; Arias y Guzmán, 1997).



Figura 4. Individuo adulto de *Poluskia chichipe*.

En *P. chichipe*, La liberación del polen ocurre aproximadamente a las 11:00 horas y la máxima turgidez del estigma a las 15:00 horas. Los polinizadores más probables son *Xilocopa* sp.

Apis mellifera y *Plebeya mexicana*. En poblaciones silvestres existe una autoincompatibilidad total. La polinización cruzada es exitosa durante el día pero nula durante la noche (Bartolo, 2000).

Descripción del híbrido

Planta arborescente de 3 a 5 m de altura con tronco grueso. Ramas muy numerosas color verde olivo; presenta de 6 a 8 costillas. Las aréolas se encuentran con una separación promedio de 6.59 cm entre cada una. Presenta de 7 a 10 espinas radiales de 6.88 cm de longitud promedio y una espina central de 37.71 cm de longitud y 1.45 cm de diámetro. Las flores se encuentran en la parte terminal de las ramas, una por aréola, de 29.94 cm de largo y 14.80 cm de diámetro; los segmentos del perianto son de color blanco verdoso, con pequeñas escamas. El fruto es globoso color rojo, con pulpa carnosa, muy dulce, comestible, tiene en promedio 17.15 cm de longitud y 17.82 cm de diámetro, posee escamas translúcidas y espinas caducas. Las semillas son muy pequeñas de color negro, con la testa rugosa, a veces con malformaciones en la cutícula (Fig. 5)

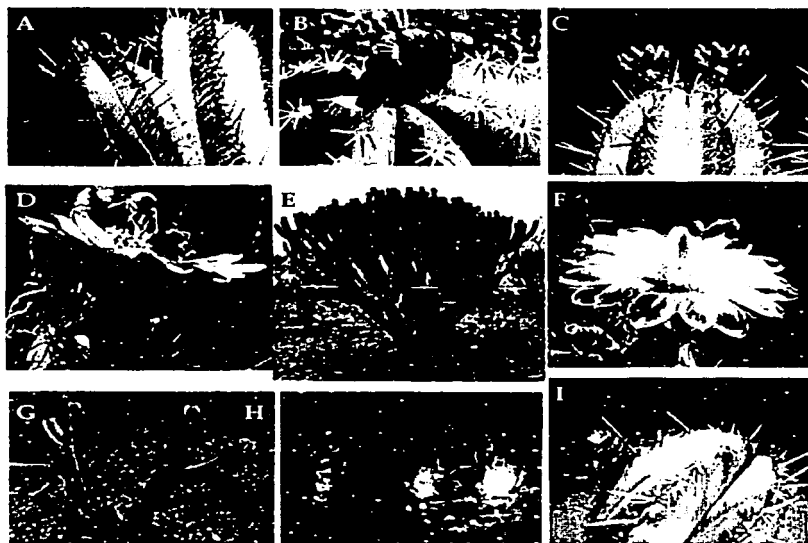


Figura 5. Características del posible híbrido. A. Rama con botones florales. B. Botón floral. C. Flores en antesis. D. Polinizadores. E. Hábito arborescente. F. Flor en antesis. G. Individuo juvenil. H. Frutos maduros, abortivo y normal. I. Fruto inmaduro.

IV.3 Caracterización morfológica

IV.3.1 Toma de datos

Se emplearon transectos para el muestreo. En total se realizaron 3 transectos, uno en cada una de las localidades que se mencionaron en el sitio de estudio. Cada transecto tuvo como dimensiones 100 metros de longitud por 10 metros de ancho. Se tomaron en cuenta a todos aquellos individuos que presentaron tanto flor como fruto que estuvieran dentro del transecto, hasta completar 30 individuos de cada posible progenitor. En promedio se muestrearon de 8 a 11 individuos por transecto.

Debido a que solamente se puede identificar a los posibles híbridos en etapa reproductiva, únicamente fue posible detectar a 4 individuos adultos los cuales fueron incluidos en el análisis.

IV.3.2. Medición de caracteres

En total se tomaron en cuenta 16 caracteres morfológicos, 14 cuantitativos y 2 cualitativos (tabla 3). Las mediciones fueron hechas con un vernier digital y con una regla de 30 cm.

Tabla 3. Caracteres morfológicos analizados en los supuestos híbridos entre *P. chichipe* y *E. chiotilla*.

Carácter	no. de partes medidas por individuo.	Unidades
Número de costillas	5 ramas	número
Ancho de costilla	5 costillas	mm
Profundidad de costilla	5 ramas	mm
No. espinas radiales por aréola	5 aréolas	número
Longitud de espinas radiales	1 aréola	mm
Longitud de espina central	5 aréolas	mm
Diámetro de espina central	5 aréolas	mm
Distancia entre aréolas	5 pares de aréolas	mm
Longitud de flor	3-5 flores	mm
Diámetro de flor	3-5 flores	mm
Longitud del fruto	3-5 frutos	mm
Diámetro del fruto	3-5 frutos	mm
Número de aréolas en 30 cm	1 rama	número
Presencia/ausencia de brácteas y espinas en el fruto	3-5 frutos	1= brácteas 2= espinas 3= brácteas y espinas
Forma de las unidades del perianto	1 flor	1= revolutos 2= no revolutos

IV.3.3 Análisis fenético

Todos los análisis que se llevaron a cabo en el presente trabajo fueron hechos con el programa NTSYS pc 2.1 (Rohlf, 2000). Los análisis que se realizaron en esta parte del trabajo fueron un análisis de conglomerados (AC) y uno de componentes principales (PCA). Para la realización de ambos análisis, se construyó una matriz básica de datos de los caracteres empleados (apéndice I). Debido a que se tomaron varias mediciones de un mismo carácter en un

solo individuo, se utilizó la media de cada uno de los caracteres cuantitativos, obteniendo una matriz rectangular de 34 columnas por 16 filas, en donde las hileras representan los caracteres evaluados y las columnas a los individuos u OTUs (unidades taxonómicas operacionales) muestreados.

Esta matriz fue estandarizada por hileras utilizando la media como opción de substracción y la desviación estándar como opción de división, para eliminar el efecto de las escalas y mantener la varianza interna de los datos. Con esta nueva matriz, se construyó una matriz de distancia, en la cual se empleó el coeficiente de correlación. Para el análisis de conglomerados se probaron tres métodos de agrupamiento, el de ligamiento simple, el completo y el de UPGMA (Unweighted Pair Group Method); finalmente, para analizar los resultados se seleccionó el método UPGMA puesto que fue el que presentó el valor más alto del coeficiente de correlación cofenética.

IV.4 Caracterización molecular

IV.4.1 Purificación de DNA genómico

Se tomaron muestras de tejido del tallo de 13 individuos de *E. chiotilla* y 13 de *P. chichipe* y de los 4 individuos del posible híbrido natural. Dado que el número de posibles híbridos naturales fue bajo, se tomaron 7 plántulas obtenidas de semillas germinadas de los posibles híbridos naturales para así tener un análisis estadístico más representativo. En total, para la generación y el análisis de marcadores de DNA se tomaron en cuenta a 37 individuos.

La extracción del DNA total de estos 37 individuos se llevó a cabo empleando el protocolo de extracción modificado de Doyle y Doyle (1987, 1990, citado en Csaiki *et al.*, 1998). Se pulverizaron 0.5g de tejido con nitrógeno líquido y se les adicionó 5 ml de buffer de lisis (apéndice III) precalentado a 65 °C por 30 minutos agitando ocasionalmente. La muestra se enfrió a 37° C por 10 minutos. Pasado este tiempo, se realizó una primera extracción con 1 volumen de PCI (fenol, cloroformo, isoamilico, 25:24:1). La mezcla se centrifugó a 10,000 rpm a 4° C durante 10 minutos. Se recuperó la fase acuosa y se agregaron 5 ml de 5x CTAB (apéndice III) para precipitar carbohidratos. Se llevó a cabo una segunda extracción con 1 volumen de PCI.

La precipitación de los ácidos nucleicos se realizó adicionando 3.5 ml de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente por un mínimo de 1 hora. Después, se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a -4° C. El precipitado se resuspendió en 3 ml de agua desionizada. Se llevó a cabo una segunda precipitación con 1/3 del volumen de acetato de amonio (10 M) y 2 volúmenes

de etanol (100%); se incubó por 1 hora como mínimo a -20°C . Se centrifugó a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C . El precipitado se resuspendió en agua desionizada.

Debido a que los ácidos nucleicos copurifican con una gran cantidad de pectinas, fue necesario hacer una purificación más fina a través de un fraccionamiento electroforético en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (10 mg/ml). El gel se corrió a 90 volts durante 45 minutos. Además, esto permitió separar el DNA de alto peso molecular del RNA.

Una vez separados los ácidos nucleicos, se cortaron del gel las bandas correspondientes a DNA y se colocaron en un tubo de 500 μl con 3 perforaciones en la base y un tapón de pelo de angel en el fondo. Este tubo se puso dentro de otro tubo colector de 1 ml. La columna, se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. El eluato colectado se sometió a otra extracción con un volumen de PCI y se incubó con agitación constante moderada a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se centrifugó a 13,000 rpm por 5 minutos. Se separó la fase acuosa y se hizo una precipitación con 1/3 del volumen de acetato de amonio (10 M) y 2 volúmenes de etanol (100%) durante 30 minutos a -20°C . Pasado el tiempo, se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C . El precipitado fue lavado con 500 μl de etanol al 70 % , agitado con vortex y centrifugado por 3 minutos a 13,000 rpm. Se removió completamente los residuos de etanol y finalmente se resuspendió el precipitado en agua desionizada.

Para evaluar la pureza y cantidad de DNA obtenido, se diluyó 1 μl de la solución de DNA en 1 ml de agua y se midió su absorbancia a 260 y 280 nm. Los ácidos nucleicos absorben a 260nm y las proteínas a 280 nm, por lo que el cociente 260/280 que debe ser aproximadamente de 2.0 implica que el DNA purificado tiene una baja porción de proteínas contaminantes. Para cuantificar la cantidad de DNA se sabe que, por cada unidad de densidad óptica (D.O.) corresponde 50 ng/ μl de DNA.

IV.4.2 Obtención de caracteres moleculares (DNA) por medio de AFLP's

El protocolo que se utilizó fue el desarrollado por Vos *et al.* (1995) y modificado por Liscum (1999).

Primer paso. Digestión/ligamiento

A 1 μg de DNA se adicionaron 8 μl del buffer de digestión/ligamiento (apéndice III), 0.5 μl de la enzima EcoRI (10U/ μl), 1 μl de la enzima MseI (5U μl) y 25.5 μl de agua desionizada, para obtener un volumen final de 40 μl . La digestión se llevó a cabo por 3 horas a 37°C . Pasado este tiempo, a cada muestra se agregó 1 μl del adaptador para EcoRI (5'

CTCGTAGACTGCGTACC 3'), 1 μ l del adaptador para MseI (5' GACGATGAGTCCTGAG 3'), 2 μ l de ATP (10mM), 4 μ l del buffer de digestión/ligamiento, 1 unidad de T4 DNA-ligasa y 1 μ l de dH₂O; se obtuvo un volumen final de 50 μ l. La reacción de ligado se llevó a cabo toda la noche a 37° C.

Segundo paso. Preamplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction)

Para evaluar la eficiencia de ligado de los adaptadores al DNA digerido, se tomaron 5 μ l del DNA quimérico (digerido y ligado) y se agregaron 0.5 μ l del primer EcoRI Core + adaptador (5'CTCGTAGACTGCGTACCAATTC 3') (50 ng/ μ l), 0.5 μ l de MseI Core + adaptador (5' GACGATGAGTCCTGAGTAA 3') (50 ng/ μ l), 0.8 μ l de dNTP's (5 mM), 2 μ l del buffer de PCR 10x (apéndice III), 0.6 μ l de MgCl₂ (50 mM), 0.4 μ l de Taq DNA polimerasa (1U/ μ l) y 10.2 μ l de H₂O; se obtuvo un volumen final de 20 μ l.

Las condiciones de preamplificación fueron las siguientes:

90° C 2 minutos	} 19 ciclos
94° C 30 segundos	
56° C 1.0 minuto	
72° C 1 minuto	
72° C 2 minutos	

Se separaron electroforéticamente 10 μ l del producto de PCR un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (10mg/ml) a 100 volts durante 1 hora (Fig. 6). En esta figura se observa el producto de amplificación en un rango de 100 a 500 pb, lo cual concuerda con lo esperado para DNA's quiméricos con adaptadores EcoRI - MseI (Liscum, 1999). El producto de la reacción de PCR se diluyó 10 veces (1:10).

Tercer paso. PCR AFLP

Se tomaron 5 μ l del DNA diluido (1:10) del paso anterior y se le adicionaron 0.25 μ l del primer EcoRI-AFLPx (50 ng μ l) marcado con el radioisótopo ³²P, 0.30 μ l del primer MseI-AFLPz (50 ng/ μ l) no marcado, 0.4 μ l de dNTP's, 1.0 μ l de buffer de PCR 10x, 0.3 μ l de MgCl₂ (50 mM), 0.3 unidades de Taq DNA polimerasa (1 unidad/ μ l) y 2.45 μ l de dH₂O con lo que se obtuvo un volumen final de 10 μ l. En total se utilizaron 10 combinaciones de pares de primers (Tabla 4).

MM

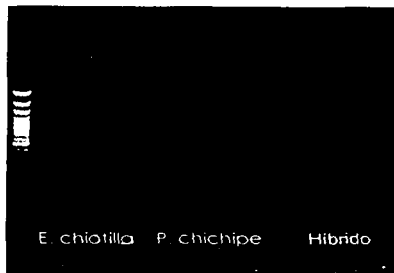


Figura 6. Corroboración por PCR de la eficiencia de ligado de los adaptadores. Los productos de amplificación fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (10 mg/ml). MM= marcador molecular.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

94° C 2 minutos
94° C 30 segundos
65° C 30 segundos
72° C 1 minuto



12 ciclos reduciendo la temperatura de
alineamiento 0.7° C por ciclo

94° C 30 segundos
56° C 30 segundos
72° C 1 minuto



25 ciclos

72° C 2 minutos
Mantener a 4° C.

Para visualizar los fragmentos amplificados, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% de la siguiente forma:

Preparación del gel

La noche anterior a realizar la electroforesis se preparó el gel mezclando 60 ml de acrilamida al 5% para secuenciación prefiltrada (apéndice III), 150 µl de persulfato de amonio (10mM) y 100 µl de TEMED. Se limpiaron perfectamente 2 vidrios para secuenciación con acetona y etanol al 70%; los separadores fueron colocados en el vidrio más grande y encima de éstos se puso el otro vidrio. Se sujetaron ambos vidrios con los separadores con clips grandes. Se vació el gel tratando de que no quedaran burbujas; finalmente se colocó el peine en la parte superior y se dejó polimerizando una hora a temperatura ambiente y luego se colocó a 4° C para que siguiera polimerizando toda la noche.

Desnaturalización de la muestra

A cada muestra de DNA quimérico templado amplificado, se agregaron 10 µl de buffer de secuenciación (apéndice III) y se colocó a 94° C durante 5 minutos. Inmediatamente después, la muestra se pasó a hielo por 5 minutos para evitar la renaturalización del DNA.

Electroforésis

Una vez polimerizado el gel, se retiró el peine del gel y con agua se levaron los residuos de poliacrilamida que quedaron fuera de los vidrios. El gel se precalentó en el secuenciador durante 1 hora a 3000 volts con el buffer TBE 0.5x (apéndice III). Con una jeringa se retiró los restos de urea depositados en los pozos del gel, finalmente se cargó el gel con 5µl de cada muestra de DNA. La electroforésis se realizó a 3000 volts durante 2 horas.

Obtención de imágenes

El gel fue transferido a papel Whatman 3 MM y se cubrió con plástico autoadherente; se colocó en el secador al vacío durante 90 minutos a 85° C. Posteriormente, el gel seco fue expuesto a una pantalla radiosensible (BioRad) durante 4 horas dentro de un cassette para revelar. La pantalla fue colocada en el equipo Personal Molecular Imagen FX de BioRad para ser escaneada y así poder visualizar los AFLP's a través del programa Quantity One de BioRad.

Tabla 4. Combinación de pares de primers para la obtención de AFLP's

Combinación de primers	EcoRI	MseI
1	5'AGACTGCGTACCAATTC A3'	5'GATGAGTCCTGAGTAAA3'
2	AGACTGCGTACCAATTCT	GATGAGTCCTGAGTAAG
3	AGACTGCGTACCAATTCTG	GATGAGTCCTGAGTAAC
4	AGACTGCGTACCAATTCC	GATGAGTCCTGAGTAAAA
5	AGACTGCGTACCAATTCTA	GATGAGTCCTGAGTAATA
6	AGACTGCGTACCAATTCTT	GATGAGTCCTGAGTAATT
7	AGACTGCGTACCAATTCTG	GATGAGTCCTGAGTAATG
8	AGACTGCGTACCAATTCTC	GATGAGTCCTGAGTAATC
9	AGACTGCGTACCAATTCGA	GATGAGTCCTGAGTAAGA
10	AGACTGCGTACCAATTCTGT	GATGAGTCCTGAGTAAGT

IV.4.3 Análisis de datos moleculares

Con los marcadores de DNA, se construyó una matriz básica de datos binarios considerando a todos los individuos (apéndice II).

Únicamente se tomaron en cuenta a aquellas bandas que estuvieron claramente definidas en todos los individuos o donde se observaron claramente una ausencia de éstas. Por lo que para el análisis estadístico solamente se tomaron en cuenta 4 combinaciones de pares de primers (tabla 4).

Para el análisis fenético se utilizó el coeficiente de similitud de Jaccard. El fenograma (Fig. 17) se construyó con el método de agrupamiento de UPGMA por presentar el valor más alto del coeficiente de correlación cofenético (tabla 9).

El análisis de coordenadas principales (PCOORD) se realizó a partir de la misma matriz de similitud que en el análisis de conglomerados con datos moleculares. El PCOORD se hizo por columnas para obtener la representación gráfica de los OTUs en un espacio multidimensional de caracteres y por hileras para determinar los caracteres que más contribuyen con los agrupamientos.

IV.5 Híbridos artificiales

IV.5.1 Polinizaciones manuales

Para la obtención de híbridos artificiales se realizaron 124 polinizaciones en el campo. 22 de ellas tomaron a *E. chiotilla* como madre y a *P. chichipe* como donador de polen; otras 17 para la cruce recíproca. El resto de las polinizaciones se realizaron con los individuos 1, 2 y 3 del posible híbrido en cruces recíprocas con cada uno de los progenitores y entre los híbridos. El individuo 4 solamente se utilizó como donador de polen debido a que solamente presentaba una flor en postantesis. Estas cruces se visualizan mejor en la tabla 5.

Las polinizaciones se llevaron a cabo de la siguiente manera: se colectó polen de ambos progenitores por separado en microtubos de 1.5 ml, se seleccionaron flores en preantesis de cada uno de los progenitores y del posible híbrido y a cada una se le extrajeron con mucho cuidado los estambres. Se realizó una prueba de receptividad del estigma con peróxido de hidrógeno al 3% ya que la actividad peroxidasa en el estigma es una forma para probar su receptividad mediante la eferescencia. El polen previamente colectado fue depositado en el estigma de la flor receptora y finalmente, ésta fue cubierta con una malla para evitar contaminación con polen indeseado acarreado por polinizadores. Dos meses después de las polinizaciones se colectaron los frutos maduros.

Tabla 5. Polinizaciones manuales realizadas en el campo. Los números indican el número de flores. En la primer columna se enlistan los taxa que fueron utilizados como madre; la primer fila corresponde a los taxa que sirvieron como donadores de polen.

	<i>P. chichipe</i>	<i>E. chiotilla</i>	Híbrido 1	Híbrido 2	Híbrido 3	Híbrido 4
<i>P. chichipe</i>	5	17	5	6	6	1
<i>E. chiotilla</i>	22	5	11	8	11	1
Híbrido 1	4	2	2	1	1	1
Híbrido 2	2	0	1	2	2	0
Híbrido 3	2	2	2	1	2	0

IV.6 Fertilidad del híbrido

IV.6.1 Pruebas de germinación de semillas

Se pusieron a germinar 30 semillas de cada progenitor y del posible híbrido en cajas petri de plástico, utilizando agar al 2% como soporte. La germinación se llevó a cabo a una temperatura de 25°C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

Se consideró como semilla germinada a aquella que presentara emergencia de la radícula. Las plántulas fueron transplantadas cuando contaban con aproximadamente medio centímetro de altura a un sustrato con dos partes de tezontle por una de "peat moss" (*Sphagnum*) y una y media de tierra negra. Las plántulas crecieron en condiciones de invernadero.

IV.6.2 Pruebas de viabilidad de polen

Se tomaron botones florales en preantesis y se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento en el laboratorio. Después de dos días, se pusieron a desecar las anteras en cámaras con sílica gel para permitir su dehiscencia. El polen se colocó en portaobjetos y se les agregó unas gotas del reactivo de Alexander (1980) y se observaron inmediatamente bajo microscopio fotónico. Las observaciones se realizaron en 3 campos de 40 x (para cada taxón) y se calculó el número de granos de polen viable. Los granos de polen cuyo citoplasma es color magenta se consideraron viables, mientras que aquellos granos de polen cuyo citoplasma no se tiñó se consideraron no viables.

IV.7 Híbridos virtuales

Para contrarrestar los efectos de pocos individuos del posible híbrido en el campo, se llevó a cabo un análisis que consiste en la generación de individuos virtuales a partir del patrón polimórfico generado por los AFLP's. Para crear estos individuos, se llevó a cabo el siguiente procedimiento, según lo describe Congiu *et al.* (2001): asumiendo que existe equilibrio Hardy-Weinberg, para cada locus (banda) se estima la frecuencia alélica en cada uno de los dos progenitores; basándose en esas frecuencias, los alelos de cada progenitor fueron sorteados y combinados para crear el genotipo híbrido. Este procedimiento se repitió para cada locus y así producir perfiles multilocus individuales.

Los resultados de este procedimiento se visualizan como probabilidades de asignación, es decir, a cada individuo híbrido natural se le estima la probabilidad que tiene de encajar dentro de los individuos virtuales generados.

A partir del patrón de bandeos de los posibles progenitores, se generaron 100 individuos híbridos virtuales y 100 individuos virtuales de cada uno de los posibles progenitores.

V. RESULTADOS

V.1 Caracterización morfológica

Los individuos de posible origen híbrido identificados a 10 kilómetros del municipio de Huajuapam de León, Oaxaca, poseen características morfológicas intermedias entre sus posibles progenitores putativos; *Escontria chiotilla* y *Polaskia chichipe*, dos géneros de cactáceas que habitan simpátricamente en la región. Estos individuos presentan pequeñas escamas parecidas a las de *E. chiotilla* aunque no son triangulares, y las espinas como las de *P. chichipe* en la flor y en el fruto; la flor posee tépalos parecidos a los de *P. chichipe*; el tallo puede ser fácilmente confundido en color, número de ramas y de costillas con cualquiera de los dos géneros involucrados (Fig. 7).

Debido a los caracteres morfológicos intermedios, se planteó la hipótesis de que estos nuevos individuos podrían ser híbridos naturales producto de la cruce entre estos dos géneros.

En esta parte de la Mixteca Baja de Oaxaca, únicamente se encontraron cuatro individuos del posible híbrido. La identificación de estos individuos se logró gracias a que se encontraban en etapa reproductiva, ya que es la única etapa en la que se puede reconocer al posible híbrido y diferenciarlo de los supuestos progenitores.

V.1.1 Análisis de componentes principales

Se tomó como muestra a 30 individuos de cada posible progenitor y a todos los individuos del posible híbrido, haciendo un total de 64 individuos.

Los eigenvectores resultantes del análisis de PCA mostraron que los caracteres responsables de la separación en tres grupos definidos en el primer componente principal son los tépalos revolutos (forma de las unidades del perianto), la distancia entre costillas, la profundidad de la costilla, la longitud de la espina central, el diámetro de la espina central, el número de costillas, el número de espinas radiales y la presencia/ausencia de espinas y escamas en el fruto (tabla 6). Estos caracteres separaron a los individuos de *E. chiotilla* en un grupo, en otro a los de *P. chichipe* y en otro a los del posible híbrido (Fig. 8).

Dentro de los caracteres más importantes que dividieron a los individuos en el segundo componente principal están el diámetro y longitud del fruto (tabla 6). Proyectando estos resultados en un plano de dos dimensiones, se observó que las unidades de estudio se dividieron en 3 grupos discretos: hacia la izquierda todos los individuos de *Escontria chiotilla*; a la derecha todos los individuos de *Polaskia chichipe* y en medio, formando un solo grupo, se ubicaron los cuatro individuos postulados como posible híbrido. Esta localización intermedia de los posibles híbridos apoya la hipótesis original de hibridación intergenérica (Fig. 8).

Tabla 6. Variación explicada para los dos primeros componentes principales y caracteres de mayor peso para cada componente principal.

Componente principal	Caracteres con mayor peso	Variación explicada	Variación acumulada
PC1	Forma de las unidades del perianto	57.05 %	57.05%
	Distancia entre costillas		
	Profundidad de la costilla		
	Longitud de la espina central		
	Diámetro de la espina central		
	Número de costillas		
PC2	Número de espinas radiales	12.02 %	69.08 %
	Presencia/ausencia de espinas y escamas en el fruto		
	Diámetro del fruto		
	Longitud del fruto		

V.1.2 Análisis de conglomerados

Este análisis tuvo como propósito el establecer las relaciones de parecido global en forma jerárquica entre los OTUs. A partir de los caracteres morfológicos de la tabla 3, se construyó una matriz de correlación; se utilizó el índice de correlación (Pearson product moment correlation coefficient). El método de agrupamiento empleado fue el de UPGMA debido a que fue el que presentó el coeficiente de correlación más alto (tabla 7), lo que indica que el fenograma (Fig. 9) representa mejor a la matriz de correlación.

Tabla 7. Valores del coeficiente de correlación empleando diferentes métodos de agrupamiento para caracteres morfológicos

	Método de agrupamiento		
	UPGMA	Simple	Completo
Coefficiente de correlación (r)	0.93237	0.92385	0.90315

Los resultados que arrojó este análisis se reflejan en el fenograma de la figura 9. La primera división generó dos conglomerados principales; en el primero se agrupó a todos los individuos de *E. chiotilla* y en el segundo a todos los individuos de *P. chichiye* junto con los posible híbrido. El primer conglomerado se subdividió quedando en un grupo los individuos E3, E17 y E19 y en el otro los individuos restantes. En este último grupo, se realizaron varias

individuos de *E. chiotilla* y en el segundo a todos los individuos de *P. chichipe* junto con los del posible híbrido. El primer conglomerado se subdividió quedando en un grupo los individuos E3, E17 y E19 y en el otro los individuos restantes. En este último grupo, se realizaron varias subdivisiones sucesivas. El segundo conglomerado principal, también se subdividió; en un conglomerado se agruparon todos los individuos de *P. chichipe* y en el otro los cuatro posibles híbridos. El conglomerado de *P. chichipe* se subdividió formando dos grupos; en uno el individuo P13 y en el otro los individuos restantes. El conglomerado de los híbridos también se subdividió, el individuo H1 quedó solo y los otros tres quedaron en un conglomerado aparte, el cual se volvió a dividir, agrupando a los individuos H2 y H3, dejando fuera al individuo H4.



Figura 7. Características principales del tallo, flor y fruto de *E. chiotilla*, posible híbrido y *P. chichipe*. El fruto de *E. chiotilla* presenta escamas; el de *P. chichipe* espinas y el del posible híbrido presenta tanto escamas como espinas. Los tépalos son los que diferencian más a los tres taxa, únicamente son revolutos en *P. chichipe*. El color del tallo es muy similar en los tres taxa; el número de costillas varía.

Uno de los aspectos importantes a conocer es la fertilidad del posible híbrido ya que en el campo se encontraron algunos frutos de este taxón de carácter abortivo. Para esto, se estudió el polen y la presencia de embrión en la semilla del posible híbrido y de cada uno de los posibles progenitores.

Se realizó la prueba de viabilidad de Alexander, cuyos resultados indicaron altos porcentajes de viabilidad: *E. chiotilla* 96%, *P. chichipe* 94% y el híbrido 88%. Se hicieron cortes y observaciones al microscopio estereoscópico de las semillas para verificar la presencia de embrión en el posible híbrido. Los resultados de estas observaciones fueron los siguientes: en las semillas de los frutos bien formados se podían encontrar generalmente, embriones bien desarrollados, pero en algunas semillas también se encontraron embriones abortivos, y en algunos casos se observaron malformaciones en la cubierta de la semilla (Fig. 10).

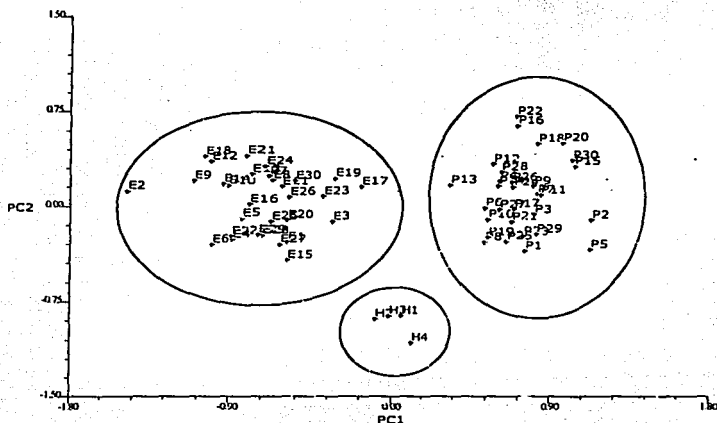


Figura 8. Proyección de los individuos de *E. chiotilla* (E), *P. chichipe* (P) y del posible híbrido (H) en el espacio de los dos primeros componentes principales (PC) resultantes del análisis de la matriz de datos morfológicos.

V.2 Fertilidad del posible híbrido

La viabilidad de las semillas se evaluó a través de pruebas de germinación. *E. chiotilla* presentó un porcentaje de 76.47% (13/17); *P. chichipe* obtuvo un porcentaje de 53.33% (16/30) y el híbrido de 40% (12/30). Un dato importante es que las semillas del posible híbrido tardaron más tiempo en germinar que las de los otros dos taxa. Tanto las semillas de *E. chiotilla* como las de *P. chichipe* germinaron entre el 5º y el 7º día; en cambio, las del híbrido se tardaron en germinar de 6

a 15 días, siendo por lo tanto la germinación más sincrónica y rápida en los progenitores que en el híbrido.

Para completar el estudio de fertilidad y conocer la micromorfología de los individuos del posible híbrido y hacer comparaciones con sus progenitores putativos, se realizaron observaciones al microscopio electrónico de barrido de la semilla y del polen.

Al analizar la micromorfología de los granos de polen de los taxa involucrados se encontró que no hay diferencias significativas ya que los 3 taxa presentan granos de polen tricolpados y la exina con ornamentación espinulada. El tamaño del grano es similar en los 3 (Fig. 12). Sin embargo, el híbrido presenta granos de polen abortivos (Fig. 11).

Escontria chiotilla, *P. chichiye* y el posible híbrido presentan semillas rugosas (Fig. 13). En el híbrido se detectaron anomalías ya que algunas de las semillas son de menor tamaño y carecen de embrión así como de tejidos nutritivos.

En la familia Cactaceae la gran mayoría de los estudios sistemáticos se han basado en aspectos morfológicos. El mayor problema con los caracteres morfológicos es su plasticidad debido en gran parte a su respuesta al cambio en los factores ambientales y a eventos de evolución paralela. En cambio, los caracteres moleculares presentan menos problemas pues son de origen genético y por lo tanto son hereditarios (Rieseberg y Ellstrand, 1993). Asi mismo, cabe mencionar que los datos moleculares no están separados de la información morfológica, de hecho, Hillis (1987, citado en Cota y Wallace, 1996) ha indicado que los caracteres morfológicos y moleculares se encuentran relacionados, y en conjunto los datos provenientes de diferentes fuentes tienen el potencial de producir un mejor análisis (Cota y Wallace, 1996)

Es por esto, que uno de los objetivos de esta investigación fue generar marcadores de DNA del posible híbrido y sus progenitores propuestos para establecer las relaciones genéticas entre los taxa y complementar el análisis morfológico para dar más evidencias de las relaciones taxonómicas que guardan entre sí los grupos bajo estudio. Los marcadores moleculares de DNA se obtuvieron por medio de la técnica de AFLP; ésta es una técnica que combina PCR y análisis de fragmentos de restricción para detectar polimorfismos debidos a cambios en/ o cerca de sitios de corte de enzimas de restricción.

Estos fragmentos se observan como bandas en autorradiografías de geles de poliacrilamida, las cuales finalmente se traducen, cada una en un carácter. Por medio de esta técnica se puede generar un alto número de caracteres pues es posible detectar un número elevado de loci polimórficos en el genoma. Las ventajas que ofrece este método son confiabilidad y reproducibilidad, debido a las condiciones de alta astringencia bajo las cuales se llevan a cabo las reacciones de PCR y la habilidad de detectar rápidamente muchos loci polimórficos (Vos *et al.*,

1995; Liscum, 1999); además no es necesaria ninguna información de secuenciación de DNA previa para la realización de la técnica.

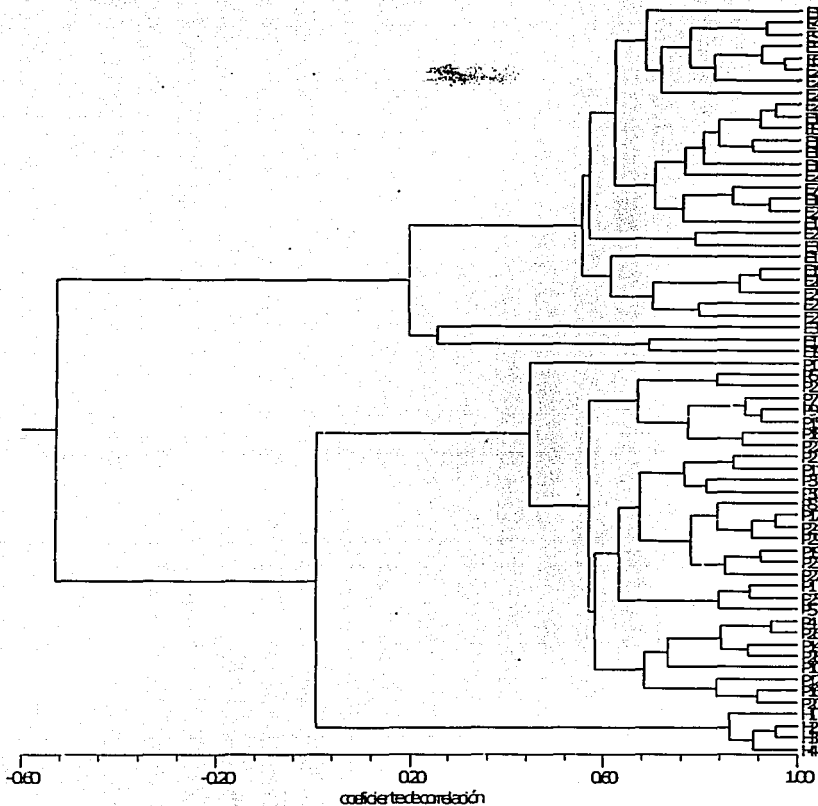


Figura 9. Fenograma que muestra el agrupamiento de los individuos de *E. chiotilla* (E), *P. chichipe* (P) y del posible híbrido (H) resultante del análisis de conglomerados mediante el método de agrupamiento UPGMA a partir de una matriz de correlación ($r = 0.93237$).

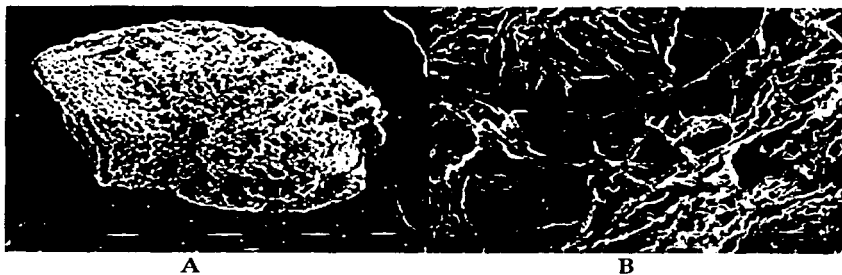


Figura 10. Cubierta seminal del posible híbrido. A. Formación anómala B) Prolongaciones cuticulares irregulares (flecha)



Figura 11. Granos de polen del híbrido. A. grano de polen normal y tres abortivos. B. Acercamiento de granos de polen abortivo.

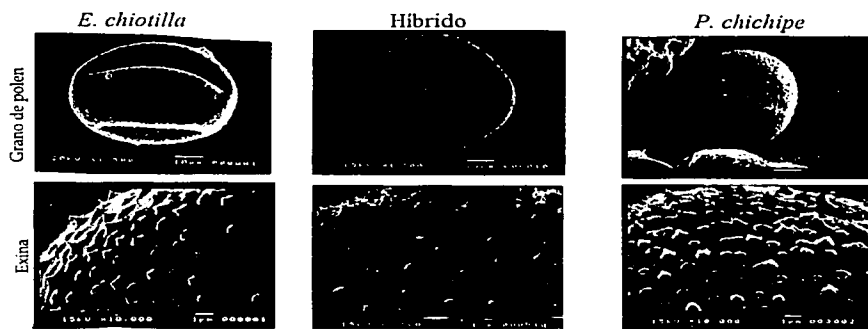


Figura 12. Micromorfología del polen

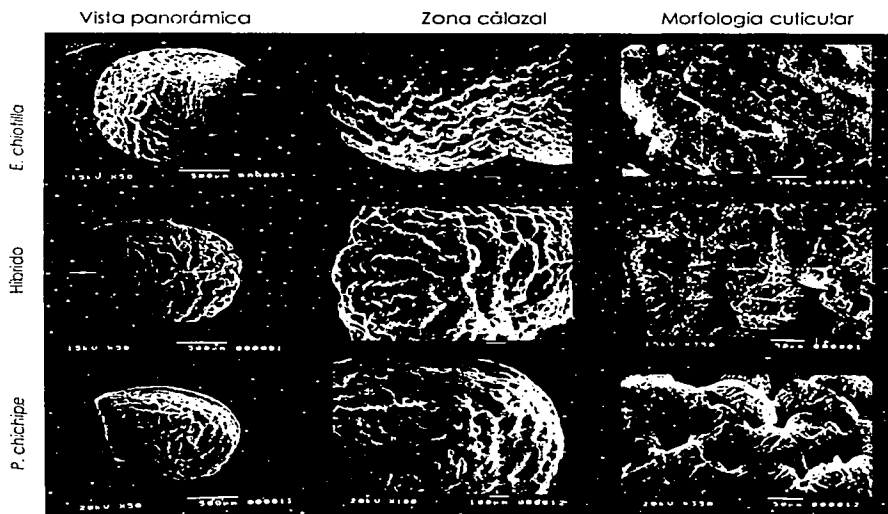


Figura 13. Micromorfología de semilla

V.2 Caracterización molecular

Al igual que en el análisis de caracteres morfológicos, los caracteres moleculares, fueron empleados para realizar dos análisis estadísticos, primero un análisis de coordenadas principales (PCOORD) y después un análisis de conglomerados.

Debido a que el número de individuos detectados en el campo es bajo, y a la necesidad de tener un análisis más representativo, se germinaron semillas obtenidas de los frutos de tres de los cuatro individuos híbridos identificados en el campo, a pesar de considerar que estos pueden ser una generación avanzada que incluso se haya retrocruzado con alguno o ambos progenitores. No obstante, esto permitiría establecer sus relaciones de parentesco con los cuatro híbridos identificados de los cuales también se desconoce su pedigríe.

Las plántulas utilizadas para la purificación de DNA presentaron una altura promedio de 1 a 1.3 cm de alto y un peso de 0.130 a 0.500 g en mes y medio.

El DNA se purificó de las muestra de tejido colectadas en el campo por el método modificado de Doyle y Doyle (1987, 1990, citado en Csaiki *et al.*, 1998). Las modificaciones que se hicieron a este protocolo se debió a que en general las cactáceas presentan un alto porcentaje de carbohidratos, dentro de los cuales se encuentran las pectinas. Estos carbohidratos copurifican con el DNA provocando que los rendimientos finales de éste sean muy bajos sin lograr eliminar del todo a las pectinas. Para resolver esto, se adicionó al protocolo un paso final de purificación, el cual consistió en separar electroforéticamente la mezcla de DNA y pectinas en un gel de agarosa al 1%.

Este paso de purificación se agregó debido a que las pectinas (polímeros de ácido glucourónico) tienen una longitud aproximada y comparable en pares de bases (pb) de alrededor de 10,000 pb (Bernal-Lugo, comunicación personal); mientras que el DNA genómico que es de alto peso molecular está por arriba de 100,000 pb.

En la figura 14 se puede observar como se separó el DNA genómico del RNA, el cual tiene una longitud que va desde 500 a 15,000 pb. Además, esta purificación adicional permitió recuperar una fracción enriquecida en DNA genómico, ya que la banda de DNA de alto peso molecular fue la única que se recuperó del gel, evitando así contaminación de RNA y pectinas.

Una vez obtenido el DNA de todos los individuos a analizar, se procedió a generar los marcadores moleculares. El análisis se hizo por duplicado corriendo dos reacciones por cada par de *primers*, llegando a los mismos resultados, corroborando así que los marcadores moleculares obtenidos por AFLP son altamente reproducibles. Se probaron 10 pares de primers, de los cuales se eligieron los que produjeron un mayor número de bandas claras y bien definidas. En este caso

es razonable utilizar pocas combinaciones de primers dado que *E. chiotilla* y *P. chichiye* son dos taxa que no se encuentran tan relacionados genéticamente como podría ser el caso entre especies de cada uno de estos géneros, por lo que se esperaba detectar fácilmente los polimorfismos asociados a cada genoma.

Los resultados obtenidos de las 4 diferentes combinaciones de primers finalmente seleccionados, se muestran en la tabla 8. Se observaron en total 157 marcadores de DNA (bandas) por columnas; sin embargo, se consideraron únicamente 65 ya que en algunos individuos no se podía realizar la lectura con claridad y confiabilidad. De las 65 bandas, 44 son polimórficas, representando el 67.69% del número total de bandas (tabla 8). Con estas 65 bandas se generó la matriz básica de datos (apéndice II) para el análisis estadístico, asignándose un valor de 0/1 de acuerdo a la ausencia/presencia de bandas, respectivamente. En esta matriz se hacen evidentes los caracteres monomórficos (caracteres exclusivos de un taxa) de cada posible progenitor y del posible híbrido y los caracteres que comparten todos los taxa (Fig. 15).

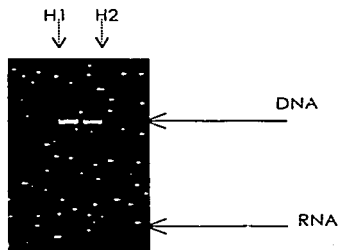


Figura 14. Separación electroforética de DNA de alto peso molecular en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

V.2.1 Análisis de coordenadas principales (PCOORD)

Los resultados del análisis de PCOORD discriminaron 3 grupos bien definidos, uno formado por los individuos de *E. chiotilla*, otro por los individuos de *P. chichiye* y el último por los individuos del híbrido (Fig. 16).

Los individuos del posible híbrido (híbrido natural y progenie de éstos) se ubicaron en la parte superior izquierda del gráfico, formando un grupo muy compacto. Los individuos de *P. chichiye* se localizaron en valores negativos hacia la parte inferior izquierda y el grupo de *E. chiotilla* se proyectó en la parte media, hacia la derecha.

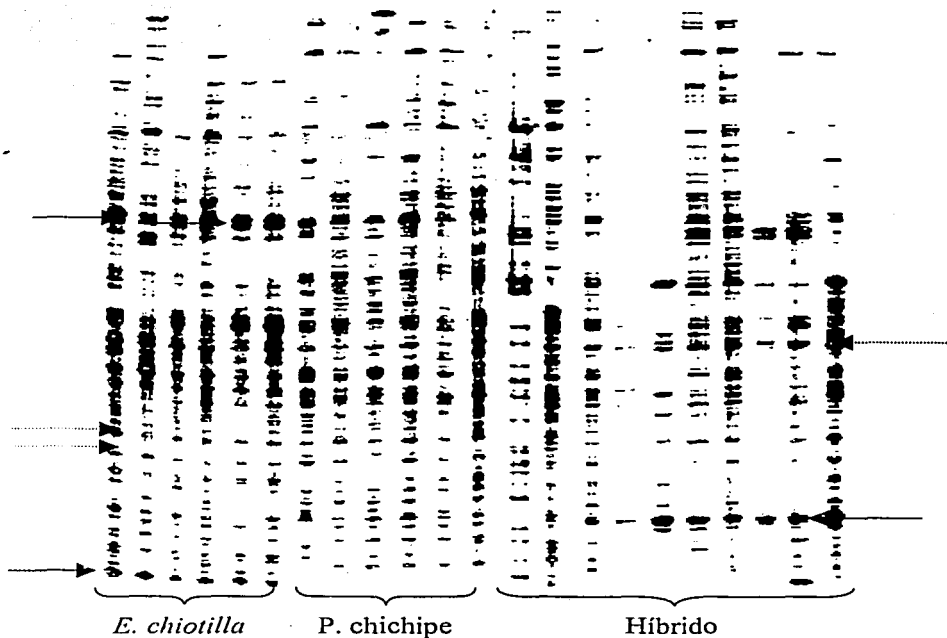


Figura 15. Marcadores moleculares generados por AFLP a partir de DNA de *E. chiotilla*, *P. chichipe* y del posible híbrido. Se hacen evidentes los marcadores propios de cada taxón y los marcadores moleculares que comparten los taxa involucrados. Las flechas continuas indican bandas monomórficas y las espaciadas bandas polimórficas.

V.2.2 Análisis de conglomerados

Para el análisis de conglomerados también se utilizaron varios métodos de agrupamiento, el ligamiento simple, el ligamiento completo y el de UPGMA; se seleccionó este último pues como lo muestra la tabla 9, es el método que presentó el índice más alto de correlación cofenética. Los resultados de este análisis, que se muestran en el fenograma de la figura 17, fueron los siguientes: se distinguieron dos conglomerados principales; en el primero se ubicaron los individuos de *E. chiotilla* y en el segundo los individuos de *P. chichipe* junto con los

del posible híbrido (individuos naturales y su progenie). La distinción entre los individuos de *P. chichipe* y del posible híbrido se hizo evidente en la siguiente división, en la que por un lado quedaron todos los individuos del posible híbrido y por otro los de *P. chichipe*.

En el conglomerado del posible híbrido, los individuos H1, H3, H10 y H11 (marcados con *) son naturales; los individuos H2, H4, H5 y H12 son individuos obtenidos del híbrido H3; los individuos H7, H8 y H9 son la progenie del individuo H1. Se observa un agrupamiento de los individuos híbridos H3, H1, H2, H4 y H5 por un lado y por otro los individuos H7, H12, H10, H11, H8 y H9.

Tabla 8. Niveles de polimorfismo de los marcadores moleculares generados por AFLP.

Combinación de primers	Total de bandas	Bandas Polimórficas	Porcentaje de polimorfismo (%)	Bandas monomórficas		
				<i>E. chiotilla</i>	<i>P. chichipe</i>	Híbrido
1	25	17	68	4	3	1
2	6	5	83.3	1	0	0
3	20	13	65	3	2	2
4	14	9	64.28	1	2	2
total	65	44	67.69	9	7	5
promedio	16.25	11	70.14			

Tabla 9. Valores del coeficiente de correlación utilizando diferentes métodos de agrupamiento para marcadores moleculares. En negritas se resalta el valor más alto.

	UPGMA	Simple	Completo
Coeficiente de correlación (r)	0.94720	0.93250	0.92877

V.3 Híbridos artificiales

Dado que es estrictamente necesario conocer si en realidad los genomas de *E. chiotilla* y de *P. chichipe* pueden combinarse y generar individuos híbridos y que además los individuos híbridos encontrados en el campo son producto de la combinación de estos genomas, se decidió crear híbridos artificiales. Esta decisión está fundamentada en las observaciones de campo de

los visitantes florales de los taxa bajo estudio; en dichas observaciones se encontró que los abejorros y las abejas son los candidatos más fuertes para ser los polinizadores por lo siguiente: tanto las abejas como los abejorros volaban de una flor a otra cargando cantidades cuantiosas de polen en sus apéndices, además, un mismo insecto se posaba en flores de *E. chiotilla*, de *P. chichipe* e incluso, en flores del posible híbrido, lo que permite el flujo de genes entre los taxa y apoyó la hipótesis propuesta de hibridación. También se observaron algunos colibríes visitando flores de *P. chichipe* y del híbrido así como hormigas y otros insectos no voladores quienes pueden estar funcionando como ladrones de néctar (Bartola, 2000). No se colectaron ni se identificaron ninguno de los organismos antes mencionados. Para generar los híbridos artificiales se realizaron polinizaciones manuales en el campo. En total se hicieron 24 polinizaciones, 10 tomaron a *E. chiotilla* como receptor de polen y a *P. chichipe* como donador, otras 10 utilizaron a *P. chichipe* como receptor y a *E. chiotilla* como donador y las últimas 4 fueron retrocruzadas, tomando al híbrido como receptor de polen de *E. chiotilla* y de *P. chichipe*. Los resultados de estas cruza (tabla 10) muestran que las polinizaciones entre ambos progenitores así como las retrocruzadas pueden llegar a formar frutos aunque en poca proporción (Fig. 18). Los frutos obtenidos presentaron un buen número de semillas, las cuales, comparadas con las de los progenitores son de menor tamaño.

V.4 Híbridos virtuales

El análisis de conglomerados de los datos moleculares al igual que el de los morfológicos, muestran que los individuos del posible híbrido son genética y morfológicamente distintos a los otros dos taxa, y además se observa en ambos análisis, un mayor parecido con *P. chichipe*; sin embargo, para corroborar esto y contrarrestar el bajo número de individuos identificados se realizó un último análisis, el cual consistió en generar 100 individuos híbridos virtuales y 100 individuos virtuales de cada uno de los posibles progenitores por medio de una nueva metodología (Congiu *et al.*, 2001) que se basa en el patrón de bandeo (frecuencia alélica) de cada taxa, cuando el número de individuos naturales es escaso. Los resultados obtenidos de este análisis fueron similares a los obtenidos en el fenograma anterior dado que los individuos del posible híbrido también se agruparon junto con los individuos de *P. chichipe* (Tabla 11).

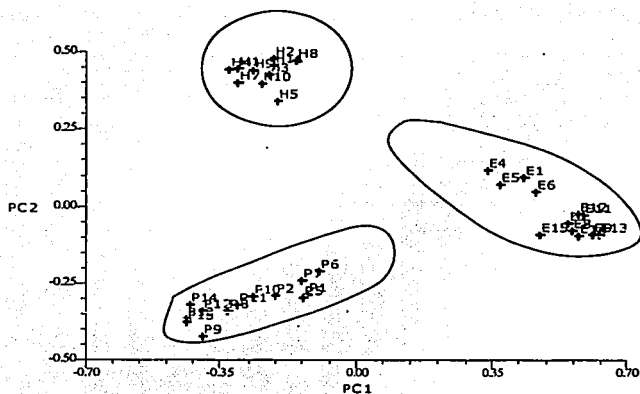


Figura 16. Proyección de los individuos de *E. chiotilla* (E), *P. chichipe* (P) y del posible híbrido (H) en el espacio de los dos primeros componentes principales (PC) resultantes del análisis de la matriz de datos moleculares.

Tabla 10. Resultados de las polinizaciones manuales en el campo

	Número de polinizaciones realizadas	Número de frutos formados
<i>E. chiotilla</i> × <i>E. chiotilla</i>	5	0
<i>P. chichipe</i> × <i>P. chichipe</i>	5	0
<i>E. chiotilla</i> × <i>P. chichipe</i>	22	1
<i>P. chichipe</i> × <i>E. chiotilla</i>	17	4
<i>E. chiotilla</i> × Híbrido	31	0
<i>P. chichipe</i> × Híbrido	18	2
Híbrido × <i>P. chichipe</i>	6	1
Híbrido × <i>E. chiotilla</i>	6	1
Híbrido × Híbrido	14	1

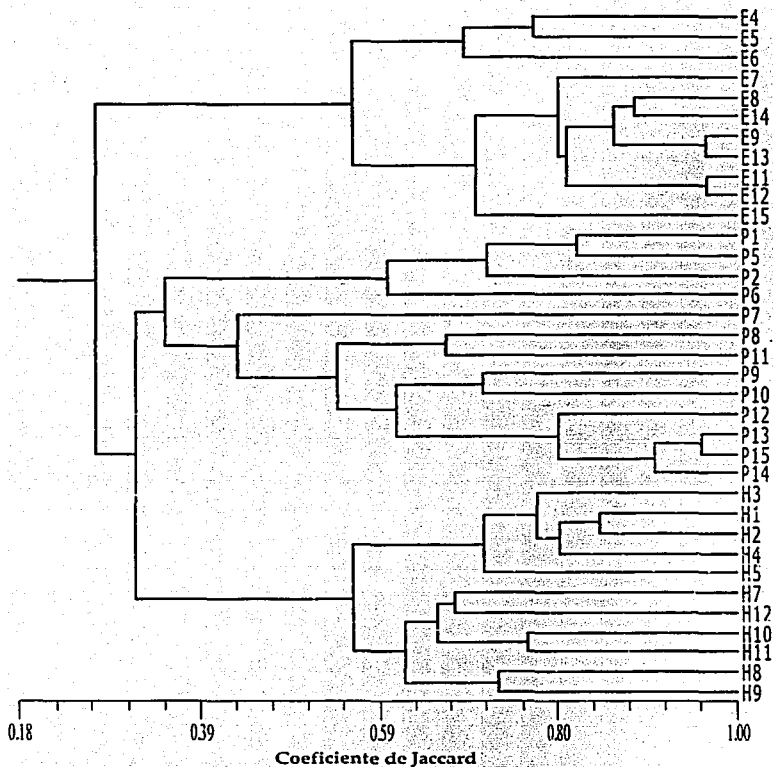


Figura 17. Fenograma que muestra el agrupamiento de los individuos de *E. chiotilla* (E), *P. chichipe* (P) y del posible híbrido (H) resultante del análisis de conglomerados mediante el método de agrupamiento UPGMA a partir de una matriz de similitud. Los individuos híbridos H1, H3, H10 y H11, son los identificados en el campo, los demás corresponden a su progenie. * = híbridos naturales. $r = 0.94720$.

Tabla 11. Probabilidad de asignación de cada posible híbrido a las 3 clases putativas (posibles progenitores e híbridos artificiales) basada en la correlación de las frecuencias alélicas. En negritas se resalta la probabilidad de asignación más alta. Los individuos híbridos empleados para este análisis son los identificados en el campo. n = número total de individuos generados para el análisis.

Híbrido	Probabilidad de asignación		
	<i>E. chiotilla virtual</i>	<i>P. chichipe virtual</i>	Híbrido virtual
	<i>n = 100</i>	<i>n = 100</i>	<i>n = 100</i>
1	1.12×10^{-78}	3.97×10^{-67}	2.41×10^{-73}
3	2.11×10^{-45}	2.06×10^{-58}	3.82×10^{-64}
10	3.24×10^{-49}	3.2×10^{-44}	1.68×10^{-58}
11	3.37×10^{-51}	1.18×10^{-40}	1.89×10^{-55}



Figura 18. Fruto formado a partir de polinización manual realizada en el campo. *P. chichipe* fungió como donador de polen y *E. chiotilla* como receptor.

Se desconoce si los híbridos naturales corresponden a una F1 o a una generación posterior, o incluso si son el producto de una retrocruza con uno o con los dos progenitores. Sin embargo, en este análisis también se hace evidente la posibilidad de que los híbridos encontrados en el campo sean generaciones híbridas avanzadas. Sin embargo, destaca la mayor semejanza tanto morfológica como molecular entre los híbridos y *P. chichiye*.

VI. DISCUSIÓN

En el reino vegetal, la hibridación es un fenómeno muy importante dentro de la evolución de las plantas y es un factor determinante para generar variabilidad genética y nuevas especies. Un híbrido es el resultado de la mezcla de dos genomas relacionados pudiéndose presentar entre especies o entre géneros como en la familia Cactaceae.

El análisis morfológico presentado en este trabajo permite identificar 3 grupos independientes, uno formado por *E. chiotilla*, otro por *P. chichipe* y el último por el posible híbrido. Esta parte del trabajo apoya fuertemente la hipótesis original de hibridación intergenérica, pues como se observa en la figura 8, la ubicación de los individuos del posible híbrido es intermedia entre ambos progenitores, lo que indica que comparten características morfológicas. Sin embargo, la formación de grupos específicos de cada taxón muestra que cada uno tiene características propias que los delimita como grupos. Además de lo anterior, el bajo número de individuos identificados en el campo y los frutos de carácter abortivo colectados, sustentan también que se trata de individuos híbridos.

Gibson y Horak (1978) propusieron una clasificación basada en anatomía comparada y en la revaloración de caracteres tradicionales de la tribu Pachycereeae con una perspectiva filogenética. En esta clasificación, el grupo que se definió más claramente fue la subtribu Stenocereinae, la cual de acuerdo a su propuesta incluye a *Escontria*, *Polaskia*, *Myrtillocactus* y *Stenocereus*. Ellos proponen a *Polaskia* como el género con estados de carácter más ancestrales y a *Escontria* y *Myrtillocactus* como los más derivados.

El análisis de conglomerados de los caracteres morfológicos reveló que el posible híbrido se encuentra más relacionado con *P. chichipe* que con *E. chiotilla* dado que se encuentran dentro del mismo conglomerado principal (Fig.9)

Los estudios sobre hibridación en la familia Cactaceae se han llevado a cabo, en su gran mayoría a nivel morfológico, como los realizados por Glass (1963), Moran (1963), Grant y Grant (1979, 1980), Vite *et al.*, (1996) y Méndez (2000); sin embargo, estos estudios pueden verse enriquecidos y complementados con análisis a nivel molecular puesto que los caracteres morfológicos poseen una limitante que los moleculares no tienen y es que los morfológicos son el resultado de la interacción genotipo-ambiente, lo que puede dar lugar a una plasticidad de los caracteres; además, los caracteres morfológicos pueden ser producto de convergencia.

Para complementar el estudio morfológico hecho en este trabajo, se tuvo que hacer una evaluación de las relaciones genéticas entre los individuos del posible híbrido y sus supuestos progenitores. En las cactáceas, los trabajos realizados con marcadores moleculares son pocos, un ejemplo es *Opuntia prolifera* en donde se utilizaron RAPD's para elucidar su origen híbrido. De

hecho, hasta este momento, no se han reportado trabajos realizados con marcadores moleculares generados por AFLP para la familia.

En la actualidad, las metodologías más utilizadas para generar marcadores moleculares de DNA son: RFLP's (Restriction Fragment Length Polymorfism), microsatélites y métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como los RAPD's (Random Amplification of Polymorphic DNA) y los AFLP's (Amplified Fragment Length Polymorfism) (Liu *et al.*, 1998).

De estos métodos el que se ha empleado con mayor frecuencia en estudios sobre hibridación en diferentes grupos de plantas y el que mejor resultados ha proporcionado ha sido el de AFLPs (Hughes y Harris, 1994; Caputo, *et al.*, 1997; Urbanska, *et al.*, 1997; Samuel, 1999; Aggarwal, *et al.*, 1999; Milne, *et al.*, 1999; Mayer, *et al.*, 2000; van Raamsdonk, *et al.*, 2000; Bottini *et al.* 2002). Esta técnica basada en PCR, a diferencia de las otras, requiere de pequeñas cantidades de DNA, no requiere de ninguna información genética previa, son altamente reproducibles y lo que es más importante es la obtención de resultados reproducibles debido a que uno de los pasos de PCR (alineamiento) se hace a temperaturas muy restrictivas (56° C) comparado con una baja temperatura de alineamiento en RAPDs (40° C), lo cual promueve que existan amplificaciones de DNA inespecíficas. Sin embargo, la técnica de AFLPs a diferencia de la de RAPDs permite observar varios loci polimorficos en un solo análisis, lo que se traduce en una aproximación más real de las relaciones genéticas entre los individuos en estudio. Por lo anterior, en este trabajo se utilizaron caracteres moleculares generados por la técnica de AFLP.

Al igual que los caracteres morfológicos, los moleculares discriminan 3 grupos bien definidos (Fig. 16). En esta figura se hacen evidentes dos aspectos: 1) los individuos del posible híbrido mantienen relaciones genéticas entre sí muy cercanas sin importar a qué generación filial pertenecen y 2) estos individuos no son producto de un polimorfismo de ninguno de los progenitores puesto que se encuentran agrupados y alejados de los grupos parentales. En *Opuntia prolifera*, los resultados fueron similares (Mayer *et al.*, 2000).

El análisis de conglomerados para los caracteres moleculares sustenta que los individuos del posible híbrido se encuentran más cercanos a *P. chichipe* que a *E. chiotilla*, lo cual es congruente con el análisis de los caracteres morfológicos. Esto quiere decir que el genoma del posible híbrido se encuentra más relacionado con el de *P. chichipe* que con el de *E. chiotilla*. Este resultado también está apoyado por los híbridos virtuales pues como lo muestra la tabla 11, la probabilidad de asignación es más alta en *P. chichipe* que en *E. chiotilla* e incluso que en los híbridos virtuales. Además, los resultados de las polinizaciones sugieren fuertemente que el híbrido tiende a retrocruzarse con mayor frecuencia con *P. chichipe*.

Los resultados de las polinizaciones manuales realizadas en el campo (tabla 10), junto con el escaso desarrollo de barreras reproductivas reportado para esta familia (Anderson, 2001), y los resultados de los análisis morfológico y molecular posibilitan la idea de que los individuos identificados en el campo sean el producto de una retrocruza con *P. chichipe*. Su historia sería la siguiente: el primer híbrido debió haber sido el producto de la cruce entre *E. chiotilla* y *P. chichipe*, puesto que el posible híbrido presenta características morfológicas de ambos géneros (Fig. 7) además, estos dos géneros poseen la capacidad de hibridar, por lo menos de forma artificial (Tabla 10). Posteriormente, este individuo pudo haberse retrocruzado una o varias veces con sus progenitores, creando una serie de combinaciones genéticas con las mismas probabilidades de éxito. Sin embargo, dado que dentro de la evolución de cualquier organismo existe alguna presión de selección que actúa directa o indirectamente sobre los individuos en cuestión, los individuos que se encuentran en el presente podrían ser derivados de una o varias retrocruzas en donde el genoma de *P. chichipe* se haya visto seleccionado o favorecido de alguna manera. Esto explicaría la relación más cercana al genoma de *P. chichipe* que presentan los individuos actuales del posible híbrido.

La propuesta taxonómica anterior, se basa en los resultados de la tabla 10, en la cual se observan varias cosas:

1) la cruce artificial recíproca entre *E. chiotilla* y *P. chichipe* produce progeñe, 2) cuando los progenitores funcionan como madre sólo *P. chichipe* es capaz de formar frutos, 3) los híbridos como madre aceptan polen de ambos progenitores, 4) el híbrido es fértil porque deja descendencia y 5) se excluye cualquier autopolinización.

Esta tabla también apoya el rechazo de la posibilidad de que los individuos del posible híbrido sean una nueva especie o una variación de *P. chichipe* puesto que se hace evidente la ausencia de barreras reproductivas que aislen a estos individuos de sus posibles progenitores.

El bajo número de individuos encontrados en el campo se puede explicar de dos formas, una es que no se hayan podido identificar un número mayor debido a que no se encontraron en etapa reproductiva (única etapa en la que se pueden identificar); de hecho, en la zona donde se trabajó, se observaron muchos individuos juveniles que no pudieron ser catalogados dentro de ningún taxa. En cuanto a la edad de los híbridos, se puede decir que tres de los cuatro identificados parecen individuos ya muy maduros dado que tienen una talla de aproximadamente de 3 a 5 m de altura, con muchas ramificaciones y además, parte de su tronco y ramas se encuentran lignificadas. En cambio, el cuarto individuo identificado, apenas cuenta con dos ramas, mide un metro de altura aproximadamente y en su etapa reproductiva únicamente presentó 3 flores al momento de ser visitado en el campo. Lo anterior brinda una posibilidad de

que en efecto, existan más individuos híbridos juveniles que en el presente no puedan ser identificados a nivel morfológico.

La otra posible explicación del bajo número de individuos es que estos híbridos sean producto de una hibridación poco frecuente entre *E. chiotilla* y *P. chichipe* que unido al escaso éxito reproductivo de los individuos híbridos, su proporción sea baja en la población, por lo que se consideraría como una línea evolutiva prácticamente muerta, es decir, con muy pocas posibilidades de llegar a especiación. Lo anterior también se observa en el estudio realizado por Moran (1963) en donde únicamente encontraron a 4 individuos híbridos producto de la cruce entre *Pachycereus pringlei* y *Bergerocactus emoryi*, aunque en este caso esos 4 individuos han sido suficientes para reconocerlos oficialmente como un híbrido genérico llamado *xPacherocactus orcuttii* por Moran (1962, 1963) y *xPachycereus orcuttii* por Rowley (1982), Hunt (1999) y Anderson (2001).

Una evidencia importante en los estudios de hibridación es el número cromosómico de los taxa en cuestión, porque la hibridación puede ser el resultado de un arreglo cromosómico inusual en la meiosis, lo que puede generar individuos poliploides. Con el número cromosómico, se puede saber si los individuos bajo estudio son homoploides o poliploides lo que brindaría una mejor visión de las relaciones que existen dentro de los taxa en estudio, como se hizo en *Opuntia prolifera* (Mayer *et al.*, 2000) en donde se conoce el número cromosómico de cada taxón. En los sistemas de estudio de este trabajo se desconoce el número cromosómico.

El trabajo que aquí se llevó a cabo, confirma la existencia de los híbridos; sin embargo, aún se pueden realizar más estudios dentro e los cuales se encuentra evaluar el porcentaje de germinación de las semillas que se obtuvieron de las cruza manuales en el campo y así obtener plántulas que serán procesadas de la misma manera que se hizo en este trabajo y adicionar alguna otra metodología como secuenciación de genes que han sido utilizados en la determinación de individuos híbridos como en *Oryza* (Aggarwal *et al.*, 1999). Los resultados que se obtengan esclarecerán las relaciones genéticas de la F1 de los híbridos artificiales con los híbridos naturales.

Retomando los criterios de Hughes y Harris (1994) para el estudio sobre hibridación, las plantas que se presentan en este trabajo pueden considerarse como híbridos puesto que reúnen 4 puntos de los 5 que enumeran; estas plantas presentan un fenotipo intermedio entre los padres putativos, su fertilidad es reducida, existe un solapamiento de la distribución de los padres con los híbridos, compartiendo periodos de floración y por último, se puede dar la síntesis artificial entre los posibles progenitores.

Como se menciona en los antecedentes, estos criterios se basan en caracteres morfológicos y cromosómicos, por lo que para brindar una mayor evidencia y complementar el estudio, se tiene que hacer la parte molecular, la cual involucra una examinación directa al DNA. Es así, como en este trabajo también se encontró, a nivel molecular, que el sistema de estudio es un híbrido entre los dos géneros propuestos puesto que forman un grupo a parte (Figs. 16 y 17), existe un polimorfismo alto entre los ~~taxa~~ taxa lo que indica que comparten muchos loci (caracteres) y además, los híbridos poseen menos caracteres propios (bandas monomórficas) que sus posibles progenitores lo que estaría indicando una semejanza entre el genoma del híbrido y sus posibles progenitores (tabla 8).

VII. CONCLUSIONES

La evidencia morfológica, molecular y genética presentada en este trabajo demuestra que existe un híbrido entre los géneros de cactáceas columnares *Escontria chiotilla* y *Polaskia chichipe*, localizados en una región de la Mixteca Baja de Oaxaca.

Los individuos híbridos son escasos sin embargo, son fértiles.

Estos híbridos se pueden retrocruzar con ambos progenitores, pero presentan una mayor similitud genética con *P. chichipe* por lo que se puede considerar que la introgresión es frecuente con este progenitor.

LITERATURA CITADA

1. Aggarwal, R.K., D.S. Brar, S. Nandi, N. Huang and G.S. Khush. 1999. Phylogenetic relationships among *Oryza* species revealed by AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1320-1328.
2. Albertson, R.C., J.A. Markert, P.D. Danley and T.D. Kocher. 1999. Phylogeny of a rapidly evolving clade: The tilchid fishes of Lake Malawi, East Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 5107-5110.
3. Alexander, M.P. 1980. A versatile stain for pollen, fungi, yeast and bacteria. *Stain Technology* 55: 13-18.
4. Anderson, E.F. 2001. *The cactus family*. Timber Press, Portland, Oregon.
5. Arias, M.S., y L.U. Guzmán. 1997. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 14. Cactaceae. A.L. Juss. Instituto de Biología UNAM. México.
6. Bartolo G., M. C. 2000. Biología reproductiva y procesos de domesticación de la cactácea columnar *Polaskia chichipe* Backeberg en el Valle de Tehuacán, Puebla, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.
7. Barton, N.H. 2001. The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology* 10: 551-568.
8. Bottini, M.C.J., A. De Bustos, N. Jouve and L. Poggio. 2002. AFLP characterization of natural populations of *Berberis* (Berberidaceae) in Patagonia, Argentina. *Plant Systematics and Evolution* 231: 133-142.
9. Bravo-Hollis H. 1978. *Las cactáceas de México*. Vol I. México, D.F.: Universidad Autónoma de México.
10. Bravo-Hollis, H. 1997. Introducción (Ed.) *Suculentas mexicanas. Cactáceas*. CONABIO, SEMARNAP, UNAM. México.
11. Caputo, P., S. Acelo, S. Coccolino and R. Nazzarro. 1997. Morphological and molecular characterization of a natural hybrid between *Orchis laxiflora* and *O. morio* (Orchidaceae). *Plant Systematics and Evolution* 205: 147-155.
12. Casas, A., A. Valiente-Banuet, A. Rojas-Martínez and P. Dávila. 1999. Reproductive biology and the process of domestication of the columnar cactus *Stenocereus stellatus* in Central Mexico. *American Journal of Botany* 86: 534-542.
13. Congiu, L., I. Dupanloup, T. Patarnello, F. Fontana, R. Rossi, G., Arlatis, and L. Zane, L. 2001. Identification of interspecific hybrids by amplified fragment length polymorphism: the case of sturgeon. *Molecular Ecology* 10: 2355-2359.
14. Cornejo, D.O. and B.B. Simpson. 1997. Analysis of form and function in north american columnar cacti (Tribe Pachycereaceae). *American Journal of Botany* 84: 1482-1501.

15. Cota, H.J. and R.S. Wallace. 1996. La citología y la sistemática molecular en la familia Cactaceae. *Cactáceas Suculentas de México* XLI: 27-45.
16. Cruz, V. M.A. 2000. Aspectos de la biología reproductiva de *Polaskia chende* (Gosselin) A.C. Gibson & K. Horak (Cactaceae) en el Valle de Tehuacán, Puebla, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán. México.
17. Csaiki, U.M., H. Bastian, R. Bretschneider, S. Gauch, A. Meir, M. Schauerte, E. Scholz, C. Sperisen, B. Vornam and B. Ziegenhagen. 1998. Comparative analysis of different DNA extraction protocols: a fast, universal maxi-preparation of high quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic studies. *Plant Molecular Biology Reporter* 16: 69-86.
18. Ellstrand, N.C., R. Whitkus, and L.H. Rieseberg. 1996. Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 93: 5090-5093
19. Gibson, A.C. and K.E. Horak. 1978. Systematic anatomy and phylogeny of mexican columnar cacti. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 65: 999-1057.
20. Gibson, A.C. and P.S. Nobel. 1986. *The cactus primer*. Cambridge, Massachusetts. Harvard University Press.
21. Glass, C. 1963. Probable híbrido de *Myrtillocactus* y *Lemaireocereus*. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. 8: 36-37.
22. Grant V. and K.A. Grant. 1979. Hybridization and variation in the *Opuntia phaeacantha* group in Central Texas. *Botanical Gazette* 140: 208-215
23. Grant V. and K.A. Grant. 1980. Clonal microspecies of hybrid origin in the *Opuntia lindheimeri* group. *Botanical Gazette*. 141: 101-106.
24. Hawkes, M. W. 1982. Hybridization in the Cactaceae. *Cactus and Succulent Journal (U.S.)*. 54: 223-225.
25. Hawkes, M. W. 1983. Hybridization in the Cactaceae. Conclusion. *Cactus and Succulent Journal (U.S.)* 55: 31-36.
26. Hughes, C.E. and S.A. Harris. 1994. The characterization and identification of a naturally occurring hybrid in the genus *Leucaena* (Leguminosae: Mimosoideae). *Plant Systematics and Evolution* 192: 177-197.
27. Hunt, D. 1999. *CITES Cactaceae checklist*. 2ª Ed. Royal Botanical Gardens and Internacional Organization for Succulent Plant Study (IOS). EUA.
28. Jones, S.B. 1988. *Sistemática vegetal*. McGraw-Hill. USA.
29. Lester, R. N., and J.H. Kang. 1998. Embryo and endosperm function and failure in *Solanum* species and hybrids. *Annals of Botany* 82: 445-453.

30. Liscum, M. 1999. PCR applications. Amplified Fragment Length Polymorphism: studies on plant development. Academic Press. p. 505-519.
31. Liu, Z., A. Nichols, P. Li, and R.A. Dunham. 1998. Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*), and their F1, F2, and backcross hybrids. *Molecular and General Genetics* 258: 260-268.
32. Loh, J.P., R. Kiew, A. Kee, L.H. Gan and Y. Gan. 1999. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) provides molecular markers for the identification of *Caladium bicolor* cultivars. *Annals of Botany* 84: 155-161.
33. Mayer, M.S. L.M. Williams, and J.P. Rebman, 2000. Molecular evidence for the hybrid origin of *Opuntia prolifera* (Cactaceae). *Madroño* 47: 109-115.
34. Méndez, E. 2000. Hibridación natural entre *Trichocereus candicans* y *T. strigosus* en la provincia de Mendoza (Argentina). *Hickenia* 3: 73-76.
35. Milne, R. I., R.J. Abbott, K. Wolff, and D.F. Chamberlain. 1999. Hybridization among sympatric species of *Rhododendron* (Ericaceae) in Turkey: Morphological and molecular evidence. *American Journal of Botany* 86: 1776-1785.
36. Moran, R. 1962. *Pachycereus ocutii* - a puzzle solved. *Cactus and Succulent Journal (U.S.A.)* 34:88-94.
37. Moran, R. 1963. Dos híbridos naturales de *Bergerocactus*. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 8: 59-61.
38. Mummenhoff, K. and H. Hurka. 1995. Allopolyploids origin of *Arabidopsis suecica* (Fries) Norrlin: evidence from chloroplast and nuclear genome markers. *Botanica Acta* 108: 449-456.
39. Niklas, K.J. 1997. *The evolutionary biology of plants*. The University of Chicago Press.
40. Pinkava, D. J. and B.D. Parfitt. 1982. Chromosome numbers in some cacti of western North America-IV. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 109: 121-128.
41. Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RADP, AFLP y SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2:225-238.
42. Rieseberg L.H. and N.C. Ellstrand. 1993. What can morphological and molecular markers tell us about plant hybridization? *Critical Reviews in the Plant Sciences* 12: 213-241.
43. Rieseberg, L.H. 1995. The role of hybridation in evolution: old wine in new skins. *American Journal of Botany* 82: 944-953.
44. Rieseberg, L. 1997. Hybrid origins of plant species. *Annual Review Ecological Systematics* 28: 359-389.

45. Rohlf, F. J. 2000. NTSYSpc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (versión 2.1f). Exeter Software Publishers Ltd., setanket, New York.
46. Rosabelles, S. 1999. Identification of hybrids between *Quercus petraea* and *Q. robur* (Fagaceae): results obtained with RAPD markers confirm allozyme studies based on the *Got-2* locus. *Plant Systematics and Evolution* 217: 137-146.
47. Rowley, G.D. 1982a. Intergeneric hybrids in succulents. *National Cactus and Succulent Journal* 37: 76-78.
48. Rowley, G.D. 1982b. Intergeneric hybrids in succulents. *National Cactus and Succulent Journal* 37: 2-6.
49. Russell, JR., JD. Fuller, M. Macaulay, B.G. Hatz, A. Jahoor, W. Powell and R. Waugh. 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, SSRs and RAPDs. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 714-722.
50. Samuel, R. 1999. Identification of hybrids between *Quercus petraea* and *Q. robur* (Fagaceae): results obtained with RAPD markers confirm allozyme studies based on the *Got-2* locus. *Plant Systematics and Evolution*. 217: 137-146.
51. Urbanska, K. M., H. Hurka, E. Landolt, B. Neuffer and K. Mummenhoff. 1997. Hybridization and evolution in *Cardamine* (Brassicaceae) at Urnerboden, Central Switzerland biosystematics and molecular evidence. *Plant Systematics and Evolution* 204: 233-256.
52. van Raamsdonk, L.W.D., M.V. Ginkel and C. Kik C. 2000. Phylogeny reconstruction and hybrid analysis in *Allium* subgenus *Rhizirideum*. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1000-1009.
53. Villaseñor, J.S., P. Dávila and F. Chiang, F. 1990. Fitogeografía del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 50: 135-149.
54. Vite, F, E. Portilla, J.A. Zavala-Hurtado, P.L. Valverde and A. Díaz-Solis. 1996. A natural hybrid population between *Neobuxbaumia tetetzo* and *Cephalocereus columna-trajiani* (Cactaceae). *Journal of Arid Environments* 32: 395-405.
55. Vos P., R. Hogers, M. Becker M. Reijans, van Lee, T. Hornes, A. Freijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

APENDICE I

Matriz básica de datos de caracteres morfológicos

Número de costillas

E. chiotilla

7.80 6.60 7.20 7.00 7.00 6.80 6.80 6.80 7.40 7.00 7.60 6.80 7.20 7.00 7.20 7.00 7.00 6.80 7.40 7.00 7.20
6.80 8.20 7.40 6.20 6.80

P. chichipe

7.00 6.40 6.80 8.40 8.20 9.80 8.80 8.20 8.20 7.00 8.80 8.60 8.40 8.20 8.80 9.20 8.20 8.00 8.80 10.00 8.60
9.00 8.20 9.80 8.00 9.00 8.60 8.40 8.80 9.00 8.80 8.60 8.40 12.00

Híbrido

7.00 6.40 6.80 6.80

Distancia entre costilla

E. chiotilla

61.74 83.70 70.99 56.21 64.31 62.86 62.24 58.13 61.83 68.21 48.54 68.66 65.45 70.50 49.62 55.85 51.08
57.79 48.40 50.41 55.74 61.14 45.12 53.00 47.33 57.87 56.60 51.88 53.00 53.54

P. chichipe

28.75 31.54 33.31 39.09 24.17 39.76 30.90 41.32 32.04 44.12 39.11 34.48 35.18 41.26 29.16 38.05 31.05
29.47 44.95 25.10 33.76 36.76 39.23 32.82 29.39 37.03 42.14 36.35 30.43 35.28

Híbrido

39.65 45.38 45.44 53.01

Profundidad de costilla

E. chiotilla

34.87 38.51 34.23 29.08 34.87 36.83 30.28 27.94 31.15 35.94 28.45 34.42 29.29 32.74 29.41 33.85 27.41
34.74 26.48 26.72 30.88 35.02 27.34 29.46 30.59 28.63 31.47 29.63 28.34 27.43

P. chichipe

17.22 19.23 21.19 23.01 14.94 23.57 20.45 24.32 18.93 23.89 22.43 22.07 21.68 22.02 20.30 20.96 20.69
18.15 24.38 16.09 26.06 19.64 24.97 17.19 19.96 24.13 26.25 24.64 18.88 22.16

Híbrido

29.20 26.52 29.34 29.37

Número de espinas radiales

E. chiotilla

8.00 12.00 7.80 8.00 8.20 7.60 8.20 9.00 8.60 9.00 8.60 8.60 8.40 9.40 9.00 8.80 8.00 8.80 9.60 8.00 8.20
7.80 8.40 9.60 8.40 8.40 8.20 8.40 8.00 8.00

P. chichipe

7.20 5.00 6.40 5.80 6.40 7.40 7.80 7.60 6.80 6.60 5.60 7.40 8.80 5.80 6.40 6.60 7.40 6.40 7.20 5.80 7.00
6.80 6.60 7.60 8.00 6.00 7.00 5.20 7.00 6.60

7.60 9.00 8.80 8.80

Longitud de espinas radiales

E. chiotilla

10.46 7.67 2.97 11.75 9.17 11.27 7.26 6.37 10.62 10.64 11.52 9.28 9.15 7.89 14.56 9.08 5.92 9.17 6.27
11.80 7.81 10.20 7.09 9.91 9.22 6.82 7.84 8.85 12.63 7.05

P. chichipe

10.04 5.41 5.75 6.59 7.14 6.77 4.38 8.17 3.16 7.51 5.21 7.09 6.29 5.83 2.50 4.14 5.39 6.04 5.18 4.97 7.20
3.81 4.11 5.43 8.13 7.06 4.72 6.28 5.45 5.10

Híbrido

9.72 7.70 6.28 6.09

Longitud de espina central*E. chiotilla*43.62 32.85 48.76 58.99 31.01 42.25 45.79 23.59 71.49 27.86 35.46 40.84 36.04 28.30 26.21 28.26 29.14
49.91 36.43 23.72 38.62 46.42 39.87 26.60 48.89 41.91 41.90 47.30 42.18 38.47*P. chichipe*12.74 10.33 10.23 15.61 13.86 14.34 10.74 16.56 14.87 11.59 9.93 13.00 17.29 13.49 9.34 7.33 10.81
11.93 19.04 8.35 8.62 6.66 12.33 11.53 13.83 13.63 18.89 10.00 11.21 11.94**Híbrido**

38.48 43.74 43.11 25.54

Diámetro de espina central*E. chiotilla*1.52 2.01 0.92 1.89 2.18 2.38 1.16 1.57 1.50 1.42 1.45 1.31 1.97 1.49 1.45 1.53 0.66 1.46 0.29 1.55 1.64
1.89 1.32 0.64 1.14 1.47 1.72 1.74 1.75 1.89*P. chichipe*0.72 0.72 0.40 0.72 0.30 0.76 0.76 1.08 1.21 0.68 0.93 0.70 1.35 0.75 0.58 0.50 0.95 0.56 1.08 0.46 0.69
0.79 0.98 0.92 1.06 0.90 1.10 0.80 0.75 0.75**Híbrido**

1.34 1.53 1.42 1.52

Distancia entre aréolas*E. chiotilla*8.89 2.07 10.13 4.57 5.96 4.21 3.41 2.85 4.37 5.61 6.03 4.51 3.54 2.20 2.25 0.62 1.30 1.95 2.06 0.00 2.06
3.84 2.22 0.89 1.59 6.95 1.57 4.64 2.65 3.25*P. chichipe*7.04 7.59 4.30 9.64 7.53 9.04 9.37 9.43 9.05 7.18 7.52 8.56 10.22 6.96 8.78 5.13 8.20 5.61 8.96 5.99 9.36
7.14 7.76 9.84 6.42 12.64 12.45 6.27 6.61 10.35**Híbrido**

6.59 7.11 6.04 6.63

Longitud del fruto*E. chiotilla*19.60 26.50 25.21 999 22.70 999 25.11 25.80 27.61 27.44 29.84 28.26 25.46 26.71 20.14 21.07 24.71
30.74 24.51 999 27.80 999 21.92 26.82 24.75 24.52 21.92 25.73 23.39 25.73*P. chichipe*16.57 14.97 17.20 21.96 15.24 999 19.77 16.20 21.79 20.14 18.45 23.12 24.76 999 20.77 26.58 19.22
26.15 18.35 25.92 17.45 31.63 16.03 999 17.12 21.41 20.34 20.75 15.68 21.11**Híbrido**

16.80 16.74 15.76 12.47

Diámetro del fruto*E. chiotilla*20.66 25.56 16.99 999 23.24 999 25.78 23.72 25.76 24.24 21.77 27.04 27.36 23.35 18.30 24.38 21.61
26.95 22.48 999 27.10 999 22.35 24.64 20.58 23.38 18.14 18.56 20.71 22.83*P. chichipe*16.63 17.57 17.88 22.51 15.59 999 21.09 18.87 21.65 17.98 21.66 23.60 22.57 999 23.05 23.12 19.65
23.61 17.41 20.96 20.45 23.62 17.22 999 17.50 22.58 19.84 23.34 17.58 20.80 **Híbrido**

16.11 16.72 16.59 13.90

Número de aréolas en 30 cm

E. chiotilla

20.00 15.00 24.00 17.00 20.00 19.00 24.00 18.00 15.00 20.00 21.00 17.00 28.00 17.00 25.00 20.00 34.00
22.00 25.00 22.00 21.00 19.00 22.00 19.00 24.00 21.00 24.00 20.00 23.00 20.00

P. chichipe

25.00 26.00 22.00 21.00 30.00 30.00 27.00 23.00 29.00 21.00 30.00 21.00 21.00 23.00 32.00 21.00 21.00
32.00 23.00 22.00 26.00 29.00 24.00 21.00 25.00 20.00 22.00 21.00 22.00 24.00

Híbrido

24.00 23.00 25.00 25.00

Características del fruto

E. chiotilla

111111111111111111111111111111111111

P. chichipe

2222222222222222222222222222222222

Híbrido

3333

Tépalos

E. chiotilla

2222222222222222222222222222222222

P. chichipe

111111111111111111111111111111111111

Híbrido

2222

APENDICE II

Matriz básica de datos de caracteres moleculares

	E1	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E11
b1	0	0	0	0	0	0	0	1
b2	0	0	0	0	0	0	0	0
b3	1	1	1	0	0	0	0	0
b4	0	0	0	0	0	0	0	1
b5	0	0	0	0	0	1	1	1
b6	1	1	1	1	1	1	1	1
b7	1	1	1	1	1	1	1	1
b8	1	1	1	1	1	1	1	1
b9	1	0	0	1	1	1	1	1
b10	1	1	1	1	1	1	1	1
b11	0	0	0	0	0	0	0	0
b12	1	1	1	1	0	0	0	0
b13	1	1	1	1	1	1	1	1
b14	0	0	0	0	0	0	0	0
b15	1	1	1	1	1	1	1	1
b16	1	1	1	1	1	1	1	1
b17	1	1	1	1	1	1	1	1
b18	1	1	1	1	1	1	1	1
b19	0	0	0	0	0	0	0	0
b20	1	1	1	1	1	1	1	1
b21	1	1	1	1	1	1	1	1
b22	0	0	0	0	0	0	0	0
b23	1	1	1	0	0	0	0	1
b24	0	0	0	0	0	0	0	0
b25	0	0	0	0	0	0	0	0
b26	0	0	0	0	0	0	0	0
b27	1	1	0	1	0	0	0	0
b28	0	1	1	1	0	0	0	0
b29	0	0	0	0	0	0	0	0
b30	1	1	1	1	1	1	1	1
b31	0	0	0	0	0	0	0	0
b32	0	1	1	0	0	0	0	0
b33	0	0	0	0	0	0	0	0
b34	0	0	0	0	1	1	1	1
b35	0	0	0	0	0	0	0	0
b36	0	0	0	0	0	0	0	0
b37	0	0	1	0	0	0	0	0
b38	0	0	0	0	0	0	0	0
b39	0	0	0	0	0	0	0	0
b40	1	1	1	1	1	1	1	1
b41	0	0	0	0	0	0	0	0
b42	0	0	0	0	0	0	0	0
b43	0	0	0	0	0	0	0	0
b44	1	0	0	0	0	1	0	0
b45	0	0	0	0	0	0	0	0
b46	0	0	0	0	0	0	0	0
b47	1	0	1	1	1	1	1	1
b48	1	1	1	1	1	0	1	1
b49	1	1	1	1	0	0	1	0
b50	0	0	1	0	0	0	0	0
b51	1	0	0	0	1	0	1	1
b52	0	1	0	0	0	0	0	0
b53	0	0	0	0	0	0	0	0
b54	0	0	0	0	1	1	1	1
b55	0	0	1	1	1	1	1	1
b56	0	0	0	0	0	0	0	0
b57	0	0	0	0	0	0	1	1
b58	0	0	0	0	0	0	1	1
b59	1	1	1	1	0	0	0	0
b60	0	0	0	0	0	0	0	0

	E12	E13	E14	E15	P1	P2	P5	P6
b1	1	0	0	0	0	0	0	1
b2	0	0	0	0	0	0	0	0
b3	0	0	0	0	0	0	0	0
b4	1	0	0	1	0	0	0	0
b5	1	1	1	1	0	0	0	0
b6	1	1	1	1	0	0	0	1
b7	1	1	1	1	0	0	0	1
b8	1	1	1	1	0	0	0	1
b9	1	1	1	1	0	0	0	0
b10	1	1	1	1	0	0	0	0
b11	0	0	0	0	0	0	0	0
b12	0	0	0	0	0	0	0	0
b13	1	1	0	0	0	0	0	0
b14	0	0	0	0	0	0	0	0
b15	1	1	1	1	0	0	0	0
b16	1	1	1	1	1	1	1	1
b17	1	1	1	1	0	0	0	1
b18	1	1	1	0	0	0	0	1
b19	0	0	0	0	0	0	0	1
b20	1	1	1	1	1	1	1	1
b21	1	1	1	0	0	0	0	0
b22	0	0	0	0	0	0	0	0
b23	1	0	0	0	0	0	0	1
b24	0	0	0	0	0	0	0	0
b25	0	0	0	0	0	0	0	0
b26	0	0	0	0	1	0	0	1
b27	0	0	0	0	0	0	0	0
b28	0	0	0	0	1	1	1	1
b29	0	0	0	0	0	0	0	1
b30	1	1	1	1	1	1	1	1
b31	0	0	0	0	1	1	1	1
b32	0	0	0	0	1	1	1	1
b33	0	0	0	0	0	0	0	0
b34	1	1	1	1	0	0	0	0
b35	0	0	0	0	0	0	0	0
b36	0	0	0	0	0	0	0	0
b37	0	0	0	0	0	1	1	1
b38	0	0	0	0	0	0	0	0
b39	0	0	0	0	1	1	1	1
b40	1	1	1	1	0	0	0	0
b41	0	0	0	0	1	1	1	1
b42	0	0	0	0	0	0	0	0
b43	0	0	0	0	0	0	0	0
b44	0	1	0	1	1	1	1	1
b45	0	0	0	0	0	0	0	0
b46	0	0	0	0	0	0	0	0
b47	1	1	1	1	1	1	0	1
b48	1	1	0	1	1	0	0	0
b49	0	1	1	1	1	1	1	0
b50	0	0	0	0	1	1	0	0
b51	0	1	0	1	0	0	0	0
b52	0	0	0	0	0	0	0	0
b53	0	0	0	0	1	0	1	1
b54	0	0	0	0	0	0	0	0
b55	1	1	1	0	0	0	0	0
b56	1	1	1	1	0	0	0	0
b57	0	0	0	0	0	0	0	0
b58	1	1	1	1	1	0	1	1
b59	1	1	1	1	1	1	1	0
b60	0	0	0	0	1	1	1	1
b61	1	1	1	0	0	0	0	0
b62	1	1	1	1	1	1	1	1
b63	1	1	1	1	1	1	1	1
b64	1	1	1	1	1	0	1	1
b65	0	0	0	0	0	0	0	0

b61	1	0	1	1	1	1	1	1
b62	1	1	1	1	1	1	1	1
b63	1	1	1	1	1	1	1	1
b64	0	0	0	0	1	1	1	1
b65	0	0	0	0	0	0	0	0

	P7	P8	P	P10	P11	P12	P13	P14
b1	0	0	0	0	0	0	0	0
b2	0	0	1	1	0	0	1	1
b3	0	0	0	0	0	1	0	1
b4	1	0	0	0	0	0	0	0
b5	1	0	0	0	0	0	0	0
b6	0	0	0	1	0	1	1	1
b7	0	0	0	1	0	1	1	1
b8	1	1	1	1	1	1	1	1
b9	0	0	0	0	0	0	0	0
b10	0	0	0	0	0	0	0	0
b11	1	0	1	0	0	1	1	1
b12	0	0	0	0	0	0	0	0
b13	1	0	0	0	0	0	0	0
b14	1	0	0	1	1	1	1	1
b15	0	0	0	0	0	0	0	0
b16	1	1	1	1	1	1	1	1
b17	1	0	0	1	1	0	0	0
b18	0	0	0	1	0	0	0	0
b19	0	0	1	1	0	1	1	1
b20	1	1	0	1	0	0	0	0
b21	0	0	0	0	0	0	0	0
b22	0	0	1	1	0	1	1	1
b23	1	0	0	0	0	0	0	0
b24	0	0	0	0	0	0	0	1
b25	0	0	1	1	1	1	1	1
b26	0	0	0	0	0	0	0	0
b27	1	0	0	0	0	0	0	1
b28	0	0	0	0	0	0	0	0
b29	0	0	0	0	0	0	0	0
b30	1	1	1	1	1	1	0	1
b31	1	1	1	1	1	1	1	1
b32	0	0	0	0	0	0	0	0
b33	0	0	0	0	0	0	0	0
b34	1	1	1	1	1	1	1	1
b35	1	0	0	0	0	0	0	0
b36	1	0	0	0	0	0	0	0
b37	0	0	0	0	0	0	0	0
b38	1	1	0	0	0	0	1	1
b39	1	1	1	1	1	1	1	1
b40	1	1	1	1	1	1	1	1
b41	1	1	1	1	1	1	1	1
b42	0	0	0	0	0	0	0	0
b43	1	1	1	1	1	1	1	1
b44	1	1	1	1	1	1	1	1
b45	1	1	1	1	1	1	1	1
b46	0	0	0	0	0	0	0	0
b47	1	1	1	1	1	1	1	1
b48	0	0	0	0	0	0	0	0
b49	0	0	0	0	0	0	0	0
b50	1	1	1	1	1	1	1	1
b51	0	0	0	0	0	0	0	0
b52	0	0	0	0	0	0	0	0
b53	0	0	0	0	0	0	0	0
b54	1	1	1	1	1	1	1	1
b55	1	1	1	1	1	1	1	1
b56	1	0	0	0	0	0	0	0
b57	0	0	0	0	0	0	0	0
b58	1	0	0	0	0	0	0	0
b59	0	0	0	0	0	0	0	0
b60	1	1	0	0	1	1	1	1
b61	0	0	0	0	1	1	1	1

	P15	H1	H2	H3	H4	H5	H7	H8
b1	0	1	1	1	1	1	0	1
b2	1	1	1	1	1	1	0	1
b3	0	1	1	0	1	1	0	0
b4	0	1	1	1	1	1	1	0
b5	0	0	0	0	0	0	0	0
b6	1	1	1	1	1	1	1	1
b7	1	1	1	1	1	1	1	1
b8	1	1	1	1	1	1	1	1
b9	0	0	0	0	0	0	0	0
b10	0	1	1	1	1	1	0	0
b11	1	0	0	0	0	0	0	0
b12	0	0	1	1	1	1	1	1
b13	0	0	1	1	1	1	1	1
b14	1	1	1	1	1	1	1	1
b15	0	0	0	0	0	0	0	0
b16	1	1	1	1	1	1	1	1
b17	0	0	1	1	0	1	0	0
b18	0	0	1	1	0	0	0	1
b19	1	1	1	1	0	0	0	0
b20	0	1	1	1	1	1	1	1
b21	0	0	0	0	0	0	0	0
b22	1	0	0	0	0	0	0	0
b23	0	0	0	0	0	0	0	0
b24	0	1	1	1	1	1	1	1
b25	1	0	0	0	0	0	0	0
b26	0	0	0	0	0	0	0	1
b27	0	0	0	1	0	1	0	1
b28	0	0	0	0	0	0	0	0
b29	0	1	1	0	1	0	1	0
b30	1	1	0	1	1	1	1	1
b31	1	0	0	1	1	1	1	1
b32	0	0	0	0	0	0	0	0
b33	0	0	0	0	0	0	1	1
b34	0	0	0	0	0	0	0	0
b35	0	0	0	0	0	0	1	0
b36	0	1	1	1	1	0	1	1
b37	0	0	0	0	0	0	0	0
b38	1	0	0	0	0	0	0	0
b39	1	1	1	1	1	1	0	0
b40	0	0	0	0	0	0	0	0
b41	1	0	0	0	0	0	0	1
b42	0	1	1	1	1	0	1	1
b43	0	0	0	0	0	0	0	0
b44	0	0	0	0	0	0	C	0
b45	1	1	1	1	1	0	1	0
b46	1	C	0	0	1	1	0	0
b47	1	1	1	1	1	1	1	1
b48	0	0	0	0	0	0	0	0
b49	0	0	0	0	0	0	0	1
b50	1	1	0	0	0	1	0	0
b51	0	0	0	0	0	0	0	0
b52	0	1	1	0	0	0	0	1
b53	0	0	0	0	0	0	0	0
b54	0	0	0	0	0	0	0	0
b55	1	0	0	0	0	C	0	0
b56	0	0	0	0	0	0	0	0
b57	0	1	1	1	1	1	1	1
b58	0	0	0	0	0	0	0	0
b59	0	0	0	0	0	0	0	0
b60	1	1	1	1	1	1	1	1
b61	1	1	1	1	1	1	1	1
b62	1	1	1	1	1	1	1	1
b63	1	1	1	1	1	1	1	1
b64	0	0	0	0	0	0	0	0
b65	0	1	1	1	1	1	1	1

b62	1	1	1	1	1	1	1	1	1
b63	1	1	1	1	1	1	1	1	1
b64	1	0	0	0	0	0	0	0	0
b65	0	0	0	0	0	0	0	0	0

	H9	H10	H11
b1	1	1	1
b2	1	0	0
b3	1	0	0
b4	0	0	0
b5	0	0	0
b6	0	0	1
b7	1	1	1
b8	1	1	1
b9	0	0	0
b10	0	0	0
b11	0	0	0
b12	1	1	1
b13	0	0	1
b14	1	0	0
b15	0	0	0
b16	1	1	1
b17	0	0	0
b18	1	0	0
b19	0	0	0
b20	1	1	1
b21	0	0	0
b22	0	0	0
b23	0	0	0
b24	1	1	1
b25	0	0	0
b26	1	0	0
b27	1	0	0
b28	0	0	0
b29	0	0	0
b30	1	1	1
b31	1	1	1
b32	0	0	0
b33	1	1	0
b34	0	0	0
b35	0	1	0
b36	1	1	1
b37	0	0	0
b38	0	0	0
b39	0	0	0
b40	0	0	0
b41	0	0	0
b42	1	1	1
b43	1	1	1
b44	0	0	0
b45	1	1	1
b46	1	0	0
b47	1	1	1
b48	0	0	0
b49	1	1	0
b50	1	0	0
b51	0	0	0
b52	1	0	1
b53	0	0	0
b54	0	0	0
b55	0	0	0
b56	0	0	0
b57	1	1	1
b58	0	0	0
b59	0	0	0

b60	0	0	0
b61	1	1	1
b62	1	1	1
b63	1	1	1
b64	0	0	0
b65	1	1	1

APENDICE III

Soluciones

Acrilamida al 5% (500 ml)

- > Acrilamida: 23.75 g
- > Bis-acrilamida: 1.25 g
- > 7.5 M Urea: 225 g
- > TBE 10x: 50 ml
- > TEMED: 300 μ l

Disolver todo menos el TEMED y filtrar al vacío. El TEMED se adiciona cuando se elabora el gel.

Gel de acrilamida al 6%

- > 60 ml acrilamida para secuenciación.
- > 150 μ l Persulfato de amonio
- > 40 μ l TEMED

Bromuro de etidio (10 mg/ml)

Disolver 0.2 g de bromuro de etidio en 20 ml de agua; mezclar perfectamente y almacenar a 4° C.

Buffer de PCR (10x)

- > 500 mM KCl
- > 100 mM Tris-Cl, pH 8.8
- > 30 mM DTT
- > 1 mg/ml BSA

Gel de agarosa 1%

- > Agarosa: .3 g
- > TAE 1x: 30 ml
- > Bromuro de etidio: 1.5 μ l.

Buffer de lisis

CTAB 1%
1.4 M NaCl
100mM Tris/HCl
20 mM EDTA, pH 8.0, 2% PVP-40

5x CTAB

53.9 g Tris base
27.5 g Acido bórico
20 ml 0.5 M EDTA pH 8.0

Solución 5x CTAB

5% CTAB, 0.7 M NaCl

Buffer de digestión/ligamiento

- > Tris-acetato (pH 7,5) 50 mM
- > Mg-acetato 50 mM
- > K-acetato 250 mM
- > 25 ng/ μ l suero bovino de albúmina

Buffer de secuenciación

- > 98% (v/v) formamida
 - > 0.025% (w/v) xilen cianol
 - > 0.025% (w/v) azul de bromofenol
 - > 450 mM Tris-borato
-