

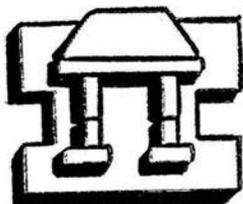


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CAMPUS IZTACALA

"ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENETICA DE LA
CACTACEA COLUMNAR
Neobuxbaumia mezcalaensis"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A ;
IRMA RIVERA MONTOYA



IZTACALA

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNAM IZTACALA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

JEFATURA DE LA CARRERA DE BIOLOGIA



IZTACALA

09 de abril de 2003

M C RAMIRO JESÚS SANDOVAL
DIRECTOR
PRESENTE.

Atención Lic. América Landa Romero
Jefa de la Unidad de Administración Escolar.

Los abajo firmantes, miembros de la Comisión Dictaminadora del trabajo de:

(x) Tesis de Investigación Tesis de experiencia Profesional ()
Titulado "Estudio de la variabilidad genética de la cactácea columnar *Neobuxbaumia mezcalaensis*"

Que presenta el pasante de Biología **IRMA RIVERA MONTOYA**

Para obtener el título de Biólogo.

Informan que después de haber revisado cuidadosamente el trabajo, consideramos que reúne las características de calidad académica que se requieren para aspirar a la obtención del título citado, razón por la cual otorgamos nuestros votos aprobatorios para la presentación del examen profesional correspondiente.

GRADO	NOMBRE	FIRMA	CARGO
DRA.	MARTHA MARTINEZ GARCIA		Presidente
DR.	JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS		Vocal
BIOL.	ANTONIA TRUJILLO HERNANDEZ		Secretario
BIOL.	MANUEL MANDUJANO PIÑA		Suplente
BIOL.	GUMERCINDO H. DE LA CRUZ GUZMAN		Suplente

Con base en lo anterior solicito su autorización para que los profesores que otorgan los votos aprobatorios funjan como sinodales del examen profesional en el cargo anotado, y a la Administración Escolar otorgue la fecha para la Réplica Oral del trabajo presentado.

Atentamente
"Por mi raza hablará el espíritu"

DR. SERGIO CHÁZARO OLVERA
JEFE DE LA CARRERA

Vo.Bo M C Ramiro Jesús Sandoval
Director

DEDICATORIA

A las dos personas más importantes en mi
vida y motor que me impulsa a seguir

A mi madre **Guadalupe Montoya Juárez**

y

a mi Hijo **José Arturo Sánchez**

este título les pertenece

A mi padre y hermanos por lo que hemos
vivido juntos:

Raúl Rivera

Lety

Alberto

Pedro

Jorge

Alejandro

Martha

gracias por su tiempo y apoyo.

A todos mis maestros y compañeros de la
carrera, sin los cuales este trabajo no sería
posible... gracias por su apoyo y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial al laboratorio de Edafología que siempre nos ha brindado su valiosa colaboración y han compartido sus conocimientos para enriquecer nuestros estudios.

A Dios, parte importante en mi vida y a quien agradezco la existencia que me regaló.

Al Dr. Jorge por dirigir mi trabajo de tesis, compartir conmigo sus conocimientos, por enseñarme a apreciar nuestro trabajo y brindarme su amistad

A la Dra. Martha, por compartir sus valiosos conocimientos tanto científicos como personales y por brindarme su amistad.

A mis revisores, Dra. Martha, al maestro Manuel, a la maestra Tony, al maestro Gume, por su paciencia, tiempo y valiosos comentarios.

A mi madre, una gran mujer a la que nunca terminare de agradecer su amor, sus desvelos, el cariño que siempre me ha expresado y por el gran ejemplo de lucha y entereza que siempre me ha dado.

A mi hijo, que me da una gran felicidad y orgullo, a su paciencia y fe en mí, te amo.

A mis hermanos, por siempre estar al pendiente de mí y por el apoyo incondicional que siempre me han dedicado, los quiero mucho.

A todos mis maestros de la carrera, pero en especial a Nacho Peñalosa, Anita, Gabriel, Diego Arenas, Jorge Gersenovies, Lucy, Rafael Jiménez, que me enseñaron que la biología es más que una ciencia es una forma de vida y que para lograr nuestras metas se debe trabajar día con día.

A mis amigos, Lizzy, Isabel, Mony, Paty, Naty, Gina, Julio, Chio, Martha, Lety, Chucho, Karen, Rober, por hacer de la carrera una experiencia llena de anécdotas, por su apoyo incondicional en las buenas y en las malas y por brindarme siempre su confianza. Por ser mis confidentes y confortarme en los malos momentos, los quiero mucho.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Bioquímica Molecular (LBM) Paty, Lety, Wendy, Amelia, Ale, Eduardo, Fer., Ramón, Barbarita, a la Dra. Martha y al Dr. Jorge y aunque ya no estén a Blanca, Alex, Claudia y Mario; gracias a todos por compartir su vida, su tiempo y por hacer de nuestro lugar de trabajo un sitio muy agradable en donde las horas pasaron sin sentir y en donde la amistad, el apoyo y la convivencia siempre estuvieron presentes. A todos muchas, muchas gracias.....

ÍNDICE

Presentación		i
Abreviaturas		ii
Resumen	IZT.	iii

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Los desiertos mexicanos	1
1.2 La familia Cactaceae	2
1.3 <i>Neobuxbaumia mezcalaensis</i> (Bravo) Backeberg	6
1.3.1 Ubicación taxonómica	6
1.3.2 Anatomía	6
1.3.3. Morfología y Fisiología	7
1.3.4. Distribución de <i>N. mezcalaensis</i> en el territorio mexicano	8
1.3.5. Importancia y Polinizadores	9
1.4 Técnicas Moleculares	10
1.5. Genética de Poblaciones	18
1.6. Diversidad Morfológica y Genética	20
1.6.1 Diversidad Morfológica	20
1.6.2 Diversidad Genética	20
1.7. Fuentes de Variación Genética	20
1.7.1 Selección Natural	21
1.7.2 Deriva Génica	21
1.7.2.1 Efecto fundador	21
1.7.2.2 Cuello de botella	21
1.7.3 Endogamia	22
1.7.4 Migración o Flujo Génico	22
1.7.5 Mutación	23
1.8 Distribución Amplia vs. Restringida	23
1.9 Antecedentes	24

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis	28
2.2 Objetivo General	28
2.3 Objetivos Particulares	29

3 MATERIALES Y METODOS	
3.1 Zona de Estudio	30
3.2 Colecta del Material Biológico	32
3.3 Extracción del DNA	34
3.4 Marcadores Tipo RAPD's	36
3.5 Análisis estadístico	37
3.5.1 Diversidad Genética	37
3.5.2 Índice de Shannon	38
3.5.3 Análisis de Ordenación	39
3.5.4 Análisis de Agrupación	39
3.5.5 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)	40
4 RESULTADOS	
4.1 Extracción y Purificación del DNA	42
4.2 Amplificación de los marcadores tipo RAPD's	43
4.3 Análisis Estadístico	45
4.3.1 Diversidad Genética	45
4.3.2 Análisis de agrupación	45
4.3.3 Análisis de Ordenación	48
4.3.4 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)	53
4.3.5 Índice de Shannon	53
4.3.6 Distancias Genéticas vs. Distancias geográficas	56
5 DISCUSIÓN	59
6 CONCLUSIONES	71
LITERATURA CITADA	73
ANEXO 1	80
ANEXO 2	83

INDICE DE CUADROS

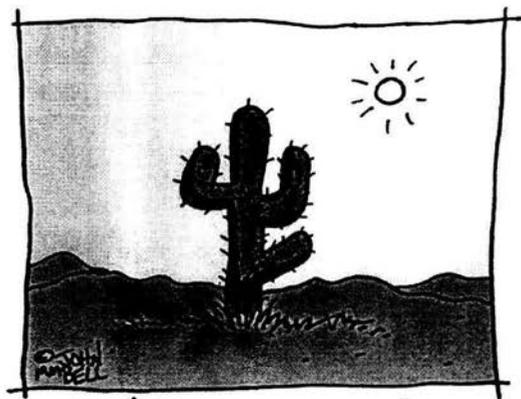
Cuadro 1:	Especies de <i>Neobuxbaumia</i> y su distribución en los estados de la República Mexicana.	5
Cuadro 2:	Características Generales de los Marcadores Genéticos.	17
Cuadro 3:	Mapa de la zona de estudio, ubicación geográfica de los sitios de colecta en el Valle de Tehuacan-Cuicatlán y la Cuenca del Río Balsas.	31
Cuadro 4:	Número y rango de peso molecular de los marcadores generados con los cinco primer's.	43
Cuadro 5:	Presencia de individuos en los 7 diferentes grupos que se forman en el dendrograma a partir de la similitud genética.	47
Cuadro 6:	Porcentaje de componentes principales empleado en el análisis de ordenación, para todos los individuos.	48
Cuadro 7:	Resultados diversidad genética obtenidos a partir del AMOVA, al analizar 85 individuos de <i>N. mezcalaensis</i> .	53
Cuadro 8:	Valores de diversidad genética obtenidos mediante el Índice de Shannon, para cada uno de los primer empleados por sitio de colecta analizados para <i>N. mezcalaensis</i> .	54
Cuadro 9:	Matriz de distancias geográficas vs distancias.	57
Cuadro 10:	Características Biológicas y genéticas de las tres especies de <i>Neobuxbaumia</i> que cohabitan en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán.	83
Cuadro 11:	Niveles promedio de diversidad genética en plantas con características de historia de vida similares. Los datos que se muestran están basados en isoenzimas y marcadores RAPD.	84
Cuadro 12:	Valores de diversidad genética obtenidos mediante AMOVA e Índice de Shannon y flujo génico calculados para <i>N. mezcalaensis</i> .	85

INDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Filogenia de la familia Cactaceae.	4
Figura 2:	<i>Neobuxbaumia mezcalaensis</i>	7
Figura :3	Mapa de distribución de <i>Neobuxbaumia mezcalaensis</i> en los estados de la República Mexicana.	9
Figura 4:	Técnica de RAPD's.	15
Figura 5:	Mapa de la zona de estudio, ubicación geográfica de los sitios de colecta en el Valle de Tehuacan-Cuicatlán y la Cuenca del Río Balsas.	30
Figura 6:	Obtención de la muestra de tejido parenquimático de <i>N. mezcalaensis</i> .	33
Figura 7:	Diagrama de flujo del manejo de las muestras y análisis estadístico realizados a 85 muestras de <i>N. mezcalaensis</i> y 7 referencias.	34
Figura 8:	Ciclos y temperaturas empleadas para la amplificación de los marcadores tipo RAPD.	36
Figura 9:	Electroforesis en gel de agarosa para corroborar la integridad del DNA empleado.	42
Figura 10:	Polimorfismos expresados entre individuos de Río Salado cuadrante 1 (RS-1) de <i>N. mezcalaensis</i> , utilizando el primer C07 en el extremo izquierdo se encuentra un marcador de peso molecular de 1 Kb, para estimar el peso de los marcadores RAPD.	43
Figura 11:	Dendrograma obtenido mediante el método UPGMA y el índice de similitud de Jaccard para los 85 individuos de <i>N. mezcalaensis</i> y 7 referencia externa de <i>N. macrocephala</i> así como 2 individuos de <i>N. tetetzo</i>	46
Figura 12:	El Análisis de Coordenadas Principales (PCO) con red de tendido mínimo (MST) de los 85 individuos de <i>N. mezcalaensis</i> .	49
Figura 13:	Análisis de Coordenadas Principales (PCO) con red de tendido mínimo (MST) de cada uno de los sitios de colecta de <i>N. mezcalaensis</i> .	50
Figura 14:	PCO con red de tendido mínimo (MST) para las tres especies de <i>Neobuxbaumia</i> , <i>N. mezcalaensis</i> , <i>N. macrocephala</i> y <i>N. tetetzo</i> .	52
Figura 15:	El PCO de dos dimensiones de los 6 diferentes sitios de colecta empleados para el análisis de <i>N. mezcalaensis</i> .	55
Figura 16:	PCO de dos dimensiones de los 10 diferentes cuadrantes para el análisis de <i>N. mezcalaensis</i> .	56
Figura 17:	Distancias geográficas (\log_{10}) vs. distancias genéticas (Φ_{ST} pareada) de cada cuadrante en que se colecto <i>N. mezcalaensis</i> .	58

PRESENTACIÓN

El presente trabajo intitulado "Estudio de la variabilidad genética de la cactácea columnar *Neobuxbaumia mezcalaensis*", fue realizado por Irma Rivera Montoya, en el laboratorio de Bioquímica Moléculas de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Campus Iztacala de la UNAM bajo la dirección del Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras.



ABREVIATURAS

AMOVA	Análisis Molecular de Varianza
CH	Población ubicada en Santiago Chazumba
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EtBr	Bromuro de Etidio
Φ_{ST}	Coefficiente de endogamia homólogo a la F_{ST} de Wright
GPS	Sistema de Posición Global
G'_{ST}	Índice de Diversidad
He	Diversidad por sitio
Ho	Diversidad por locus
H_{pop}	Diversidad para todas las subpoblaciones
H_{sp}	Diversidad de la especie
<i>m</i>	Número de inmigrantes por generación
<i>N_e</i>	Número efectivo de la población
NH	Población ubicada en Nuevos Horizontes
nm	Nanómetros
OTU	Unidad Taxonómica Operativa
<i>P</i>	Probabilidad
PCO 1	Coordenada Principal 1
PCO 2	Coordenada Principal 2
PCO 3	Coordenada Principal 3
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PVP	Polivinil Pirrolidona
<i>r</i>	Coefficiente de correlación
RAPD's	Amplificación aleatoria del DNA Polimórfico
RFLP	longitud de fragmentos de restricción polimórficos
RS	Población ubicada en las riberas del Río Salado
SJR	Población ubicada en San Juan Raya
SL	Población ubicada en San Lucas
SSR	microsatélites
T	Población ubicada en Tepenene
UICN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
UPGMA	Agrupamiento por Promedio Aritmético no Ponderado
VNTR	minisatélites

RESUMEN

El presente trabajo de investigación observacional fue diseñado para determinar la estructura genética y variabilidad del cactus columnar *N. mezcalaensis* que se distribuye en la región de Oaxaca y Puebla, se realizaron colectas en seis sitios (San Juan Raya; San Lucas; en las riberas del Río Salado; Tepenene, Nuevos Horizontes y Santiago Chazumba), con un total de 10 diferentes cuadrantes, colectados de acuerdo con su distribución y abundancia. Esta especie presenta la distribución más amplia de todo el género, en algunas localidades llega a presentarse con una densidad poblacional de 1680 ind/Ha y es polinizada principalmente por tres especies de quiropteros nectarívoros que distribuyen el polen y las semillas.

Utilizando el sistema de marcadores moleculares RAPD, se determinó que *N. mezcalaensis* tiene un nivel relativamente alto de variación genética, todos los organismos estudiados son polimórficos, para un total de 145 alelos, obtenidos con cinco primers (iniciadores) para el análisis de 85 individuos colectados. Para estimar la variabilidad genética se calculó el índice de Shannon, la estructura genética se determinó mediante el análisis de AMOVA, el flujo génico que se determinó a partir de la Φ_{ST} , que es equivalente a la F_{ST} de Wright. Se construyó un dendrograma y un análisis de agrupamiento (UPGMA) y de ordenación (PCO) a partir del índice de similitud de Jaccard para apreciar las posibles relaciones entre poblaciones e individuos.

La variabilidad genética encontrada entre las seis poblaciones de *N. mezcalaensis* es del 23% ($G'_{ST} = 0.230$), en cuyo caso un valor de 1 indica la igualdad genética, este valor es similar al reportado para *N. macrocephala*, menor al reportado para *N. tetetzo* y superior al encontrado para una cactácea clonal *S. stellatus* estudiados con anterioridad en el laboratorio de Bioquímica Molecular. Estos valores concuerdan con los obtenidos a partir del AMOVA, que indica que el

91.9% de la variación total se encuentra dentro de las seis poblaciones estudiadas de las cuales San Juan Raya fue la más variable (He 5.126) y Nuevos Horizontes (con He 4.396) fue la menos variable. El valor de Φ_{ST} para todos los sitios fue de 0.081(1= igualdad genética); a partir de este valor se estableció el flujo génico que existe ($N_e m = 1.81$); estos valores refleja que no existe una estructuración entre las poblaciones, ya que existen pocas diferencias entre ellas y la presencia de flujo génico. Así mismo, se encontró que San Juan Raya es un centro de información genética altamente variable y que *N. mezcalaensis* muestra niveles de variación genética superiores a los esperados para poblaciones endémicas.

Con base en los resultados obtenidos se concluye que *N. mezcalaensis* no presenta estructuración genética, que los sitios muestreados constituyen una sola población, probablemente influenciado por un proceso de polinización que es realizado por los murciélagos, quienes favorecen el intercambio genético entre los sitios. La diversidad genética encontrada para *N. mezcalaensis* esta íntimamente ligada a su distribución, historia de vida y características biológicas, y que el flujo génico mantiene una pequeña diferenciación genética entre los sitios, lo que evita la especiación.

La información obtenida será útil para desarrollar estrategias de conservación.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LOS DESIERTOS MEXICANOS

En México los ecosistemas áridos constituyen los sistemas que dominan el escenario ambiental. Se forman tanto por causas relacionadas con el patrón general de circulación atmosférica como por la sombra orográfica producida por las cadenas montañosas del país (Valiente-Banuet, *et al.*, 1995).

El territorio mexicano ubicado en la confluencia de dos grandes regiones la neártica y la neotropical, una situación mesocontinental entre dos océanos y una ubicación dentro de la trayectoria de migración florística hacia los trópicos reúne una de las más grandes riquezas biológicas del mundo (Rzedowski, 1978). Dentro de esta gran riqueza se encuentran los ecosistemas áridos, que ocupan alrededor del 60% del territorio mexicano y constituyen el sistema que domina el escenario ambiental del país (Valiente-Banuet, *op. cit.*).

Los desiertos son el resultado de los patrones de circulación atmosférica que originan una franja árida entre los 15° y 35° de latitud, así como por la sombra orográfica que producen las cadenas montañosas del país (Valiente-Banuet, *op. cit.*). Es en estos ecosistemas se encuentra una de las más grandes riquezas biológicas, ya que en ellos habitan el 14% de las plantas vasculares que existen en México (Moreno y Sánchez, 1990; Rzedowski, 1991), en estas zonas se representa aproximadamente una tercera parte de la flora fanerogámica del país y concentra el mayor número de endemismos de la flora mexicana (Rzedowski, 1962), ubicándonos como el país que presenta la mayor diversidad y riqueza de cactáceas y suculentas (www.ine.gob.mx); sin embargo, se sabe muy poco de los procesos que mantienen esta biodiversidad y sobre los procesos naturales de deterioro.

Es importante señalar que la diversidad de los ambientes áridos ha sido alterada por la modificación de sus sistemas (Frankham, 1995), poniendo a varias poblaciones naturales en serios problemas de sobrevivencia. El efecto de estos cambios pueden verse reflejados en el genoma de los organismos y pueden llegar a

expresarse como cambios en el flujo génico y la diversidad genética de las poblaciones, en cuyo caso pueden llevar al aislamiento, especiación, e incluso a la extinción local de una población (Clark, 2000).

1.2 LA FAMILIA Cactaceae

La familia Cactaceae que es endémica de América, es una de las formas de vida más características del paisaje mexicano. Su distribución natural abarca prácticamente todo el continente, y aunque existen muy pocos registros fósiles de los cactus, estudios realizados por especialistas consideran la zona tropical seca de Sudamérica como el probable centro de origen de la familia, aunque a través de los siglos se fueron concentrando tanto en algunos territorios de África (región meridional y Este) y al paso de los siglos su distribución fue ampliándose a varios hábitats del mundo. La mayoría de las especies, alrededor del 70%, se distribuyen en regiones áridas y semiáridas, constituyendo en varias zonas elementos dominantes de la vegetación, (Valiente-Banuet, *et al.*, 1995).

En los últimos siglos, las especies que conforman la familia de los cactus han sido clasificadas y reclasificadas repetidas veces. No fue sino hasta 1904 que dos americanos: Britton (director de los jardines botánicos de Nueva York) y J. Nelson Rose (administrador auxiliar del herbario nacional del museo Smithsonian de Estados Unidos), viajaron por todo el continente americano y a revisar las colecciones europeas para organizar y clasificar los especímenes de cactus, tanto de herbarios como de archivos; con la colaboración de diversos botánicos, colectores e individuos interesados lograron a partir de 1919 y hasta 1923 publicar cuatro volúmenes de *Cactaceae*. En estos volúmenes, dividieron a la familia Cactaceae en tribus, subtribus y de vez en cuando en series; estableciendo nuevos géneros y eliminando otros. Esta división todavía es aceptada por muchos hoy en día, no obstante se han agregado nuevos descubrimientos y se han hecho algunas modificaciones ([www .Projeto_Cactáceas_Brasileiras.htm](http://www.Projeto_Cactáceas_Brasileiras.htm)).

En 1958, la familia Cactaceae fue nuevamente dividida por Buxbaum en tres subfamilias: Pereskioideae, Opuntioideae y Cactoidea (Clark, 2000). Buxbaum

(Gibson, 1998, citado en Clark, 2000) además, reconoció a 4 grupos dentro de la tribu Pachycereae, conformados por las subtribus: Pterocereinae, Myrtillocactinae, Pachycereinae y Stenocereinae. Basándose en datos bioquímicos y morfológicos Gibson y Horak (1978) propusieron que las subtribus Pachycereinae y Stenocereinae tenían un origen monofilético. Recientemente Cornejo y Simpson (1997) construyeron una filogenia de la tribu Pachycereae (Figura 1) basándose principalmente en los trabajos realizados por Arthur Gibson con caracteres morfológicos. Aunque esta filogenia no está completamente resuelta, ni incluye información de la longitud de las ramas, concuerda en topología con la filogenia desarrollada por Wallace (Cornejo y Simpson, op. cit.) una de las más aceptadas actualmente.

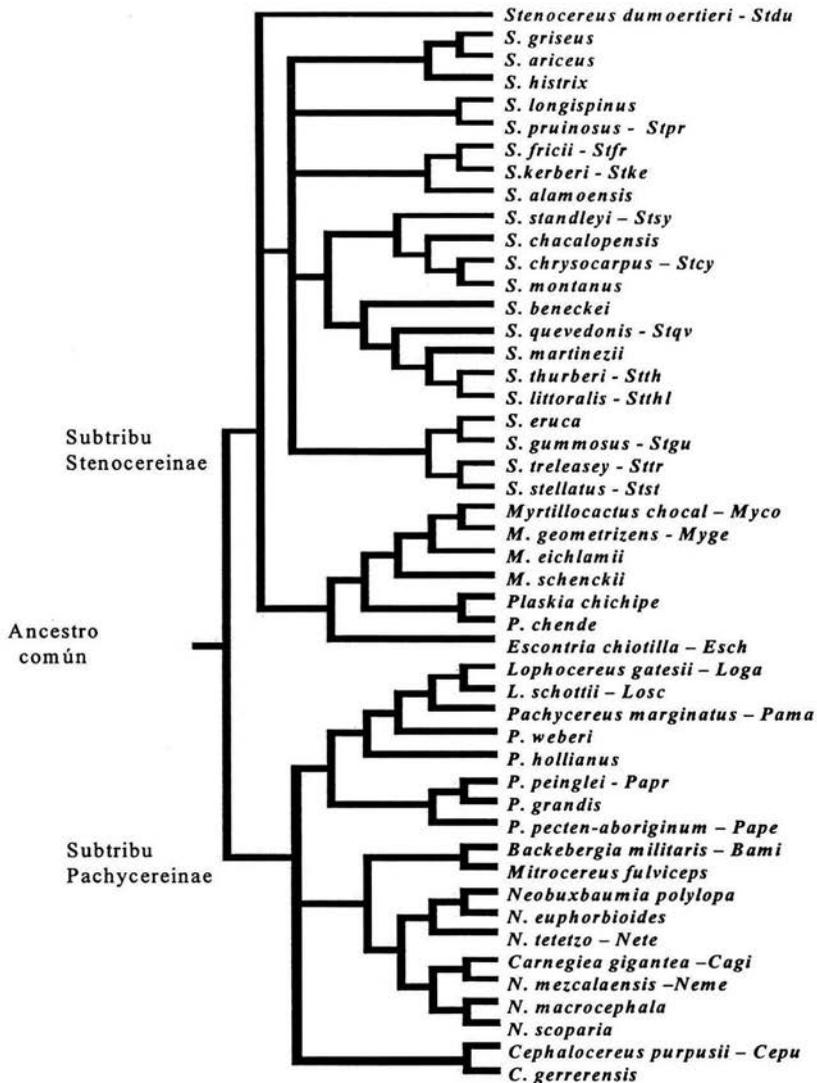


Figura 1: Filogenia de la familia Cactaceae (adaptada de Cornejo y Simpson, 1997).

La familia Cactaceae se ha convertido en una de las especies más codiciadas por los coleccionistas y la afición de muchos coleccionistas por adquirir plantas exóticas como los cactus representa una presión para las poblaciones silvestres, ya que la demanda internacional se ha abastecido fundamentalmente con la extracción de plantas y semillas de su hábitat natural (de manera ilegal). La Norma Oficial Mexicana (NOM_059_ECOL_1994) en la cual se establecen las especificaciones para la protección de especies de flora y fauna silvestres ya incluye 257 especies de cactáceas en alguna categoría en riesgo, 24 en peligro de extinción, 96 amenazadas, 135 raras y 2 sujetas a protección especial, es decir, cerca de la tercera parte de la flora cactológica del país se encuentra amenazada. Del total de estos cactus, el 93% (238 especies) son endémicas de México, tal es el caso del género *Neobuxbaumia* que está constituido por nueve especies todas ellas endémicas de México (Cuadro 1).

Cuadro 1. Especies de *Neobuxbaumia* y su distribución en los estados de la República Mexicana (adaptado de Arias, *et al.*, 1997).

ESPECIE	DISTRIBUCIÓN
<i>N. euphorbiodes</i> (Haw.) Buxb.	San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz y Puebla
<i>N. macrocephala</i> (F. A. C. Weber) Dawson	Puebla
<i>N. mezcalaensis</i> (Bravo) Backeberg	Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca y Puebla
<i>N. multiareolata</i> (E.Y. Dawson) Bravo	Guerrero
<i>N. polylopha</i> (DC.) Backeb.	Guanajuato, Hidalgo, Querétaro y San Luis Potosí
<i>N. sanchez-mejoradae</i> A. Lau	Oaxaca
<i>N. scoparia</i> (Poselger) Backeb	Oaxaca y Veracruz
<i>N. squamulosa</i> Scheinvar y Sánchez-mej.	Colima, Guerrero y Michoacán
<i>N. tetetzo</i> (J. Coult.) Backeberg	Oaxaca y Puebla

Dado que la mayoría de las especies que se encuentran amenazadas, pertenecen a poblaciones pequeñas, presentan distribución restringida, o son especies recientemente descubiertas por la ciencia, se conoce muy poco de su biología (Becerra, 2000). Por lo tanto, resulta de vital importancia conocer y

comprender la naturaleza de este tipo de organismos, que llegan a ser el elemento dominante del paisaje.

1.3 *Neobuxbaumia mezcalaensis* (Bravo) Backeberg

Neobuxbaumia mezcalaensis, fue descrita originalmente por Helia Bravo H. en 1932, como originaria de Guerrero del Río Mezcala en el cañón del zopilote, nombrandose originalmente como *Pilocereus mezcalaensis*, e incluida así en los Anales del Instituto de Biología México (3:379 figs. 3-8). Posteriormente Sukkulentenpflege lo denominó como *Cephalocereus mezcalaensis* Bravo en 1941, W.T. Marshall lo clasifica como *Carnegiea mezcalaensis* (Bravo) en Cactaceae 75:1941; al igual que P.V. Heath, en Calyx 2:109 en 1992 (citas de Arias, *et al.*, 1997). Sin embargo, muchos taxónomos no concuerdan con esta nueva reclasificación de esta especie y siguen nombrándola como *Neobuxbaumia*.

1.3.1. Ubicación Taxonómica

Taxonomicamente *N. mezcalaensis* pertenece a:

Subdivisión: Angiospermae

Clase: Dicotiledónea

Orden: Cactales

Familia: Cactacea

Subfamilia: Cactoidea

Tribu: Pachycerea op cit

Subtribu: Pachycereinae

1.3.2. Anatomía

Son plantas columnares simples de crecimiento apical que ramifican solo por daño en el tallo, mide hasta 14 m de altura (Valiente-Banuet, *et al.*, 1997; Rojas, 1996) de color verde claro ligeramente amarillento, presenta de 13 a 25 costillas angostas. Aréolas en las costillas, distantes entre sí de 18 a 26 mm, provistas de fieltro blanco amarillento, con las aréolas más viejas grisáceas o negruzcas. Las aréolas contienen de 5 a 9 espinas radicales extendidas radiantes aciculares de 8 a 20 mm de longitud,

blancas o amarillentas con la punta morena o rojiza, grisáceas con el tiempo. Espinas centrales de 1 a 4, más largas que las radiales y con la base oscura (figura 2).

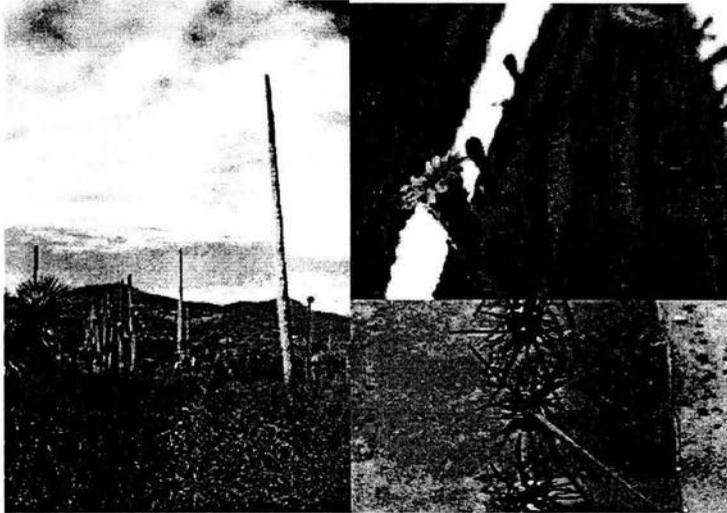


Figura 2: *Neobuxbaumia mezcalaensis*.

1.3.3. Morfología y Fisiología

Las flores de esta cactácea presentan corola de color blanco amarillento con pétalos resistentes y muchas anteras con grandes cantidades de polen; muestran una biología floral de individuos masculinos y hermafroditas (6.5 hermafroditas/planta masculina), la apertura floral es nocturna, la flor permanece abierta sólo por una noche (Fægri y Van der Pijl, 1971; Grant y Grant, 1979; Gibson y Nobel, 1986; Howe y Westley, 1988) durante periodos que varían entre 13 y 15 h. La producción de néctar es elevada llegando a 510 ml (Valiente-Banuet, *et al.* 1997) y se inicia poco antes de la apertura de la flor, se va incrementando a medida que avanza la noche y desciende al amanecer (Fægri y Van der Pijl, 1971; Howe y Westley, 1988; Valiente-Banuet, *et al.*, 1996; Petit y Freeman, 1997). *N. mezcalaensis* como todos los cactus tiene tejidos externos extremadamente gruesos, llamados cutículas, que lo aíslan de su ambiente externo, limitando la pérdida de agua, por lo tanto tienen la capacidad de sobrevivir en los ambientes que contienen

una cantidad limitada de humedad. Casi el vástago entero del cactus es tejido fino parenquimatoso que sirve de almacén de agua, así 80-90% de un individuo es agua, por lo en regiones áridas pueden soportar una pérdida considerable de agua ([www .Projeto_Cactáceas Brasileiras.htm](http://www.Projeto_Cactáceas_Brasileiras.htm)).

1.3.4. Distribución de *N. mezcalaensis* en el territorio mexicano

N. mezcalaensis se distribuye en manchones , aunque se pueden encontrar ocupando grandes regiones conformando bosques de cactáceas columnares en los estados de Puebla, Oaxaca, Morelos, Jalisco, Colima, Michoacán y Guerrero (figura 3).

En la costa michoacana se le puede observar caracterizando la vegetación que crece sobre afloramientos rocosos en climas de tipo semiárido, con temperatura alta; entre el bosque tropical caducifolio y el bosque tropical subcaducifolio. Este clima se debe fundamentalmente al efecto de sombra de lluvia que producen las serranías de Juárez y Zongolica (Villaseñor, *et al.*, 1990).

En Puebla se distribuye desde la provincia denominada Mixteca-Oaxaqueña y abarca varios valles, entre los que destaca el de Tehuacán-Cuicatlán, el cual es considerado como un centro de megadiversidad y endemismo, declarado reserva de la biosfera (Febrero 23, Diario Oficial); Huajuapán de León, Tepelmeme y Zapotitlán, que a su vez forman parte de la Cuenca Alta del Río Papaloapan y en menor proporción de la cuenca Alta del río Balsas. Sus límites orográficos principales son al Este y Noreste la Sierra de Zongolica y al Sur por la Sierra de Juárez. Los valles que conforma la provincia están limitados por una serie de serranía que en conjunto se conoce como Sierra Mixteca, la cual forma parte de la Sierra Madre Oriental.



Figura 3: Mapa de distribución de *Neobuxbaumia mezcalaensis* en los estados de la República Mexicana (basado en Arias, *et al.*, 1997).

1.3.5. Importancia y Polinizadores

Es muy común su uso como cercas vivas, madera para tejados, y forraje para el ganado, además sus flores y frutos son comestibles (Arias, 1993; Casas, *et al.*, 1999), sin embargo, su importancia más relevante es la ecológica, ya que dentro de las tetecheras (término genérico para los bosques de cactáceas columnares) se encuentra el mayor número de especies de aves registradas en este tipo de ecosistemas (90 especies); dentro de las cuales existen especies tanto frugívoras como nectarívoras (*Archilochus colubris*, colibrí) que se alimentan de los frutos y el abundante néctar de las cactáceas; las cactáceas columnares constituyen un recurso importante para muchas especies (Arizmendi y Espinosa, 1996), tanto de aves como de mamíferos, y aunque se ha observado que varias especies de aves e insectos pueden transportar el polen se ha indicado que los principales polinizadores son tres especies de murciélagos, de las cuales, la más frecuentemente observada es *Leptonycteris curasoae*, seguida de *Choeronycteris mexicana* y *Leptonycteris nivalis*, en menor proporción (Valiente-Banuet, *et al.*, 1997); los cuales exhiben una relación mutualista de polinización y dispersión con muchas especies de cactus columnares (Howell y Roth, 1981; Álvarez y González-Quintero, 1970; Arita y Cevallos, 1991; Valiente-Banuet, *et al.*, 1996), estos murciélagos son considerado

como una especie migratoria (Barbour y Davis, 1969; Cockrum y Petryszyn, 1991) que distribuye desde el Sudoeste de los Estados Unidos, hasta el Salvador. En México se presentan en hábitats subtropicales y secos por toda la vertiente del Pacífico penetrando hacia la región central. Su gradiente altitudinal va de 2400m a 1700m, sin embargo, resulta mas factible su presencia en altitudes menores a los 1700m (Cockrum y Petryszyn, op. cit.; Arita y Cevallos, 1991).

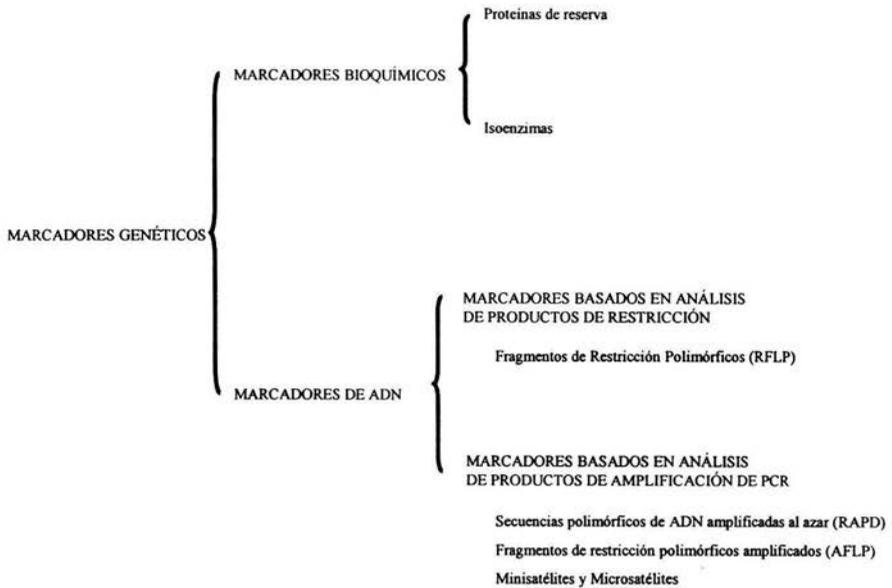
Debido a que *N. mezcalaensis* se describió recientemente, en diversas ocasiones a sido reclasificada y cambiada de género, se conoce muy poco de su biología y debido a que las poblaciones naturales sufren constantes reducciones que las llevan a encontrarse en peligro o amenazadas; es importante conocer la naturaleza genética de esta especie que además de ser endémica de nuestro país, dentro de su género es la más ampliamente distribuida.

1.4 TÉCNICAS MOLECULARES

El uso de las técnicas moleculares ha facilitado la elucidación de una gran variedad de posibilidades, aplicaciones y ventajas que brinda el análisis de los organismos desde el punto de vista genético, ya que permite determinar varios aspectos relacionados con la sistemática, taxonomía, flujo génico, especiación, variabilidad genética y niveles de perturbación que tienen los individuos de una comunidad determinada (Waugh y Powell, 1992). Han permitido observar una gran variabilidad genética en poblaciones naturales (Lenay, 1994; Hartl y Clark, 1989); además de elucidar las estrategias de supervivencia que adoptan.

Un marcador de DNA es una técnica que permite detectar variabilidad genética producto de mutaciones presentes en el DNA. En la actualidad existen diversos métodos para el estudio variabilidad genética, sin embargo, hasta la década de los 60's se contaba con muy pocas técnicas para determinar la variación genética que se basaban en caracteres morfológicos, no obstante, la mayor variación es la que no se ve y se encuentra expresada en el genotipo.

Estas técnicas se clasifican en:



Una de las primeras técnicas son las **proteínas de reserva**, que se estudian mediante: centrifugación, cromatografía, análisis de aminoácidos y electroforesis; tanto en geles de almidón como de poliacrilamida, debido a que las proteínas carecen de actividad enzimática son detectadas en gel por medio de técnicas de tinción. Esta técnica se basa en el hecho que las proteínas de diferentes individuos, poblaciones y especies son homólogas y que al separarse en un gel, producen bandas similares o diferentes. Los estudios genéticos han demostrado que los patrones de bandeo de las proteínas de reserva son heredados como caracteres discretos y en forma codominante, observándose en algunos casos un efecto materno. El número de genes que controlan estas características es reducido y varía de acuerdo a la especie. Como marcadores bioquímicos las proteínas de reserva tienen una baja influencia ambiental, aunque existen algunas excepciones, y permiten un análisis rápido por un método simple. Las variaciones en los patrones electroforéticos pueden deberse a sustituciones, inserciones y pérdidas de nucleótidos. Sin embargo, las diferencias también pueden ser causadas por modificaciones pre y post transcripcional y/o traduccional (Becerra, 2000).

En los años 70's con el avance tecnológico del uso de geles de almidón y la tinción histoquímica de las proteínas, se descubrieron las **isoenzimas**, formas proteicas múltiples que catalizan una misma reacción dentro de un organismo. El efecto de modificaciones alélica es detectado a través de un cambio en la migración electroforética. La sensibilidad electroforética hizo que esta técnica revolucionara los estudios de diversidad genética en diversas especies. La técnica consiste en el macerado en crudo de diversos tejidos para obtener la proteína; posteriormente se emplea una matriz permeable (almidón) que mediante una electroforesis logra la separación de las moléculas en base a la carga eléctrica neta, peso molecular, seguido de una tinción histoquímica. La migración electroforética logra separar enzimas codificadas por familias de genes, llamados isoenzimas que son productos de diferentes alelos de un mismo gen (Machado, *et al.*, 1993)

Sin embargo, el desarrollo tecnológico basado en el DNA (Ácido Desoxirribonucleico) ha permitido un gran y rápido avance en el número de marcadores, entre los que destacan los basados en fragmentos de restricción RFLP (longitud de fragmentos de restricción polimórficos), como los que se basan en productos de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), que han dado origen a múltiples variantes tales como: La amplificación aleatoria del DNA polimórfico (RAPD), Fragmentos Polimórficos de DNA Amplificados (AFLP), minisatélites (VNTR) y microsatélites (SSR), entre otros (Becerra, *op. cit.*).

Dentro de los marcadores de DNA los **RFLP's**, que se basan en el análisis de productos de restricción, permiten estudiar el genoma con una mayor cobertura al incluir secuencias codificadoras y no-codificadoras del DNA (exones e intrones). Esto permite detectar con mayor eficiencia cambios genéticos puntuales, comparado con las proteínas. Permiten la visualización de un gran número de marcadores, no son afectados por el medio ambiente y pueden ser analizados en cualquier etapa de desarrollo. La técnica se basa en la digestión del DNA total (genómico) de un individuo con diferentes enzimas de restricción. Los RFLPs son heredados en forma Mendeliana simple, y su expresión es codominante, permitiendo detectar los híbridos y estudiar el flujo génico entre poblaciones. El nivel de polimorfismo que esta técnica

puede detectar depende en gran medida de la naturaleza de las sondas empleadas, de las enzimas de restricción utilizadas y de la complejidad y tamaño del genoma de la especie en estudio (Becerra, op. cit.).

Por otro lado, los marcadores basados en Productos de PCR son más diversos, por ejemplo, una de las principales técnicas de múltiples aplicaciones dentro de la Genética de poblaciones son los marcadores moleculares **RAPD's** (Random Amplified Polymorphic DNA) desarrollada a partir de 1990 por dos grupos independientes (Welsh y McClelland, 1990; Williams, *et al.*, 1990) como un método que propone la utilización de iniciadores ("primers") arbitrarios para obtener marcadores moleculares en cualquier tipo de genoma aplicando la técnica de la PCR, la cual puede ser aplicado para detectar polimorfismos (expresados como bandas separadas por electroforesis) en una amplia variedad de organismos usando diferentes iniciadores de secuencias arbitrarias. Por lo que el método no requiere de un conocimiento previo del genoma que se desea estudiar. Los iniciadores preferiblemente deben pertenecer a grupos estándar ya conocidos para facilitar la comparación de resultados entre laboratorios y que tengan alrededor de 20 pares de bases. Welsh y McClelland (1990) denominaron el método "arbitrarily primed PCR" (AP-PCR) mientras que Williams, *et al.*, 1990, lo denominaron como "Random Amplified Polymorphic DNA" (RAPD) y a los polimorfismos que se producen proponen llamarlos "marcadores RAPD". Esta metodología destaca como un proceso simple basado en la amplificación de DNA genómico con iniciadores (uno por reacción PCR) de secuencia de nucleótidos arbitraria, que detecta polimorfismos que funcionan como marcadores genéticos. A diferencia de Welsh y McClelland, los iniciadores propuestos por Williams, *et al.*, 1990, tienen sólo 9 ó 10 nucleótidos de longitud y una composición en G+C de entre 50% y 80%. Cada iniciador amplifica por PCR varios segmentos de DNA (detectados por electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio) y en muchos de ellos aparecen polimorfismos entre las especies analizadas (tanto de organismos procariotas como de eucariotas). Una importante particularidad que presentan los marcadores RAPD es su carácter dominante, ya que no es posible distinguir cuando un segmento de DNA ha sido amplificado a partir de un locus heterocigoto (+/-) u homocigoto (+/+) (Staub y Serquen, 1996).

El método RAPD (como se conoce actualmente) (figura 4) es ampliamente aplicado, por su simplicidad y bajo costo, no requerir de marcadores radioactivos y utilizar cantidades mínimas de DNA. El polimorfismo detectado puede deberse a un simple cambio de un par de bases, inserciones o deleciones, que modifican o eliminan el sitio de acoplamiento del "primer". Debido a su "herencia dominante", los marcadores RAPD se expresan como presencia o ausencia de un producto amplificado, lo cual se traduce en una pérdida de información si se les compara con marcadores heredados como "codominantes", como es el caso de las isoenzimas. Sin embargo, los RAPDs proveen una enorme fuente de datos y por lo tanto pueden ser más informativos acerca de la estructura de las poblaciones y su diversidad genética que las isoenzimas (Campbell, *et al.*, 1999).

Una de las principales preocupaciones que se suscitó para la aplicación del método RAPD fue la reproducibilidad los resultados obtenidos. Para poder garantizar la reproducción de los resultados, al iniciarse un estudio con aplicación de este método, deben establecerse las condiciones óptimas de trabajo en los dos pasos fundamentales del proceso: extracción y amplificación del DNA, en el caso de la extracción existen protocolos bien establecidos para la extracción del DNA de tejidos vegetales (Doyle y Doyle, 1990; Guillemaut y Maréchal-Drouard, 1992; Luo, *et al.*, 1992; Thomson y Henry, 1993).

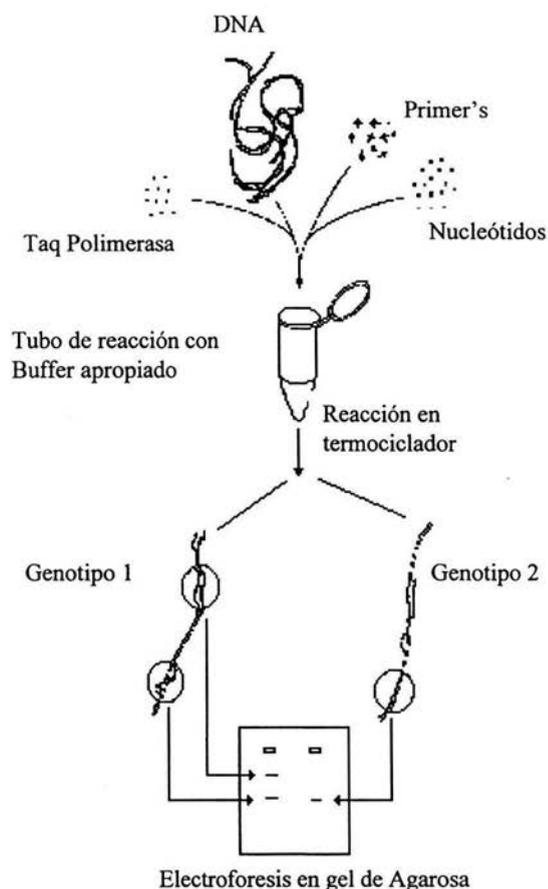


Figura 4: Técnica de RAPD's

En el caso de la aplicación del método RAPD se ha sugerido que las sustancias contaminantes que precipitan junto al DNA en el etanol son una de las primeras causas de la falta de reproducibilidad en los resultados, debido a que estos contaminantes pueden afectar la inserción efectiva del iniciador (Micheli, *et al.*, 1994). Por lo que se debe de realizar una estandarización del protocolo de amplificación para establecer las concentraciones óptimas, de acuerdo al material a utilizarse; Mg^{2+} , enzima Taq DNA Polimerasa, el iniciador y el DNA. Una vez estandarizadas las condiciones, éstas deben mantenerse invariables durante todas las reacciones PCR en las cuales se utilice el material biológico para el cual fueron

establecidas, en cuyo caso dichas precauciones no parecen garantizar un 100% de reproducibilidad de los resultados, aunque Skroch y Nienhuis (1995), sostienen que esta depende estrechamente de la uniformidad en las condiciones de amplificación de los experimentos.

Otra de las técnicas basada en el método de reacción de PCR son los **AFLP's** (Polimorfismos en longitud de fragmentos amplificados), los cuales desarrolló Zabeau en 1993. Esta técnica combina la especificidad, resolución y poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción con la velocidad y practicidad de detección de polimorfismo vía PCR. Una de las mayores ventajas de esta técnica es que en una sola reacción se pueden identificar alrededor de 50 loci (Zabeau, op. cit.).

Al igual que RAPD, el AFLP son heredados predominantemente. Esto quiere decir que no es posible distinguir si una banda en el gel es resultado de la amplificación de uno (+/-) o de dos alelos (+/+).

Las secuencias de DNA de **mini (VNTR)** y **microsatélites (SSR)** son dos técnicas de secuencias de repetidos que se presentan en eucariontes. Estas se encuentran repetidas en "tandem" (sucesivamente) y dispersas a través del genoma representando muchos loci. Cada locus tiene distinto número de repetidos variable, asociándose de esta manera a alelos específicos de alta variabilidad. Los minisatélites son usados como sondas de secuencias simples repetidas, la técnica es de alta reproducibilidad, aunque requiere de un proceso de clonación previo de la sonda, además, se requiere de un DNA de alta calidad para el proceso de restricción y transferencia (Southern Blot) e hibridación con la sonda, generalmente marcada radioactivamente y finalmente de la visualización de los productos de hibridación se efectúa mediante la exposición a una película de rayos X.

La segunda categoría de secuencias repetidas son los microsatélites. Estos son secuencias de 1 a 5 nucleótidos repetidas en tandem y existen en forma abundante en plantas. Mediante los microsatélites se puede medir la diversidad

entre genotipos amplificando mediante PCR la región del ADN genómico que contiene estas secuencias repetidas. Las regiones que contienen secuencias sencillas repetidas son amplificadas individualmente a través de PCR a partir de un par de partidores específicos, de 20 a 30 bases, complementarias a las secuencias únicas que flanquean el microsatélite. Los segmentos amplificados a partir de estos sitios presentan un extenso polimorfismo resultante de la presencia de diferentes números de elementos repetidos. Así, cada "isla" microsatélite, independientemente del elemento repetido (CA, TG, ATG, etc.) constituye un locus genético altamente variable, multialélico, de gran contenido informativo. Cada segmento amplificado de diferente tamaño representa un alelo distinto del mismo locus.

Aunque, el uso de marcadores bioquímicos y moleculares es limitado por el costo de los reactivos, y en algunos casos por el elevado costo de los equipos, los avances técnicos que estas tecnologías han alcanzado en los últimos años los hacen más accesibles a los genetistas y a los programas de mejoramiento. La elección del marcador a usar depende de los objetivos del estudio, del costo y de las características que cada uno de ellos presenta (Cuadro 2).

Cuadro 2: Características Generales de los Marcadores Genéticos
(tomado de Becerra y Paredes, 1999).

CARACTERÍSTICA	PROTEÍNA	ISOENZIMA	RFLP	RAPD	VNTR	AFLP	SSR
Polimorfismo	alto	bajo	bajo- alto	medio- alto	medio- alto	medio- alto	medio- alto
Estabilidad Ambiental	alta	moderada	alta	alta	alta	alta	alta
Número de Loci	bajo	medio	alto	alto	alto	alto	alto

Según Ferreira y Grattapaglia (1989), en las últimas décadas se ha observado un notorio aumento en el uso y aplicación de los marcadores genéticos para estudios de diversidad genética. Algunos de estos tienen diferentes bases moleculares, pero todos están enfocados a determinar la organización de la estructura genética en las poblaciones naturales y cultivadas. Revelan la similitud entre y dentro de las

poblaciones, evitando el efecto ambiental observado en los análisis morfológicos. Estimar la variabilidad entre los individuos y entre las poblaciones es de gran utilidad en los programas de mejoramiento genético y conservación, ya que permite además de conocer la organización del material genético, realizar una selección adecuada de los genotipos superiores que complementada con datos fenotípicos y agronómicos permite desarrollar poblaciones mejoradas o mejor representada.

1.5. GENÉTICA DE POBLACIONES

La variabilidad genética se ilustra mediante la genética de poblaciones que es un método cuantitativo y predictivo, el cual trata de explicar los procesos de adaptación y ayuda a entender los procesos de especiación (Hartl y Clark, 1989) mediante el análisis de los cambios en las frecuencias alélicas (evolución). Por lo tanto, cualquier fuerza o fenómeno que genere cambios en las frecuencias alélicas genera evolución. Este tipo de estudios se encuentran ubicados dentro del estudio de la microevolución y junto con la ecología son una de las pocas disciplinas biológicas que cuentan tanto con un desarrollo teórico como con uno observacional (Lewontin, 1974)

El desarrollo de la genética de poblaciones se basa en las leyes y teorías Mendeliana y Darwiniana; así como los modelos matemáticos y estadísticos de Fisher y Wright, entre otros, que actualmente constituyen la teoría Neodarwiniana (Clark, 2000).

Los cambios microevolutivos dentro de las poblaciones son generados por las fuerzas evolutivas tales como: mutación, deriva génica, migración y selección natural. Estas mismas fuerzas son las responsables de las variaciones (aumento o disminución) en las frecuencias alélicas; y son estas variaciones de las que son cuantificadas dentro de la estructura génica, lo que permite determinar y predecir el estado actual de las poblaciones, hacer predicciones o reconstruir su historia evolutiva (Wallace, 1974).

Las principales herramientas de esta disciplina fueron planteadas por Hardy y Weinberg los cuales establecieron en términos algebraicos el comportamiento de las frecuencias alélicas a través del tiempo bajo el supuesto de la ausencia de fuerzas evolutivas (mutación, deriva génica, migración y selección natural) Estableciendo la ley del equilibrio de Hardy-Weinberg, la cual evalúa lo que sucedería si no existiera evolución y predice que:

$$\begin{aligned}D &= p^2 \\H &= 2pq \\R &= q^2\end{aligned}$$

Donde **D** es la frecuencia genotípica de los homocigotos **AA**, **H** es la frecuencia genotípica de los heterocigotos **Aa**, **R** es la frecuencia de los homocigotos recesivos **aa**, **p** es la frecuencia del alelo dominante **A** y **q** la frecuencia del alelo recesivo **a** ; para lo que se establece la siguiente igualdad

$$D+H+R= 1, \text{ es decir, } (p^2+2pq+q^2)=1$$

Esta ley nos permite establecer el efecto de las fuerzas evolutivas mediante las proporciones de las frecuencias alélicas. Este caso hipotético esta sustentado en una serie de supuestos, como son: Que los organismos dentro de la especie se aparean todos con todos, y de manera aleatoria (panmixia), que el tamaño de la población es infinito, que las generaciones no se sobrelapen y que el material genético de los organismos no sufra alteraciones (no hay mutaciones), lo que permite que las frecuencias alélicas sean constantes y se traduciría en la ausencia de evolución, aunque esto no se observa dentro de las poblaciones naturales. Es aquí donde entra el marco observacional y la predicción tratan de explicar los fenómenos que han llevado a la población a su estado actual (Loveless y Harmick, 1984).

Sus principales aplicaciones son la comprensión y predicción de los procesos evolutivos, reconstrucciones filogenéticas, así como describir la estructura espacio temporal de las poblaciones (Wallece, op. cit.).

1.6. DIVERSIDAD MORFOLÓGICA Y GENÉTICA

1.6.1 Diversidad morfológica

La variación morfológica o fenotípica esta ampliamente descrita y estudiada desde los primeros naturalistas, sin embargo la mayor variación es la que no se ve y se encuentra expresada en el genotipo. Esta variación es regida por las bases genéticas y moldeada por los aspectos y condiciones ambientales, los cuales, pueden lograr que individuos genéticamente iguales en condiciones diferentes expresen características morfológicas muy diferentes, lo cual puede atribuirse a la plasticidad fenotípica. Es aquí donde deben de integrarse los aspectos cuantitativos y observacionales dentro de la genética de poblaciones en las predicciones sobre el estado espacio temporal de las poblaciones.

1.6.2 Diversidad genética

El estudio moderno de los procesos evolutivos esta basado en comprender los niveles de variación genética, los procesos por los cuales esta se origina y los factores que alteran los patrones de variación en las poblaciones (Futuyama, 1998). La variación genotípica es un estimador proporcional de los loci polimórficos, denominada como P y es una medida directa de la variación entre individuos, familias, géneros o especies.

1.7. FUENTES DE VARIACIÓN GENÉTICA

La variabilidad genética expresada en los organismos diploides se fundamenta en el principio de Hardy-Weinberg, el cual establece que en las poblaciones panmíticas y en ausencia de fuerzas evolutivas las frecuencias alélicas permanecen constantes y no hay evolución (Futuyama, op. cit.). Estas fuerzas están constituidas por: la selección natural, la migración, la deriva génica, la endogamia y la mutación, que expresan su efecto en el genotipo de las poblaciones y por tanto logran modificar las frecuencias alélicas y por tanto la variación. La manera como se distribuye la variación genética dentro y entre poblaciones constituye su estructura genética. Describir la estructura genética de las poblaciones es el paso previo para comprender como las fuerzas evolutivas han actuado en la evolución de estas poblaciones (Loveless y Harmick, 1984).

1.7.1 La selección natural es básicamente un proceso que ocurre cuando existe una sobrevivencia y reproducción diferencial de genotipos; es decir, cuando los genotipos difieren en su habilidad para sobrevivir y reproducirse en un ambiente. Como resultado las frecuencias alélicas pueden cambiar gradualmente o permanecer estables promoviendo una mayor adaptación al ambiente (Hartl y Clark, 1989).

1.7.2 La deriva génica es una fuerza por medio de la cual hay fluctuaciones impredecibles de las frecuencias alélicas de una población, es decir, es un cambio en el reservorio génico que ocurre como resultado del azar. Los genetistas de poblaciones y otros biólogos evolutivos generalmente concuerdan en que la deriva génica desempeña un papel determinante en el curso evolutivo de las poblaciones. Sin embargo, su importancia relativa, comparada con la de la selección natural, es un asunto que se debate. Hay cuando menos dos situaciones en las cuales se ha demostrado su importancia.

1.7.2.1 El efecto fundador: En el cual, una población pequeña que deriva por bifurcación de una más grande puede ser no representativa genéticamente de esta última. Algunos alelos raros pueden estar representados en exceso o perderse por completo. En consecuencia, cuando la población pequeña aumenta de tamaño, tendrá una composición y un reservorio genético diferentes al del grupo de origen.

1.7.2.2 El cuello de botella de la población: aparece cuando el número de miembros de una población se reduce drásticamente por un acontecimiento que tiene poca o ninguna relación con las fuerzas habituales de la selección natural. Un cuello de botella en una población no sólo tiende a eliminar por completo algunos alelos, sino también a que otros estén representados excesivamente en el reservorio génico.

Debido a que el tamaño de las poblaciones restringidas es generalmente bajo, la deriva génica es la principal causa de la pérdida de diversidad.

La dispersión de las frecuencias alélicas, producida en la deriva es mayor cuando el número de individuos es muy reducido, y por lo tanto, la deriva puede considerarse como presente en todas las poblaciones naturales cuyo tamaño poblacional es pequeño y /o poblaciones que han pasado por un cuello de botella. La deriva génica se asemeja considerablemente a la endogamia ya que en ambos casos se produce una deficiencia de heterocigosidad (Futuyama, 1998).

1.7.3 La endogamia es un fenómeno que reduce la frecuencia de heterocigos e incrementa la frecuencia de homocigos dentro de una población (Futuyama, op. cit.). Los efectos en las frecuencias genotípicas son especialmente evidentes en especies de plantas que practican la autopolinización, ya que la autopolinización reduce la heterocigosidad (Futuyama, op. cit.). La endogamia puede ser ocasionada también por cruza entre parientes, motivada por un número pequeño de individuos efectivos, que contribuyen a la reproducción en poblaciones naturales (Ellstrand y Elam, 1993).

1.7.4 La migración o flujo génico puede contrarrestar el efecto homogenizador entre las distintas poblaciones y si esta continua por mucho tiempo, paulatinamente las poblaciones serán más idénticas (Futuyama, 1998). Este proceso depende de dos cosas: A) la tasa de migración (m), definida como la proporción de individuos que llegan a la población; y B) la frecuencia alélica de los individuos migrantes. El flujo génico puede aumentar la variabilidad genética existente de una población y dicha variación puede ser importante desde el punto de vista selectivo, sin embargo, la migración puede también introducir genes adaptados a otras condiciones y en consecuencia disminuir la adaptación promedio de la población (Slatkin, 1987). El movimiento de genes entre poblaciones tiene una influencia significativa sobre la estructura genética de las poblaciones. Las altas tasas de flujo génico incrementan los tamaños efectivos de la población y reducen la diferenciación genética entre poblaciones, que podría darse por procesos de deriva génica o selección. De esta forma, las especies con mayor flujo génico muestran una menor diferenciación entre poblaciones que las especies con un flujo génico restringido (Hamrick y Godt, 1989).

1.7.5 La mutación es una de las fuerzas más importante ya que es la fuente original de la variación, sin embargo, las tasa de mutación en la naturaleza son muy bajas: en promedio un locus presenta una tasa cercana a 10^{-6} a 10^{-5} mutaciones por gameto por generación, mientras que la tasa de mutación promedio para pares de bases es de aproximadamente 10^{-9} . Por lo que, la mutación es una fuerza que produce pocos cambios en las frecuencias alélicas (Futuyama. 1998).

1.8 DISTRIBUCIÓN AMPLIA vs. RESTRINGIDA

Aunque son pocos los estudios comparativos con especies de diferente rangos de distribución geográfica, en plantas se sabe que las especies con una distribución más restringida, tales como las endémicas (Krukkeberg y Rabinowitz, 1985; Hamrick y Godt, 1996) o especies que en el pasado han presentado problemas reproductivos o incluso un cuello de botella (Eguiarte y Piñero, 1990) llegan a presentar patrones de diversidad genética bajos, comparados con especies que presentan una distribución más amplia (Karron, 1987; Waller, *et al.*, 1987).

En estos casos se deben de combinar los datos genéticos con otro tipo de estudios ecológicos de los habitats para tratar de comprender los bajos niveles de variación que pueden deberse a lo específico del habitat de las especies, problemas en la dispersión de las semillas e incluso ausencia del o los polinizadores. Por su parte, Hamrick, *et al.*, (1979) aseguran que los factores históricos pueden explicar de mejor manera los niveles de variación de especies con diferentes tipos de distribución geográfica. Por el contrario, Patrick (1980, citado en Clark, 2000) sugiere que las especies restringidas en ocasiones tienen una mayor variación genética dentro de sus poblaciones que especies de amplia distribución. Debido a que estas, pueden tener una mayor adaptación local al ambiente, que contribuye a que sus poblaciones sean genéticamente diversas.

Existen excepciones en las que se observa mayor variación genética en especies con distribución restringida, como por ejemplo en los estudios realizados por Sysmsma y Schaal (1985) con cuatro especies de hábitat restringido y una de

amplia distribución del género *Lisianthus*, ellos encontraron que las especies restringidas presentan mayor variabilidad en términos de polimorfismo y número de alélos por locus, con respecto a las especies de amplia distribución en la que no se detectó variación en ninguno de los loci analizados.

1.9 ANTECEDENTES

A pesar de que son pocos los estudios comparativos entre especies cercanas filogenéticamente y con distribuciones geográficas constantes, se ha observado que el patrón encontrado generalmente es de mayor diversidad genética en especies más ampliamente distribuidas, con relación a especies de hábitat restringido (Karron, 1987). Por ejemplo, Pleasants y Wendel (1989) encontraron que la especie *Erythronium albinum* presenta mayor diversidad genética que la especie endémica *E. propullans*. Sin embargo, existen excepciones en las que se observa mayor variación genética en especies con distribución restringida, como por ejemplo en los estudios realizados por Sysmsa y Schaal (1985) con cuatro especies de hábitat restringido y una de amplia distribución del género *Lisianthus*, ellos encontraron que las especies restringidas presentan mayor variabilidad en términos de polimorfismo y número de alélos por locus, con respecto a las especies de amplia distribución en las que se detectó muy poca variación entre los loci analizados.

El enfoque que ha sido usado para estimar el efecto de características ecológicas sobre la estructura genética de plantas es la comparación de especies del mismo género que difieren en uno a más atributos ecológicos (Clark, 2000).

En la actualidad, el método RAPD ha sido ampliamente utilizado para determinar los niveles y modelos de diversidad genética tanto en especies sexuales como clonales (individuos genéticamente idénticos). Chalmers, *et al.*, (1992) realizaron un trabajo pionero sobre la utilización de los marcadores RAPD para estimar la variación genética intra e interpoblacional en poblaciones naturales del género *Gliricidia*, árbol leguminoso americano, de fertilización cruzada (alógamo), de múltiples usos, como un requisito para optimizar estrategias de muestreo y conservación de recursos genéticos; encontrando en este caso una alta diversidad

interpoblacional mayor que la intrapoblacional.

Un estudio de variación intra e interpoblacional realizado por Nebauer, *et al.*, (1999) utilizando marcadores RAPDs en la especie medicinal *Digitalis obscura* (especie también alógama), mostró que la mayor variación ocurría entre individuos dentro de las poblaciones, que según los autores es lo esperado en especies con fertilización cruzada.

En un análisis de variación genética entre diferentes poblaciones de la conífera *Picea mariana* en Canadá (Isabel, *et al.*, 1995) en el cual, los autores reportan una total congruencia entre los estimados de diversidad genética obtenidos tanto por datos isoenzimáticos como por los loci RAPDs. En un estudio similar, Porebski y Catling (1998) al comparar dos subespecies norteamericanas y una sudamericana de *Fragaria chiloensis* encontraron por medio de RAPDs, que la mayor diversidad genética se encuentra en las poblaciones de la subespecie canadiense, sugiriendo que el germoplasma de la *Fragaria* silvestre canadiense debe ser protegido y utilizado para mejorar los cultivos.

En otros estudios se analiza la cosegregación de marcadores RAPD (en F2) junto con caracteres fenotípicos contrastantes, para encontrar genes relacionados con la evolución fenotípica, como es el caso de la especie Asteracea *Microseris pymeaea* de aparición reciente (Van Houten, *et al.*, 1994).

El mayor campo de aplicación de los RAPD a nivel intraespecífico ha sido en poblaciones de plantas cultivadas. Este método ha servido múltiples veces en la separación e identificación de cultivos, como por ejemplo, en coles (*Brassica oleracea*) (Kresovich, *et al.*, 1992; Divaret, *et al.*, 1999), crisantemos (*Dendranthema grandiflora*) (Wolf y Peters-Van Rijn, 1993) y chícharos (*Pisum sativum*) (Samec, *et al.*, 1998). Además, ha permitido evaluar las relaciones genéticas, por ejemplo, entre cultivos (ancestrales, modernos, regionales) y poblaciones naturales indígenas del tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Williams, 1993); entre subespecies y cultivos de arroz (*Oryza sativa*) de tierras altas, adaptados a sequía y tierras bajas, adaptados a

humedad (Yu y Nguyen, 1994) y entre variedades de maíz (*Zea mays*) desarrolladas por culturas agrícolas nativas norteamericanas de la región de "Las Grandes Planicies" (Moeller y Schaal, 1999).

Para cactáceas, son pocos los estudios que se han realizado utilizando marcadores moleculares, y se limitan casi todos a aspectos morfológicos, fisiológicos o ecológicos como en el estudio realizado por Bernal y Terrazas (1997), en el cual hizo un estudio de comparación anatómica de *Neobuxbaumia tetetzo*, de Zapotitlán de las Salinas, Puebla, que puede ser afectada por factores genéticos, geográficos y ecológicos, encontrando diferencias entre individuos que crecen en regiones contrastantes y las diferencias de individuos de una misma zona, indican que las características están asociadas a la edad de los individuos. Vite, *et al.*, (1997), estudiaron individuos que parecían combinar características de las dos especies de cactáceas columnares más conspicuas del Valle de Zapotitlán, Puebla: *Cephalocereus columna trajani* y *N. tetetzo*, por lo que realizaron un estudio morfométrico de individuos de las dos especies y de sus supuestos híbridos, comprobando su hipótesis.

Guzmán y Aranda (1997), analizaron el porcentaje de germinación y latencia de diversas cactáceas entre ellas *N. tetetzo* a diferentes temperaturas, encontrando que las semillas guardan estrategias para germinar cuando las condiciones son adecuadas. Rojas, *et al.*, (1996), en cámaras de germinación estudiaron el efecto de la temperatura en siete especies de cactáceas columnares como *N. tetetzo* y cuatro biznagas, para conocer el efecto de las fluctuaciones de temperatura que se presentan en diferentes épocas del año en el sitio de estudio, reportando que las especies columnares tienen un rango más amplio de respuesta y que son más tolerantes a las bajas temperaturas que las biznagas.

Clark (2000) realizó un estudio sobre la estructura genética de dos cactáceas columnares del desierto sonorense: *Stenocereus gummosus* y *S. eruca* (Cactacea). Esparza, *et al.*, (1997), realizaron un estudio poblacional de *N. macrocephala*, para analizar su estado de conservación en base a su densidad, encontrando que el 74%

de los individuos son plántulas, lo que genera una tasa de crecimiento positiva. Godínez-Álvarez (2000), estudió la demografía de *N. tetetzo* en el Valle de Tehuacán, Puebla, reportando que estadísticamente esta población se encuentra en equilibrio, para *N. macrocephala* y Esparza, *et al.* (1999) realizaron un estudio de dinámica poblacional en el mismo lugar.

Algunos de los primeros estudios sobre variabilidad genética que se han realizado con marcadores moleculares en el género *Neobuxbaumia* son los realizados en el laboratorio de Bioquímica Molecular en la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FES Iztacala, UNAM, por Martínez-García, *et al.* (enviado) y Alejos (2002) en las especies *N. tetetzo* y *N. macrocephala* respectivamente. En donde se encontraron niveles de diversidad genética superiores a los esperados para especies endémicas de distribución restringida y en el caso de *N. tetetzo*, se encontró que las poblaciones se encuentran en proceso de estructuración, en el cual, el flujo de la información genética solo ocurre dentro de los sitios en donde se distribuye.

Por lo que en el presente trabajo se planteo la siguiente hipótesis y objetivos:

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

A pesar de que son pocos los estudios comparativos entre especies cercanas filogenéticamente y con distribuciones geográficas constantes, se ha observado que el patrón encontrado generalmente es de mayor diversidad genética en especies ampliamente distribuidas con relación a especies de hábitat más restringido y presentan mayor diversidad genética que las especies endémicas. Por lo que para *N. mezcalaensis*, debido a su mayor distribución, se espera encontrar un patrón de mayor diversidad genética con respecto a sus congéneres *N. tetetzo* y *N. macrocephala*, analizados anteriormente y que presentan una distribución más restringida.

2.2 OBJETIVO GENERAL

Estimar el grado de variabilidad genética de la cactácea columnar *Neobuxbaumia mezcalaensis* en las localidades del Valle de Tehuacán-Cuicatlán y la cuenca del río Balsas, mediante marcadores moleculares tipo RAPD's.

2.3 OBJETIVOS PARTICULARES

- a. Estandarización del análisis de polimorfismos genéticos utilizando técnicas moleculares RAPD's, en fragmentos de costilla de los organismos muestreados.
- b. Comparar la diversidad genética inter e intrapoblacional de *N. mezcalaensis* mediante Índice de Shannon.
- c. Determinar el flujo génico y la estructura poblacional de *N. mezcalaensis* por medio del Análisis de Varianza Molecular.
- d. Realizar comparaciones de los parámetros de diversidad de *N. mezcalaensis* en los diferentes sitios muestreados.
- e. Realizar comparaciones entre diferentes especies a partir de los valores de diversidad.
- f. Realizar correlaciones de los parámetros biológicos y edáficos con los datos genéticos.

IZT.



3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ZONA DE ESTUDIO

Para la realización del presente trabajo se seleccionaron 6 localidades comprendidas entre los 18 y 21° de latitud Norte; en esta franja se localizan dos zonas importantes, la cuenca del Río Balsas y el Valle de Tehuacán-Cuicatlán (figura 5) que son considerados el centro de diversificación de las cactáceas (Arizmendi y Espinosa, 1996). Tanto el Valle de Tehuacán-Cuicatlán como la cuenca del Balsas son regiones cálidas semiáridas que se caracterizan por una alta concentración de endemismos y porque las cactáceas columnares constituyen el elemento dominante del paisaje (Rzedowski, 1978).

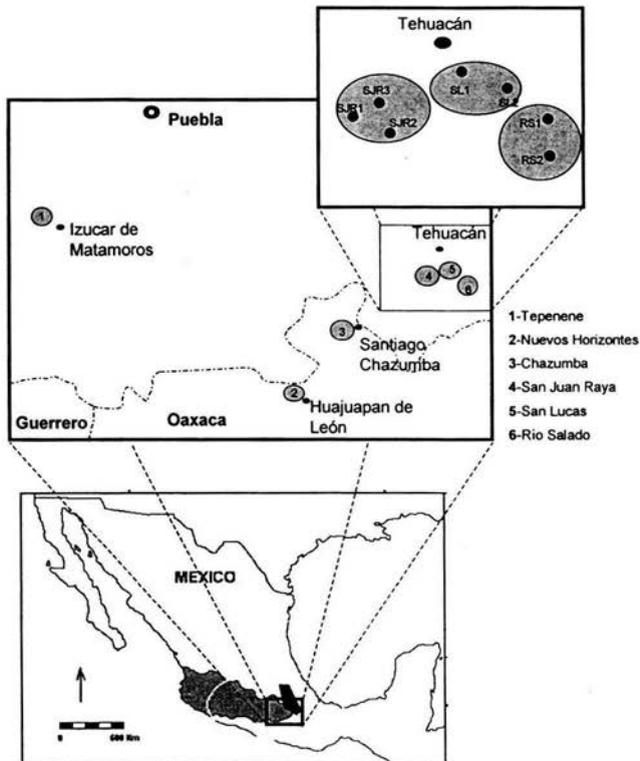


Figura 5: Mapa de la zona de estudio, ubicación geográfica de los sitios de colecta en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán y la Cuenca del Río Balsas.

Se colectaron un total de 100 individuos adultos de *N. mezcalaensis* en 10 cuadrantes de 6 diferentes poblaciones, dentro del Valle de Tehuacán–Cuicatlán, en San Juan Raya se muestrearon tres cuadrantes (SJR1, SJR2 y SJR3); en San Lucas dos cuadrantes (SL1 y SL2) y en las riberas del Río Salado dos cuadrantes (RS1 y RS2) y para la Cuenca del Río Balsas se realizaron muestreos en tres localidades; Tepenene (T), Nuevos Horizontes (NH) y Santiago Chazumba (CH). El número de Individuos y cuadrantes colectados varió dependiendo de la distribución y densidad en las poblaciones (Cuadro 3).

Cuadro 3: Datos de colecta, sitios, cuadrantes, ubicación y número de individuos de *N. mezcalaensis* colectados para el estudio.

COLECTA	SITIO/CUADRANTE	UBICACIÓN	IND. COLECTADOS	IND. ANALIZADOS
1	Tepenene	N 18° 13' 32.9" O 98° 08' 4.7"	10	9
	Nuevos Horizontes	N 18° 30' 0.05" O 98° 24' 17.9"	10	10
	Chazumba	N 18° 11' 54.4" O 97° 39' 56.8"	10	9
	San Juan Raya (1)	N 18° 19' 18" O 97° 39' 53"	8	3
	San Juan Raya (2)	N 18° 19' 08" O 97° 38' 21"	10	6
	San Juan Raya (3)	N 18° 19' 59" O 97° 38' 38"	10	7
3	San Lucas (1)	N 18° 18' 55" O 97° 37' 45"	6	5
	San Lucas (2)	N 18° 19' 39" O 97° 35' 47"	12	12
	Río Salado (1)	N 18° 19' 25.9" O 97° 33' 43.1"	12	12
	Río Salado (2)	N 18° 19' 25.9" O 97° 33' 43.1"	12	12

Las distancias calculadas entre los sitios de colecta mediante GPS y las cartas geográficas fueron de 7.23 hasta 92 Km.

3.2 COLECTA DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Se realizaron tres salidas de campo para los muestreos en el Valle de Tehuacán–Cuicatlán y Cuenca del Balsas, en los cuales, se colectaron 6 diferentes poblaciones de *N. mezcalaensis*, en las que se trazaron cuadrantes de 50X50 m y se colectaron de 5-13 individuos por población, estos presentaban una altura de más de 10m, en algunos casos se redujo el número de individuos analizados por dificultades en la obtención del DNA genómico del material biológico, debido a la presencia de compuestos secundarios.

Para detectar una mayor variabilidad entre los individuos, se procuro colectar plantas alejadas por lo menos dos metros entre individuos dentro de una misma población y un kilómetro entre cuadrantes.

Las coordenadas de los sitios de muestreo se estimaron vía satélite con la ayuda de un Sistema de Posición Global (GPS) y cartas geográficas del INEGI (escala 1:250000).

Las muestras colectadas fueron fragmentos de costilla de aproximadamente 10 cm de largo tomados a una altura de aproximadamente 1.5 m de la base (figura 6), estos fragmentos se envolvieron en papel de estraza cada una por separado, se etiquetaron con los datos de colecta y se transportaron a temperatura ambiente al laboratorio de Bioquímica Molecular de la UBIPRO de la FES-Iztacala, para su posterior tratamiento y análisis.

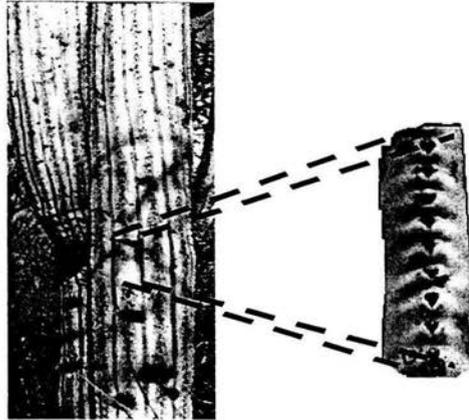


Figura 6: Obtención de la muestra de tejido parenquimático de *N. mezcalaensis*.

Una vez en el laboratorio se cortaron en rebanadas delgadas transversales de tejido parenquimático (10-15 g) que facilitan el macerado, los fragmentos se envolvieron en papel autoadherible y aluminio antes de ser sumergidos en un recipiente con nitrógeno líquido para evitar la degradación y actividad de las nucleasas, después de lo cual se trasladaban a un ultra congelador vertical (REVCO) a -70°C para su almacenamiento hasta ser procesadas y analizadas de acuerdo al siguiente diagrama (figura 7).

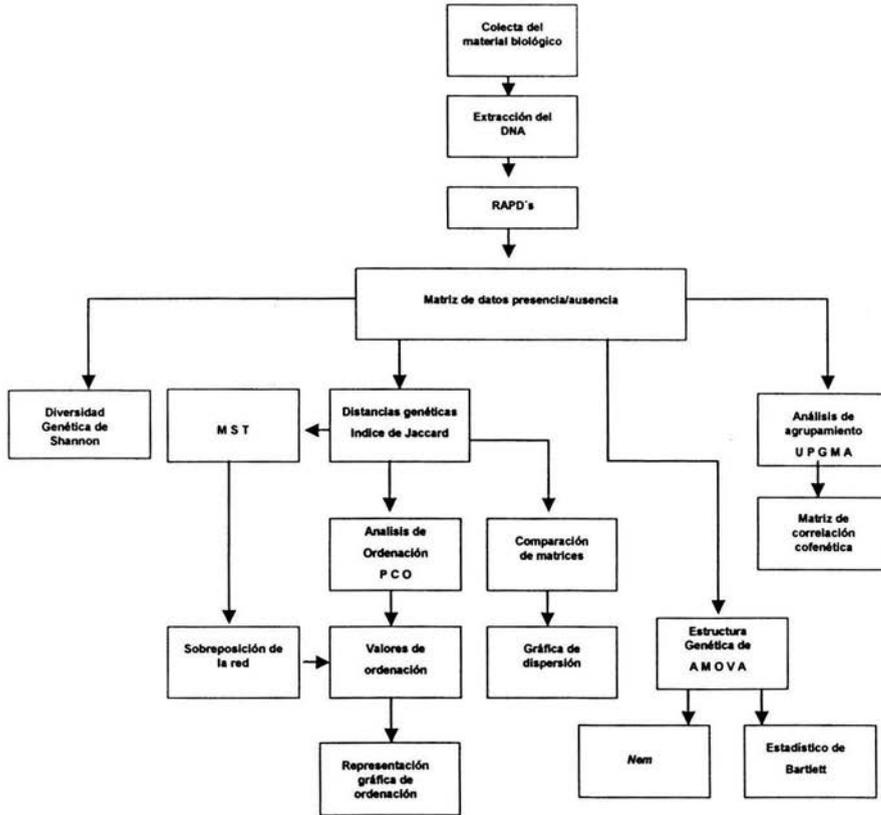


Figura 7: Diagrama de flujo del manejo de las muestras y análisis estadístico realizados a 85 muestras de *N. mezcalaensis* y 7 referencias externas (5 de *N. macrocephala* y 2 de *N. tetetzo*).

3.3 EXTRACCIÓN DEL DNA

La extracción de DNA genómico de cactáceas columnares se fundamentó en dos protocolos diferentes: el primero desarrollado por Dellaporta, *et al.*, (1983) y el segundo de acuerdo con la técnica de CTAB (Doyle y Doyle, 1990) con algunas modificaciones (Anexo 2). Ambas técnicas consisten en pulverizar el tejido congelado con nitrógeno líquido. El polvo resultante es sometido a diferentes reacciones basadas en su afinidad química, las cuales van a purificar el DNA, que posteriormente es almacenado a 4°C.

De acuerdo a la técnica de CTAB (Doyle y Doyle, op cit.) se empleó el polvo fino del tejido parenquimático al que se le agregó buffer de extracción CTAB 2x (CTAB 2% PV40 2% Tris pH 8.0 100mM, EDTA pH 8.0 20mM, NaCl 1.4M, β -Mercapto-etanol 0.2%) el cual fue precalentado aproximadamente a 40°C antes de agregar el polvo obtenido. Esta mezcla se mantuvo durante 30 min a 62°C, trascurrido este tiempo se le agregó cloroformo-isoamílico (24:1) que permite la separación del DNA y las proteínas, esta mezcla se mantuvo 5 min en Vortex para homogeneizar. Se procedió a un ciclo de centrifugación a 15,000 rpm durante 10 min a 4°C. Se precipitó el DNA con isopropanol frío a -20° C. Para facilitar la precipitación se mantuvo durante 15 min a 4° C. Mediante otra centrifugación a 15,000 rpm durante 10 min a 4° C se obtuvo una pastilla, la cual se lavó con etanol frío (-20° C) al 70%, en dos ocasiones; al término de este procedimiento la pastilla de DNA resultante se resuspendió en 100 μ l de buffer TE (Tris HCl 10mM pH 8.0, EDTA 1mM) al DNA se le verificó su integridad a partir de la visualización de una alícuota de 5 μ l de DNA en un gel de agarosa al 0.8 % teñido con 2 μ l de EtBr (10 mg/ml) a 100 mV, sumergido en buffer TBE 0.5X, por aproximadamente 40 min y visualizados en un digitalizador de imágenes con transluminador de luz UV.

Una vez asegurada la integridad del DNA se cuantificó la concentración de este, tomando una alícuota de 3 μ l en 1 ml de H₂O y con un espectofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Spectromer lamda 2S; programado a 260, 280 y 320 nm de Absorbancia para cuantificar DNA de doble cadena, proteínas y fenoles respectivamente; ya que estos dos últimos pueden interferir la reacción de PCR. Para obtener la concentración de DNA libre de contaminantes se aplicó la formula:

$$\text{ng} / \mu\text{l} = \frac{[(A_{260} - A_{320})(50,000)]}{3}$$

En donde, A_{260} representa la lectura a 260nm, A_{320} representa la lectura a 320 nm y 50,000 es el coeficiente de extinción de los nucleótidos constituyentes del DNA y 3 es la dilución que se manejó (3 μ l DNA /1 ml H₂O).

3.4 MARCADORES TIPO RAPD's

La técnica de amplificación RAPDs se trabajó mediante diluciones del DNA que variaban de 200 a 300 ng / μl de cada dilución se agregó 2.5 μl de DNA total, 17 μl de H_2O destilada desionizada y esterilizada; 2.5 μl de buffer para PCR sin magnesio; 0.75 μl MgCl_2 (50 mM); 2 μl de nucleótidos premezclados para PCR (dNTP's) 200 mM, 1U de Taq polimerasa y 1.0 μl de alguno de los primer decanucleótido J13 ($5'\text{CCACACTACC}^3$), E14 ($5'\text{TGCGGCTGAG}^3$), C08 ($5'\text{TGGACCGGTG}^3$), C07 ($5'\text{GTCCCGACGA}^3$) y B10 ($5'\text{CTGCTGGGAC}^3$), todos de Operon Technologies Inc., para obtener un volumen final de 25 μl para cada reacción.

Las reacciones PCR se realizaron con un Termociclador GeneAMP PCR System 9700 el cual fue programado (figura 8) con un primer ciclo a 94°C durante 2 min y 40 ciclos de un min a 94°C (desnaturalización del DNA), un min a 37°C (alineación del primer) y un min a 72°C (polimerización de la cadena complementaria) y un ciclo final de 15 minutos a 72°C , tras lo cual, la temperatura se mantuvo a 4°C indefinidamente hasta ser retirado para realizar una electroforesis.

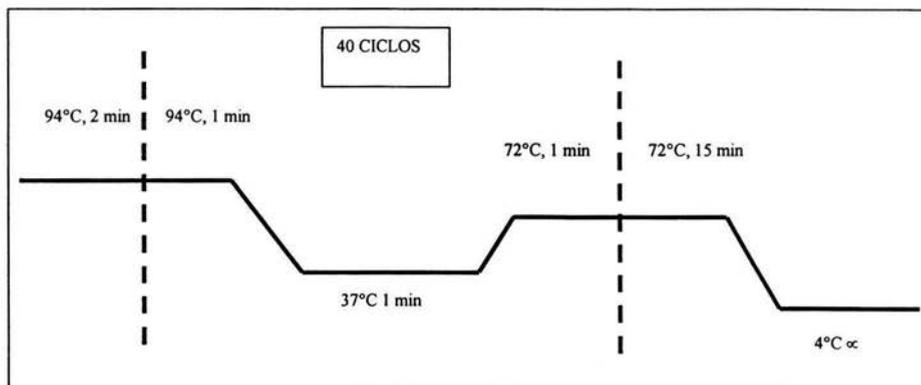


Figura 8: Ciclos y temperaturas empleadas para la amplificación de los marcadores tipo RAPD.

Los productos de la amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa (1.2%) teñidos con bromuro de etidio (EtBr) en las condiciones anteriores junto con un marcador de peso molecular de 1 kilobase para estimar el tamaño de los

fragmentos amplificados y se visualizaron con luz UV; las imágenes se almacenaron digitalmente para su posterior análisis en el programa Alphasizer 2000.

Para corroborar la amplificación y robustecer el análisis se emplearán referencias externas en este caso 5 muestras de *N. macrocephala* obtenidas en los Reyes Metzontla (RM3, RM5, RM8), San Martín (M28, M32, M25), y San Juan Raya (R14) así como 2 individuos de *N. tetetzo* (TZ1 y TZ2).

3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Las bandas visualizadas de los polimorfismos moleculares encontradas en los geles analizados fueron codificadas a manera de datos binarios y se construyeron matrices de presencia /ausencia, en donde el alelo dominante representa la presencia de la banda en la que los individuos $+/+$ y $+/-$ (homocigotos dominantes y heterocigotos) tienen el fenotipo (1) y los individuos $-/-$ (homocigotos recesivos) tienen el fenotipo (0) (Criscy y López-Armengol, 1983).

3.5.1 DIVERSIDAD GENÉTICA

El porcentaje de loci polimórficos es un estimador denominada como P y es una medida directa de la variación entre individuos, familias, géneros o especies. Se considera un locus polimórfico a aquel alelo común que no excede el 99% de presencia en la población o simplemente si se encuentra más de un alelo (Hedrick, 1983). Se obtiene dividiendo el número de loci polimórficos sobre el número total de loci analizados. Un valor de cero indica que los loci muestreados son monomórficos, mientras que un valor del cien por ciento señalara que todos los loci son polimórficos y por lo tanto existe una alta diversidad genética (Futuyama, 1998).

Las frecuencias alélicas se determinaron mediante el método Bayesiano (Zhivotovski, 1999), el cual permite obtener estimaciones de las frecuencias alélicas de manera no sesgada. Estas frecuencias nos permite determinar la heterocigocidad esperada (H_e) presente en la especie y establece el efecto de las fuerzas evolutivas en las frecuencias; estas pueden adoptar valores entre 0 y 1 (Wallace, 1974).

3.5.2 ÍNDICE DE SHANNON

La diversidad genética se estima para cada locus RAPD's a partir de la relación, mediante el Índice de diversidad de Shannon, el cual es uno de los más usados para evaluar la diversidad de las especies (Daniel, 1998).

$$H_o = - \sum_{i=1}^n P_i \log_2 P_i$$

Donde P_i es la frecuencia del i ésimo locus de la presencia del marcador RAPD's en la población. El promedio de la diversidad para todas las poblaciones fue calculado para cada locus como:

$$H'_{pop} = \frac{1}{n} \sum H'_j$$

En la que n es el número de marcadores, j es cada uno de los marcadores.

La diversidad de las especies fue calculada para cada locus como :

$$H'_{sp} = - \sum P_s \log_2 P_s$$

Donde P_s es la frecuencia del marcador RAPD en la muestra total.

De esta forma, para cada locus los componentes de diversidad dentro de las poblaciones son:

$$H'_{pop} / H'_{sp}$$

Y la diversidad entre poblaciones es :

$$\frac{H'_{sp} - H'_{pop}}{H'_{sp}}$$

Que es equivalente a la $G'st$, que es un índice de diversidad que provee de una estimación relativa del grado de variación de la especie (Hartl, 1999; Busell, 1999). Este análisis se realizó para todos los individuos.

3.5.3 ANÁLISIS DE ORDENACIÓN

Un análisis que permite establecer más claramente las relaciones entre individuos es el análisis de Coordenadas Principales (PCO) que representa gráficamente las interrelaciones entre individuos por agrupamiento tridimensional de los datos; el cual se obtiene mediante la transformación de las matrices de valores y vectores a una de dispersión central con el programa NTSyS-pc 2.02i; para definir las posibles conexiones entre poblaciones cercanas se aplicó el análisis de PCO que se superpone con una red de tendido mínimo (MST).

3.5.4 ANÁLISIS DE AGRUPACIÓN

De acuerdo con las leyes de probabilidad se espera que los entrecruzamientos entre individuos de diferentes poblaciones, ocurra con mayor frecuencia entre poblaciones cercanas debido al "aislamiento por distancia" establecido por Wright (1958), por lo que se procedió a analizar la matriz de presencia/ausencia mediante el índice de Jaccard; uno de los más empleados en este tipo de estudios; con el programa NTSyS-pc 2.02i, que realiza comparaciones mediante matrices de valores y vectores, y genera un dendrograma mediante el método UPGMA (Análisis de Agrupación por Promedio Aritmético no Ponderado, por sus siglas en inglés) de Swofford y Olsen (1990), el cual se compara un n número de permutaciones (en nuestro caso 1000) para definir la proporción de pseudoréplicas que soporta cada nodo; lo que permite obtener una representación gráfica de las distancias genéticas, que se basa en la similitud establecida por el Índice de Jaccard con las que podemos deducir las relaciones filogenéticas entre las poblaciones analizadas.

Para corroborar la representación gráfica de las distancias genéticas se empleo la Prueba de Mantel (1967). Esta prueba se aplica a partir del supuesto de que las dos matrices no están correlacionadas y se intenta analizar si cualquier aparente relación es efecto del azar. Esto se logra calculando el estadístico Z :

$$Z = \sum_i \sum_j m_{ij} e_{ij},$$

Donde m corresponde a los elementos de la matriz 1 (distancia genética) y e a los elementos de la matriz 2 (distancia geográfica). Para lo cual, se realizan un n número de permutaciones (de 1000 a 10 000) azarosas de las posiciones de los elementos de una de las matrices (cualquiera de ellas), generando una distribución normalizada; si Z observada es mayor que Z promedio obtenida de las permutaciones aleatorias indica una correlación positiva. De este modo el programa NTSyS-pc 2.02i calcula la Z observada y un coeficiente de correlación de Z promedio a partir de las permutaciones, así como la proporción de permutaciones que coinciden con la Z original; a partir de lo cual se genera una gráfica de la dispersión de los datos.

Las agrupaciones en el dendrograma se analizaron con la prueba del mejor corte que mediante 1000 permutaciones origina un valor que indica las distancia a la cual las congregaciones son originadas por diferencias genéticas y no son debidas al azar. Las agrupaciones que se conserven del lado derecho son agrupaciones significativas (Strauss, 1982).

3.5.5 ANÁLISIS DE VARIANZA MOLECULAR (AMOVA)

El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de las frecuencias de las bandas puede estimar la estructura genética de poblaciones diploides en equilibrio Hardy-Weinberg o con un alto nivel de autofecundación (Stewart y Excoffier, 1996). Se aplicó para determinar la variación genética homogénea entre las poblaciones contrarresta la diferenciación que pudiera darse por adaptaciones a las condiciones locales y por lo tanto la especiación, pero a la vez promueve la dispersión de genes y/o la recombinación genética a lo largo de toda el área de distribución de la especie (Slatkin, 1987). La estructura génica o diferenciación interpoblacional es calculada ; mediante valores como la F , G o θ (theta) (Slatkin, 1994). Estas estimaciones se basan en el modelo de islas de Wright (1951) y modificado por Crow y Aoki (1984), en el cual tendremos:

$$N_e m = \left[\frac{1}{4 \cdot} \right] \left[\left[\frac{1}{\Phi_{st}} \right] - 1 \right]$$

en la que $\sigma^2 = (n/(n-1))^2$ y n constituye el número de poblaciones; $N_e m$ representa el flujo génico(número de inmigrantes por generación).

El modelo de islas de Wright (1965) predice originalmente, que si $N_e m$ es mayor a 1 se debe esperar poca diferenciación, ya que el flujo génico no permite que se presente deriva génica, pero Kimura (1983) argumenta que en algunos casos con valores de $N_e m$ mayores a 5 se puede seguir detectando cierta diferenciación genética. Mientras que Slatkin (1994) menciona que el flujo génico disminuye al aumentar la distancia física que separa las poblaciones. Un flujo génico constante impide que exista una gran diferenciación genética entre ellas y/o que el tiempo transcurrido ha sido insuficiente para alcanzar el equilibrio.

Aunado a este análisis se aplicó el estadístico de Bartlett, que es una prueba no paramétrica de varianza molecular para corroborar si los resultados de la diversidad genética de *N. mezcalaensis* son reales y estadísticamente significativos o producto del azar.

4 RESULTADOS

4.1 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL DNA

Se realizó la extracción de DNA de los 100 individuos de *N. mezcalaensis* (figura 9), de las cuales solo se obtuvo el DNA de 85 debido a una rápida degradación de algunas muestra, de los 85 DNA's obtenidos inicialmente solo se obtuvo la amplificación de 55 individuos, debido a una alta presencia de metabolitos secundarios, principalmente fenoles que interfieren la reacción de amplificación del PCR, los cuales se determinaron mediante una lectura en espectrofotómetro a 260 nm (nanómetros).

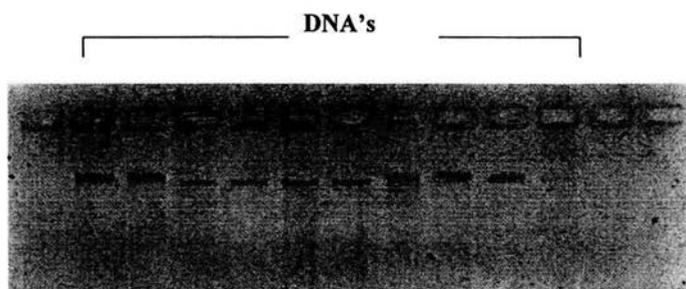


Figura 9: Electroforesis en gel de agarosa para corroborar la integridad del DNA empleado.

Para evitar el efecto de los fenoles, las muestras con dificultades de amplificación fueron pasadas por una columna de PVP (Polivilín Pirrolidona), para reducir la concentración de estos, de acuerdo a su afinidad química, esto realizado a los organismos de Río Salado, que presentaban una concentración de fenoles significativamente más elevada al momento de cuantificar y una vez eluidas las muestras mostraron una reducción significativa en las lecturas (datos no mostrados), que son directamente proporcionales a la concentración de estos componentes. Para determinar estas deferencias se aplicó una prueba de t de Student para muestras pareadas que arrojó un valor de $P < 0.001$.

Una vez realizadas las extracciones del DNA de *N. mezcalaensis* a los 85 individuos empleados se les cuantificaron las concentraciones del DNA's obtenidos y se observaron concentraciones que variaban de 60-1150 ng/ μ l.

Para el análisis de RAPDs se realizaron diluciones a una concentración determinada de entre 200-300 ng/ μ l.

4.2 AMPLIFICACIÓN DE LOS MARCADORES TIPO RAPD's

Para la amplificación de los marcadores tipo RAPD's se probaron 3 individuos con 20 primer y se seleccionaron 5 primers (J13, B10, C08, E14 y J07), basándose en el número de polimorfismos presentados y en la reproducibilidad de los mismos. Los 5 primers decanucleótidos empleados se probaron en los 100 individuos de *N. mezcalaensis* y en las 9 referencias externas de las especies de *N. macrocephala* y *N. tetetzo*. De los individuos amplificados solo se obtuvieron 85 individuos que amplificaron con los 5 primers y las referencias, se obtuvo un total de 145 marcadores, de los cuales 7 son específicos para *N. macrocephala* y 10 son específicos para *N. tetetzo*; para *N. mezcalaensis* solo se obtuvieron 4 bandas monomórficas, el número de loci polimórficos vario según el primer empleado; de 17 bandas por primer hasta 43 cuyos pesos moleculares oscilaron de 202-3463 pares de bases (pb) (Cuadro 4).

Cuadro 4: Número y rango de peso molecular de los marcadores generados con los cinco primers.

PRIMER	SECUENCIA	# MARCADORES	RANGO DE PESO MOLECULAR (pb)
E 14	5'TGCGGCTGAG 3'	43	1974-202
C 08	5'TGGACCGGTG 3'	25	2743-218
C 07	5'GTCCCGACGA 3'	25	2058-261
J 13	5'CCACTACTACC 3'	17	1659-309
B 10	5'CTGCTGGGAC 3'	35	3463-310

En la figura 10 se muestra un ejemplo de amplificación con el primer C 07 en donde se presentan claramente las diferencias génicas, es decir, los polimorfismos

(bandas) que expresan diferentes individuos de *N. mezcalaensis*, los cuales son observados como presencia o ausencia de las bandas.

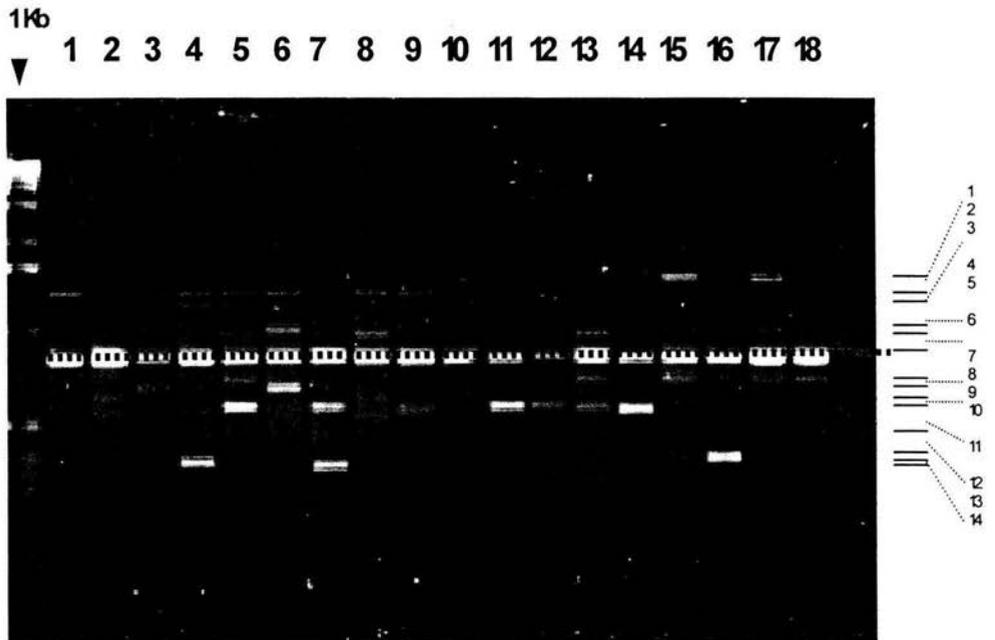


Figura 10: Polimorfismos expresados entre individuos de Río Salado cuadrante 1 (RS-1) de *N. mezcalaensis*, utilizando el primer C07 en el extremo izquierdo se encuentra un marcador de peso molecular de 1 Kb, para estimar el peso de los marcadores RAPD.

4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.3.1 DIVERSIDAD GENÉTICA

La proporción de loci polimórficos encontrada para *N. mezcalaensis* fue de $P=97.24\%$. La heterocogocidad esperada calculada mediante el método Bayesiano fue de $He=0.21$ para la especie.

4.3.2 ANÁLISIS DE AGRUPACIÓN

Las bandas encontradas se codificaron a manera de matriz binaria y de los 94 individuos del estudio se detectaron 145 marcadores, a partir de la cual se determinaron las distancias genéticas por medio del Índice de similitud de Jaccard; las distancias se transforman a una representación gráfica a manera de dendrograma, mediante el método UPGMA (figura 11), el cual, permite observar que los individuos no se agruparon por sitio de colecta y que el parecido genético entre los individuos ocurre entre OTUS muy alejados geográficamente. Así mismo, se observó que la técnica fue capaz de separar a las tres especies que se compararon, originando grupos compactos de cada especie; los individuos de *N. mezcalaensis* se unieron entre ellos a una distancia 0.15, *N. macrocephala* a 0.61, mientras que los individuos de *N. tetetzo* se unieron a una distancia de 0.52 y las agrupaciones interespecie unieron a *N. mezcalaensis* con *N. macrocephala* a una distancia de 0.13, mientras que a *N. tetetzo* se unieron a ambas con una similitud de 0.9. Considerando que la escala va de 0 a 1, y 1 corresponde a la más alta similitud los valores más cercanos a cero son los que presentan un menor parecido genético y por tanto son muy variables.

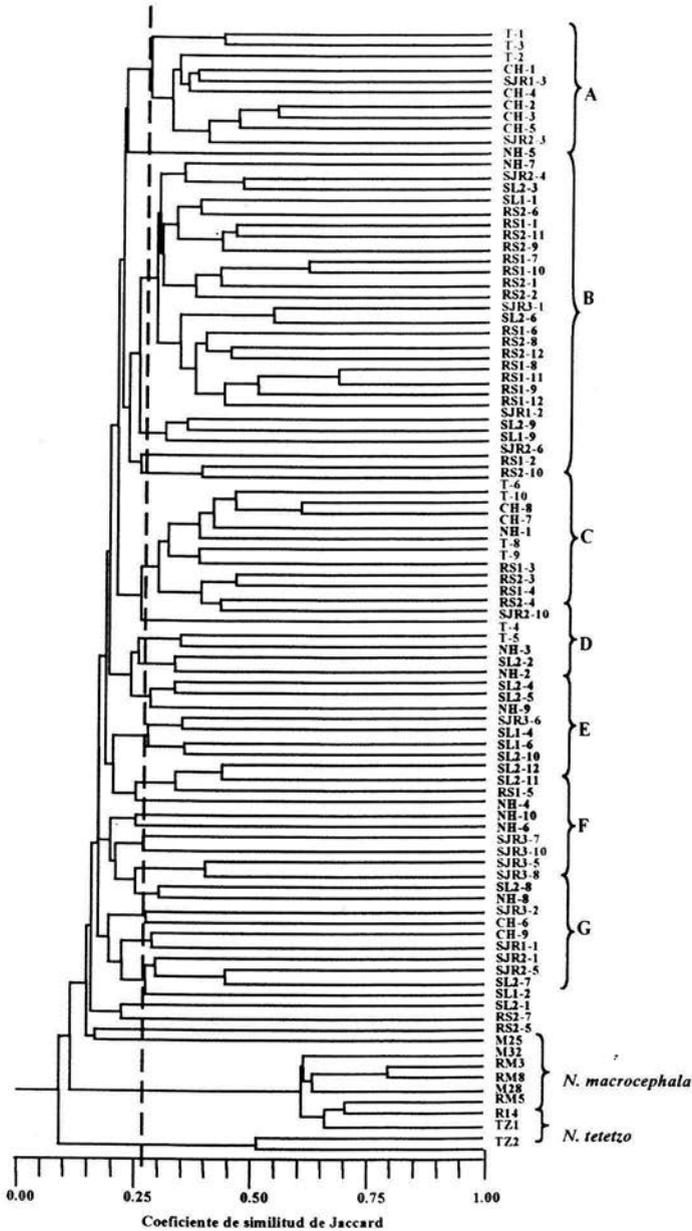


Figura 11: Dendrograma obtenido mediante el método UPGMA y el índice de similitud de Jaccard para los 85 individuos de *N. mezcalaensis* (de SJR1, SJR2 y SJR3 que corresponden a San Juan Raya, SL1 y SL2 a San Lucas, RS1 y RS2 a las riberas del Río Salado, T es Tepehene, NH Nuevos Horizontes y CH Santiago

La representación del análisis gráfico de las distancias genéticas se cotejó a partir del índice de Jaccard y una matriz cofenética mediante la prueba de Mantel (1967) obteniendo un coeficiente de correlación de $r = 0.78$ que indica una muy buena representación de los datos en el dendrograma obtenido.

La prueba del mejor corte realizada al análisis de agrupación (línea discontinua, Figura 12) correspondió a un valor de 0.26. Esta línea establece varias agrupaciones tanto significativas como grupos dispersos (A, B, C, D, E, F, G). En estos grupos aunque se encontró que no se agruparon de acuerdo al sitio de colecta si se percibió que la mayoría de los individuos que conformaron un grupo son de la misma región, como es el caso del grupo **A** en el cual se agruparon los individuos T1, T2 y T3 de Tepenene (T); CH1, CH2, CH3, CH4 y CH5 de Chazumba, así como el individuo 3 del cuadrante 1 de San Juan Raya (SJR1-3), SJR2-3 y NH3 de Nuevos Horizontes; en el grupo **B** se encontraron 4 individuos de San Juan Raya (SJR) , 5 individuos de San Lucas (SL), 1 de NH y 17 del Río Salado (RS); en el grupo **C** se presentaron 4 individuos de T, 2 de CH, 1 de NH, 4 de RS y 1 SJR; en el grupo **D** tenemos 4 individuos de T, 2 de NH y 3 de SL; en el grupo **E** se agrupan 1 de NH, 1 de SJR, 5 de SL (Cuadro 5), así mismo, se observa que dos individuos de San Lucas (SL1-2 y SL2-1) y dos del Río Salado (RS2-5 y RS2-7) no forman grupos con los demás individuos de *N. mezcalaensis*.

Cuadro 5: Presencia de individuos en los 7 diferentes grupos que se forman en el dendrograma a partir de la similitud genética.

Grupo/población	A	B	C	D	E	F	G
T-Tepenene	3	-	4	2	-	-	-
NH-Nuevos Horizontes	1	1	1	2	1	3	1
CH-Chazumba	5	-	2	-	-	-	2
SJR-San Juan Raya	2	4	1	-	1	4	4
SL-San Lucas	-	5	-	3	5	1	1
RS-Río Salado	-	17	4	-	1	-	-

4.3.3 Análisis de Ordenación

A partir del índice de similitud de Jaccard se realizó el Análisis de Coordenadas Principales (PCO), al cual se le superpone con una red de tendido mínimo (MST) para definir las interrelaciones existentes entre individuos. En este análisis se mostró que con las tres primeras coordenadas se explica el 13.99 % de la variación y un porcentaje acumulado de 45 marcadores contribuye a explicar el 80% de la variación genética (Cuadro 6).

Cuadro 6: Porcentaje de componentes principales empleado en el análisis de ordenación, para todos los individuos.

COMPONENTES	VALOR DEL COMPONENTE	PORCENTAJE DE VARIANZA	PORCENTAJE ACUMULADO
1	3.61	5.523	5.523
2	2.99	4.573	10.096
3	2.54	3.891	13.987
4	2.36	3.614	17.601
5	2.04	3.120	20.721
6	1.96	2.995	23.716
7	1.87	2.867	26.584
8	1.76	2.691	29.275
9	1.66	2.540	31.816
10	1.61	2.472	34.287
...
43	0.53	0.802	79.076
44	0.51	0.779	79.855
45	0.50	0.757	80.613

Con el análisis PCO se advirtió una tendencia similar al dendrograma, los individuos no se agruparon de acuerdo al sitio en que fueron colectados, se observó una interacción entre todos los individuos (Figura 12).

A excepción de los sitios del Río Salado en donde se observa una tendencia a agruparse de manera similar a lo que ocurriría en una población estructurada, en donde la información genética solo fluye dentro de cada uno de los sitios en donde se distribuye la especie.

Para poder apreciar las agrupaciones de cada una de las poblaciones se realizó un extracto de los individuos del PCO original (figura 12), de acuerdo al sitio en donde fueron colectados (figura 13).

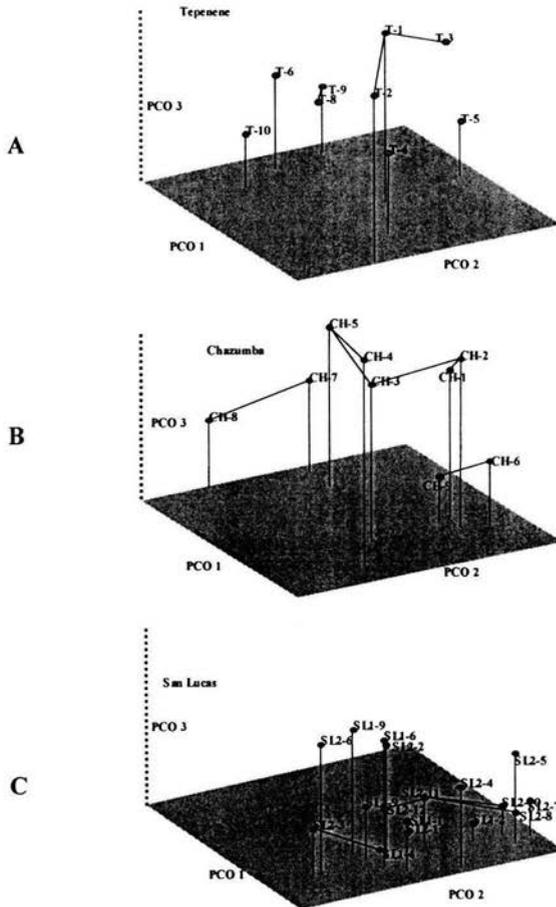


Figura 13: Análisis de Coordenadas Principales (PCO) con red de tendido mínimo (MST) de cada uno de los sitios de colecta de *N. mezcalaensis*: (A Tepene, B Chazumba, C San Lucas, D Nuevos Horizontes, E San Juan Raya y F Río Salado, las líneas punteadas muestran una relación directa del flujo de la información genética.

En el dendrograma y análisis de coordenadas principales de toda la especie no se observa estructuración; es decir, que las distancias genéticas no los agrupan de acuerdo al sitio en que son colectadas; separando del PCO original las 6 poblaciones analizadas se observa en las figuras 13-E y 13-F, que los individuos de las localidades de San Juan Raya y Río Salado se encuentran formando grupos, es decir que de acuerdo a los tres primeros componentes estos sitios comparten con una alta afinidad su información genética, de manera similar a lo que se observaría en una población estructurada.

Para determinar las relaciones existentes entre las tres especies de *Neobuxbaumia* se realizó el PCO con red de tendido mínimo para *N. mezcalaensis*, *N. macrocephala* y *N. tetetzo*, en donde se observa que con tres componentes *N. tetetzo* es más parecida a *N. mezcalaensis* y *N. macrocephala* forman grupos separados (Figura 14).

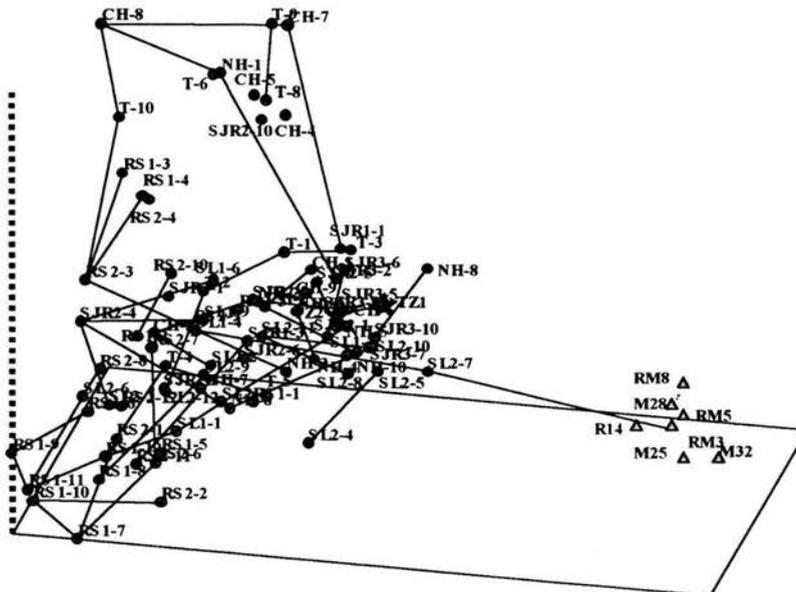


Figura 14: PCO con red de tendido mínimo para *N. mezcalaensis* (círculos ●), *N. macrocephala* (triángulos ▲) y *N. tetetzo* (estrellas ★).

4.3.4 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

El análisis de AMOVA realizado a todos los individuos de *N. mezcalaensis* y considerando 6 poblaciones arrojó un valor de 91.91% (Cuadro 6) que indica la varianza dentro de las poblaciones, es decir, entre los individuos; mientras que la variación entre las poblaciones es solo del 8.09%. Estos resultados indican que no existe una estructuración entre las poblaciones de *N. mezcalaensis*, ya que las diferencias en esta es menor que la que se observa entre los individuos (Cuadro 7).

La Φ_{ST} obtenida a partir del análisis de AMOVA fue de 0.081, este resultado comparado con los valores del Índice de Shannon caen dentro de los valores observados para otras especies con fertilización cruzada (Harmick y Godt, 1996; citado en Busell, 1999).

Cuadro 7: Resultados diversidad genética obtenidos a partir del AMOVA, al analizar 85 individuos de *N. mezcalaensis*.

Componentes de variación	gl	Varianza total	%variación	Φ_{ST}	<i>P</i>
V (A)	6	0.948	8.09		
V (B)	79	10.782	91.91		
Total	85			0.081	<0.0010

gl: grados de libertad; Φ_{ST} :Phi estadística homóloga a la F_{ST} de Wright (1951); V(A) varianza entre las poblaciones; V(B) Varianza dentro de las poblaciones; *P* probabilidad de obtener un valor similar al observado después de 1000 permutaciones al azar.

4.3.5 Índice de Shannon

La variabilidad genética se estimó utilizando el índice de Shannon, que sirve para obtener la variabilidad genética por sitios y por primer, además se obtuvo la variabilidad contenida entre las poblaciones ($G'_{ST} = 0.203$). Con este análisis se observó la variabilidad de los sitios en orden decreciente: San Juan Raya (H_e 5.126),

Tepenene (*He* 4.730), San Lucas (*He* 4.639) Río Salado (*He* 4.589), Chazumba (*He* 4.517) y Nuevos Horizontes (con *He* 4.396) (Cuadro 8).

También se determinó la heterocigocidad esperada a partir del cociente (H_{pop}/H_{sp}), observándose que los valores obtenidos están cercanos a 1, los cuales reporta Navarro (1999) Eguiarte y Piñero (1990) son un indicador de la cantidad y distribución de la variabilidad genética.

Los valores de heterocigocidad para las poblaciones, son en promedio altos (H_{pop}) (Cuadro 8), lo que sustenta la hipótesis de que *N. mezcalaensis* presenta una alta variación genética.

Cuadro 8: Valores de diversidad genética obtenidos mediante el Índice de Shannon, para cada uno de los primer empleados por sitio de colecta analizados para *N. mezcalaensis*.

	T	NH	CH	SJR	SL	RS	Hpop	Hsp	Hpop/Hsp	Hsp-Hpop/Hsp
E14	4.370	5.061	6.193	6.112	7.245	7.387	6.061	7.048	0.860	0.140
C08	3.768	4.006	3.348	3.781	2.451	4.715	3.678	5.148	0.714	0.286
C07	6.143	4.196	5.047	5.921	5.348	4.853	5.251	6.651	0.790	0.210
J13	2.960	3.438	2.738	3.655	1.955	3.235	2.997	3.893	0.770	0.230
B10	6.407	5.278	5.258	6.163	6.196	2.754	5.343	6.526	0.819	0.181
promedio	4.730	4.396	4.517	5.126	4.639	4.589	4.666	5.853	0.797	0.203
G'_{ST}										0.203

Hpop: diversidad dentro de las poblaciones; Hsp: diversidad dentro de la especie; (Hpop/Hsp): proporción de la diversidad dentro de la especie; (Hsp-Hpop/Hsp) proporción de la diversidad entre poblaciones y G'_{ST} parámetro de diversidad homólogo a la F_{ST} de Wright (1965).

Para determinar las posibles relaciones existentes entre los diferentes sitios se realizó un dendrograma con los valores de Φ_{ST} pareadas de las 6 poblaciones obtenidos con el AMOVA en el que se empleo el PCO de 2 dimensiones MST (Figura 15) en que se aprecia un centro de unión en la población San Juan Raya.

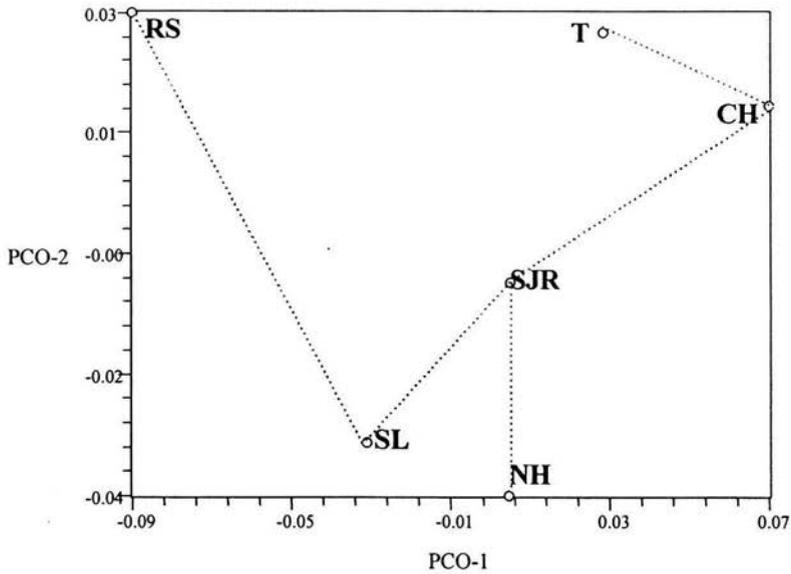


Figura 15: El PCO de dos dimensiones de los 6 diferentes sitios de colecta empleados para el análisis de *N. mezcalaensis*.

Con los valores de Φ_{ST} estadísticas pareadas de los 10 cuadrantes muestreados obtenidos con el AMOVA se realizó un PCO de dos dimensiones MST (Figura 16) en que se aprecia un centro de unión en la población San Juan Raya, particularmente del cuadrante 1.

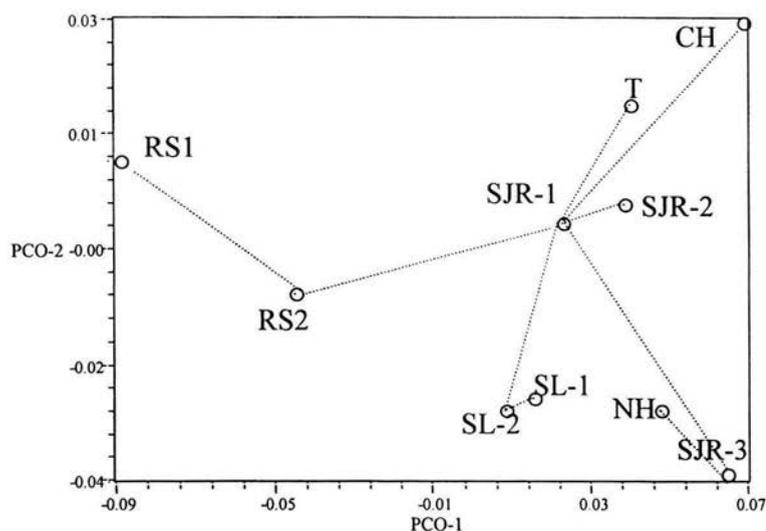


Figura 16: PCO de dos dimensiones de los 10 diferentes cuadrantes para el análisis de *N. mezcalaensis*.

4.3.6 Distancias genéticas vs. Distancias geográficas

La Teoría de Nei (1972) predice que de acuerdo a la distribución geográfica las poblaciones más cercanas geográficamente o espacialmente son las más cercanas genéticamente este principio se le conoce como aislamiento por distancia, ya que deduce que los individuos tienden a aparearse con aquellos más cercanos geográficamente.

Para corroborar este principio se realizó una correlación entre la matriz de Φ_{ST} pareadas obtenidas con el AMOVA (que indican las distancias genéticas) y la matriz de distancias geográficas, las cuales, para homogenizar los valores se transformaron a \log_{10} (Cuadro 9).

Cuadro 9: Matriz de distancias geográficas vs. distancias genéticas (en Km). Por encima de la diagonal se encuentran las distancias geográficas para cada sitio de muestreo (en negritas) y por debajo de la diagonal las Φ_{ST} pareadas obtenidas a partir del AMOVA.

	T	NH	CH	SJR1	SJR2	SJR3	SL1	SL2	RS1	RS2
T	–	41.50	86.00	79.50	80.50	80.88	85.50	88.25	91.00	92.00
NH	0.07	–	50.50	50.63	51.38	51.75	56.25	58.13	62.13	63.00
CH	0.02	0.09	–	14.63	14.13	15.50	17.00	18.00	19.00	20.00
SJR1	0.01	0.01	0.00	–	1.00	1.25	5.50	8.75	11.25	12.00
SJR2	0.02	0.05	0.03	0.01	–	1.50	5.25	8.25	10.75	12.30
SJR3	0.08	0.00	0.10	0.00	0.07	–	4.50	8.13	10.50	11.00
SL1	0.08	0.04	0.11	0.03	0.06	0.04	–	3.38	6.23	7.23
SL2	0.08	0.06	0.13	0.01	0.05	0.06	0.02	–	26.25	4.25
RS1	0.14	0.17	0.20	0.11	0.15	0.19	0.12	0.12	–	1.00
RS2	0.09	0.09	0.16	0.03	0.07	0.12	0.07	0.09	0.02	–

Se realizó la comparación de estas matrices mediante la prueba de Mantel del programa NTSys-pc 2.02i, que después de 1000 permutaciones obtuvo un coeficiente de correlación $r = 0.01$ (Figura 17) que indica que no existe una relación directa entre las distancias genéticas y geográficas de los sitios de colecta de *N. mezcalaensis* de igual forma se realizó una regresión lineal que generó un valor r^2 de 0.013 confirmando que no existe una tendencia lineal, sin embargo existe una incipiente relación no significativa entre las distancias genéticas y las geográficas. Los datos aportados por esta prueba ponen de manifiesto que en análisis de coordenadas principales así como los anteriores análisis no existe una agrupación de acuerdo a las distancias geográficas lo que permite que los sitios de colecta sean estudiados como una sola población que abarca desde el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, hasta la cuenca del Río Balsas.

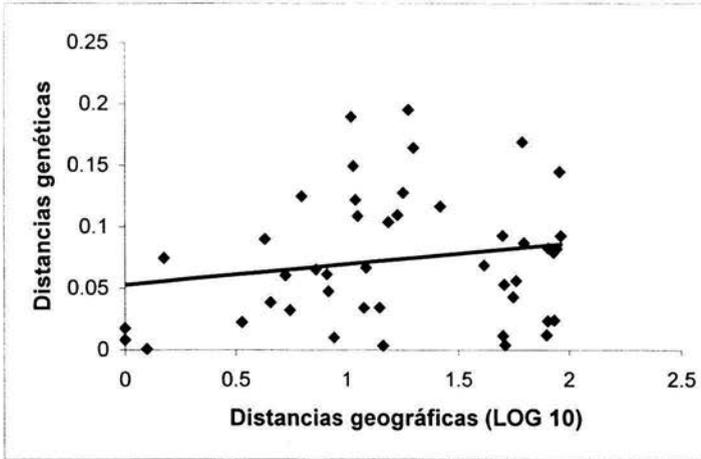


Figura 17: Distancias geográficas (\log_{10}) vs. distancias genéticas (Φ_{ST} pareada) de cada cuadrante en que se colectó *N. mezcalaensis*.

5 DISCUSIÓN

La diversidad que presenta la familia Cactaceae en cuanto a formas, variedad de especies y rangos de distribución; son indicadores de una alta variabilidad, sin embargo, existen muy pocos estudios sobre variabilidad genética de estas especies, que constituyen el elemento predominante del relieve en las zonas áridas del Valle de Tehuacan-Cuicatlán y la cuenca del río Balsas. Estas zonas han sufrido diferentes grados de perturbación que pueden deberse a factores tanto naturales como originados por el hombre, y que pueden favorecer la especiación, principalmente entre las zonas que quedan más alejadas entre sí geográficamente, en este caso Tepenene y Río Salado, entre las cuales la distancia geográfica es de 92 Km.

Cabe destacar que por observaciones de campo, existen muy pocos individuos juveniles y la identificación del género resulta complicada en ellos, debido a que aún no han adquirido sus características diacríticas, concordando con lo que reporta Godínez-Álvarez (2000) quien menciona que el establecimiento de nuevos individuos de cactáceas columnares ha decrecido en los últimos décadas; así como Zavala-Hurtado y Díaz-Soltis (1995) afirman que hace 100 años existieron condiciones favorables para el establecimiento de las cactáceas como *Neobuxbaumia* aunque posiblemente en la actualidad estas condiciones ya no son favorables. En estas condiciones, las estrategias reproductivas favorecen la autofecundación o presentan proporciones inusuales de apareamiento que generalmente presentan una variabilidad genética baja, y en condiciones particulares hace muy vulnerable a las poblaciones y en casos extremos llegar incluso a la extinción. Por lo que es importante conocer el estado de estructuración genética de las poblaciones. Hamrick y Godt (1996) aseguran que las especies endémicas tienden a presentar una menor variación debido a que se ha demostrado que los bosques de cactáceas columnares dependen de un conjunto de múltiples interacciones bióticas para su mantenimiento, su conocimiento detallado resulta de vital importancia al elaborar planes de manejo y conservación (Valiente Banuet, *et al.* 1995).

El género *Neobuxbaumia* originario de México, presenta características particulares dentro de las cactáceas columnares ya que solo producen semillas hasta después de que estas han sido visitadas por sus polinizadores (murciélagos), y durante el día la flor no está activa y no produce néctar, otra fase crítica es el establecimiento y germinación de las semillas, debido a que sus dispersores primarios deben transportar las semillas hasta un sitio en el cual esta encuentre el microclima y suelo adecuado para que se lleve a cabo la germinación. Estas complicaciones, aunadas al constante deterioro de los ambientes en donde se desarrollan crean un frágil equilibrio, en el cual, se han desarrollado interacciones muy específicas entre el género *Neobuxbaumia*, sus polinizadores y sus dispersores, quienes afectan directa o indirectamente su composición genética.

La aplicación de los marcadores moleculares se ha convertido en una herramienta indispensable en los estudios de conservación y manejo sustentable principalmente en especies en donde no se conoce información alguna sobre su genoma; con estas se ha podido estudiar la construcción genética de especies tanto silvestres como cultivadas, por lo que los RAPD's son una de las metodologías más empleadas para detectar la variación genética; debido a sus características, el número de marcadores detectables y el relativo bajo costo (Otero, *et al.* 1997), además de la detección de variación genética en toda la longitud del DNA de manera neutral y aleatoria (Clark, 2000).

Como menciona Micheli, *et al.*(1994), una de las principales problemáticas de la reproducibilidad de los marcadores tipo RAPD son los contaminantes que precipitan junto con el DNA, ya que estos contaminantes pueden afectar la inserción efectiva del iniciador; sin embargo, en nuestro caso, la amplificación se vio afectada por un alto contenido de fenoles, por lo que se procedió a realizar una eliminación de estos componentes mediante la utilización de una columna con PVP, que aunque no esta reportado anteriormente para este tipo de muestras, la elución resultó efectiva, ya que, según los resultados muestra una disminución significativa de estos en las extracciones de DNA y comparando las lecturas de estas muestras con alto contenido

de fenoles con las muestras que amplificaban sin problema, aplicando una prueba de t de Student se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos, a las muestras que se les aplicó el PVP se aplicó una prueba de t de Student para muestras pareadas y se observaron diferencias significativas entre los resultados antes y después de pasar las muestras por la columna de PVP ($P < 0.01$).

La presencia de fenoles puede deberse a un estrés diferencial en estas localidades que se ubican en ambas riveras del Río Salado, lo que constituye un microambiente diferencial para estas localidades o al ataque de plagas. La presencia de estos metabolitos fue la razón por la cual se emplearon dos diferentes técnicas de extracción así como columnas de PVP.

En el caso particular del presente estudio, de un total de 100 organismos colectados, solo se utilizaron 85 para los análisis estadísticos, debido a la rápida degradación del DNA o a la falta de amplificación de algunas muestras, considerando también a aquellos que presentaban los datos completos para las amplificaciones con los cinco primers, y considerando únicamente los marcadores que resolvían confiablemente (Weeden, *et al.* 1992, citado en Divaret, *et al.* 1999). Consideramos que el número de individuos y poblaciones analizadas proporcionan un buen análisis ya que de acuerdo con la revisión bibliográfica realizada por Nybom y Bartish (2000), en el cual, reportan que de 150 estudios revisados, el número promedio de individuos analizados es de 12-17; el promedio de poblaciones en otros estudios es de 7; el número de marcadores varió de 57-71 en promedio, por lo que valores por encima de estos logran afinar aún más este tipo de análisis y de igual manera, el número de marcadores obtenido en este análisis es de 145, que en el caso de tener un bajo número de individuos lograría compensar el número reducido de estos (Krauss, 2000, en Alejos, 2002).

Para este estudio, el número de loci detectados por primer fue alto, puesto que se detectaron 145 marcadores con la utilización de 5 primers, y por primer se detectaron de 17 hasta 43 locus, este número es muy elevado, ya que Diveret, *et al.*

(1999) han reportado emplear marcadores de bajo y alto polimorfismo, considerando como de alto polimorfismo los marcadores a partir de los cuales se obtiene un número mayor de 15 loci; mientras que Clark (2000) considera que 15 marcadores son un número alto de loci. De los siete primers utilizados el E14 produjo un mayor número de bandas por primer (43), mientras que el J13 generó el menor número de bandas (17). El número de marcadores obtenido fue muy similar al de las otras dos especies de *N. tetetzo* y *N. macrocephala* (Alejos, 2002 y Martínez-García, *et al.* enviado), que cohabitan en el Valle de Tehuacán, aunque el número de primers empleados para *N. mezcalaensis* fue menor, lo que nos habla de una alta variabilidad de esta especie. El número promedio de marcadores fue de 29, en un rango de 202-3463 pares de bases, el número promedio de marcadores obtenidos fue superior al de sus congéneres *N. tetetzo* y *N. macrocephala* el cual fue en promedio de 22. Otros autores han reportado números elevados de bandas como es el caso de Moodle, *et al.* (1997) quienes reportaron 22 bandas en promedio para la mostaza silvestre (*Sinapis arvensis*). Palacios y González-Candelas (1997) obtuvieron 21 bandas en *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae).

Del análisis de agrupación se observó la formación de agrupaciones tanto significativas como dispersas de acuerdo con el punto de mejor corte ($t=0.26$), en el dendrograma (figura 11), esto indica que las agrupaciones entre individuos son más significativas que las agrupaciones por población.

La representación gráfica del índice de similitud de Jaccard nos permite distinguir entre diferentes especies, además se observó una agrupación más compacta de los grupos externos, indicando que las distancias genéticas de ambos grupos externos son menores que la observada para *N. mezcalaensis*. La falta de unión a un grupo de los individuos de San Lucas (SL1-2 y SL2-1) y del Río Salado (RS2-5 y RS2-7) se debe a la presencia de dos bandas únicas las cuales sólo se encuentran presentes en estos cuatro individuos.

El análisis de PCO mostró que los individuos de las localidades de San Juan Raya y Río Salado se encuentran formando grupos separados de manera similar a una población estructurada aún cuando estas poblaciones se encuentran muy cercanas (7.23 Km), no se asocian entre sí, una posible explicación puede deberse a las rutas de alimentación de sus polinizadores, los murciélagos *Leptonycteris curasoae*, *L. Nivalis* y *Choeronycteris mexicana*, y aunque pueden desplazarse hasta 30 Km en una sola noche (Rojas, 1996) estas diferencias génicas se pueden asociar con diferencias en el relieve del Valle, el cual, presenta un corredor biológico a lo largo de los sitios de distribución por donde los murciélagos pueden desplazarse en una sola dirección, prefiriendo ciertas rutas de alimentación y visitar algunos sitios hasta que el alimento es escaso.

El análisis de PCO (figuras 15 y 16), muestraN que la localidad de San Juan Raya es un posible centro de distribución de información genética creando un puente que evita la especiación de las poblaciones. En el dendrograma 13-E y 13-F, se observa que los individuos de las localidades de San Juan Raya y Río Salado se encuentran formando grupos, es decir que de acuerdo a los tres primeros componentes estos sitios comparten con una alta afinidad su información genética, de manera similar a lo que se observaría en una población estructurada, esta conformación puede estar relacionada con una estructuración que hasta el momento no resulta significativa. También, se debe de observar que las distancias geográficas utilizadas en este estudio resultan pequeñas en términos de la capacidad de dispersión de los polinizadores (Clark, 2000), que en este caso es de hasta 200 Km² en una semana (Rojas, 1996).

Los valores de Φ_{ST} (0.081) y la G_{ST} (0.23) son valores que indican la variabilidad entre las poblaciones y nos indican que la variabilidad es mayor dentro de las poblaciones y que las diferencias que existen entre ellas son pocas. Estos parámetros coinciden con lo predicho por Hamrick y Godt (1996) y Bussell (1999), aseguran que las especies con fertilización cruzada tienden a presentar una mayor diversidad dentro de las poblaciones y presentan pocas diferencias entre las

poblaciones, por su parte Bonning, *et al.*(1996) sugiere que en nivel de entrecruzamiento originado por la dispersión de polen y semillas mediante animales es suficiente para generar altos niveles de polimorfismo.

Los valores de diversidad genética encontrados para *N. mezcalaensis* son comparables a los reportados para un conjunto de especies de diversas plantas ($G_{ST}=0.29$), de igual manera es muy similar a los índices encontrados anteriormente para especies de vida larga ($G_{ST}=0.23$) y entrecruzamiento ($G_{ST}=0.23$), así como para especies de plantas con dispersión de semillas mediante animales ($G_{ST}=0.17$); este valor en comparación con otras cactáceas es muy similar al de su congénere *N. macrocephala* ($G_{ST}=0.229$), pero inferior al de *N. tetetzo* ($G_{ST}=0.357$). Todos estos son superiores a los valores encontrados para otro tipo de cactáceas clonales como *S. stellatus* (Cornejo, en prep.) y para otras especies obtenidos mediante isoenzimas (Hamrick, *et al.*2002), en cuyo caso reporta que el valor promedio para cactáceas es de $G_{ST}=0.12$, para plantas con entrecruzamiento y polinizadas por animales $G_{ST}=0.099$.

El Análisis de AMOVA revela que para las tres especies de *Neobuxbaumia* la mayor parte de la varianza esta dentro de las poblaciones y que solo una parte está distribuida entre estas (*N. tetetzo* 73.13% y 26.87%; para *N. macrocephala* 89.38% y 10.62% y para *N. mezcalaensis* 91.91% y 8.09%), solo que en el caso de *N. tetetzo* existe una tendencia al agrupamiento por localidades. Estos resultados son ventajosos para *N. mezcalaensis*, ya que generalmente se relacionan de manera favorable con la habilidad de resistencia a enfermedades al incrementar las posibilidades de sobrevivencia (Olfel, *et al.*2001).

Por lo que los resultados del AMOVA, del Análisis de agrupación así como los del análisis de ordenación tanto para individuos como para las diferentes localidades sugieren que las condiciones ecológicas en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán al momento de establecerse estos fueron optimas y eficientes, por lo tanto hay una tendencia hacia la homogeneidad de la variabilidad genética, al encontrar un alto flujo

génico mayor a 1, en el caso de *N. mezcalaensis* y de *N. macrocephala*, el cual debe estar siendo ocasionado por la alta eficiencia de los murciélagos, que como se mencionó anteriormente, estas cactáceas son polinizadas por murciélagos. Presentan corola de color blanco amarillento o verde pálido, con apertura floral nocturna, la flor permanece abierta sólo por una noche, muestran adaptaciones florales para atraer y facilitar la polinización por los visitantes nocturnos, la producción de néctar es elevada durante la noche y desciende al amanecer (Fægri y van der Pijl 1971, Howe y Westley, 1988, Valiente-Banuet, *et al.* 1996, Petit y Freeman, 1997). En conjunto estas características biológicas favorecen la alta relación con sus polinizadores y por tanto una interacción especies específica muy estrecha entre las cactáceas y los murciélagos, que actúan tanto como polinizadores y como dispersores primarios y son capaces de depositar las semillas en lugares seguros para su germinación bajo el dosel de los arbustos donde se perchan para comer los frutos generando así un patrón de distribución no aleatorio y favoreciendo el flujo génico entre los sitios en donde se distribuye *N. mezcalaensis*.

En el caso de *N. mezcalaensis*, presenta un sistema de flores macho y hermafrodita con un valor de 6.5 hermafroditas /macho en donde ambas flores son viables, lo que favorece la fertilización cruzada (Rojas, 1996). En *N. mezcalaensis*, se conoce también que es visitada en el día por colibríes *Cynanthus sordidus* que consume el néctar y dos especies de abejas *Aapis mellifera* y *Trigona sp.* que probablemente obtienen néctar y polen (Valiente-Banuet, *et al.* 1997) actuando como polinizadores secundarios o de "emergencia" que pueden ser vitales en ausencia de los murciélagos. Acerca de los visitantes diurnos todavía se conoce poco, particularmente sobre cómo estos visitantes interaccionan y su contribución para el éxito reproductor de la planta, Groman y Pellmyr, (1999) sugieren que mientras la polinización diurna contribuye menos a la variabilidad de reproducción de la planta por algunos años, puede ser importante cuando se considera la evolución de un sistema de polinización nocturno. Los datos de variación genética en los que se mantiene una gran variación genética y una baja diferenciación entre las poblaciones, se deben en parte al flujo génico que no presenta barreras geográficas para la dispersión de la

información genética permite mantener un efecto homogeneizante en los parámetros de la variación genética.

En el caso de *N. tetetzo* se observó un bajo flujo génico y estructuración de las poblaciones, que puede deberse a que esta especie solo es polinizada por dos especies de murciélagos (*Leptonycteris curasoae* y *Choeronycteris mexicana*) (Martínez-García, enviado), en cuyo caso la polinización y dispersión pueden ser eficientes, pero el establecimiento está siendo influenciado por características particulares de la especie como lo es su asociación con el arbusto *Mimosa luisana* que le brinda un microambiente propicio para su desarrollo (Valiente-Banuet y Ecurra, 1991), pero que también puede limitar su establecimiento.

Para *N. mezcalaensis* se ha estudiado la germinación en condiciones de laboratorio, que indican que la germinación de semillas en estas especies, es un proceso rápido que se inicia por lo general entre los tres y 6 días, alcanzando porcentajes de germinación superiores al 80% en un lapso de tiempo relativamente corto (Loza, *et al.* 2002), de igual manera, Esparza, *et al.*, (2002) realizaron transplantes recíprocos de semillas y plántulas, observaron que pueden existir limitaciones por restricción de hábitat, al menos a nivel de germinación de semillas, encontrando que *N. macrocephala* es la especie con mayor reproducción y mejor sobrevivencia, en donde sugieren la existencia de "años semilleros" en *N. mezcalaensis* y *N. tetetzo* para explicar su mayor abundancia en la región, por otro lado, Ramírez y Valverde (2002) determinando las características germinativas de las tres especies como limitantes de la distribución encontrando que *N. tetetzo* presenta el mayor porcentaje de germinación, las fluctuaciones de temperatura no afectan la germinación, aunque para *N. mezcalaensis* se encontró que a temperaturas de 60°C producen una germinación más rápida. Conforme el potencial hídrico disminuye decrece el porcentaje y velocidad de germinación en las tres especies siendo *N. tetetzo* la que soporta más el estrés hídrico y que *N. macrocephala* germina mejor en suelos de su propia localidad, además de que se encontró que *N. macrocephala* en condiciones experimentales siempre presentó un porcentaje de germinación

ligeramente menor al de las otras dos *Neobuxbaumias*, por lo que los autores sugieren que su nivel de rareza puede estar relacionado con sus características germinativas.

Estos datos sugieren que para *N. mezcalaensis*, la germinación no es un proceso limitante y que su incremento de germinación a altas temperaturas favorece su rápido establecimiento, la eficiencia de los polinizadores, el empleo de estrategias particulares de fecundación, los rangos de distribución y las características de tipo de suelo en los cuales se establece son en conjunto las condiciones que le permiten presentar la más alta distribución de todo el género.

Todos estos factores contribuyen a que aunque el hábitat de las cactáceas columnares se encuentre aparentemente perturbado y fragmentado, estas cactáceas no presente una estructuración, si no una sola población no subdividida, lo que indica que aunque la distribución de estas especies es en manchones las diferentes zonas estudiadas para *N. mezcalaensis* en realidad son una sola población que hasta el momento presenta una diversidad genética comparable a la de otras especies vegetales y un alto flujo génico, ya que de acuerdo con los datos del AMOVA, se puede observar una mayor diferenciación se encuentran dentro de cada zona, lo que se traduce en un comportamiento similar al de especies no endémicas, de fertilización cruzada y con ciclos de vida largos.

Correlacionando la distribución que ocurre en manchones, los valores de diversidad de la especie y sus características edáficas obtenidas del estudio de suelos realizado por Rivas (2003), reportadas para los sitios de colecta ubicados dentro del Valle de Tehuacán-Cuicatlán reporta la presencia de suelo tipo Feozem calcárico, con textura franco arcillosa, con una alta pedregosidad y pendientes fuertes de 15-25%, con una vegetación de Matorral crasicaule con un pH promedio de 8.48 y un rango de materia orgánica que oscila entre los 0.6-4.07%. En comparación con los datos encontrados para las otras dos *Neobuxbaumias* (Cuadro 10, Anexo 1), encontramos que el tipo de suelo si puede ser una limitante en el establecimiento de estas especies

ya que la tolerancia a ciertas condiciones edáficas es hereditaria como un proceso microevolutivo y de selección y la adaptación a diferentes tipos de suelos ocurre mediante cambios genéticos pero que en el caso de especies de vida tan larga pueden llevar a la extinción antes de acumular los cambios que le permitan adaptarse (Pepper y Norwood, 2001).

Slatkin (1994) menciona que el flujo génico disminuye al aumentar la distancia física que separa las poblaciones. Un flujo génico constante impide que exista una gran diferenciación genética entre ellas y/o que el tiempo transcurrido ha sido insuficiente para alcanzar el equilibrio.

Se encontró que los datos de variación genética son muy similares tanto de AMOVA como los obtenidos con el índice de Shannon. La estructuración genética se mide a partir de los datos obtenidos con la Φ_{ST} (0.081) y la G_{ST} (0.23) en los que se observa que son cercanas a cero e indican que la población está muy cerca del equilibrio de Hardy-Weinberg, y que existen pocas diferencias entre las poblaciones ya que los valores de Φ_{ST} y G_{ST} indican la afinidad genética entre las poblaciones cuyos valores son inversamente proporcionales al flujo génico que en este caso es igual a 1.81, este valor de flujo génico es superior a 1, lo que nos indica que existe poca o nula diferencia entre las poblaciones. Estos valores indican variabilidad para *N. mezcalaensis* (Cuadro 12, Anexo 1), debida al flujo génico que se traduce en un gran parecido entre los individuos que constituyen una población (sitio de colecta), por lo que los sitios estudiados aunque se distribuyen en manchones en realidad son una sola población que comparte información genética.

Dado, que las especies endémicas tienen una mayor probabilidad de extinción que las especies con mayor distribución (Esparza, *et al.* 2002), y son pocos los estudios que analizan este tipo de especies, por lo que se realizaron comparaciones con los valores obtenidos para otras especies así como con los valores encontrados en la bibliografía, en donde de acuerdo con Hamrick, *et al.* (2002) (cuadro 11, anexo 1), en datos obtenidos mediante isoenzimas determinando valores de diversidad

encontrados para plantas en general, plantas leñosas de vida larga, cactáceas, así como plantas con entrecruzamiento y polinizadas por animales, arrojaron que *N. mezcalaensis* presenta valores de diversidad que coinciden con especies de vida larga, dispersión de sus semillas mediante animales y patrones de diversidad de especies no endémicas. Comparando estos datos con los reportados por Nybom y Bartish, (2002), obtenidos mediante marcadores RAPD, para las plantas en general, leñosas de vida larga, especies con entrecruzamiento y las dispersadas por animales; otros datos de gran importancia son los que se han encontrado en el laboratorio de Bioquímica Molecular donde se realizó este trabajo, al realizar comparaciones entre las tres especies de *Neobuxbaumia* todas endémicas de México, que cohabitan dentro del Valle de Tehuacan-Cuicatlán y que difieren en su rango de distribución, *N. macrocephala* es la especie más restringida ya que solo se presenta dentro del Valle en el estado de Puebla, se encuentra en densidades de 200 ind/Ha, *N. tetetzo* se distribuye en los estados de Oaxaca y Puebla y sus densidades son de 1680 ind/Ha y *N. mezcalaensis* la más ampliamente distribuida, presente en los estados de Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca y Puebla, las tres son polinizadas por murciélagos (*Leptonycteris nivalis*, *Leptonycteris curasoae* y *Choeronycteris mexicana*, en el caso de *N. tetetzo* solo es polinizada por las dos primeras); se ha demostrado que sus congéneres que cohabitan en el Valle presentan una diversidad similar aunque más baja en el caso de *N. tetetzo* y muy similar para *N. macrocephala*; (Alejos) así como también se encontró que la cactácea clonal, *S. stellatus* (Cornejo, en prep.) presenta una diversidad muy baja debido a su reproducción asexual.

IZT.

En estos datos encontramos que un parámetro de fácil comparación debido a que esta presente tanto en datos realizados con isoenzimas como en datos obtenidos a partir de RAPD's es la G_{ST} y los parámetros de loci polimórficos, que se observa (Cuadro 10, Anexo 1) que la diversidad de *N. mezcalaensis* es menor a la reportada para las plantas en general, y menor a la de su congénere *N. tetetzo*, pero su valor de G_{ST} corresponde con los datos encontrados para especies de plantas en general, con entrecruzamiento y dispersadas por animales obtenidos a partir de RAPD's.



Finalmente, se trató de correlacionar los valores de diversidad y distribución en manchones de la especie con sus características edáficas, reportadas para los sitios de colecta ubicados dentro del Valle de Tehuacán-Cuicatlán reportados por Rivas, 2003, que reporta la presencia de suelo tipo Feozem calcárico de acuerdo con la clasificación FAO (1994), con textura franco arcillosa, con una alta pedregosidad y pendientes fuertes de 15-25%, con una vegetación de Matorral crasicale con un pH promedio de 8.48 y un rango de materia orgánica que oscila entre los 0.6-4.07%. En comparación con los datos encontrados para las otras dos *Neobuxbaumias* (Alejos, 2002) (Cuadro 13, Anexo 1), estos datos muestran que *N. mezcalaensis* requiere de un pH alcalino, aunque la materia orgánica no es una limitante para su establecimiento, mientras que *N. macrocephala* requiere de suelos más neutros, lo que explicaría de manera parcial la presencia de *N. mezcalaensis* y *N. tetetzo*, en una misma región, ya que esto no se observó para *N. macrocephala* pues esta especie por lo general en los sitios donde se encuentra no está asociada a otros cactus columnares.

En el caso de *N. mezcalaensis*, a pesar de que es una especie endémica con la distribución más amplia del género, que abarca 7 estados y presenta una distribución en manchones, se encontraron valores de diversidad altos, sin embargo, los estudios comparativos con especies de diferentes rangos de distribución geográfica, en plantas consideran que para especies endémicas o especies que han presentado problemas reproductivos o incluso un cuello de botella o comparados con especies que presentan una distribución más amplia llegan a presentar patrones de diversidad genética bajos (Kruckeberg y Rabinowitz, 1985; Hamrick y Godt, 1989; Eguiarte y Piñero, 1990; Karron, 1987; Waller, *et al.* 1987). Por lo que para *N. mezcalaensis* se esperaría que su variabilidad genética fuera superior al de las otras *Neobuxbaumias*, sin embargo, estos valores son muy similares, estas excepciones en las que se observa mayor variación genética pueden ser atribuidos a diferentes factores, como la especificidad de sus habitats, historias de vida, polinizadores e incluso a cambios ambientales o a la actividad humana, los cuales llegan a tener efecto sobre las poblaciones naturales.

6 CONCLUSIONES

- Mediante un análisis de datos a partir de la prueba de t de Student para muestras pareadas se estableció que la columna de PVP no eliminó totalmente los fenoles, pero si redujo su concentración a niveles que permitieron la amplificación del DNA.
- Los marcadores RAPD tuvieron la capacidad de discernir entre tres especies del mismo género (*Neobuxbaumia*) demostrando su capacidad resolutive para cumplir con los objetivos planteados en el presente estudio.
- El valor de N_{em} encontrado (1.8) expresa un valor de flujo génico más alto en esta especie que en las dos especies de *Neobuxbaumia* anteriormente estudiadas, conformando una población no estructurada.
- El flujo génico encontrado pone de manifiesto la eficacia y una interacción muy estrecha con los polinizadores murciélagos nectarívoros (*Leptonycteris nivalis*, *Leptonycteris curasoae* y *Choeronycteris mexicana*), que realiza una amplia dispersión y homogenizado del polen y las semillas, que se comprobó con la prueba de Mantel, que confirma que en esta especie no existe aislamiento genético por distancia.
- Los datos de diversidad genética dentro y entre las poblaciones coinciden con lo predicho para especies de fertilización cruzada, polinizados y dispersados por animales y con ciclos de vida largos. No se encontró una variabilidad genética superior a la de sus congéneres de menor distribución.

- La variabilidad genética encontrada para *N. mezcalaensis* es muy similar a la encontrada para *N. macrocephala* aunque esta última presenta una distribución más restringida.
- La diversidad genética resultó superior a la esperada para especies endémicas.
- La similitud en los valores de diversidad genética de las tres especies del género *Neobuxbaumia* se debe a la similitud de sus características biológicas y de historia de vida.
- La distancia geográfica entre las poblaciones estudiadas no es suficiente como para observar una divergencia genética importante entre las poblaciones, ya que sus principales dispersores los murciélagos *Leptonycteris nivalis*, *Leptonycteris curasoae* y *Choeronycteris mexicana* cubren estas distancias con facilidad.
- Se estableció que los sitios de colecta estudiados en realidad conforman una sola población no estructurada.
- La estructura genética encontrada para *N. mezcalaensis* esta íntimamente ligada a su distribución, y el flujo génico mantiene una pequeña diferenciación genética entre las poblaciones, lo que evita la especiación.

LITERATURA CITADA

- Alejos, V. L. P. 2002. Estudio de la estructura poblacional de *N. macrocephala* en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, mediante el uso de marcadores moleculares. Tesis de licenciatura. FES-Iztacala, UNAM.
- Álvarez, T. y González-Quintero, L. 1970. Análisis polínico del contenido gástrico de murciélagos Glossophaginae de México. *Ana. Esc. Nac. Cienc. Biol.* 18: 137-165
- Arias, M.; Gama, L. S. y Guzmán, C. L. U. 1997. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, *Cactaceae*. Instituto de Biología. UNAM.14: 95-96.
- Arias, S. 1993. Cactáceas: Conservación y diversidad en México. *Rev. Soc. Mex: Hist. Nat.* XLV:109-115.
- Arismendi, M.C. y Espinosa de los Monteros. 1996. avifauna de los bosques de cactáceas columnares en el Valle de Tehuacán, Puebla. *Acta Zoológica Mexicana*. 67:25-46
- Arita, H. T. y Cevallos, G. 1997. Los mamíferos de México: distribución y estado de conservación The mammals of Mexico: distribution and conservation status. *Revista Mexicana de Mastozoología* 2:33-71.
- Barbour, R.W y Davis, W.H. 1969. Bats of North America. Univ. of Kentucky Press, Lexington. 286 pp.
- Becerra, R. 2000. Las cactáceas, plantas amenazadas por su belleza. *Biodiversitas*. Año 6, Septiembre.
- Becerra, V. V. y Paredes, M. 1999. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica*. 60:270-279.
- Bernal, S. S. y Terraza T. 1997. Comparación anatómica de la madera de individuos de *Neobuxbaumia mezcalaensis* que crecen en Zapotitlán de las Salinas, Puebla. I Congreso Nacional sobre cactáceas. Colegio de postgraduados, Montecillo, Estado de México, 26 al 29 de noviembre de 1997. p 27.
- Bonning, I; T. Huguet; Gherardi, M.; Prosperi, J.M. y Olivieri, I. 1996. High levels of polymorphism and spatial structure in selfing plant species, *Medicago truncatula* (Leguminosae), shown using RAPD markers. *American Journal of Botany*, 83(7):843-855.
- Bravo-Hollis, H. 1978. Las cactáceas de México, 2ª ed. Vol.1, UNAM, México D.F.
- Breyne, P.; Buyschaert, C.; Kremer, A.; Van Montagu, M. y Van Gysel, A.. 1997. Distribution of genetic diversity within pilot species of the tropical forest. *Belg. J. Bot.* 129:160
- Bussell, J.D. 1999. The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). *Mol. Ecol.*, 8:775-789. cacti. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 65(4): 999-1057
- Campbell, C.S.; Alice, L.A. y Wright, W.A. 1999. Comparisons of within-population genetic variation in sexual and agamospermous *Amelanchier* (Rosaceae) using RAPD markers. *Pl. Syst. Evol*, 215: 157-167.
- Casas, A. J. Caballero y A. Valiente-Banuet. 1999. Use, management and domestication of columnar cacti in south-central Mexico: A historical perspective. *Journal of Ethnobiology* 19: 71-95.
- Clark, R. 2000. Estructura genética de dos cactáceas columnares del desierto sonorense: *Stenocereus gummosus* y *S. Eruca* (Cactacea) Instituto de

- Ecología. Tesis de Maestría. UNAM México.
- Clasificación FAO.** 1994. Clasificación de suelos. Introducción al estudio de los sistemas de clasificación FAO y USDA. Reconocimiento de horizontes y horizontes de diagnósticos.
- Cockrum, E.L. y Petryszyn, Y.** 1991. The lesser long-nosed bat. *Leptonycteris* species in the Southwest? *Ocasional Papers of the Museum, Texas Tech University, Number 142: Pag 32.*
- Cornejo, O.D. y Simpson, B.B.** 1997. Analysis of form and function in North american columnar cacti (Tribe *Pachycereae*). *American Journal of Botany*, 84(11):1482-1501.
- Criscy, J.V. y López-Armengol, M.f.** 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica, serie de Biología, Monografía (Secretaría general de la Organización de los Estados Unidos Americanos, Washington D.C.). Vol 26. 132 p.
- Crow, J.F. y Aoki, K.** 1984. Group Selection for a polygenic behavioral trait: Estimating the degree of population subdivision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81:6073-6077.
- Chalmers, K.J.; Waugh, R.; Spret, J.I.; Simons, A.J. y Powell, W.** 1992. Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculata* using RAPD markers. *Heredity* 69: 465-472.
- Daniel, O.** 1998. Manejo, protección y conservación de bosques naturales. El Manejo Sustentable de los Recursos Forestales, Desafío del Siglo XXI. Primer Congreso latinoamericano IUFRO. Chile 22 a 28 de noviembre de 1998.
- Dellaporta, S.L.; Wood, J. y Hicks, J. B.** 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reproduction*. 1:19-21.
- Diario Oficial de la Federación.** 1998. Primera sección. Oficina de Publicaciones Oficiales. 10-11 pp.
- Divaret, I.; Margalé, E. y Thomas, G.** 1999. RAPD markers on seed bulks efficiently assess the genetic diversity of a Brassica oleracea L. collection. *Theor. Appl. Genet.* 98: 1029-1035.
- Doyle, J.J. y Doyle, J.L.** 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13-15.
- Egiarte, L.E. y Piñero, D.** 1990. Genética de la conservación: leones vemos corazones no sabemos. *Especial de Ciencias* No. 4:34-46 pp.
- Ellstrand, N.C. y Elam, D.R.** 1993. Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. *Annu Rev Ecol Syst* 24:217-242.
- Esparza, O. L.; Anaya G. V.; Valverde V. y Reyes S.** 1997. Estudio poblacional de *Neobuxbaumia macrocephala* en Zapotitlán de las Salinas, Puebla. I Congreso Nacional sobre Cactáceas. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México, 26 al 29 de noviembre de 1997. p 35.
- Esparza, O. L.; Valverde T. y Vilchis A. E.** 1999. Dinámica poblacional de *Neobuxbaumia macrocephala* en Zapotitlan Salinas, Pue. Cactáceas y otras suculentas. II Congreso Mexicano. I Congreso Latinoamericano y del Caribe. Oaxaca, México. p 77.
- Esparza, O. L.; Valverde T. y Vilchis A. E.** 2002. Demografía comparativa de tres especies de cactáceas columnares (*Neobuxbaumia*) con diferentes niveles de rareza. XV Congreso Mexicano de Botánica.
- Fægri, K. y Van del Pijl, L.** 1971. The principles of pollination ecology. Pergamon,

- Londres. 291 p.
- Ferreira E.M., y Grattapaglia, D.** 1989. Introducao ao uso de marcadores moleculares *analise genética*. Embrapa, CENARGEN. Brasilia, DF. 220p.
- ▷ **Frankham, R.** 1995. Conservation genetics. *Annual Review of Genetics* 29:305-327.
- Futuyama, D. J.** 1998. "Evolutionary Biology", 3rd edition, chapter 26 on developmental biology. Sinauer Associates Publisher. Sunderland, Mass.
- Gibson, A.C. y Horak, E.H.** 1978. Systematics, anatomy and phylogeny of Mexican columnar
- Gibson, A.C. y Nobel, P. S.** 1986. The cactus primer. Harvard University, Boston, 180 p.
- Godínez-Álvarez, H.O.** 2000. Dispersión biótica de semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* (Coulter) Backeberg en el valle de Tehuacan, Puebla. Tesis de Doctorado. Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Posgrado del C:C:H: Instituto de ecología. UNAM 200 p.
- Grant, V. y Grant, K.A.** 1979. The pollination spectrum in the southwestern America cactus flora. *Plant Syst. Evol.* 133: 29-37.
- Groman, J. D.; Pellmyr, O.** 1999. The pollination biology of *Manfreda virginica* (Agavaceae): relative contribution of diurnal and nocturnal visitors. *Oikos*, 87(2):373-381.
- Guillemaut, P. y Maréchal-Drouard, L.** 1992. Isolation of plant DNA: A fast, inexpensive, and reliable method. *Pl. Mol. Biol. Rep.* 10: 60-65.
- Guzmán, A. L.** 1993. El conocimiento de la biodiversidad en México. La Jornada ecológica. pp.4-5.
- Guzmán, C. y Aranda, U.D.** 1997. Propagación por semillas de diversas Cactáceas. I Congreso Nacional sobre cactáceas. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Estado de México, 26 al 29 de Noviembre de 1997. p 40.
- Hamrick J.I. y Godt, M. J.W.** 1989. Allozyme diversity in plant species. En Brown, A.H:D M:T: Clegg, A.L. Kahler y B. S. Weir. Eds Plant Population Genetic, Breeding and Genetic resources. Sinauer Associates Inc. Publishers, sunderland Massachussets. p. 43-63.
- Hamrick, J. L., Nason, J. D. y Fleming, T. H.** 2002. Genetic diversity in columnar cacti. En Evolution, ecology and conservation of columnar cacti and their mutualists. Fleming, T. y A., Valiente (eds.) Arizona University Press. 122-133 pp
- Hamrick, J.I. y Godt, M. J.W.** 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Proc. Roy. Soc. london B* 351:1291-1298.
- Hamrick, J.I.; Linhart, Y.B. y Motton, J.B.** 1979. Relationship between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 10:173-200.
- Hardy G.H. y Weinberg.** 1908. 'Mendelian proportions in a mixed population.' *Science*, 28, 49-50.
- Hartl, D.** 1999. A primer of population genetics. Genetic Variation. 3ª ed. E. U. A. pp. 1-58.
- Hartl, D. L. y Clark, A. G..** 1989. Principles of Population Genetics. Sinauer Associates. Sunderland, Mss.
- Hedrick, P. W.** 1983. Genetics of populations. Science Books International. USA. 629 p.
- Howe, H.F y Westley, L.C.** 1988. Ecological relationships of plant and animals. Oxford University, Oxford, 273 p.

- Howell, D.H. y Roth, B.S. 1981. Sexual reproduction in Agaves: the benefits of bats; the cost of semelparous advertising. *Ecology*. 62:1-7.
- Isabel, N.; Beaulieu, J. y Bousquet, J. 1995. Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6369-6373.
- Karrón, J.D. 1987. A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners. *Evolutionary Ecology* 1:47-58.
- Kimura, M. 1983. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press. Cambridge.
- Kresovich, S.; Williams, J.G.K.; Mc Ferson, J.R.; Routman, E.J. y Schaal, B.A. 1992. Characterization of genetic identities and relationships of Brassica oleracea L. via random amplified polymorphic DNA assay. *Theor. Appl. Genet.* 85: 190-196.
- Kruckeberg, A.R. y Rabinowitz, D. 1985. Biological aspects of endemism in higher plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 16:447-479.
- Lenay, C. 1994. La Evolución: de la bacteria al hombre. RBA Editores, S.A. Barcelona, España. p 128.
- Lewontin, R.C. 1974. The genetic basis of evolutionary change. Columbia University Press. USA.
- Loveless, M.D. y Harmick, J.L. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant population. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15:65-95.
- Loza C., Terrazas, S.; López, M.; Trejo, L. 2002. Características morfológicas y germinación de semillas en especies de Pachycereae (Cactaceae). XV Congreso Mexicano de Botánica.
- Luo, G.; Hepburn, A.G. y Widholm, J.M. 1992. Preparation of Plant DNA for PCR analysis: a fast, general and reliable procedure. *Pl. Mol. Biol. Rep.* 10: 319-323.
- Lynch, M. y Milligan, B. G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3:91-99
- Machado, M.F.; Prioli, A.J. y Mangolin, C.A. 1993. Malate Dehydrogenase (MDH; EC 1.1.1.37) isozymes in tissues and callus cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae) *Biochemical Genetics*, 31: Nos.3/4: 167-172.
- Mantel, N. A. 1967. The detection of disease clustering and a generalized approach. *Cancer Research*, 27:209-220.
- Martínez-García, M. ; Chavez, B.; Zúñiga, G y Campos, C. E. (Enviado) Genetic Diversity in the columnar cactus *Neobuxbaumia tetetzo* (Cactaceae) using RAPD.
- Micheli, M.R.; Bova, R.; Pascale, E. y D'Ambrosio, E. 1994. Reproducible DNA fingerprinting with the random amplified polymorphic DNA (RAPD) method. *Nucleic Acids Res.* 22: 1921-1922.
- Moeller, D.A. y Schaal, B.A. 1999. Genetic relationships among Native American maize accessions of the Great Plains assessed by RAPDs. *Theor. Appl. Genet.* 99: 1061- 1067.
- Moodle, M. Finch, R.P. y Marshall, G. 1997. Analysis of genetic variation in wild mustard (*Sinapis arvensis*) using molecular markers. *Weed Science*, 45:102-107.

- **Moreno, C.P. y Sánchez, R.G.** 1990. La enseñanza de la ecología en México. *Ciencias*, especial 4:96-111.
- Navarro, Q.A.R.** 1999. Estructura Genética y procesos de especiación de *Agave cerulata* (Trel.) y *Agave subsimplex* (Trel.) en el desierto sonorense a partir de RPD's. Tesis de licenciatura. UNM Facultad de Ciencias. 96 p.
- Nebauer, S.G., Del Castillo-Agudo, L. y Segura, J.** 1999. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing willow-leaved foxglove (*Digitalis obscura* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98: 985-994.
- Nei, M.** 1972. Genetic distance between populations. Patterns and theory. *Theoretical population biology* 13:121-177.
- Norma Oficial Mexicana.** 1994. NOM_059_Ecol_1994. Norma Oficial Mexicana (NOM-ECOL-059-1994). Que determina a las especies y subespecies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial y que establecen especificaciones para su protección. Diario Oficial de la Federación 16 de Mayo de 1994. 115p.
- Nybom, H y Bartish, I.** 2002. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics.* 3/2:93-114.
- Olfel, J. P., Furnier, G. R. y Luby J.J.** 2001. GAT data determine whether a plant taxon is distinct enough to merit legal protection? A case study of *Sedum integrifolium* (Crassulaceae). *American Journal of Botany*, 88:401-410.
- Otero, A.A., Cruz, M. y Oyama K.** 1997. El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. *Bol. Soc. Bot. México.* 60:85-117.
- Palacios, C. y González-Candelas, F.** 1997. Lack of genetic variability in the rare and endangered *Limonium cavanillesii* (Plumbaginaceae) using RAPD markers. *Molecular Ecology*, 6:671-675.
- Pepper, A.E. y Norwood, L.E.** 2001. Evolution of *Caulanthus amplexicaulis* var. *barbarae* (Brassicaceae), a rare serpentine endemic plant: a molecular filogenetic perspective. *American Journal of Botany*, 88:1479-1489.
- Petit, S. y Freeman, C. E.** 1997. Nectar production of two sympatric species of columnar cacti. *Biotropica* 29: 175-183.
- Pleasants, J.M y Wendel, J.F.** 1989. Genetic diversity in a clonal narrow endemic, *Erythronium propullans* and in its widespread progenitor, *Erythronium albidum*. *Amer. J. Bot.* 76: 1136-1151.
- Porebski, S. y Catling, P.M.** 1998. RAPD analysis of the relationship of North and South American subspecies of *Fragaria chiloensis*. *Can. J. Bot.* 76: 1812-1817.
- Ramírez, P. C. y Valverde, V.** 2002. Germinación de semillas en tres especies de *Neobuxbaumia* que difieren en su nivel de rareza. XV Congreso Sociedad Botánica de México.
- Rivas, R.A.** 2003. Levantamiento edafológico semidetallado de la porción Norte del Valle de Zapotitlán, Puebla. Tesis de Licenciatura. FES-Iztacala, UNAM.
- Rojas, M. A.** 1996. Estudio poblacional de tres especies de murciélagos nectarívoros considerados como migratorios y su relación con la presencia estacional de los recursos florales en el Valle de Tehuacán. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM.

- Rojas, M. A. Valiente-Banuet, Arizmendi, M.C y Alcantar A. 1996. Seasonal distribution of the long-nosed (*Leptonycteris curasoae*) in North America; does a generalizalized migration pattern really exist?. Instituto de Ecología. UNAM.
- Rzedowski, J. 1962. Contribuciones a la fitogeografía florística de México. Y algunas consideraciones acerca del elemento endémico en la flora de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 27: 52-65.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Limusa. México, D.F. 432 p.
- Rzedowski, J. 1991. Vegetación de México. Limusa. México, D.F. 432 p.
- Samec, P.; Pasvec, Z.; Stejskal, J.; Nažinec, V. y Griga M. 1998. Cultivar identification and relationships in *Pisum sativum* L. based on RAPD and isoenzymes. *Biologia Plantarum* 41: 39-48.
- Skroch, P. y Nienhuis, J. 1995. Impact of scoring error and reproducibility of RAPD data on RAPD based estimates of genetic distance. *Theor. Appl. Genet.* 91: 1806-1091.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural population. *Science* 236:787-792.
- Slatkin, M. 1994. Gene flow and population structure. En Real, L. (Ed.) Ecological genetics. Princeton Univesrity Press, N.J.
- Staub, J.E. y Serquen, F.C. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Hort Science* 31: 729-740.
- Stewart, N.C. y Excoffer, L. 1996. Assessing population genetic structure and variability with RAPD data: Application to *Vaccinium macrocarpon* (*American cranberry*). *Juornal of Evolutionary Biology* 9:153-171.
- Strauss, R.E. 1982. Statical significance of species clusters in association analysis. *Ecology*. 63:634-639.
- Swofford, D.L. y Olsen, G.J. 1990. Phylogeny reconstruction. In Hillis, D. M. and Moritz, C., editors, *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Systma, K.J. y Schaal, B.A. 1985. Genetic variation, differentiation and evolution in a species of complex tropical shrubs based on isozymic data. *Evolution*, 39: 582-593.
- Thomson, D. y Henry, R. 1993. Use of DNA from dry leaves for PCR and RAPD analysis. *Pl. Mol. Biol. Rep.* 11: 202-206.
- Valiente-Banuet A.; Arizmendi M.C.; Rojas, A. y Casas, A. 1995. Bases ecológicas del desarrollo sustentable en zonas áridas: El caso de los bosques de cactáceas columnares en el Valle de Tehuacán y Baja California Sur, México. Enb:G.M. Anaya y C. Díaz Editores. Memorias del IV curso sobre desertificación y desarrollo sustentable. PNUMA, FAO. colegio de Posgraduados, Chapingo, México. pp. 20-36.
- Valiente-Banuet A.; Rojas-Martinez, A.; Arizmendi M.C. y Dávila, P. 1997. Pollination biology of two calumnar cacti (*Neobuxbaumia mezcalaensis* and *Neobuxbaumia macrocephala*) in the Tehuacan Valley, central Mexico. *Amer. J. Bot.* 84(4):452-455.
- Valiente-Banuet, A.; Arizmendi M.C. y Rojas-Martinez, A. 1996. Nectar-feeding bats in columnar cacti forest of Central México. *Bats* 14:12-15.
- Valiente-Banuet, A.; Arizmendi M.C.; Rojas-Martinez, A. 1996. Ecological relationships between columnar cacti and nectar-feling bats in México. *J. Trop. Ecol.* 11:1-17.

- Valeiente-Banuet, A y Escurra, E. 1991. Shade as a cause of the association between the cactus *Neobuxxaunia teterzo* an the nurse plant *Mimosa luisana*. *Journal of Ecology* 79: 961-971.
- Van Houten, W.; Van Raamsdonk, L. y Bachmann, K. 1994. Intraspecific evolution of *Microseris pygmaea* (Asteraceae, Lactuceae) analyzed by cosegregation of phenotypic characters (QTLs) and molecular markers (RAPDs). *Pl. Syst. Evol.* 190: 49-67.
- Villaseñor, J.L.; Dávila, P. y Chiang, F. 1990. Fitogeografía del Valle de Tehuacán Cuicatlán. *Bol Soc Bot México* 50:135-149.
- Vite, G.; Portilla, G.; Zavala, H.; Valverde P.; Díaz S. y Arias M. 1997. *Cephaluxbaumia zapotitlana*, un híbrido natural de dos especies de cactáceas columnares de la región de Tehuacán-Cuicatlán. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. p 61.
- Wallace, B. 1974. Genética de Poblaciones. Compañía Editorial Continental. México. 35p
- Waller, D.M.; O'Malley, D.M y Gawler S.C. 1987. Genetic variation in the extreme endemic *Pedicularis furbishiae* (Scrophulariaceae). *Conserv. Biol.* 1(4):335-340.
- Waugh, R. y Powell W. 1992. Using RAPD Markers for Crop Improvement, for crop improvement. *Tibtech* 10:186-191.
- Welsh, J. y McClelland, M. 1990. Fingerprints genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213- 7218.
- Williams, J.G.K. 1993. Genetic analysis using RAPD markers, *Methods in Enzymology* Vol. 224 pag 704.
- Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A. y Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Wolff, K. y Peters-Van Rijn, J. 1993. Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) using random primers. *Heredity* 71: 335-341.
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating, *Evolution*, 19: 395-420.
- Yu, L.X. y Nguyen, T. 1994. Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 87: 668-672.
- Zabeau, M. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. *European Patent Application. Publication No.* 0 534 858 A1.
- Zavala-Hurtado, J. A. y Díaz-Soltis A. (1995) Repair, growth, age and reproduction in the gigant columnar cactus *Cephalocereus columna-trajani* (Karwinki ex. Pfeiffer)Schuman (Cactaceae). *Journal of Arid Environmens*, 31:21-31.
- Zhivotovsky, L. A. 1999. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology* 8:907-913.
- www. Ine.gob.mx. 2003. Instituto Nacional de Ecología. Desarrollo rural, recursos naturales y biodiversidad.
- www. Proyecto_Cactáceas_Brasileiras.htm. 2000. Proyecto Cactáceas Brasileiras.

Cuadro10: Características Biológicas y genéticas de las tres especies de *Neobuxbaumia* que cohabitan en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

Espece	Abundancia	Distribución	Variabilidad G'_{ST}	Φ_{st}	V(A)	$N_e m$	Estructura ción
<i>N. Macrocephala</i> ¹	200 ind/Ha	Baja	0.226	0.106	89.38%	1.19	NO
<i>N. tetetzo</i> ²	1200 ind /Ha	Media	0.357	0.288	73.13%	0.47	SI
<i>N. mezcalaensis</i>	1680 ind /Ha	Alta	0.23	0.081	91.91%	1.81	NO

Φ_{ST} .Phi estadística homóloga a la F_{ST} de Wright; V(A) varianza entre las poblaciones; $N_e m$, flujo génico

Datos obtenidos en el Laboratorio de Bioquímica Molecular de la FES-Iztacala, Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO)

¹ Alejos, V.L.P. 2002.

² Martínez-García, *et al.*, en prensa

Cuadro 11: Niveles promedio de diversidad genética en plantas con características de historia de vida similares. Los datos que se muestran están basados en isoenzimas y marcadores RAPD.

Grupo	$P(\%)$	AP_s	H_{es}	G_{ST}	H_{sp}	H_{pop}	ϕ_{ST}
Todas las plantas ¹	51.3	2.89	0.150	0.288			
Leñosas de vida larga ¹	65.0	2.88	0.177	0.084			
Leñosas con entrecruzamiento y polinizadas por animales ¹	63.2	2.87	0.211	0.099			
Cactáceas ¹	91.5	3.38	0.211	0.120			
Todas las plantas ²				0.29		0.214	0.35
Leñosas de vida larga ²				0.23		0.242	0.25
Especies con entrecruzamiento ²				0.23		0.260	0.28
Especies dispersadas por animales ²				0.17		0.228	0.29
<i>S. stellatus</i> (Comejo, en prep.)	79.72			0.085	0.236	0.226	0.093
<i>Neobuxbaumia tetetzo</i> (Martínez-García, et al., 2002)				0.357	0.402	0.314	0.288
<i>N. macrochepala</i> (Alejos, 2002)				0.226	0.348	0.359	0.106
<i>N. mezcalaensis</i>	97.24		0.21	0.230	0.28	0.380	0.081

P = proporción de loci polimórficos; AP_s = número de alelos por locus polimórfico; H_e = proporción esperada de loci heterocigos por individuo = diversidad genética; G_{ST} = proporción de diversidad genética debida a diferencias entre poblaciones; H_{sp} diversidad genética obtenida con el índice de Shannon; H_{pop} diversidad promedio dentro de poblaciones; ϕ_{ST} pareada.

¹ Datos tomados de Hamrick *et al.*, 2002, obtenidos mediante isoenzimas.

² Datos tomados de Nybom y Bartish, 2000, obtenidos mediante marcadores RAPD.

Cuadro 12: Valores de diversidad genética obtenidos mediante AMOVA e Índice de Shannon y flujo génico calculados para *N. mezcalaensis*.

V(A)	V(B)	(Hsp-Hpop/Hsp)	Hpop/Hsp	Φ_{ST}	G_{ST}	$N_e m$
8.09%	91.9%	23%	77%	0.081	0.23	1.815

V(A): diversidad entre poblaciones, V(B): diversidad dentro de las poblaciones, Hpop/Hsp: proporción de la diversidad dentro de la especie; (Hsp-Hpop/Hsp) proporción de la diversidad entre poblaciones, Φ_{ST} y G_{ST} : estructura genética, $N_e m$: flujo génico en donde N_e es el número. efectivo de la población y m : No. de inmigrantes por generación.

Cuadro 13: Datos edáficos y ecológicos encontrados para las tres especies de *Neobuxbaumia*.

Especie	Ind/Ha	Suelo	pH	m.o.
<i>N. tetetzo</i>	1200	Franco-areno-limoso	6.5-9.66	4.28
<i>N. macrocephala</i>	200	Franco areno arcillosos	7.76	4.55
<i>N. mezcalaensis</i>	1680	Franco arcilloso	8.48	0.6-4.07

Ind/Ha: individuos por hectárea; m.o: materia orgánica presente en el suelo.

I
TÉCNICA DE CTAB (Doyle y Doyle, 1990)

1. Calentar el Buffer de CTAB 2x* a 60°C
2. Moler 70mg de tejido en un mortero, con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino.
3. Agregar 1.5 ml de buffer de CTAB 2X tibio y moler, hasta obtener una mezcla homogénea.
4. Transferir el homogenizado aproximadamente 2ml a un tubo Eppendorf e incubar a 62°C, por 30min.
5. Agregar 10 µl de Proteinasa K 10mg/ml, incubar a 37°C por 30 min.
6. Agregar un volumen igual de CIA (Cloroformo-alcohol isoamilico, 24:1 y mantener en vortex invertido por 10min.
7. Centrifugar por 10 min a 15,000 r.p.m. y colectar el sobrenadante en un tubo nuevo.
8. Agregar 2.5 µl de RNAsa (10 mg/ml) agitar fuertemente e incubar a 37° C por 30 min.
9. Agregar un volumen igual de CIA y homogeneizar en Vortex con el tubo invertido por 5 min.
10. Centrifugar por 10 min a 15,000 r.p.m. Colectar el sobrenadante en un tubo nuevo.
11. Agregar 2/3 del volumen de isopropanol frío. Mezclar fuertemente, incubar por 15 min a 4°C.
12. Centrifugar por 10 a 15,000 r.p.m. y remover el sobrenadante a un tubo nuevo.
13. Lavar la pastilla de DNA con 250 ml de etanol al 70%.
14. Dejar secar.
15. Agregar de 50-100 ml de buffer de TE y mezclar suavemente por 30 min o toda la noche para resuspender a 4°C.
16. Correr una alícuota de 3 µl de DNA con 1-2 µl de colorante 6X en un gel de agarosa 0.8% para determinar la integridad del DNA.

***CTAB2X**

2% CTAB 2g

1.4 M NaCl o 28 ml de NaCl5 Mo 8.19 g de NaCl.

100 mM de Tris-HCl pH 8.0 o 10ml de Tris HCl M.

20 mM de EDTA o 4 ml de EDTA 0.5 M.

1% o 1 g de PVP-40

0.25% o 200 ml de 2-mercaptoetanol.

Aforar a 100 ml con H₂O destilada.

TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE Dellaporta, et al.(1983).

1. Agregar 500 μ l de buffer de mercaptoetanol (Tris 100mM, EDT A 50mM, NaCl 500 mM y mercaptoetanol 10 mM).
2. Añadir 1 g muestra.
3. Agregar 34 μ l de SDS al 20%.
4. Mantener en baño María 10 min a 65°C.
5. Agregar 167 μ l de acetato de potasio 5M.
6. Mantener 20 min en hielo o en congelador a -20°C.
7. Centrifugar a 14,000 r.p.m. durante 20 min.
8. Pasar el sobrenadante a otro tubo con 350 μ l de isopropanol.
9. Mantener a -20°C por 30 min.
10. Centrifugar a 14,000 r.p.m. durante 15 min.
11. Secar con papel.
12. Resuspender la pastilla en 600 μ l de agua estéril.
13. Agregar 500 μ l de fenol-cloroformo 1:1.
14. Agitar por inversión, y dejar de 2- 5 min y volver a agitar.
15. Centrifugar a 14,000 r.p.m. durante 20 min
16. Recobrar la fase acuosa (aprox. 500 μ l)
17. Agregar 50 μ l de acetato de Sodio 3 M.
18. Agregar 1 ml de etanol absoluto.
19. Mantener 60 min a -20°C.
20. Centrifugar a 14,000 r.p.m. por 30 min.
21. Lavar con etanol al 70%
22. Secar con papel.
23. Resuspender la pastilla resultante en 50 μ l de agua estéril.
24. Guardar a 4°C.
25. Correr una alícuota de 3-5 μ l de DNA con 1-2 μ l de colorante 6X en un gel de agarosa 0.8% para determinar la integridad del DNA.

