



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES IZTACALA

Caracterización a nivel genético de un
posible híbrido entre dos especies de
cactáceas columnares del género
Neobuxbaumia

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA

Biól. Laura Patricia Alejos Velázquez

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE E. CAMPOS CONTRERAS

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla Edo. de México.

Noviembre 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*"Nada tiene sentido en biología
si no es bajo el prisma de la evolución"*

Dobzhansky

DEDICATORIA

A mis padres,

Salvador Alejos Betancourt

y

Patricia Velázquez Martínez

*Gracias por su apoyo, por sus desvelos
y preocupaciones.*

*Gracias por su gran ejemplo como seres humanos, por su amor
y sacrificios.*

*Gracias por la confianza que me han brindado y por tantos
momentos felices, mil gracias.*

Los amo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad y a la FES Iztacala, principalmente a los maestros que me dieron clases durante mi formación. Un agradecimiento especial a los funcionarios que han apoyado a miles de estudiantes a obtener un grado, en particular a la Maestra Pilar Castillo y a Lolita (Dolores Rodríguez) muchas gracias por orientarnos y apoyarnos con tanto esmero y cariño durante este trayecto.

Al CONACyT por la beca otorgada durante los dos años de posgrado, No. de registro 172561.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP), por la beca complementaria, para cursar mis estudios.

Al COMECyT por la beca concedida para concluir ésta tesis. No. de registro 199.

A mi querido asesor el Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras, nunca lograre saldar mi cuenta, usted me ha apoyado en todos los sentidos, no solo ha sido un asesor científico si no un gran amigo, un gran apoyo. Gracias por confiar en mí siempre y por ayudarme a crecer como profesionista y ser humano, ¡MIL GRACIAS!

A los miembros de mi comite:

Dra. Guadalupe Palomino Hasbach y Dr. Alfonso Valiente Banuet Verdaderos sabedores del espíritu universitario. Con profundo agradecimiento por brindarme su tiempo y conocimientos, por orientarme, pero sobre todo por su paciencia y comprensión... ¡GRACIAS!

A mis sinodales:

El Dr. Salvador Arias Montes y la Dra. Sofía Solórzano Lujano, por que la verdadera grandeza de la Universidad, esta en aquellas personas que se preocupan en apoyar a sus alumnos ¡Gracias Por Su Valiosa Ayuda!

*Muchas gracias al Maestro Javier Martínez R. y a la Maestra Miriam,
por su paciencia y apoyo en la parte de realizada en el laboratorio
de Citogenética del Instituto de Biología- Jardín Botánico.*

Gracias al Maestro Ernesto Aguirre León y a sus alumnos Enrique,

Gustavo y Angélica por ayudarme a cuidar mis plantas en el invernadero de la FES- Iztacala.

*Gracias al Dr. Gerardo Zúñiga y al Dr. Fabián Vargas, del IPN,
por ser grandes maestros, compartir conmigo sus conocimientos en el
análisis estadístico y ser mis tutores durante tantos años.*

*A mis grandes amigos Irma Rivera, Lety Santos, Amelia Cornejo, Alejandro Monsalvo, la Dra.
Martha Martínez, Adelaida Ocampo, Dr. Ernesto Aguirre, Carlos Rosas, Ramón, Yarai
Gaviria, Alma D. David y Martha Contreras, por ser mi fuerza y apoyo en los momentos de
flaqueza, los grandes oídos en los momentos de catarsis y el rostro amable con la sonrisa franca en
los momentos felices. ¡MUCHAS GRACIAS POR SU AMIDTAD!*

*Al Dr. Rodolfo de la Torre, por ser una pieza fundamental
en mi crecimiento profesional y personal, por haberme apoyado
en los momentos difíciles y presionar en la medida exacta.
Gracias por siempre por su gran amistad*

*A todos los integrantes del laboratorio de Biología Molecular de la UBIPRO, a los que ya no
están, a los que continúan, a los que llegaron, a un espacio que permite crecer el conocimiento, la
experiencia y la amistad.*

*Adrián Chávez, Eduardo Alvarado y Carlos Pérez,
por que a pesar de los años transcurridos, siempre puedo confiar en ustedes,
por que son el eslabón con el pasado y los cimientos del futuro,
por demostrarme el valor de la amistad sincera. Muchas gracias por seguir a mi lado.*

*A mis amigos de ACCESOLAB, Lorena, Mónica, Mary
Carmen, Enrique, Luis, Martín, Israel, David, Gaby, Alis y Elizabeth.
Gracias amigos por alentarme a concluir esta etapa.*

*A mis hermanos, Salvador, Carmen, Ana, Lizeth, Yeny, Karen, Caro, a mi
cuñado preferido Gerardo Román y a mi sobrino adorado
Joshua Essau Román Alejos, muchas gracias por confiar en mí, por
permitirme compartir su vida por mostrarme mis errores y aceptarme
con mis defectos, por apoyarme y ser mi aliento. Muchas Gracias
por ser mi familia.*

*A todos mis tíos, por creer en mí por apoyarme y preocuparse por
mi bienestar y el de mi familia, por hacer a un lado las
diferencias y crear un núcleo de seguridad y de unidad,
por ser el respaldo de mi vida. ¡GRACIAS!*

*A mi abuelita Anita Martínez, por ser el cimiento fuerte de
una gran familia y mi ejemplo a seguir como mujer.
La quiero mucho abuelita.*

*A mis Padrinos Domingo Veles y María del Jesús Guzmán y a
mi pequeña Dianita, muchas gracias por todo su amor, por su
preocupación y su cariño.*

*Al amor de mi vida Iván Cárdenas B.
Gracias por seguir a mi lado y apoyarme siempre, por demostrarme
tu cariño en todo momento, por ser paño de lagrimas y fuente de alegrías
El refugio de mis tristezas y el amigo incondicional. Te
amo.*

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ABREVIATURAS	V
RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 CONCEPTO DE ESPECIE	1
1.2 HIBRIDACIÓN: EXTINCIÓN O DESARROLLO DE UNA NUEVA ESPECIE	2
1.3 IDENTIFICACIÓN DE POBLACIONES HÍBRIDAS	5
1.4 MÉTODOS UTILIZADOS EN LA DETECCIÓN DE HÍBRIDOS	6
1.4.1 Marcadores moleculares	6
1.4.2 Viabilidad del polen y Estimación del tamaño del genoma	7
1.5 ANTECEDENTES	11
1.6 HIPÓTESIS	16
1.7 OBJETIVOS	16
2. MATERIALES Y METÓDOS	17
2.1 COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO	17
2.2 TRABAJO DE LABORATORIO	19
2.2.1 Extracción de ADN	19
2.2.2 Marcadores moleculares RAPD	19
2.2.2.1 Análisis estadístico de marcadores RAPD	20
2.2.2.2 Similitud Genética	20
2.2.2.3 Análisis de coordenadas principales	21
2.2.2.4 Estructura genética	21
2.2.2.5 Flujo génico ($N_e m$)	22
2.2.3 Amplificación de las Secuencias de ADNcp e ITS	23
2.2.3.1 Análisis de las secuencias de ADNcp e ITS	24
2.2.4 Viabilidad del polen	26
2.2.5 Contenido de ADN por citometría de flujo	26
3. RESULTADOS	28
3.1 MARCADORES RAPD	29
3.1.1 Similitud Genética	29
3.1.2 Análisis de coordenadas principales	32
3.1.3 Estructura Genética	33
3.1.4 Flujo génico ($N_e m$)	33
3.2 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE ADNCP	36
3.3 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA NUCLEAR EN LA REGIÓN DEL ITS	38
3.4 VIABILIDAD DEL POLEN	44
3.5 ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DEL GENOMA POR CITOMETRÍA DE FLUJO	44

4. DISCUSION	48
Evidencia de hibridación con marcadores RAPD	48
Evidencia de hibridación en la región de ADNcp	49
Evidencia de hibridación en la región nuclear del ITS	50
Evidencia de fertilidad en los posibles híbridos por viabilidad del polen	51
Evidencia de homología cromosómica por citometría de flujo	51
Impacto de la hibridación en la integridad de las especies paternas	52
Impacto de la hibridación en la permanencia de las especies paternas	54
5. CONCLUSIONES	57
6 BIBLIOGRAFÍA	58
APÉNDICE 1 Localización geográfica de los posibles híbridos analizados	77
APÉNDICE 2 Extracción de ADN	78
APÉNDICE 3 Preparación de muestras para determinar el contenido de ADN nuclear	79

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1	Características generales de las especies de <i>Neobuxbaumia</i> y posibles híbridos	14
CUADRO 2	Oligonucleotidos utilizados para amplificar la región cloroplástica y nuclear	23
CUADRO 3	Fenotipo y número de costillas de 17 posibles híbridos en las dos zonas de estudio.	28
CUADRO 4	Bandas obtenidas con seis oligonucleotidos, exclusivas por especie y posibles híbridos.	29
CUADRO 5	Análisis de Varianza molecular (AMOVA), para las especies de <i>N. macrocephala</i> , <i>N. mezcalaensis</i> y sus posibles híbridos	33
CUADRO 6	Φ_{ST} pareadas entre especies y flujo génico ($N_e m$)	34
CUADRO 7	Sitios nucleotídicos compartidos entre especies en la región nuclear del ITS	41
CUADRO 8	Sitios nucleotídicos polimórficos conservados en la secuencia del ITS	42
CUADRO 9	Arreglo por similitud en las secuencias de ITS de los posibles híbridos.	43
CUADRO 10	Porcentaje de viabilidad en granos de polen de flores maduras.	44
CUADRO 11	Contenido de 2C ADN en pg de cada una de las especies analizadas.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Histogramas producidos por el citómetro de flujo	9
FIGURA 2	Características morfológicas en tres especies del género <i>Neobuxbaumia</i>	15
FIGURA 3	Mapa que muestra los sitios de colecta del material biológico	18
FIGURA 4	Sitio de reconocimiento de los oligonucleotidos para amplificar la región trnT-trnL del ADNcp	23
FIGURA 5	Sitio de reconocimiento de los oligonucleotidos para amplificar el ITS	24
FIGURA 6	Dendrograma obtenido con el índice de Similitud de Dice agrupado por UPGMA	31
FIGURA 7	Análisis de coordenadas principales en tres dimensiones	32
FIGURA 8	Dendrograma de la distancia genética entre los grupos analizados	35
FIGURA 9	Uno de los tres árboles más parsimoniosos, obtenidos de las secuencias de la región cloroplástica	37
FIGURA 10	Cladograma realizado con las secuencias de la región del ITS	39
FIGURA 11	Red filogenética generada con el programa Splitstree, de las secuencias de ITS	40
FIGURA 12	Contenido 2C de ADN nuclear	46
FIGURA 13	Histograma que representa núcleos con diferente nivel de ploidía en el híbrido tipo 2	47

ABREVIATURA S

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNcp	ADN del cloroplasto
ADNrn	ADN ribosomal nuclear
AMOVA	Análisis molecular de varianza
Ce	<i>Cephalocereus columna-trajani</i>
CV	Coefficiente de variación
Φ_{ST}	Índice de variabilidad genética que analiza frecuencias de haplotipos
G_{ST}	Índice de variabilidad genética que analiza frecuencias alélicas
H	Posibles híbridos
ITS	Espaciador de transcripción interna
JB	Jardín Botánico
Ma	<i>Neobuxbaumia macrocephala</i>
MER	Método de evaluación del riesgo de extinción de las especies silvestres en México
Mpb	Millones de pares de bases
Mz	<i>Neobuxbaumia mezcalaensis</i>
n. e.	No estimado
$N_e m$	Número de inmigrantes por generación o flujo génico
NJ	Neighbor-Joining
PCA	Análisis de componentes principales
PCO	Análisis de coordenadas principales
Pg	Picogramos
PI	Ioduro de propidio
r	Coefficiente de correlación
RAPD	Amplificación azarosa de ADN polimórfico
RM	Los Reyes Metzontla
SJR	San Juan Raya
SM	San Martín
Te	<i>Neobuxbaumia tetetzo</i>
TIM	Tepenene Izúcar de Matamoros
UPGMA	Agrupamiento aritmético por promedios no ponderados
1C	Contenido de ADN nuclear del complemento cromosómico haploide
2C	Valor diploide del contenido de ADN nuclear

RESUMEN

La hibridación es un mecanismo de especiación que puede causar incertidumbre entre hipótesis filogenéticas en cactáceas y su descripción permite inferir rutas evolutivas y aclarar relaciones taxonómicas. La plasticidad genética puede ser confundida con un proceso de hibridación pero la combinación de datos morfológicos y moleculares permiten un mejor análisis filogenético. Se analizaron individuos con características morfológicas intermedias, para determinar la presencia de híbridos entre *Neobuxbaumia macrocephala* y *N. mezcalaensis*, que coexisten en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla. Se emplearon técnicas moleculares (RAPD) para analizar el genoma total y determinar la existencia de flujo génico (N_{em}). Se compararon secuencias de ADN del cloroplasto (ADNcp) y nuclear (ITS), para deducir relaciones filogenéticas. Se utilizaron técnicas indirectas como la estimación de la viabilidad del polen, para cuantificar la homología cromosómica y del tamaño del genoma en millones de pares de bases (Mpb). De acuerdo a los resultados, existe flujo génico entre las poblaciones ($N_{em} = 1.08$). En la región de ADNcp existe mayor parecido entre *N. mezcalaensis* y los híbridos. En la región nuclear algunos individuos presentaron similitud con *N. mezcalaensis* y otros con *N. macrocephala*. Además, se encontró similitud en el tamaño del genoma en *N. macrocephala* 2538 Mpb, *N. mezcalaensis* 2528 Mpb y los híbridos 2616 Mpb y estos últimos presentaron alto porcentaje de viabilidad del polen (60% al 90%), lo que sugiere la existencia de homología cromosómica. En conclusión, las características morfológicas en los individuos analizados se deben a un proceso de hibridación entre *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis*.

ABSTRACT

The hybridization is a mechanism of speciation, that origin uncertainty among hypothesis phylogenetic in cactaceae. Description of this species, permits to infer evolutionary routes and to clarify relations taxonomic. The plants present mechanisms of answer environment that origin morphological changes, that can be confused with a process of hybridization. In this work, individuals with intermediate morphological characteristics were analyzed, to determine the presence of hybrids among *Neobuxbaumia macrocephala* and *N. mezcalaensis*, that coexist in the Valley of Tehucán-Cuicatlán, Puebla. Molecular techniques were employed to analyze the genome and to determine the existence of gene flow (N_{em}). Sequences of chloroplast DNA (cpDNA) and the spacer of internal transcription (ITS) of the nuclear DNA were compared, to deduce relations phylogenetic. Indirect techniques were utilized like the estimation of the size of the genome in millions of pairs of bases (Mpb) and the viability of the pollen, to quantify the chromosomal homology. According to the results, gene flow among the populations exists ($N_{em} = 1.08$), what supposes the existence of hybrids among the species analyzed. Greater similarity in the region can be observed of ADNcp among *N. mezcalaensis* and the putative hybrids. In the analysis of the sequence ITS, some individuals presented similarity with *N. mezcalaensis* and other with *N. macrocephala*, indicating a process of hybridization. Some hybrids were grouped in different groups to the parents, indicating existence of backcross. Besides, similarity in the size of the genome was found, in *N. macrocephala* 2538 Mpb, *N. mezcalaensis* 2528 Mpb and the putative hybrids 2616 Mpb. The putative hybrid present high percentage of viability of the pollen (60% al 90%), what suggests the existence of chromosomal homology. In conclusion, the results indicate that the morphological characteristics in the individuals analyzed, themselves due to that share genetic information of both species. According to the previous thing, evidence of hybridization exists between *N. macrocephala* and *N. mezcalaensis*.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 CONCEPTO DE ESPECIE

Las formas biológicas que identificamos como entidades diferentes han sido designadas con el nombre de especies y su reconocimiento se basa en la comprobación de que existen diferencias morfológicas y genéticas dentro de la biodiversidad (Dobzhansky *et al.*, 1980; Perfectti, 2002). El concepto biológico de especie propuesto por Mayr (1942), es el más utilizado. En este concepto se resalta la existencia de reproducción sexual y la fertilidad de la descendencia, además enfatiza el aislamiento reproductivo con miembros de otras especies mediante mecanismos de aislamiento pre o postcigóticos. Estos mecanismos al interrumpir el flujo génico, permiten la fijación de características genéticas y morfológicas particulares para cada especie mediante la reproducción sexual. Con esto se mantienen homogéneos los acervos genéticos de las poblaciones por recombinación genética y previene la excesiva diferenciación entre individuos de la misma especie, proceso que se conoce como evolución concertada (Dobzhansky *et al.*, 1980; Perfectti, 2002).

Aunque el concepto biológico de especie es muy aceptado existen diferentes trabajos experimentales en genética y taxonomía que demuestran que algunos individuos híbridos pueden ser fértiles y por tanto no todas las especies presentan aislamiento reproductivo completo (Anderson, 1948; Barton y Hewitt, 1985). Diversos conceptos de especie han sido propuestos por especialistas de muy diversos campos (genética, taxonomía, biogeografía, paleontología, entre otras) y aunque las definiciones pueden ser adecuadas para cada disciplina, no suelen ser aplicables a toda la diversidad de seres vivos y probablemente no existe un criterio único que funcione correctamente para todos (Perfectti, 2002). Sin embargo, podemos delimitar a la especie de acuerdo a características generales que se reconocen en las definiciones biológicas como grupos de poblaciones que se entrecruzan, que comparten una serie de rasgos distintivos y que evolucionan de forma separada es decir, que presentan independencia evolutiva. Lo anterior implica que los procesos evolutivos como mutación,

selección, deriva y migración, operan de forma independiente en cada especie (Perfectti, 2002). De acuerdo a Harrison (1998), la formación de nuevas especies puede ser considerada un proceso de diferenciación entre poblaciones, que alcanzan independencia evolutiva y pasan por varios grados de diferenciación y estos son reflejados por los distintos conceptos de especie. Por ello, es posible observar híbridos naturales entre especies del mismo género que se conocen como interespecíficos y es menos frecuente la existencia de híbridos entre especies que pertenecen a géneros distintos que son conocidos como intergenéricos ya que las diferencias genéticas son mayores (Anderson, 1948; Perfectti, 2002) y de acuerdo al grado de diferenciación que exista entre taxones, puede ser posible la formación de híbridos fértiles (Barton y Hewitt, 1985).

1.2 HIBRIDACIÓN: EXTINCIÓN O DESARROLLO DE UNA NUEVA ESPECIE

La definición de hibridación que adoptaremos es la propuesta por Arnold (1997), que la define como “el apareamiento exitoso en la naturaleza entre individuos de dos poblaciones o grupos de poblaciones que son distinguidas por uno o más caracteres heredables”. Mayr (1942), reconoce la hibridación como un mecanismo de aislamiento reproductivo. La inviabilidad y esterilidad de los híbridos puede aparecer tanto en la primera generación filial (F1) como en la segunda generación filial (F2) o en los retrocruzamientos con los parentales. En algunos casos, los híbridos no presentan ningún problema reproductivo, pero pueden tener una adecuación reducida frente a las especies parentales. Si la hibridación ocurre en especies endémicas, puede ocurrir un problema de conservación ya que se favorece la extinción de estas especies (Donald *et al.*, 1996; Ellstrand y Elam, 1993). La hibridación puede reducir la tasa de crecimiento poblacional de la especie endémica por la producción de semilla híbrida que afecta su éxito reproductivo y la estabilidad de la población (Klips, 1999). La desventaja puede incrementarse si los híbridos son fértiles ya que se origina una competencia por los recursos (Donald *et al.*, 1996). Sin embargo, para que la hibridación perturbe el mantenimiento de las especies endémicas, es necesario que todas las poblaciones sean invadidas por el congénere abundante

y que la viabilidad y fecundidad relativa del híbrido sea mayor en comparación con los parentales (Waser, 1983).

Análisis recientes han encontrado que el proceso de hibridación natural puede producir genotipos que establecen nuevos linajes evolutivos (Arnold y Hodges, 1995). De igual forma, acontecimientos como recombinación sexual, la transferencia horizontal de genes en bacterias y la especiación híbrida en plantas, peces, ranas y algunos invertebrados hacen pensar que la historia de la vida no está adecuadamente representada en un árbol filogenético (Doolittle, 1999), en que el ancestro origina dos o más especies por bifurcación que nunca interaccionan. Se ha considerado utilizar un nuevo modelo, en el que las relaciones se representan con una red filogenética, cuando existe transferencia horizontal de genes o especiación por hibridación (Huson y Bryant, 2006).

La evolución reticulada o especiación por hibridación (híbridos diploides) es más frecuente en plantas, sobre todo entre especies con polinización cruzada. Esto se debe a que las barreras precigóticas son menos rigurosas (Dobzhansky *et al.*, 1980). La hibridación natural parece muy común en muchos grupos de angiospermas aunque la frecuencia de hibridación varía entre familias (Milne *et al.*, 1999; Alarcón y Campbell, 2000). Los géneros propensos a la hibridación pueden tener muchas especies que ocurren en simpatria (Milne *et al.*, 1999). Actualmente, se utiliza el término de zona híbrida como sinónimo de clina, aunque el término de clina se refiere específicamente al conjunto de gradientes morfológicos o la frecuencia de genes en uno o más loci y zona híbrida se refiere a la región geográfica donde existen híbridos (Barton y Hewitt, 1985). Esta última sirve como barrera reproductiva entre taxones incompletamente aislados (Kentner y Mesler, 2000; Hedrén *et al.*, 2001). La dinámica evolutiva de esta zona dependerá del flujo génico entre las especies y del vigor de los híbridos en relación a las especies parentales (Harrison, 1993; Arnold, 1997; Perfectti, 2002). Si los híbridos no presentan adecuación, la duración de la zona híbrida dependerá del grado de selección contra ellos. Si la

ventaja adaptativa es dependiente de un entorno determinado, la zona híbrida puede perdurar en esta región. Pero si los híbridos tienen ventaja en otros ambientes o si presentan innovaciones genéticas pueden formar una nueva especie (Butlin, 1995; Arnold, 1997; Wolf *et al.*, 2001; Perfectti, 2002).

En general, la especiación por hibridación es un proceso ampliamente encontrado en los vegetales (Grant, 1981) y se le ha considerado un proceso evolutivo importante en plantas (Arnold, 1992; Allendorf *et al.*, 2001; Perfectti, 2002; González-Rodríguez *et al.*, 2004). Se reconoce que la hibridación puede facilitar la transferencia de características genéticas entre especies por recombinación que de otra forma hubieran tardado miles de generaciones (Barton y Hewitt, 1985). Este proceso es conocido como hibridación introgresiva y acelera la presencia de una amplia variedad de combinaciones genéticas, incrementando la variabilidad y dando posibilidad de inducir eventos de especiación (Anderson, 1948; Milne *et al.*, 1999; Widmer y Baltisberger, 1999; Orians, 2000).

Cuando el nivel de ploidía cambia ocurre un aislamiento reproductivo súbito (especiación simpátrica) y esto ocurre con frecuencia en híbridos. Los híbridos pueden utilizar diferentes vías de reproducción para obtener independencia evolutiva de sus especies ancestrales. Las más utilizadas son, la reproducción vegetativa, la agamosperma (producción de semillas sin necesidad de fecundación) y la poliploidía (presencia de más de una copia del genoma completo) o alopoliploidía (genoma completo de dos especies). La reproducción vegetativa y la agamosperma han permitido a ciertas plantas híbridas reproducirse sin hacer uso de la meiosis, que en los híbridos suele ser anormal al no aparearse correctamente los cromosomas de las especies progenitoras. Aproximadamente un 70% de las angiospermas son alopoliploides, es decir producto de hibridación entre diferentes especies (Whitham *et al.*, 1991; Arnold, 1994). Un proceso de endoreduplicación (duplicación cromosómica sin la subsiguiente cariocinesis), permite la homología cromosómica entre los

cromosomas de las especies parentales, la recombinación adecuada durante la meiosis y la formación de gametos e individuos viables, ya que se restablece la reproducción sexual (Donald *et al.*, 1996; Jorgensen *et al.*, 2003).

1.3 IDENTIFICACIÓN DE POBLACIONES HÍBRIDAS

Hewitt (1988), ha considerado a las zonas híbridas como laboratorios naturales donde se pueden estudiar procesos evolutivos entendiendo la naturaleza y origen de las especies y la formación de barreras al flujo genético entre poblaciones. La amplia variación de genotipos encontrados en una zona híbrida pueden ser usados para analizar las diferencias genéticas y las fuerzas que separan a los taxones involucrados como barreras de aislamiento pre y postcigóticas, competencia del polen, esterilidad o fertilidad del híbrido (Mráz *et al.*, 2005). Se pueden realizar algunas inferencias sobre estas diferencias para entender el camino que siguen las especies al aislarse completamente y diferenciarse una de otra (Barton y Hewitt, 1985). Es posible entender estudios de filogenia molecular al aclarar el origen híbrido de algunas especies y eliminar incertidumbre en la interpretación de los análisis filogenéticos. Además, se puede investigar a nivel poblacional, el impacto de la hibridación en la integridad y permanencia de las especies paternas (Ellstrand y Elam, 1993; Otero *et al.*, 1997; Barkman y Simpson, 2002; Donald *et al.*, 1996).

Aunque, las características morfológicas son usadas como primer paso en la identificación de plantas híbridas en el campo, tienen límites debido a la variación morfológica proporcionada por plasticidad genética, por introgresión o especies poliploides que producen confusión (Cota y Wallace, 1996). Las pruebas moleculares permiten identificar con mayor precisión los procesos de hibridación y su intervención en el origen de nuevas especies y la combinación de datos morfológicos y moleculares permiten un mejor análisis filogenético (Martínez, 1997; Mráz *et al.*, 2005).

1.4 MÉTODOS UTILIZADOS EN LA DETECCIÓN DE HÍBRIDOS

1.4.1 Marcadores moleculares

Puede considerarse a un marcador molecular como una región en el ADN, que es polimórfica entre los individuos de una población y que se segrega de manera independiente (Alberts *et al.*, 1994; Snow y Parker, 1998). El uso de marcadores moleculares simplifica la identificación y descripción genética de híbridos ya que proporcionan un gran número de características neutrales e independientes (Widmer y Baltisberger, 1999; Allendorf *et al.*, 2001; González-Rodríguez *et al.*, 2004). Los marcadores producidos por la amplificación azarosa de ADN polimórfico (RAPD por sus siglas en inglés), se utilizan por la gran variación genética que revelan que incluso permite detectar híbridos (Paran *et al.*, 1995; Smith y Vuong, 1996; Widmer y Baltisberger, 1999; Sánchez-Abarca *et al.*, 2003).

La secuenciación de ADN permite realizar estudios filogenéticos que dan evidencia de especies de origen híbrido, por lo que es ampliamente utilizada. El avance más reciente en relación a la frecuencia de la hibridación, lo constituye el descubrimiento de la captura del cloroplasto (Terry *et al.*, 2000; Watano *et al.*, 2004), que indica que una o varias poblaciones pertenecen a una especie particular, pero poseen el genoma nuclear de otra especie. Esta relación ha sido interpretada como evidencia directa de introgresión citoplasmática o especiación por hibridación (Wendel *et al.*, 1995; Rieseberg y Wendel, 1993; Rieseberg, 1995; Terry *et al.*, 2000). Para la determinación de zonas híbridas se analiza el genoma nuclear y del cloroplasto que puede combinarse con datos morfológicos para realizar un mejor análisis filogenético (Wagner *et al.*, 1987; Donald *et al.*, 1996; Hardig *et al.*, 2000; Williams y Whitten, 2001; Collins *et al.*, 2003; Tovar-Sánchez y Oyama, 2004; González-Rodríguez *et al.*, 2004; Pellegrino *et al.*, 2005).

Con excepción de algunas coníferas (Soranzo *et al.*, 2000; Watano *et al.*, 2004), el ADN del cloroplasto (ADNcp), es de herencia materna (Barkman y

Simpson, 2002) y en organismos híbridos está más relacionado a uno de los parentales (Widmer y Baltisberger, 1999). En el caso de los genes nucleares que son de herencia biparental, todos los individuos híbridos de la F1 tendrán un alelo de cada parental. En los genes nucleares la evolución concertada, mantiene la homogeneidad de familias multigénicas como el ADN ribosomal, mediante recombinación genética (Arnheim, 1983). En eventos recientes de hibridación la homogeneidad de estas secuencias puede demorar, debido a la longitud del gen que afecta la posición del loci y que produce recombinación desigual de esta región. En generaciones posteriores de híbridos es menos evidente, ya que en algunos casos un solo alelo es conservado o bien se pierden ambos si existe recombinación (Quijada *et al.*, 1997). El ADN ribosomal nuclear (ADNrn) tiene una estructura bien establecida que permite que su evolución sea rápida y que difiera entre sus subunidades y espaciadores (Martínez, 1997). El espaciador de transcripción interna (ITS) diverge más rápido que el ADNcp, aunque la tasa varía en cada grupo taxonómico (Martínez, 1997).

La región del ITS es relativamente homogénea dentro del genoma, por lo que una sola secuencia caracteriza a una determinada especie (Baldwin *et al.*, 1995) y basta muestrear pocos individuos para establecer las relaciones filogenéticas entre distintas especies.

1.4.2 Viabilidad del polen y estimación del tamaño del genoma

La hibridación es muy frecuente en especies simpátricas que presentan periodos de floración simultáneos y que comparten polinizadores (Klips, 1999). Un mecanismo de aislamiento reproductivo precigótico involucra la competencia entre el polen conoespecífico que tiene ventajas sobre el polen heteroespecífico en la fertilización del óvulo (Campbell *et al.*, 2003). Los híbridos formados pueden tener baja fertilidad cuando los taxones involucrados son de orígenes distantes cuantificándose indirectamente por la viabilidad del polen (Klips, 1999; Campbell *et al.*, 2003). Si existe una distribución desigual de cromosomas durante la microesporogénesis (formación de esporas masculinas o microsporas) se obtendrá un porcentaje alto de polen no viable (Tyagi, 2002) y

un aislamiento postcigótico al reducir la formación de retrocruzas, evitando con ello la introgresión y la evolución de la zona híbrida (Campbell *et al.*, 2003).

La estimación del tamaño del genoma es otro método utilizado en la detección de híbridos que se define como el valor C o contenido de ADN nuclear del complemento cromosómico haploide (1C), aunque también puede ser referido con el valor diploide (2C) (Bennett y Smith, 1976; Poggio y Naranjo, 1990). Se denomina C, por constante o característico, para indicar que el tamaño es prácticamente constante dentro de una especie (Bennett, 1987). Tiene importancia taxonómica y se utiliza para explorar relaciones filogenéticas (Cerbah, *et al.*, 1995; Dolezel, 1997; Ohri, 1998) y existe una base de datos digital que puede ser consultada (Bennett y Leitch, 2005).

En poliploides de origen reciente el contenido de ADN es directamente proporcional al de los diploides que le dieron origen aunque, pueden perderse secuencias repetidas que no codifican en generaciones posteriores (Poggio y Naranjo, 1990; Palomino, 2000). Este ADN que aparentemente no posee ninguna función, podría tener importancia evolutiva (Narayan, 1998). Si las diferencias en el contenido de ADN en especies diferentes, se deben a diferencias de calidad y cantidad de secuencias repetidas evitarían el apareamiento entre híbridos, convirtiéndose en un mecanismo de aislamiento reproductivo (Poggio y Naranjo, 1990). Cuando especies parentales difieren grandemente en el contenido de ADN nuclear se facilita la detección de híbridos interespecíficos por su valor intermedio (Keller *et al.*, 1996) como puede observarse en plantas híbridas ($2C= 10.08$ pg) generadas de la cruce entre *Lolium multiflorum* ($2C=8.2$ pg) con *Festuca arundinacea* ($2C=12.10$ pg) (Dolezel, 1997). La recombinación entre segmentos cromosómicos que difieren en secuencias de ADN pueden producir anomalías morfológicas o citológicas en los descendientes como ocurre en híbridos de diferentes poblaciones de *Gibasis venustula* que difieren en el contenido de ADN (Kenton, 1984). Sin embargo, existen híbridos fértiles entre especies del género *Festuca* que presentan genomas de diferente tamaño. En estos híbridos el complejo

sinaptonémico (estructura proteica que garantiza el perfecto apareamiento entre cromosomas homólogos) y el apareamiento fue normal a pesar de las diferencias en el tamaño cromosómico (Jenkis y Rees, 1983).

El análisis de la intensidad de fluorescencia de núcleos teñidos con fluoróculos, como el yoduro de propidio (PI) y el bromuro de etidio permite estimar el tamaño del genoma con citometría de flujo (Dolezel, 1995, 1997). Estos se intercalan en la doble cadena del ADN y es posible analizar de 10^2 a 10^3 núcleos por segundo. La lisis de protoplastos se realiza en un buffer hipotónico, que preserva la integridad del núcleo y genera las condiciones óptimas para la tinción del ADN (Dolezel, 1995, 1997). El análisis se realiza con mayor frecuencia en células diploides, se expresa en picogramos (pg) y su composición en millones de pares de bases (Mpb) donde un picogramo es equivalente a 980 Mpb (Bennett *et al.*, 1982, 2000; Bennett y Leith, 1995).

El análisis produce un histograma (Figura 1A), que distingue las tres fases del ciclo celular. El pico dominante corresponde a núcleos en la fase G1 donde, las células diploides tienen un contenido 2C (dos cromatidas hermanas por cromosoma). En la fase S, el contenido nuclear comienza a duplicarse para obtener cuatro cromatidas hermanas por cromosoma (4C) que se observa en el histograma como un segundo pico y que corresponde a la fase G2. Durante este periodo se inicia la mitosis o división celular que retorna abruptamente al nivel 2C, formándose dos células hijas (Dolezel, 1995, 1997). Los picos son visualizados en unidades arbitrarias que se expresan como número de canal.

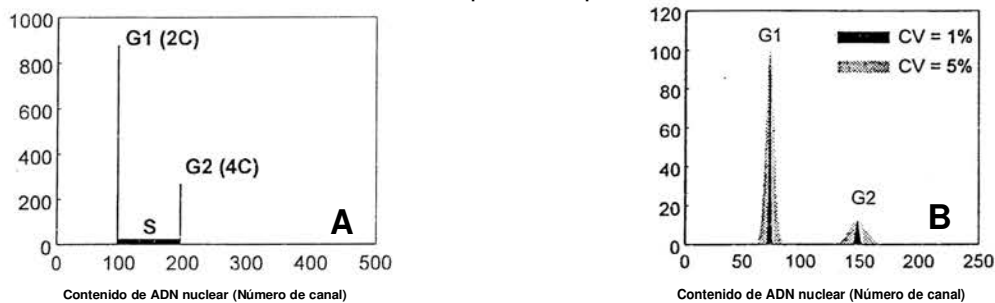


Figura 1. Histogramas producidos por el citómetro de flujo. A. Distribución teórica del contenido de ADN nuclear, pico dominante células diploides en fase G1 con dos cromatidas, pico menor corresponde a células con 4 cromatidas por cromosoma. B Coeficiente de variación de los núcleos aislados (CV), valores mayores al cinco por ciento no son recomendados.

En una distribución teórica del contenido de ADN nuclear, el pico G1 y el G2 deben observarse en un solo canal del histograma sin embargo, el contenido de ADN experimental presenta diferencias por variaciones en la preparación, tinción y el procedimiento de medida (Dolezel, 1995). Por ello la calidad del histograma es usualmente estimado por el coeficiente de variación (CV) de los picos correspondientes a las células en fase G1 o G2 del ciclo celular (Figura 1B). La precisión del citómetro de flujo puede ser controlada usando muestras estandarizadas, como microesferas marcadas con fluorescencia o núcleos aislados de pollo que permiten ajustar el citómetro de flujo para obtener una máxima amplitud de señal y un mínimo CV al definir las condiciones óptimas de operación con las muestras estandarizadas (Dolezel, 1995). Para estimar el tamaño del genoma, la posición del pico G1 es comparado simultáneamente con una planta de referencia con tamaño conocido, por ejemplo *Lycopersicon esculentum* (2C igual a 1.96 pg), *Zea mays* var. 777 (2C igual a 5.43 pg), *Vicia faba* (2C igual a 26.9 pg), *Allium cepa* (2C igual a 36.76 pg) entre otros (Dolezel, 1995, 1997; Palomino, 1998).

El contenido de ADN nuclear varía entre géneros y especies de la misma familia entre 0.2 a 127.4 pg en células haploides con 1C. El conocimiento del tamaño del genoma también tiene aplicaciones en la práctica molecular ya que la secuenciación de *Arabidopsis thaliana*, *Oriza sativa* con 1C igual a 0.5 pg y los cromosomas 22 y 21 en humanos se eligieron por tener un genoma pequeño. La estimación también permite seleccionar especies con menos de 20 pg en 1C, para evitar problemas al estudiar la diversidad del genoma con la técnica de AFLP (amplificación de fragmentos de longitud polimórfica) (Bennett *et al.*, 2000).

La citometría de flujo también permite determinar el nivel de endoploidía (Dolezel, 1991, 1997) que se origina en tejidos diferenciados que no presentan cariocinesis y citocinesis después de la duplicación cromosómica. Las células pueden presentar diferente nivel de ploidía, desde 4C hasta 128C o más (Dolezel, 1995; Palomino *et al.*, 1999). La endoploidía está ampliamente

distribuida en las plantas, particularmente en angiospermas y puede estar asociada a una etapa de desarrollo (Geitler, 1953; D'Amato, 1964; Nagl, 1978). Por ejemplo, en botones florales de *Brassica oleraceae* se encuentran células hasta con 4C y en flores maduras se encuentra 64C en diferentes tejidos (Kudo y Kimura, 2001). En *Mammillaria san-angelensis* se observó que a mayor edad, es mayor la frecuencia de núcleos con valores de 32C (Palomino *et al.*, 1999). El nivel de endoploidía más alto se encontró en tejidos involucrados con la alimentación del embrión, como el suspensor de *Phaseolus coccineus* con un valor de 8,192C (Nagl, 1974, 1976) y en el endospermos de *Arum maculatum* con 24,756C (Erbrich, 1965). Al parecer la endoreduplicación está programada genéticamente y está involucrada en el desarrollo y diferenciación celular (Nagl, 1978; Kowles *et al.*, 1992; Cebolla *et al.*, 1999, Kondorosi *et al.*, 2000; Larkins *et al.*, 2001). La presencia de células endoploides es considerado un carácter adaptativo ya que es frecuente en suculentas y plantas que habitan ambientes áridos o semiáridos y su función es almacenar una mayor cantidad de agua que en estos ambientes es escasa (Nagl, 1978; De Rocher *et al.*, 1990; Cushman, 2001).

1.5 ANTECEDENTES

La familia de las cactáceas tiene una gran variedad de especies que presentan diferentes síndromes de polinización, poliploidía e hibridación y la clasificación de algunas especies llega a ser conflictiva (Cota y Wallace, 1996). El contenido de ADN en las cactáceas se encuentra en valores $2C$ de 3.1 a 13.9 pg con $2n$ igual a 22 (Bennett y Smith, 1976), predominan los estudios en el género *Mammillaria* y sólo se ha determinado el tamaño del genoma en una cactácea columnar del Perú, *Weberbaureocereus winterianus* que presenta $2n$ igual a 88, su número básico es X igual a 11 y tiene un valor $2C$ igual a 14.2 pg (Bennett y Leitch, 2005). Así mismo, la endoploidia parece frecuente en muchas especies de cactáceas se pueden citar ejemplos de *Pereskia grandiflora* que tiene células con valores $2C$, $4C$ y $8C$ (De Rocher *et al.*, 1990) y en *M. san-angelensis*, se observaron células con $2C$, $4C$, $8C$, $16C$ y $32C$ (Palomino *et al.*, 1999). En siete especies de *Mammillaria* de la serie *Supertextae* el nivel de endoploidia encontrado fue de $2C$, $4C$, $8C$ y $16C$ (Del Angel, 2005).

La homología cromosómica facilita la hibridación entre especies del mismo o diferente género en las cactáceas (Friedrich, 1974) y es posible originar híbridos diploides fértiles. En el género *Opuntia*, la presencia de poliploides y el alto nivel de hibridación son importantes en su evolución (Pinkava *et al.*, 1985). Este proceso al parecer está incrementando el número de especies por hibridación natural y en algunos casos presentan aislamiento reproductivo con sus progenitores por lo que se han propuesto nuevos cambios en su nomenclatura (Cota y Wallace, 1996). La forma en que se nombra un híbrido es colocando el signo de multiplicación antes del nombre de un híbrido intergenérico (X) o antes del epíteto específico en el nombre de un híbrido interespecífico o prefijando el término “notho” si es una subespecie. Si una especie es considerada de origen híbrido no es necesario designarla como nothotaxón (Greuter, 2001).

Moran (1962), hace referencia a dos híbridos localizados en el desierto sonorense. El primero de ellos entre *Pachycereus pringlei* y *Bergerocactus emoryi*, inicialmente el híbrido había sido llamado *XPachycereus orcutii* hasta que se demostró con datos morfológicos, de distribución y la segregación de caracteres en la progenie de segunda generación, que el híbrido era fértil y capaz de producir semillas viables, considerándolo un nuevo taxón al que nombraron *Pachgerocereus orcuttii*. El segundo caso de hibridación documentado es el de *B. emoryi* y *Myrtillocactus cochal*, en este caso el híbrido es triploide y estéril y es llamado *XMyrtgerocactus lindsayi*. Un tercer caso de hibridación natural entre cactáceas columnares fue confirmado mediante un análisis morfométrico en la zona del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla. En este caso los individuos combinan características de dos cactáceas columnares, *Cephalocereus columna-trajani* y *Neobuxbaumia tetetzo* y los híbridos son designados como *XCephalobuxbaumia zapotitlana* (Vite *et al.*, 1997).

En San Juan Raya, además de *N. tetetzo*, también se distribuye *N. mezcalaensis* y *N. macrocephala*. Las tres especies presentan sincronía floral y

aunque pueden ser polinizadas por colibríes y abejas sus polinizadores principales son tres especies de murciélagos (Cuadro 1) siendo el polinizador más efectivo *Leptonycteris curasoae* (Valiente-Banuet *et al.*, 1997). Por la sincronía floral y el hecho de compartir los mismos polinizadores es posible que estas especies participen en un proceso de hibridación. De hecho, en dos localidades del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (San Juan Raya y San Martín), se han observado individuos que comparten caracteres diagnósticos de *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis*, que podrían ser producto de plasticidad morfológica o de origen híbrido. Los individuos presentan un cefalio rojo con crecimiento de flores en el ápice (caracteres diagnósticos de *N. macrocephala*) y a lo largo del tallo (carácter diagnóstico de *N. mezcalaensis*) y que ramifican como *N. macrocephala* (Figura 2A), por lo que se considera que el fenotipo de *N. macrocephala* es dominante en ellos, en este estudio son considerados como posible híbrido tipo 1. Existen otros individuos con crecimiento de flores en el ápice (carácter diagnóstico de *N. macrocephala*) y la columna (carácter diagnóstico de *N. mezcalaensis*) pero no ramifican como *N. mezcalaensis* (Figura 2B), por lo que se considera que el fenotipo de *N. mezcalaensis* es dominante en ellos y son considerados en este estudio como posible híbrido tipo 2.

Cuadro 1 Características generales de las especies de *Neobuxbaumia* y posibles híbridos, presentes en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

ESPECIE	<i>N. mezcalaensis</i>	<i>N. tetetzo</i>	<i>N. macrocephala</i>	Posibles híbridos
TIPO DE VEGETACIÓN	Bosque tropical caducifolio Matorral Xerófilo Bosque Espinoso	Bosque tropical caducifolio Matorral Xerófilo	Bosque tropical caducifolio Matorral Xerófilo	Bosque tropical caducifolio Matorral Xerófilo
DISTRIBUCIÓN	Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca y Puebla	Puebla y Oaxaca	Puebla	Puebla
GRADIENTE ALTITUDINAL DE DISTRIBUCIÓN (m)	800-2000	1000-1900	1600-2300	1800
NO. DE INDIVIDUOS/HECTÁREA	1680	1200	200	n.e.
FLORACIÓN	Abril a Junio	Mayo a Julio	Marzo a Agosto	Abril a Junio
FRUCTIFICACIÓN	Mayo a Junio	Junio a Julio	Abril a Agosto	Mayo Junio
POLINIZADORES	<i>Choeronycteris mexicana</i> , <i>Leptonycteris curasoae</i> y <i>L. nivalis</i>	<i>C. mexicana</i> , <i>L. curasoae</i> y <i>L. nivalis</i>	<i>C. mexicana</i> , <i>L. curasoae</i> y <i>L. nivalis</i>	n. e.
PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DIAGNÓSTICAS	No ramifica a menos que sea dañada. Mide de 5 a 16 m. Sus flores se encuentran a lo largo del tallo. Costillas 13-20 (-25)	Ramifica a diferentes alturas con la edad. Mide de 1.5 a 15 m Sus flores crecen alrededor del ápice. Costillas 13-17	Ramifica a diferentes alturas con la edad. Mide de 7 a 15 m. Sus flores se encuentran alrededor del cefalio. Costillas 17-26	Individuos con y sin ramificaciones Flores a lo largo del tallo y alrededor del ápice, algunos presentan cefalio. No, de costillas n.e.

A partir de datos de Arias *et al.*, 1997 y Valiente-Banuet *et al.*, 1997. n. e. no estimado.

1 *N. macrocephala*



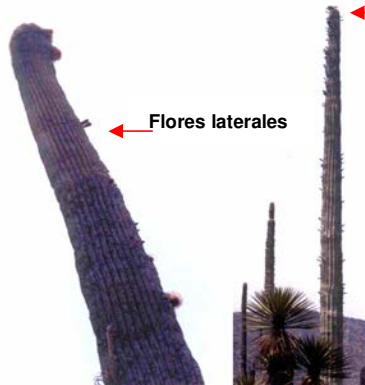
2 *N. mezcalaensis*



3 *N. tetetzo*

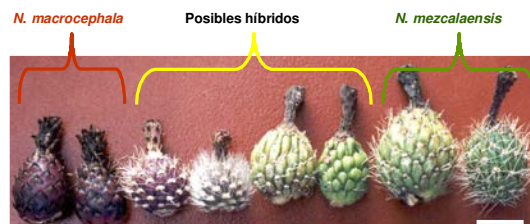


A
Híbrido tipo 1
Fenotipo
N. macrocephala



B
Híbrido tipo 2
Fenotipo
N. mezcalaensis

Posibles híbridos



Gradiente morfológico en flores

Gradiente morfológico en frutos maduros

Figura 2. Características morfológicas en tres especies (1, 2 y 3) del género *Neobuxbaumia*, sugieren proceso de hibridación. Se observan características intermedias en la posición y morfología de flores y frutos en algunos individuos. Las flechas rojas indican posición de las flores en los posibles híbridos. A. Fenotipo dominante *N. macrocephala*, B fenotipo dominante *N. mezcalaensis*. Escala = 1cm.

1.6 HIPÓTESIS

Si los caracteres morfológicos de los individuos analizados no se deben a plasticidad genética entonces un proceso de hibridación puede ser posible y compartirán información genética con las especies que les dieron origen.

1.7 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

▶ Caracterizar genéticamente a un posible híbrido entre *Neobuxbaumia macrocephala* y *Neobuxbaumia mezcalaensis* para determinar el impacto de la hibridación en la integridad y permanencia de las especies.

Objetivos particulares

- ◆ Estimar el flujo génico entre *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis* para determinar si es posible la existencia de híbridos.
- ◆ Determinar el grado de hibridación entre *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis* para inferir las posibles rutas evolutivas seguidas por las especies parentales.
- ◆ Determinar la viabilidad del polen para inferir si existe homología cromosómica entre *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis* para determinar la posibilidad de formar híbridos fértiles.
- ◆ Determinar el tamaño del genoma de *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis* para detectar híbridos con contenido de ADN intermedio.

2. MATERIALES Y METÓDOS

2.1 COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Se consideraron cinco sitios de colecta (Figura 3). Fueron analizados dos individuos de *N. macrocephala*, *N. mezcalaensis*, *N. tetetzo* y diez posibles híbridos, procedentes de San Juan Raya (SJR) (18° 19' 48" N, 97° 35' 10" W, sitio 1). De San Martín (SM) (18° 15' 19" N, 97° 32' 41" W, sitio 2) se analizaron dos individuos de *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis* y siete posibles híbridos. De los 17 individuos con morfología intermedia (localización geográfica en el Apéndice 1), cinco presentaron fenotipo dominante de *N. macrocephala*, considerados como posibles híbridos de tipo 1 (Figura 2A). Los 12 restantes se parecen a *N. mezcalaensis* y que se consideraron como posibles híbridos de tipo 2 (Figura 2B). Para tener poblaciones puras de éstas especies, se utilizaron tres individuos de *N. macrocephala* de Los Reyes Metzontla (RM) (18° 15' 08" N, 97° 29' 40" W, sitio 3) y dos individuos de *N. tetetzo* del Jardín botánico (18° 19' 49" N, 97° 27' 38.4" W, sitio 4) y tres de *N. mezcalaensis* de Tepenene Izúcar de Matamoros (TIM) (18° 13' 32.9" N, 98° 08' 4.7" W, sitio 5). Como grupo externo se consideraron dos individuos de *C. columna-trajani* del Jardín botánico. De acuerdo a estudios de genética de poblaciones realizados en *N. macrocephala* por Alejos (2002) y *N. mezcalaensis* por Rivera (2003), estas especies no presentan estructura poblacional, por lo que los individuos de las diferentes localidades fueron considerados como una sola población para cada especie.

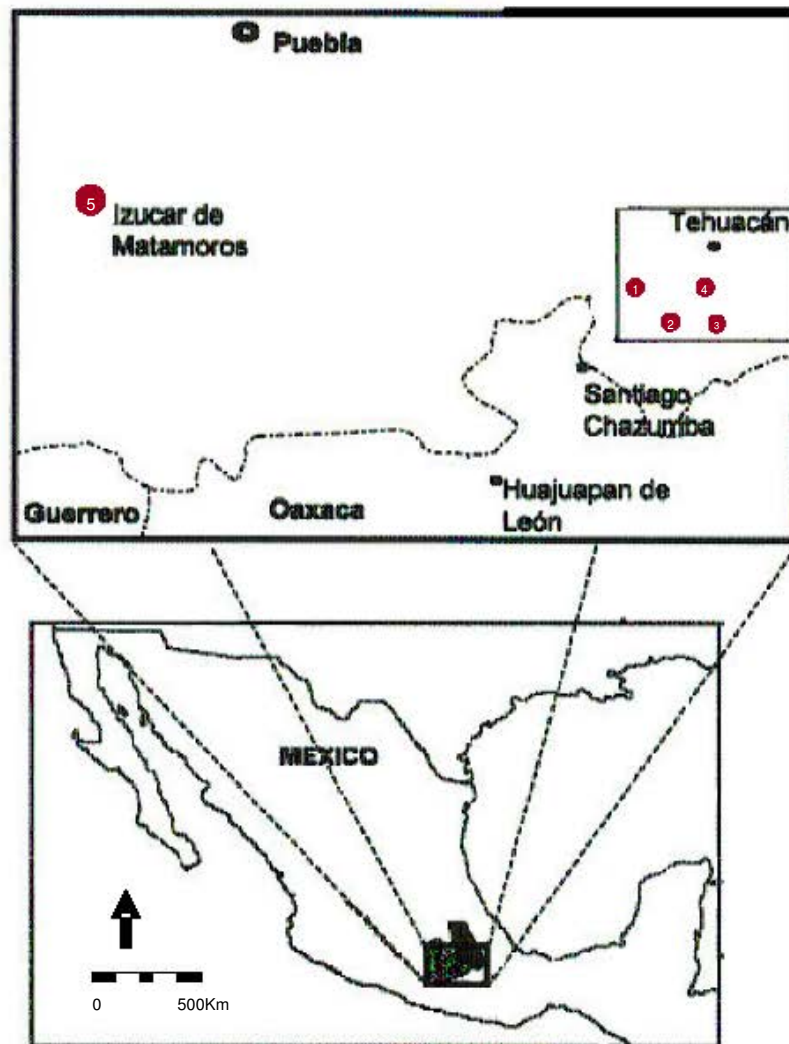


Figura 3. Mapa que muestra los sitios de colecta del material biológico: 1, San Juan Raya (SJR), 2, San Martín (SM), 3, Los Reyes Metzontla (RM), 4, Jardín Botánico (JB), 5, Tepenene Izúcar de Matamoros (TIM). Modificado de Rivera (2003).

2.2 TRABAJO DE LABORATORIO

2.2.1 Extracción de ADN

De cada muestra, se tomó una fracción de tejido parenquimático (10-15 g) el cual se cortó transversalmente en fracciones delgadas, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C hasta su procesamiento. Para la extracción de ADN genómico se utilizó el método de Dellaporta *et al.*, (1983) con modificaciones (Apéndice 2).

2.2.2 Marcadores moleculares RAPD

Se amplificó el ADN de siete individuos de *N. macrocephala* (Ma), siete individuos de *N. mezcalaensis* (Mz), cuatro individuos de *N. tetetzo* (Te) y 13 posibles híbridos (H) con seis oligonucleótidos, OPA04, OPA10, OPB10, OPC08, OPE14 y OPG06 (Operon Technologies, Alameda, California, USA).

La amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 25 μL , que contenían una unidad de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), 1X del buffer de reacción (100 mM Tris-HCl; pH 8.3; 15 mM MgCl_2 ; 500 mM KCl; 0,01 % glicerol), 1.5 mM de MgCl_2 , 200 μM de cada deoxinucleótidos (dNTP`s) (Promega, Madison, USA), 10 μM del oligonucleotido (Operon Technologies, Alameda, California, USA) y agua destilada estéril. La reacción se realizó en un termocicloro GeneAMP PCR System 9700 (Applied Biosystem, Foster, California, USA), programado a 94°C 4 min y 40 ciclos de 1 min a 94°C , 1 min a 40°C , 1 min a 72°C y finalmente 10 min a 72°C .

Los productos de la amplificación se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2%. Se utilizó un marcador de peso molecular de una kilo base (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) para estimar el tamaño de los fragmentos. Los geles teñidos con bromuro de etidio fueron expuestos a luz UV para visualizar los productos que se fotografiaron y se almacenaron digitalmente con el equipo *MultimageTM Light Cabinet* (Alpha Innotech Corporation, San Francisco, California, USA).

2.2.2.1 Análisis estadístico de marcadores RAPD

Los productos de la amplificación fueron codificados en una matriz binaria de presencia/ausencia con ayuda del programa de digitalización *Alpha Ease™* Versión 3.3a. La matriz básica de datos fue transformada de acuerdo a las necesidades de cada prueba estadística.

2.2.2.2 Similitud Genética

A partir de la matriz binaria de presencia/ausencia se estimó la similitud genética entre individuos, mediante el índice de similitud de Dice (1945), que mide el grado de asociación entre dos individuos con respecto al número de bandas que comparten y las bandas que son exclusivas para cada uno. El índice está diseñado para ser igual a uno en caso de similitud completa e igual a cero cuando no existe información genética en común. La similitud genética entre individuos fue visualizada en un dendrograma generado con el método UPGMA (agrupamiento aritmético por promedios no ponderados).

Para corroborar que el dendrograma es una representación adecuada de la similitud entre los individuos se calculó el coeficiente de correlación cofenética (r) mediante una prueba de Mantel (Mantel, 1967) con 1000 permutaciones, valores cercanos a 1 indican que es estadísticamente significativo y valores de 0.7 indican baja confiabilidad en la representación.

El programa WinBoot (Yap y Nelson, 1996) es derivado del programa Neighbor de PHYLIP (Felsenstein, 2001) y ha sido diseñado para analizar datos binarios. Utilizando este programa se estimó la estabilidad del agrupamiento entre los individuos mediante un análisis bootstrap con 1000 permutaciones a partir de la matriz de similitud de Dice.

2.2.2.3 Análisis de coordenadas principales

Para identificar los patrones de similitud y segregación de las poblaciones en un espacio tridimensional, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCO), que es un método de ordenación homólogo al análisis de componentes principales (PCA) pero adaptado para datos cualitativos (Gower, 1967). Con la matriz de similitud de Dice, se generó una matriz DCenter, que a su vez fue convertida a dos componentes con la aplicación Eigen, ambos componentes son vectores, que ayudan a representar la similitud entre individuos. Los análisis se realizaron con el programa NTSYSpc versión 2.0 (Dean *et al.*, 1998).

2.2.2.4 Estructura genética

Una forma de estimar la diversidad genética es considerar la diversidad fenotípica de las bandas de cada individuo como un haplotipo distinto y estimar las similitudes y diferencias con base en los mismos (Huff *et al.*, 1993). Bajo este supuesto a partir de la matriz básica de datos se estimó la estructura genética de los parentales y los posibles híbridos, mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA) que permite estimar variabilidad entre poblaciones, definida como Φ_{ST} que analiza frecuencias de haplotipos y que es análoga a la G_{ST} de Nei (1973), que se basa en el análisis de frecuencias alélicas. La Φ_{ST} es definida por la fórmula:

$$\Phi_{ST} = \frac{1}{(4N_e m a + 1)}$$

Donde $a = [n/(n-1)^2]$ y n es el número de poblaciones. Una Φ_{ST} igual a uno indica que no existe información genética compartida entre poblaciones.

Para analizar las relaciones de similitud entre las especies y sus posibles híbridos, se realizó el análisis de varianza molecular (AMOVA), agrupando a cada especie y separando a los posibles híbridos de acuerdo a su fenotipo, con la finalidad de no crear un grupo híbrido falso. Los individuos del fenotipo de *N. macrocephala* están en el grupo Híbrido tipo 1 y los del fenotipo de *N. mezcalaensis* en Híbrido tipo 2.

Es posible realizar una aproximación a la distancia genética que separa a las especies mediante el coeficiente de coancestría modificado (Reynolds *et al.*, 1983):

$$D = -\ln(1 - \Phi_{ST})$$

La representación gráfica de las distancias se construyó con UPGMA, a partir de una matriz de disimilitud, debido a que el valor de Φ_{ST} es inversamente proporcional a la similitud genética entre las poblaciones, mientras más cercano a cero existe mayor información genética compartida.

Los análisis de la variancia molecular se realizaron mediante los programas *AMOVA-PREP* 1.01 (Miller, 1998) y *AMOVA 155* (Excoffier, 1992). La matriz de distancia genética se obtuvo con el método de Huff *et al.*, (1993), que está diseñado para marcadores RAPD.

2.2.2.5 Flujo génico (Nem)

El flujo génico se define como el movimiento de genes desde una población hacia otra (Slatkin, 1990). En el caso de las plantas ocurre por el movimiento de polen y semillas.

A partir de la Φ_{ST} es posible obtener una estimación indirecta del flujo génico que ocurrió en el pasado entre subpoblaciones (en este análisis será entre las especies propuestas como parentales) y que produce los patrones espaciales observados. La fórmula ajustada a marcadores *RAPD* (Crow y Aoki, 1984) es:

$$Nem = \frac{1}{4} \frac{n}{n-1} \left(2 - \frac{1}{\Phi_{ST}} \right) - 1$$

Donde:

n = número de poblaciones o especies.

Según Slatkin (1990), el flujo genético de un individuo por generación, es suficiente para mantener la diversidad genética y reducir las diferencias entre poblaciones locales. El valor correspondiente a dicho flujo es mayor que uno; mientras que un valor menor implica diferencia poblacional (Hartl y Clark, 1989).

2.2.3 AMPLIFICACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE ADNcp E ITS

Se probaron tres pares de oligonucleotidos a-b, c-d, e-f (Cuadro 2), que amplifican las regiones no codificantes del ADN cloroplástico (Taberlet *et al.*, 1991), para definir que región presentaba mayor variación nucleotídica. Se seleccionó el juego a-b que amplifica la región *trnT-trnL* por presentar mayor variación, el tamaño del fragmento fue de 600 pb. Esta región fue analizada en tres individuos de *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis*, uno de *N. tetexto* y uno de *C. columna-trajani* y 11 posibles híbridos de los cuales cuatro eran del híbrido tipo 1 y siete del híbrido tipo 2. La amplificación se realizó en las mismas condiciones que los marcadores RAPD. La reacción de amplificación se realizó de igual forma en un termocigruapor GeneAMP PCR System 9700 (Applied Byosistem), programado a 25 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C, 1 min a 72°C.

Cuadro 2. Oligonucleotidos utilizados para amplificar la región cloroplástica y nuclear

Clave	Nombre	Secuencia (5'-3')
ADN CLOROPLASTO		
A	B48557	CATTACAAATGCGATGCTCT
B	A49291	TCTACCGATTTTCGCCATATC
ADN NUCLEAR		
A	1800F	ACCTGCGGAAGGATCATTG
B	ITS4R	TCCTCCGCTTATTGATATGC

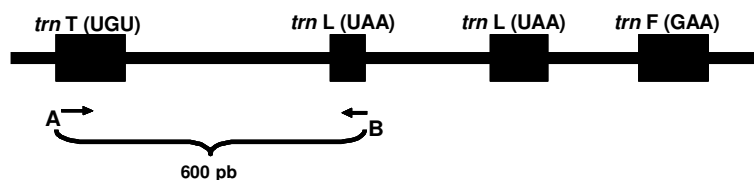


Figura 4. Sitio de reconocimiento de los oligonucleotidos para amplificar la región *trnT-trnL* del ADNcp (Taberlet *et al.*, 1991).

La región del ITS, fue amplificada con los oligonucleotidos 1800F e ITS4R (Cuadro 2) que se utilizan para amplificar la región del ITS1, el 5.8S y el ITS2 (Figura 5) en una cactácea columnar del género *Lophocereus* (Hartmann *et al.*, 2001). Las condiciones de amplificación fueron las utilizadas para la región cloroplástica. El tamaño del fragmento esperado fue de 700 pb. Se secuenciaron y analizaron los mismos individuos de los posibles parentales y del grupo externo y 14 posibles híbridos, los cuatro del híbrido tipo 1 y 10 del híbrido tipo 2.

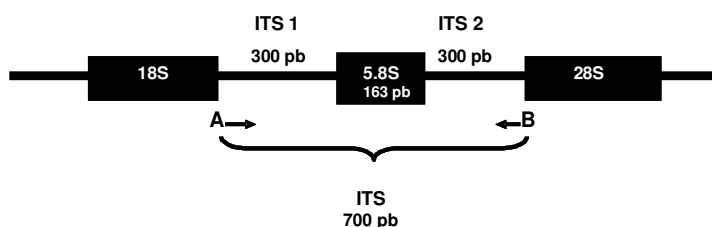


Figura 5 Sitio de reconocimiento de los oligonucleotidos para amplificar el ITS

Los productos de las amplificaciones de la región cloroplástica y nuclear se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2% y se utilizó un marcador de peso molecular de una kilo base (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), para corroborar el tamaño de los fragmentos esperados. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y expuestos a luz UV para observar los productos de la amplificación, las imágenes se fotografiaron y se almacenaron digitalmente.

Para secuenciar los productos de la región cloroplástica y nuclear, una parte del amplificado fue purificada con ExoSAP-IT™ (GE Healthcare, Uppsala, Suiza). La secuenciación se realizó en un secuenciador automatizado *ABI Prism, 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystem, Foster, California, USA).

2.2.3.1 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE ADNcp E ITS

Las secuencias del ADNcp y ADNn, se compararon con las disponibles en la base de datos digital (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/). Se alinearon con el programa Clustal X (Higgins y Sharp, 1988) y de forma manual para rectificar la alineación con ayuda del programa SeeView (Galtier *et al.*, 1996). La distancia

genética entre las secuencias del ADNcp y ADNnr se estimaron con el método de parsimonia empleando el programa PAUP*4.0b4a (Swofford, 2000). Los gaps fueron considerados como un quinto estado del carácter, el método de agrupamiento fue Neighbor-Joining (NJ) y se realizó una búsqueda heurística con 100 pasos de adición de secuencias al azar (random stepwise addition sequences), el algoritmo *Tree-Bisection-reconnection* (TBR) y la optimización del estado del carácter fue ACCTAN y se repesaron los caracteres manteniendo el máximo índice de retención (RI). Se realizó un análisis de tipo bootstrap con 1000 remuestreos.

El método de parsimonia utiliza una matriz discreta de caracteres (en una secuencia es cada una de las bases) que asignan uno o más atributos a cada taxón. La preferencia de uno u otro árbol filogenético se realiza con una precisión matemática y es definida por la longitud del árbol. Este indica el número de pasos que definen la topología del árbol, mientras menor sea el valor, está mejor representada la distancia genética de los taxones (Salemi y Vandenberg, 2003). El método de parsimonia consiste en encontrar un árbol o grupo de árboles que minimizan la cantidad de cambios evolutivos requeridos para explicar los datos (Swofford y Sullivan, 2003). El método de parsimonia puede realizarse con genes que presenten tasas de evolución lentas o rápidas, siendo adecuado para analizar secuencias de ADN cloroplástico con una tasa lenta y secuencias de ADN nuclear como la región ITS que tiene una tasa de evolución más rápida (Martínez, 1997), por ello es adecuado en estudios de hibridación. Los métodos de agrupamiento utilizados son el UPGMA y NJ (Swofford y Sullivan, 2003), este último fue descrito para aproximarse a un árbol en el que se minimiza la suma del mínimo-cuadrado de la longitud de sus ramas que se conoce como criterio de evolución mínima. Sin embargo, raramente se consigue en conjuntos de datos muy grandes. El problema es resuelto utilizando el método de "bootstrapping" o "Jackknifing", que cuantifican la incertidumbre referente a la agrupación del árbol por el método NJ y valores superiores al 60% se consideran confiables (Swofford y Sullivan, 2003).

No obstante, que la vía para representar las relaciones evolutivas entre un conjunto de taxones dado, es usar un árbol, en el cual los nodos internos representan el ancestro hipotético y las ramas terminales las especies actuales, no siempre es así, ya que algunas veces el ancestro y las especies actuales coexisten. En el caso de plantas el proceso de hibridación no es bien representado por un árbol filogenético. Esto se debe a que, en un árbol se supone implícitamente que una vez que se crean dos linajes, ellos nunca interaccionan. Sin embargo, si se asume que semejantes interacciones pueden ocurrir, una representación simplificada puede observarse mediante una red filogenética o gráfica que es representada con el método SplitsTree (Moulton, 2003). En esta red los nodos (o vértices) representan los ancestros hipotéticos y las ramas (o ejes) las especies resultantes de la combinación de los ancestros (Moulton, 2003). Este método fue utilizado para analizar las relaciones entre *N. macrocephala*, *N. mezcalaensis* y los posibles híbridos.

2.2.4 Viabilidad del polen

Para estimar la viabilidad del polen se cortaron flores unas horas antes de la anthesis para evitar la posibilidad de polen mezclado entre flores o que los granos estuvieran dañados por factores ambientales. Las flores fueron cortadas en el ápice con un bisturí nuevo. Los granos de polen maduros fueron colocados sobre un portaobjetos. Se agregó una gota de azul de algodón y se cubrió la preparación con el cubreobjetos. Se contaron los granos de polen viables que fueron observados en un color azul homogéneo, que indica la presencia de almidón al 100%. Los granos de polen que se tiñeron en secciones aisladas o que no se tiñeron se consideraron inviables.

2.2.5 Contenido de ADN por citometría de flujo

El citómetro de flujo se calibró con eritrocitos de pollo, obteniendo histogramas con CV entre 0.98 a 1.6.

De acuerdo a la bibliografía, las cactáceas presentan entre 3.1 a 14.2 pg de ADN (Bennett y Smith, 1976) por lo que se utilizó como referencia interna a *Lycopersicon esculentum*, que presenta 2C = 1.96 pg de ADN.

Una suspensión de núcleos intactos se preparó con el método de Otto (1990), con algunas modificaciones descritas por Dolezel y Göhde (1995), (Apéndice 3).

Para obtener el contenido de ADN se analizó *L. esculentum* simultáneamente con un individuos de *N. macrocephala*, *N. mezcalaensis* y de los posibles híbridos.

La intensidad de la fluorescencia de los núcleos teñidos se analizó con un citómetro de flujo partec CA II (Partec GMBH, Münster, Alemania) en una tasa de 20 a 50 núcleos por segundo. En cada muestra 10, 000 a 20, 000 núcleos fueron analizados. La posición de los histogramas, su área y coeficiente de variación fueron calculados usando el software DPAC (partec GMBH, Münster, Alemania). El tamaño del genoma nuclear fue calculado de acuerdo a Dolezel (1995), usando la formula:

$$\begin{array}{l} \text{Contenido 2C ADN} \\ \text{ADN Planta problema (pg)} \\ \text{histograma G1 planta de referencia} \\ \text{(pg)} \end{array} = \begin{array}{l} \text{Media del histograma G1 planta problema} \\ \text{Media del} \\ \text{planta de referencia} \end{array} \times \begin{array}{l} \text{Contenido 2C} \\ \text{planta de referencia} \end{array}$$

Con el programa Xlstat (Addinsoft, 2006), se realizó un ANOVA con una prueba de Tukey, de Dunnett y REGWQ, con un intervalo de confianza del 95%, para estimar si existían diferencias significativas en el contenido de ADN nuclear entre especies y los posibles híbridos.

Para estimar el patrón endoploíde se analizaron plántulas menores a seis meses de *N. macrocephala*, *N. mezcalaensis* y de los posibles híbridos,

procesando entre 500 a 600 mg de cada plántula y analizando los núcleos teñidos, sin referencia interna.

3. RESULTADOS

Un carácter morfológico considerado como diagnóstico del género *Neobuxbaumia*, es el intervalo del número de costillas que en *N. macrocephala* es de 17 a 26, en *N. mezcalaensis* es de 13 a 20 y algunos presentan hasta 25 costillas que se encuentra dentro del intervalo de *N. macrocephala* (Arias *et al.*, 1997). Únicamente en 12 de los 17 posibles híbridos, el número de costillas fue congruente con su fenotipo (Cuadro 3).

Cuadro 3 Fenotipo y número de costillas de 17 posibles híbridos en las dos zonas de estudio.

	Fenotipo	Número de costillas
H 1 SJR	Híbrido tipo 1	14*
H 2 SJR	Híbrido tipo 2	23*
H 3 SJR	Híbrido tipo 2	13-15
H 4 SJR	Híbrido tipo 2	21*
H 5 SJR	Híbrido tipo 1	22
H 6 SJR	Híbrido tipo 2	14-16
H 7 SJR	Híbrido tipo 2	18
H 8 SJR	Híbrido tipo 2	16-17
H 9 SJR	Híbrido tipo 2	21*
H 10 SJR	Híbrido tipo 1	21-23
H 11 SM	Híbrido tipo 2	20
H 12 SM	Híbrido tipo 2	19-20
H 13 SM	Híbrido tipo 2	19
H 14 SM	Híbrido tipo 2	20
H 15 SM	Híbrido tipo 1	20-23
H 16 SM	Híbrido tipo 1	18-23
H 17 SM	Híbrido tipo 2	n. d.

* Número de costillas no coincide con el fenotipo, n. d. No determinado. Posible híbrido (H), San Juan Raya (SJR); San Martín(SM). Híbrido tipo 1 fenotipo de *N. macrocephala*, Híbrido tipo 2, fenotipo de *N. mezcalaensis*.

El número de costillas, no parece ser una característica diagnóstica para diferenciar entre las especies propuestas como parentales y los posibles híbridos, ya que no siempre se relaciona con el fenotipo.

En los posibles híbridos analizados predomina el fenotipo de *N. mezcalaensis*. Esta especie presenta gran cantidad de flores a lo largo del tallo, por lo que la cantidad de polen y semillas dispersas es superior, comparado con las disponibles en *N. macrocephala* que solo presenta flores en el ápice.

3.1 MARCADORES RAPD

3.1.1 SIMILITUD GENÉTICA

Utilizando los seis oligonucleotidos en los 31 individuos analizados se obtuvieron 70 bandas polimórficas, el tamaño de las bandas fue de 200 a 2100 pb, amplificando de 7 a 15 bandas por oligonucleotido, ninguno de los individuos mostró un patrón de bandeo idéntico. Se encontraron 43 bandas que definen las relaciones entre las especies y los posibles híbridos (Cuadro 4).

Los posibles híbridos comparten ocho bandas con *N. mezcalaensis* y *N. macrocephala* y siete con *N. mezcalaensis* y *N. tetetzo*. Sin embargo, solo comparten dos bandas con *N. tetetzo* por lo que al parecer, *N. mezcalaensis* y *N. macrocephala* son las más relacionadas con los posibles híbridos.

Cuadro 4. Bandas obtenidas con seis oligonucleotidos, exclusivas por especie y posibles híbridos.

Oligonucleotido No. bandas	OPA04 12	OPA10 9	OPB10 14	OPC08 13	OPE14 7	OPG06 15	Exclusivas
Ma (7 ind)		1(1)				1(7)	2
Mz (7 ind)	1(7)	1(7)					2
Te (4 ind)		2(4)		1(2)			3
H (13 ind)		2(1)			1(1)		3
Ma/H	1(7/3)				1 (2/1)	2 (7/5) (7/5)	4
Mz/H	1(7/5)			3 (6/6) (5/3) (2/5)		3 (5/1) (6/4) (3/1)	7
Te/H				1 (1/1)		1 (1/6)	2
Ma/H/Te	2 (1/1/1) (2/5/2)		2(3/1/1) (3/2/3)			1(2/5/4)	5
Ma/H/Mz			3(3/5/7) (3/8/2) (2/2/7)	1(3/5/7)	1(1/10/7)	3(7/1/2) (1/6/2) (3/5/5)	8
Mz/H/Te	1 (1/2/1)		3(1/2/1) (1/5/2) (2/2/1)	2(5/4/4) (7/2/4)		1(6/1/3)	7
Exclusivas/oligonucleotido	6	6	8	8	3	12	43

N. macrocephala (Ma), *N. mezcalaensis* (Mz), *N. tetetzo* (Te), posibles híbridos (H), dentro del paréntesis el número de individuos que presentan o comparten la banda.

Con el índice de similitud de Dice (Figura 6), se obtuvo que las distancias genéticas entre individuos se encuentran entre 0.86 y 0.36, lo que indica que existen diferencias genéticas entre los individuos analizados.

El coeficiente de correlación cofenética calculado fue de 0.8 que indica que la representación es estadísticamente significativa. Sin embargo, solo cuatro agrupaciones presentaron un soporte alto (bootstrap superior al 80%) indicando que las agrupaciones pueden modificarse conforme aumente el número de individuos, aunque no la tendencia del agrupamiento.

De acuerdo al agrupamiento representado por el dendrograma, se observa que los marcadores permiten resolver a nivel de especie.

Los posibles híbridos se congregan con los grupos de *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis*. En el primer grupo, *N. macrocephala* se asocia con dos posibles híbridos con fenotipo de *N. macrocephala* y seis posibles híbridos con fenotipo de *N. mezcalaensis*. En el segundo grupo *N. mezcalaensis* se relaciona con dos posibles híbridos con fenotipo de *N. macrocephala* y tres posibles híbridos con fenotipo de *N. mezcalaensis*. En el dendrograma no se observa agrupación por fenotipo en los posibles híbridos ni relación con *N. tetetzo*.

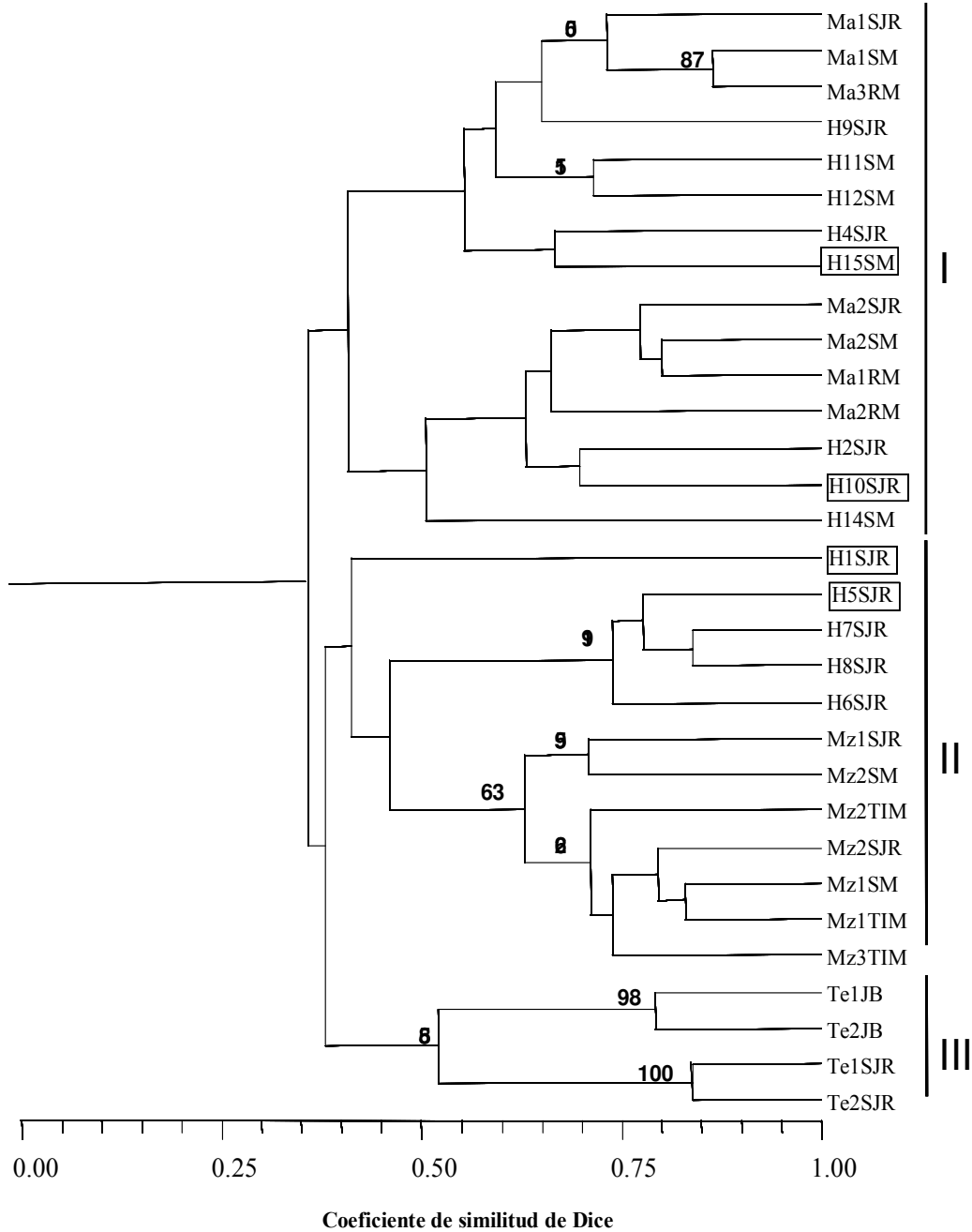


Figura 6. Dendrograma obtenido con el índice de Similitud de Dice agrupado por UPGMA. *N. macrocephala* (Ma), *N. mezcalaensis* (Mz), *N. tetetzo* (Te), posibles híbridos (H), dentro de un recuadro presentan fenotipo tipo 1 (*N. macrocephala*) y los que no presentan recuadro el fenotipo tipo 2 (*N. mezcalaensis*). San Juan Raya (SJR), San Martín (SM), Los Reyes Metzontla (RM), Jardín botánico (JB), Tepenene Izúcar de Matamoros (TIM). En números romanos se indican los grupos encontrados. Coeficiente de correlación $r = 0.8$. Los números sobre las ramas indican los valores bootstrap mayores al 50%.

3.1.2 ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES

En el análisis de coordenadas principales, los posibles híbridos se agrupan con *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis* (Figura 7), sin guardar relación con el fenotipo.

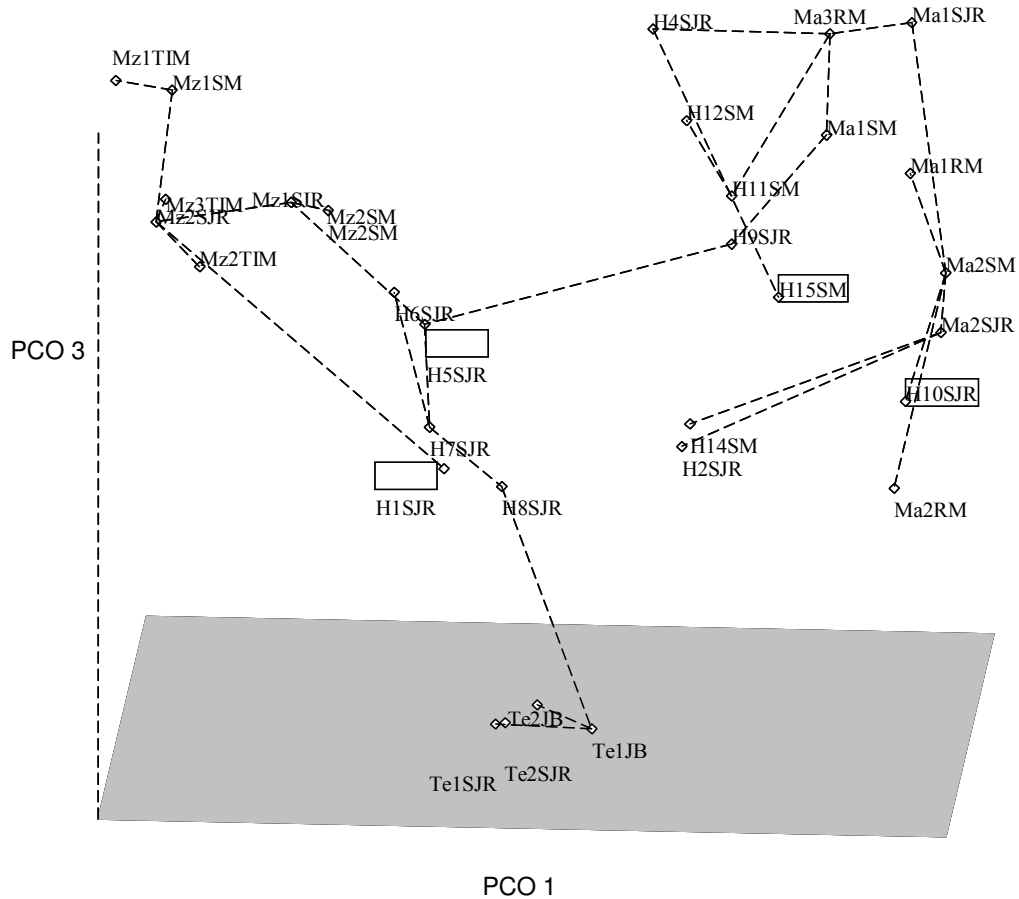


Figura 7. Análisis de coordenadas principales en tres dimensiones, componente uno (PCO1), componente dos (PCO2) y componente tres (PCO3). Se observa segregación por especies y agrupamiento de los posibles híbridos con *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis*. *N. macrocephala* (Ma), *N. mezcalaensis* (Mz), *N. tetetzo* (Te), posibles híbridos (H), dentro de un recuadro presentan fenotipo tipo 1 (*N. macrocephala*) y los que no presentan recuadro el fenotipo tipo 2 (*N. mezcalaensis*). San Juan Raya (SJR), San Martín (SM), Los Reyes Metzontla (RM), Jardín botánico (JB), Tepehene Izúcar de Matamoros (TIM).

En el dendrograma y en análisis de coordenadas principales, no existe agrupamiento de acuerdo al fenotipo de los posibles híbridos y no existe relación con *N. tetetzo*.

3.1.3 ESTRUCTURA GENÉTICA

De acuerdo a los resultados anteriores *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis* serían los parentales más factibles de los posibles híbridos. Para valorar el nivel de similitud genética entre los posibles híbridos y las especies propuestas como parentales, se realizó el análisis molecular de varianza molecular (AMOVA), eliminando a *N. tetetzo* y agrupando a los posibles híbridos de acuerdo a su fenotipo para no crear un grupo híbrido falso. Con esto podemos descartar si la variación morfológica se debe a plasticidad genética en cuyo caso, cada fenotipo compartiría más información con la especie respectiva o por el contrario, si existe un evento de hibridación la información se compartirá con ambas especies.

De acuerdo al AMOVA, el 73.94% de la variación se encuentra dentro de las especies (*N. macrocephala*, *N. mezcalaensis* y los posibles híbridos) y comparten el 26% de la información genética o variabilidad (Cuadro 5). Esto implica que no existe aislamiento genético o estructura entre las especies analizadas y los posibles híbridos.

Cuadro 5 Análisis de varianza molecular (AMOVA) en dos niveles jerárquicos, para las especies de *N. macrocephala*, *N. mezcalaensis* y sus posibles híbridos.

Origen de Variación	g.I.	V.C.	Porcentaje de variación	Φ_{ST}	P	$N_e m$
Entre especies	3	7.79	26.06	0.261	<0.0010	1.08
Dentro de las especies	23	22.1	73.94			

g. I. grados de libertad, V.C. varianza total de los componentes, Φ_{ST} , índice de diversidad genética, P, probabilidad de que sean productos al azar después de 1000 permutaciones y $N_e m$, flujo génico estimado entre especies y los posibles híbridos.

3.1.4 FLUJO GÉNICO ($N_e m$)

La variabilidad entre los grupos analizados de *N. macrocephala*, *N. mezcalaensis* y los posibles híbridos definida como Φ_{ST} , fue de 0.261 (Cuadro 5), que se encuentra dentro de los valores estimados en especies de polinización cruzada (Nybom y Bartish, 2002). A partir de este valor se realizó una estimación indirecta del flujo génico entre las especies y los posibles híbridos y el valor

obtenido fue de 1.08, que indica la migración de un individuo por generación entre las especies *N. macrocephala*, *N. mezcalaensis* y los posibles híbridos y explica porque se comparte más del 20% de la variación.

Con los valores pareados de las Φ_{ST} se realizó una estimación indirecta del flujo génico entre especies y los posibles híbridos (Cuadro 6). El flujo génico entre *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis* fue de 0.5 y de acuerdo a Hartl y Clark (1989), esto implica diferencia entre especies. Si las variaciones morfológicas observadas en los posibles híbridos se deben a plasticidad genética, se esperaría un valor similar entre el grupo del híbrido tipo 1 (fenotipo de *N. macrocephala*) y el grupo del híbrido tipo 2 (fenotipo de *N. mezcalaensis*), aunque el valor obtenido es de 24.97 (Cuadro 6), indicando que no hay diferencias genéticas entre ellos y por el contrario que comparten información genética.

El flujo génico entre *N. macrocephala* y grupo del híbrido tipo 1 que presenta el mismo fenotipo, fue de 4.62, con este mismo grupo de posibles híbridos el flujo génico con *N. mezcalaensis* fue de 1.92 (Cuadro 6). El flujo génico entre *N. mezcalaensis* y los posibles híbridos con este fenotipo (híbrido tipo 2), fue de 1.85 y con *N. macrocephala* 3.2 (Cuadro 6). Conforme a Hartl y Clark (1989) no existe diferencia poblacional entre los posibles híbridos y las especies propuestas como parentales en ningún caso. Esto implica que los posibles híbridos comparten información genética con *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis* y que las variaciones morfológicas no se deben a plasticidad genética y si a un evento de hibridación.

Cuadro 6. Φ_{ST} pareadas entre especies (por debajo de los ceros) y flujo génico ($N_e m$) (por encima de los ceros, en negritas).

	Ma	H1	H2	Mz
Ma (n= 7)	0	4.62	3.2	0.5
H1 (n= 4)	0.1780	0	24.97	1.92
H2 (n= 9)	0.2387	0	0	1.85
Me (n= 7)	0.6617	0.3418	0.3502	0

N. macrocephala (Ma), *N. mezcalaensis* (Mz), posibles híbridos con fenotipo de *N. macrocephala* (H1), posibles híbridos con fenotipo de *N. mezcalaensis* (H2), número de individuos analizados (n).

La distancia genética estimada con los valores pareados de las Φ_{ST} (Cuadro 6), pueden observarse en el dendrograma de disimilitud (Figura 8). Se observa que los posibles híbridos forman un grupo independiente de las especies propuestas como parentales y que comparten mayor información con *N. macrocephala*.

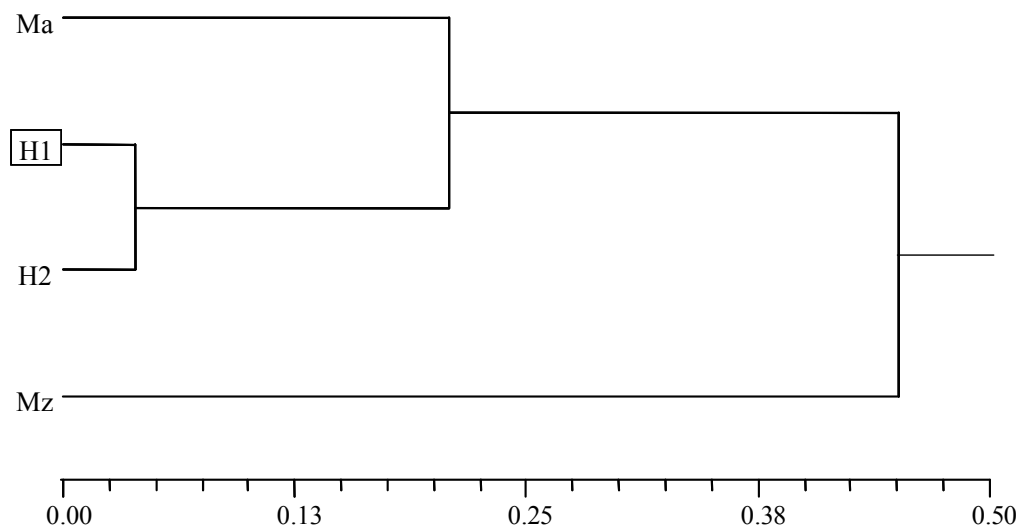


Figura 8. Dendrograma de la distancia genética entre los grupos analizados, obtenidas mediante la transformación de Φ_{ST} pareadas en coeficientes de coancestría y agrupados por el método UPGMA, indicando que la mayor similitud genética se encuentra entre *N. macrocephala* y los híbridos. *N. macrocephala* (Ma), *N. mezcalaensis* (Mz), híbrido con fenotipo de *N. macrocephala* (H1), Híbrido con fenotipo de *N. mezcalaensis* (H2).

3.2 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE ADNCP

Se encontraron 13 haplotipos distintos, de los cuales cinco corresponden a posibles híbridos. El haplotipo de *N. mezcalaensis* de San Martín, lo presenta el posible híbrido uno de San Juan Raya con fenotipo de *N. macrocephala*. El haplotipo de *N. mezcalaensis* de Tepenene Izúcar de Matamoros, se encuentra en cuatro posibles híbridos, tres de San Juan Raya y uno de San Martín todos con fenotipo de *N. mezcalaensis*.

De 554 caracteres analizados, 89 fueron variables y 55 fueron informativos filogenéticamente (9.93%). Sólo se muestra uno de los tres árboles parsimoniosos generados, con 101 pasos de longitud (Figura 9) y en los tres árboles *N. tetetzo*, se recupera como taxón basal.

Se observan dos agrupaciones, en el primero existen dos conjuntos (IA y IB), uno con un soporte bajo (bootstrap de 52%) formado por el haplotipo de *N. mezcalaensis* y el de *N. macrocephala* ambos de San Martín y tres haplotipos de posibles híbridos. El haplotipo de *N. mezcalaensis* fue igual al del posible híbrido uno de San Juan Raya, que presenta el fenotipo de *N. macrocephala*, dando evidencia de captura de cloroplasto. El haplotipo de *N. macrocephala* de San Martín, se agrupa con un posible híbrido con fenotipo de *N. macrocephala* y dos con fenotipo de *N. mezcalaensis*, con un soporte bootstrap del 100%. Esta relación, también proporciona evidencia de captura de cloroplasto. El conjunto IB, no presenta soporte bootstrap, incluye los dos haplotipos restantes de *N. macrocephala* (San Juan Raya y los Reyes Metzontla) y un haplotipo presente en dos posibles híbridos, uno con fenotipo de *N. macrocephala* y el otro con fenotipo de *N. mezcalaensis*, que permite especular retrocruzadas en los posibles híbridos.

La segunda agrupación (II) con un soporte bajo (bootstrap de 57%), está formado por los dos haplotipos restantes de *N. mezcalaensis* (San Juan Raya y

Tepenene Izúcar de Matamoros). El haplotipo de Tepenene Izúcar de Matamoros, fue el mismo para cuatro posibles híbridos con el mismo fenotipo.

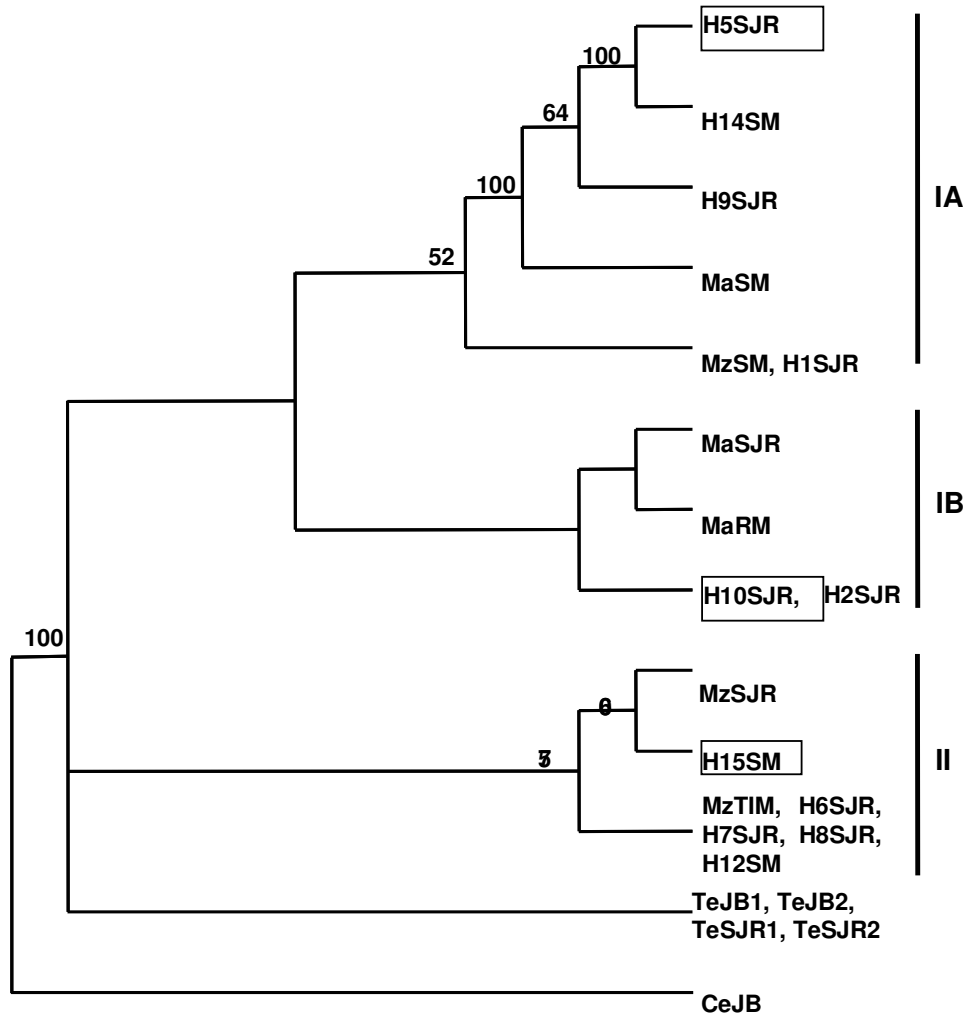


Figura 9. Uno de los tres árboles más parsimoniosos, obtenidos de las secuencias de la región cloroplástica. El índice de consistencia (CI) fue igual a 0.9554 y 0.9308 excluyendo los caracteres no informativos y el índice de retención (RI) fue igual a 0.9754. Los valores bootstrap mayores al 50 % se encuentran sobre los grupos. *N. macrocephala* (Ma), *N. mezcalaensis* (Me), *N. tetetzo* (Te), *C. columna-trajani* (Ce) posibles híbridos (H), dentro de un recuadro presentan fenotipo tipo 1 (*N. macrocephala*) y del fenotipo tipo 2 (*N. mezcalaensis*) no presentan recuadro. San Juan Raya (SJR), San Martín (SM), Los Reyes Metzontla (RM), Jardín botánico (JB), Tepenene Izúcar de Matamoros (TIM). En números romanos se indican los grupos encontrados.

Aunque los grupos presentan valores de soporte bajo, el cladograma presenta un soporte del 100%, que indica que las relaciones observadas son significativas, aunque las agrupaciones pueden variar a medida que se incluya más haplotipos en el análisis. En este cladograma se observa que los genotipos de *N. mezcalaensis* y *N. macrocephala* no están completamente aislados y que el haplotipo que se conserva en los posibles híbridos es de *N. mezcalaensis*. Además, los posibles híbridos se agrupan con *N. mezcalaensis* y *N. macrocephala*, sin guardar relación con su fenotipo, reforzando los resultados obtenidos con marcadores RAPD.

3.3 ANÁLISIS DE LA SECUENCIA NUCLEAR EN LA REGION DEL ITS

De 913 caracteres analizados, 175 fueron variables no informativos y 458 informativos filogenéticamente (50.16%). Se encontró un árbol parsimonioso con una longitud de 1132 pasos y soporte significativo (bootstrap del 100%) (Figura 10). Se observan tres grupos, el primero con un soporte alto (bootstrap de 99%), agrupa a las cuatro secuencias de *N. tetetzo*, las cuatro de *N. mezcalaensis*, la secuencia tres de *N. macrocephala* de San Juan Raya, una secuencia del posible híbrido tipo 1 y nueve del posible híbrido tipo 2.

En el segundo grupo con un soporte significativo (bootstrap de 83%), se agrupan las cuatro secuencias de *N. macrocephala* (SM, RM y SJR 1 y 2), dos de posibles híbridos tipo 1 (*N. macrocephala*) y dos de posible híbrido tipo 2 (*N. mezcalaensis*). El posible híbrido 10 de San Juan Raya, no presenta agrupación con los grupos analizados. Este individuo se agrupó con *N. macrocephala* en los análisis de marcadores RAPD y en la región analizada del cloroplasto, aunque en la región nuclear del ITS existe una delección que evita la agrupación con los otros individuos, lo que puede originar nuevos haplotipos en las subsiguientes cruces.

En el tercer grupo, con un soporte significativo (bootstrap de 79%), se agrupan las secuencias de *C. columna trajani* que se utilizó como grupo externo.

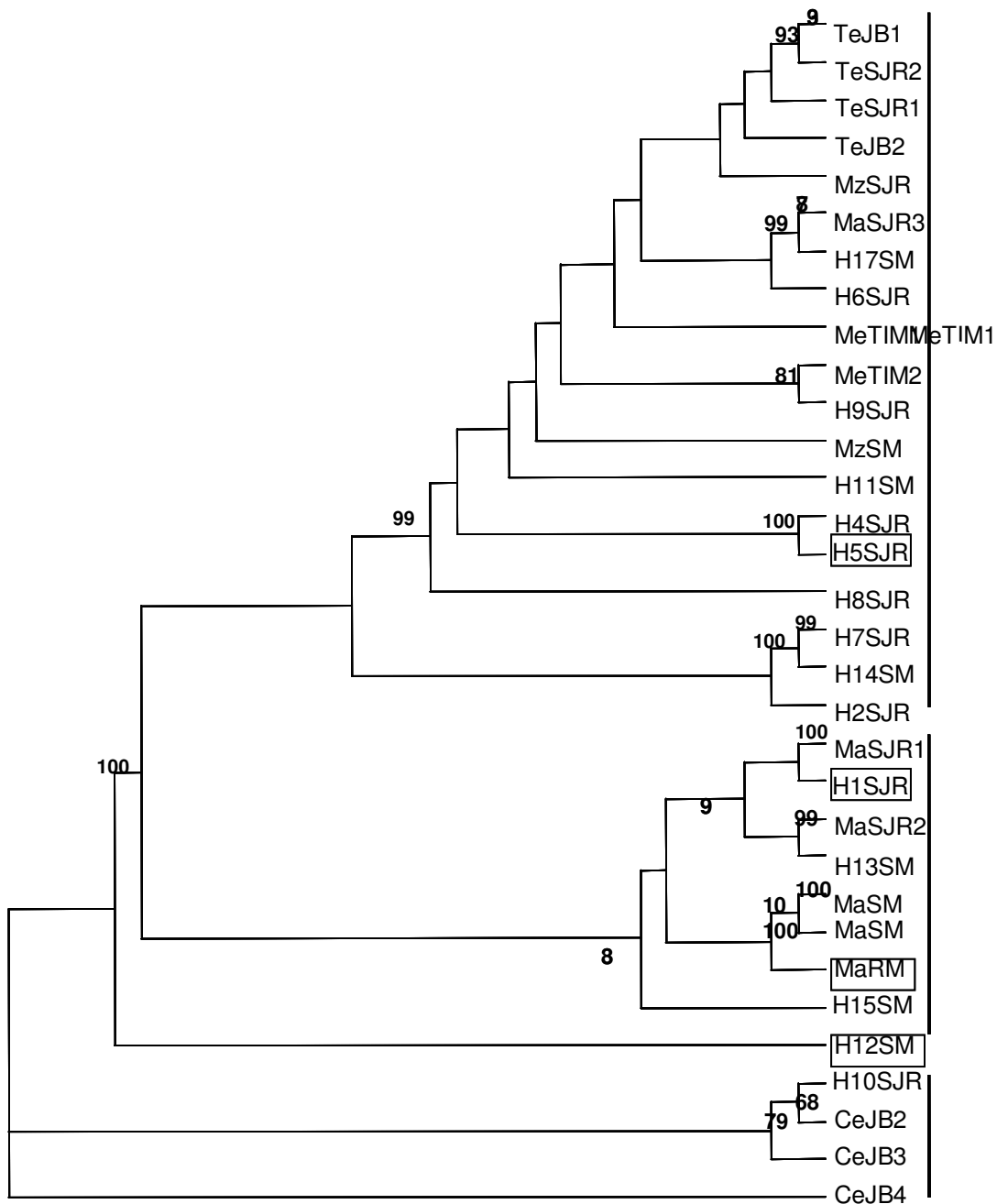


Figura 10. Cladograma realizado con las secuencias de la región del ITS. El índice de consistencia (CI) fue igual a 0.6351 y 0.5506 excluyendo los caracteres no informativos y el índice de retención (RI) fue igual a 0.7533. Los valores bootstrap mayores al 50 % se encuentran sobre los grupos. *N. macrocephala* (Ma), *N. mezcalaensis* (Me), *N. tetetzo* (Te), posibles híbridos (H), dentro de un recuadro presentan fenotipo tipo 1 (*N. macrocephala*) y sin recuadro los que presentan fenotipo tipo 2 (*N. mezcalaensis*). San Juan Raya (SJR), San Martín (SM), Los Reyes Metzontla (RM), Jardín botánico (JB), Tepenene Izúcar de Matamoros (TIM). En números romanos se indican los grupos encontrados.

Con el análisis SplitsTree se observa que existen dos grupos uno formado por *N. macrocephala*, *C. columna-trajani* y posibles híbridos y en el otro grupo *N. mezcalaensis*, *N. tetetzo* y algunos posibles híbridos (Figura 11). Los *splits* o ejes paralelos que se observan indican relación con base en la información compartida entre taxones. En el grupo uno se agrupan las secuencias de tres posibles híbridos (H2SJR, H7SJR y H14SM) que en el análisis de máxima parsimonia (Figura 10) se agrupan con *N. mezcalaensis* y *N. tetetzo*. En el grupo dos, se encuentra la secuencia del individuo tres de *N. macrocephala* de San Juan Raya que se encuentra más relacionado con dos posibles híbridos que con las secuencias de *N. macrocephala*.

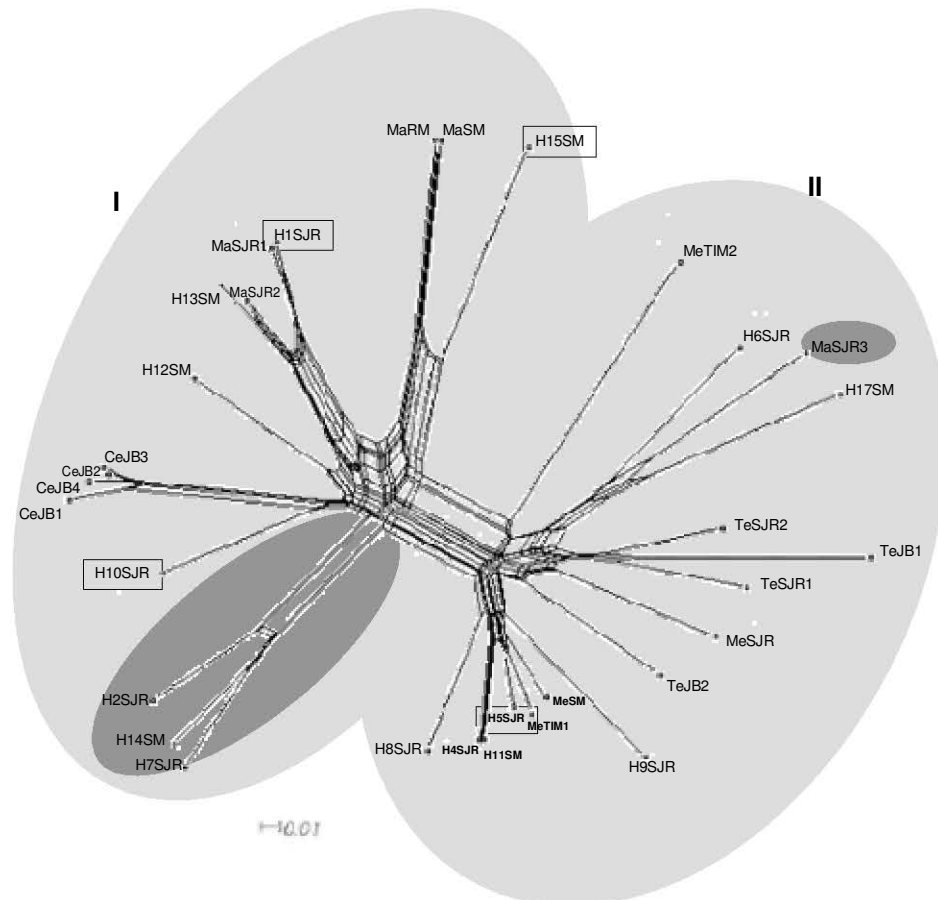


Figura 11. Red filogenética generada con el programa SplitsTree, con el método Hamming, de las secuencias de ITS. El coeficiente de correlación fue de 81.2. *N. macrocephala* (Ma), *N. mezcalaensis* (Me), *N. tetetzo* (Te), posibles híbridos (H), dentro de un recuadro presentan fenotipo 1 (*N. macrocephala*). SJR, San Juan Raya, SM, San Martín, RM, Los Reyes Metzontla, JB, Jardín botánico, TIM, Tepehene Izúcar de Matamoros.

Al analizar los nucleótidos de las secuencias, se encontraron 31 sitios polimórficos conservados en las especies analizadas. Ningún sitio se comparte entre *N. mezcalaensis* y *N. macrocephala*. Está última presenta mayor relación con *C. columna trajani* compartiendo 20 sitios y *N. mezcalaensis* comparte 24 sitios con *N. tetetzo* (Cuadro 7).

Cuadro 7. De 913 caracteres analizados 31 sitios nucleotídicos son compartidos entre especies en la región nuclear del ITS

Especie 1	Especie 2	Posición de sitios compartidos	Total sitios compartidos
<i>N. mezcalaensis</i>	<i>N. macrocephala</i>	-----	0
<i>N. mezcalaensis</i>	<i>N. tetetzo</i>	5, 13, 29, 62, 95, 191, 285, 578, 688, 715, 718, 720, 739, 743, 750, 764, 766, 768, 769, 783, 820, 823, 832, 869	24
<i>N. mezcalaensis</i>	<i>C. columna-trajani</i>	191, 578, 690, 739, 768, 769	6
<i>N. macrocephala</i>	<i>N. tetetzo</i>	801	1
<i>N. macrocephala</i>	<i>C. columna-trajani</i>	5, 62, 95, 285, 315, 688, 718, 750, 764, 766, 783, 801, 820, 823, 832, 841, 869, 885, 893, 897	20
<i>N. tetetzo</i>	<i>C. columna-trajani</i>	191, 578, 739, 768, 769	6

En las secuencias existen algunos nucleótidos compartidos entre especies, (Cuadro 8) y mutaciones que solo se encuentran en ciertos individuos y que se identifican en color rojo. Los posibles híbridos presentan adición de secuencias de *N. mezcalaensis* en verde y *N. macrocephala* en naranja que se observan como un mosaico de las secuencias en estos sitios. Las ocho secuencias H1SJR, H2SJR, H7SJR, H10SJR, H12SM, H13SM, H14SM y H15SM presentan más del 50% de los nucleótidos parecidos a *N. macrocephala* y las siete secuencias restantes a *N. mezcalaensis*, esto implicaría que el flujo génico es bidireccional (Cuadro 9).

Cuadro 8. Sitios nucleotídicos polimórficos conservados en la secuencia del ITS

	ITS1															ITS2																
	5	13	29	62	95	191	285	315	578	688	690	715	718	720	739	743	750	764	766	768	769	783	801	820	823	832	841	869	885	893	897	
TeJB1	C	C	A	T	G	T	A	G	G	T	G	-	A	C	T	A	A	C	A	C	G	A	G	C	A	T	C	T	T	K	C	
TeJB2	T	T	G	T	A	-	A	-	G	T	G	-	A	C	T	G	A	C	A	A	G	A	G	C	A	T	N	T	C	G	C	
TeSJR1	T	C	G	T	A	C	A	G	A	T	C	-	A	C	T	G	A	C	A	A	G	A	G	C	A	T	A	T	C	T	C	
TeSJR2	T	C	G	T	C	C	A	G	G	T	C	-	A	C	T	G	A	C	A	A	G	A	C	C	A	T	G	T	T	G	G	
MeSJR	T	C	G	T	A	C	A	G	G	T	C	-	A	C	T	G	A	C	A	A	G	A	A	C	A	T	G	T	C	G	G	
MeSM	T	C	G	T	A	C	A	C	G	T	C	-	A	C	T	G	A	C	A	A	G	A	A	C	A	T	G	T	C	G	A	
MeTIM1	T	C	G	T	G	C	A	C	G	T	C	-	A	C	T	G	A	C	A	A	G	A	A	C	A	T	G	T	C	G	A	
MeTIM2	T	T	G	C	A	G	A	G	G	T	T	-	A	C	T	G	A	C	A	A	C	A	A	C	A	T	A	T	C	G	A	
MaSJR1	A	T	A	C	G	T	G	T	T	C	T	A	-	T	C	C	G	T	G	G	T	G	G	T	G	A	A	C	T	T	G	
MaSJR2	A	T	A	C	G	T	G	T	T	C	T	C	-	T	C	C	G	T	G	G	T	G	G	T	G	A	A	T	T	T	G	
MaSJR3	A	T	A	T	G	-	G	T	C	T	C	-	-	T	G	A	C	A	A	A	A	G	C	A	T	G	C	C	G	G	A	
MaSM	A	T	A	C	G	T	G	T	T	C	T	A	-	G	C	C	G	T	G	G	T	G	G	T	G	A	A	C	T	T	G	
MaRM	A	T	A	C	G	T	G	T	T	C	T	A	-	G	C	C	G	T	G	G	T	G	G	T	G	A	A	C	T	T	G	
CeJB1	T	-	C	C	G	C	G	T	G	C	C	C	-	T	T	T	G	T	G	A	A	G	G	T	G	A	A	C	T	T	C	
CeJB2	A	-	C	C	G	C	G	T	G	C	C	C	-	T	T	T	G	T	G	A	G	G	G	T	G	A	A	C	T	T	G	
CeJB3	A	-	C	C	A	C	G	T	G	C	C	C	-	T	T	T	G	T	G	A	G	G	G	T	G	A	A	C	T	T	G	
CeJB4	A	-	C	C	G	T	G	T	G	C	C	C	-	T	T	T	G	T	G	A	G	G	G	T	G	A	A	C	T	T	G	
H1SJR	A	T	A	C	G	T	G	T	T	C	T	A	-	T	C	C	G	T	G	G	T	G	G	T	G	A	A	C	T	T	G	
H2SJR	A	T	G	C	G	C	G	T	T	C	T	C	-	A	C	T	T	A	C	G	G	G	G	T	A	A	G	C	C	G	G	
H4SJR	T	T	G	T	G	C	A	C	G	T	T	-	A	C	T	G	A	C	C	A	G	A	A	C	A	T	G	T	C	G	A	
H5SJR	T	T	G	T	G	C	A	C	G	T	T	-	A	C	T	G	A	C	C	A	G	A	A	C	A	T	G	T	C	G	A	
H6SJR	T	C	A	T	G	C	A	G	T	C	T	C	-	A	C	T	G	A	C	A	A	G	A	A	C	A	T	G	T	C	G	C
H7SJR	A	C	A	C	G	C	A	G	T	T	C	T	A	-	C	T	T	A	C	G	G	G	G	T	A	A	A	C	C	G	G	
H8SJR	T	T	G	T	G	-	A	G	G	T	T	-	A	C	T	G	A	C	C	A	G	A	A	C	A	T	A	T	C	G	A	
H9SJR	T	C	G	C	G	G	A	C	G	T	C	-	A	C	T	G	A	C	A	A	C	A	A	C	A	T	G	T	T	G	A	
H10SJR	-	-	-	C	A	-	G	T	G	C	T	C	-	C	C	T	G	C	G	G	G	A	G	T	G	A	A	C	C	G	A	
H11SM	T	C	G	T	G	C	A	C	G	T	C	-	A	C	T	G	A	C	A	A	G	A	A	C	A	T	G	T	C	G	A	
H12SM	A	C	G	C	G	T	G	T	G	C	T	C	-	C	C	G	C	G	G	G	A	G	T	G	A	A	C	T	C	T	G	
H13SM	A	T	G	C	G	T	G	T	T	C	T	A	-	T	C	C	G	T	G	G	T	G	G	T	G	A	A	A	T	T	-	
H14SM	A	T	G	T	G	C	G	T	T	C	T	A	-	C	T	T	A	C	G	G	G	G	T	A	A	A	A	C	C	G	G	
H15SM	A	T	A	C	A	G	G	T	T	C	T	A	-	C	C	C	G	T	G	G	A	-	T	G	A	G	T	Y	K	G	G	
H17SM	T	C	A	T	G	-	-	A	A	T	T	A	-	A	T	G	A	C	A	T	T	A	G	C	A	-	G	T	C	G	A	

Sitios conservados para *N. tetetzo* en morado, para *N. mezcalaensis* en verde, para *N. macrocephala* en anaranjado, para *C. columna-trajani* en verde agua, para los posibles híbridos en amarillo, los de tipo 1 el nombre se encuentra en rojo y los de tipo 2 en negro. En rojo mutaciones puntuales y las deleciones se indican con un guión.

Las secuencias de los individuos H2SJR, H7SJR y H14SM, que se agrupan con *N. mezcalaensis* en el análisis de máxima parsimonia (Figura 10) y con *N. macrocephala* con el análisis de SplitsTree (Figura 11), comparten con *N. macrocephala* menos del 65% de los sitios polimórficos fijados y esto podría ser la razón de que se agrupen con uno u otro parental. Las secuencias de estos individuos comparten entre sí 27 de los 31 nucleótidos (87%) y presentan una secuencia conservada que no es compartida con ningún individuo (Cuadro 9). Los individuos H10SJR y H17SM, comparten menos del 60% de los sitios nucleotídicos, el individuo H10SJR presenta cuatro deleciones en los 31 sitios polimórficos y el individuo H17SM presenta cinco mutaciones que nos son compartidas con los posibles híbridos o parentales.

El individuo tres de *N. macrocephala* de San Juan Raya que se encuentra en el grupo de *N. mezcalaensis* (Figura11), presenta sitios nucleotídicos que

comparte con esta especie (16/31, 52%). Este individuo no mostraba características morfológicas que indicaran hibridación. En el caso contrario el posible híbrido H1SJR, presentó una secuencia idéntica a *N. macrocephala* y el mismo fenotipo. No obstante, tiene el mismo haplotipo de ADN del cloroplasto que *N. mezcalaensis* (Figura 9) y su relación fue la misma con los marcadores RAPD (Figura 6), siendo esto una prueba de que tiene un origen híbrido. Estos dos individuos pueden ser producto de la primera generación filial (F1), en la que aún no existe recombinación y pueden ser identificados los alelos parentales, al igual que el posible híbrido H15SM que en los sitios 885 y 893 presentan ambigüedades por la presencia de alelos de ambas especies.

Cuadro 9. Arreglo por similitud en las secuencias de ITS de los posibles híbridos.

	ITS1										5.8	ITS2																				
	5	13	29	62	95	191	285	315	578	688	690	715	718	720	739	743	750	764	766	768	769	783	801	820	823	832	841	869	885	893	897	
TeJB1	C	C	A	T	G	TA	G	G	T	G	-	A	C	T	A	A	C	A	C	G	A	G	C	A	T	C	T	T	K	C		
TeJB2	T	T	G	T	A	-	A	-	G	T	G	-	A	C	T	G	A	C	A	A	G	A	G	C	A	T	N	T	C	G	C	
TeSJR1	T	C	G	T	A	C	A	G	A	T	C	-	A	C	T	G	A	C	A	A	G	A	G	C	A	T	A	T	C	T	C	
TeSJR2	T	C	G	T	C	C	A	G	G	T	C	-	A	C	T	G	A	C	A	A	G	A	C	A	T	G	T	T	G	G		
MeSJR	T	C	G	T	A	C	A	G	G	T	C	-	A	C	T	G	A	C	A	A	G	A	A	C	A	T	G	T	C	G	G	
MeSM	T	C	G	T	A	C	A	C	G	T	C	-	A	C	T	G	A	C	A	A	G	A	A	C	A	T	G	T	C	G	A	
MeTIM1	T	C	G	T	G	C	A	C	G	T	C	-	A	C	T	G	A	C	A	A	G	A	A	C	A	T	G	T	C	G	A	
MeTIM2	T	T	G	C	A	G	A	G	T	T	-	A	C	T	G	A	C	A	C	A	A	A	C	A	T	A	T	C	G	A	A	
MaSJR1	A	T	A	C	G	TG	T	T	C	T	A	-	T	C	C	G	T	G	G	T	G	G	T	G	A	A	C	T	T	G		
MaSJR2	A	T	A	C	G	TG	T	T	C	T	C	-	T	C	C	G	T	G	G	T	G	G	T	G	A	A	C	T	T	T		
MaSJR3	A	T	A	T	G	-	G	T	C	T	C	-	-	T	G	A	C	A	A	A	A	A	G	C	A	T	G	C	C	G	A	
MaSM	A	T	A	C	G	TG	T	T	C	T	A	-	G	C	C	G	T	G	G	T	G	G	T	G	A	A	C	T	T	G		
MaRM	A	T	A	C	G	TG	T	T	C	T	A	-	G	C	C	G	T	G	G	T	G	G	T	G	A	A	C	T	T	G		
CeJB1	T	-	C	C	G	C	G	T	G	C	C	C	-	T	T	T	G	T	G	A	A	G	G	T	G	A	A	C	T	T	C	
CeJB2	A	-	C	C	G	C	G	T	G	C	C	C	-	T	T	T	G	T	G	A	G	G	G	T	G	A	A	C	T	T	G	
CeJB3	A	-	C	C	A	C	G	T	G	C	C	C	-	T	T	T	G	T	G	A	G	G	G	T	G	A	A	C	T	T	G	
CeJB4	A	-	C	C	G	-	G	T	G	C	C	C	-	T	T	T	G	T	G	A	G	G	G	T	G	A	A	C	T	T	G	
H1SJR	A	T	A	C	G	TG	T	T	C	T	A	-	T	C	C	G	T	G	G	T	G	G	T	G	A	A	C	T	T	G		
H13SM	A	T	G	C	G	TG	T	T	C	T	C	-	T	C	C	G	T	G	G	T	G	G	T	G	A	A	T	T	T	-		
H15SM	A	T	A	C	A	G	T	T	C	T	A	-	C	C	C	G	T	G	G	G	A	-	T	G	A	A	G	T	Y	K	G	
H12SM	A	C	G	C	G	TG	TG	C	T	C	-	C	C	C	G	C	G	G	G	A	G	TG	A	A	C	C	T	G	H10SJR	-		
-	-	-	C	A	G	TG	C	T	C	-	C	C	T	G	C	G	G	G	A	G	T	G	A	A	C	C	G	A	H2SJR	-		
H7SHR	A	T	G	C	G	C	G	T	T	C	T	C	-	C	T	T	A	C	G	G	G	G	T	A	A	A	C	C	G	G		
H14SM	A	T	G	T	G	C	G	T	T	C	T	A	-	C	T	T	A	C	G	G	G	G	T	A	A	A	C	C	G	G		
H6SJR	T	C	A	T	G	C	A	G	T	C	T	C	-	A	C	T	G	A	C	A	A	G	A	A	C	A	T	G	T	C	G	C
H4SJR	T	T	G	T	G	C	A	C	G	T	T	-	A	C	T	G	A	C	C	A	G	A	A	C	A	T	G	T	C	G	A	
H5SJR	T	T	G	T	G	C	A	C	G	T	T	-	A	C	T	G	A	C	C	A	G	A	A	C	A	T	G	T	C	G	A	
H8SJR	T	T	G	T	G	-	A	G	T	T	-	A	C	T	G	A	C	C	A	G	A	A	C	A	T	A	T	C	G	A	A	
H9SJR	T	C	G	C	G	-	A	C	G	T	C	-	A	C	T	G	A	C	A	A	C	A	A	C	A	T	G	T	T	G	A	
H11SM	T	C	G	T	G	C	A	C	G	T	C	-	A	C	T	G	A	C	A	A	G	A	A	C	A	T	G	T	C	G	A	
H17SM	T	C	A	T	G	-	-	A	A	T	T	A	T	T	G	A	C	A	A	T	T	A	G	C	A	-	G	T	C	G	A	

Sitios conservados para *N. tetetzo* en morado, para *N. mezcalaensis* en verde, para *N. macrocephala* en anaranjado, para *C. columna-trajani* en verde agua, para los posibles híbridos en amarillo, los de tipo 1 el nombre se encuentra en rojo y los de tipo 2 en negro. En azul los híbridos con secuencias similares. En rojo mutaciones puntuales y las deleciones se indican con un guión.

Los datos obtenidos con las técnicas moleculares utilizadas, marcadores RAPD's, análisis de las secuencias de la región nuclear (ITS) y cloroplástica,

apoyan nuestra hipótesis de que existe hibridación entre *N. mezcalaensis* y *N. macrocephala*, ya que individuos con fenotipo de *N. macrocephala* presentan información genética de *N. mezcalaensis* y viceversa.

3.4 VIABILIDAD DEL POLEN

Se analizó la viabilidad del polen de cuatro híbridos y dos individuos de *N. macrocephala* (Cuadro 10). En *N. macrocephala* la viabilidad del polen fue del 96 al 98%, para *N. mezcalaensis* no se cuenta con datos ya que no se obtuvieron flores unas horas antes de la antesis, para obtener el polen dehiscente. Sin embargo, Valiente-Banuet *et al.*, (1997) documenta que la viabilidad del polen de *N. mezcalaensis* es del 100%. En los posibles híbridos el porcentaje de polen viable vario del 60 al 90% siendo porcentajes muy altos y poco comunes en híbridos.

Cuadro 10. Porcentaje de viabilidad en granos de polen de flores maduras.

Especie y localidad	Granos de polen analizados	Porcentaje de polen viable
H1SJR	601	60.4
H3SJR	4132	80.18
H10SJR	2776	90.78
H13SM	3108	81.89
<i>N. macrocephala</i> 1SJR	1126	96.45
<i>N. macrocephala</i> 2SJR	5493	98.36

H, posible híbrido, H1 y H10 fenotipo de *N. macrocephala* SJR, San Juan Raya, SM, San Martín.

3.5 ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DEL GENOMA POR CITOMETRÍA DE FLUJO

El porcentaje del coeficiente de variación (CV) no fue mayor a 5 por lo que los resultados se consideran estadísticamente significativos.

Se obtuvo el tamaño del genoma 2C ADN expresado en picogramos (pg) y su composición en millones de pares de bases (Mpb) para *N. macrocephala*, *N. mezcalaensis* y los posibles híbridos (Cuadro 11 y Figura 12).

Cuadro 11. Contenido de 2C ADN en pg de cada una de las especies analizadas. Por cada muestra se analizaron entre 3 a 10×10^6 núcleos, teñidos con loduro de propidio.

	<i>N. macrocephala</i>	Híbrido tipo 1	Híbrido tipo 2	<i>N. mezcalaensis</i>
Número de núcleos analizados	3 X 10 ⁶	5 X 10 ⁶	10 X 10 ⁶	3 X 10 ⁶
Tamaño Promedio del genoma en pg y Mpb	2.59 2538	2.67 2616	2.67 2616	2.58 2528

pg picogramos, Mpb millones de pares de bases. Híbrido tipo 1 fenotipo de *N. macrocephala*, Híbrido tipo 2 fenotipo de *N. mezcalaensis*

El ANOVA con una prueba de Tukey, de Dunnett y REGWQ, con un intervalo de confianza del 99%, indican que no existe diferencias significativas entre el tamaño del genoma de las especies y los posibles híbridos analizados ($P < 0.01$).

El tamaño del genoma para estas especies se encuentra dentro del gradiente documentado para angiospermas con valores 2C, (3.1 a 13.9 pg con $2n = 22$) (Bennett *et al.*, 1982; Bennett y Leith, 1995, 1997).

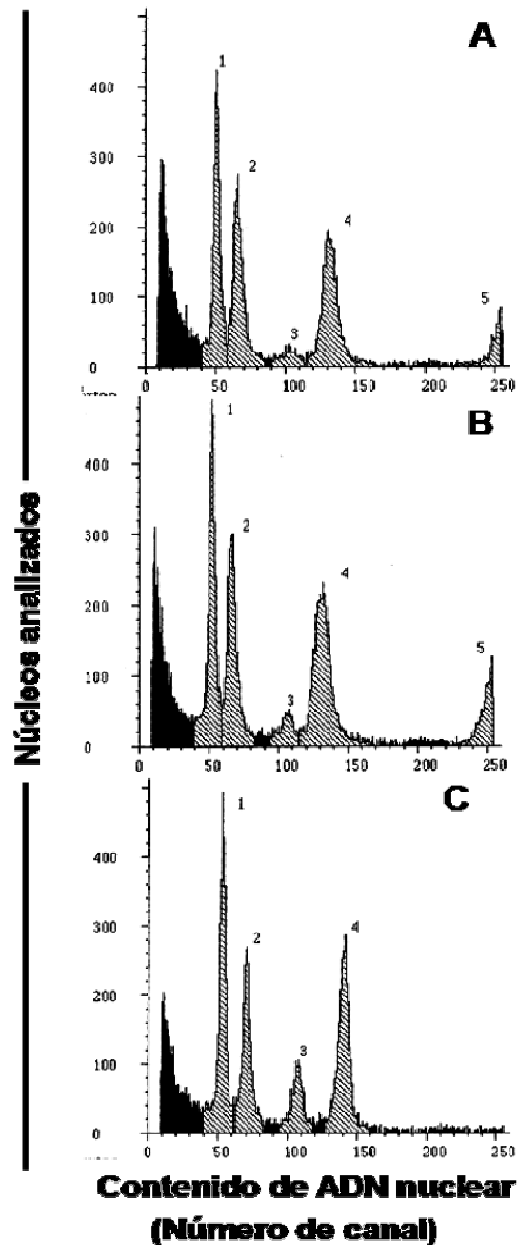


Figura 12. Contenido 2C de ADN nuclear. Los picos 1 y 3, representan la etapa G1 y G2 en núcleos de *L. esculentum* (planta de referencia). Los picos 2, 4 y 5 representan núcleos con 2C, 4C y 8C de ADN en el panel A, *N. macrocephala*, panel B, *N. mezcalaensis* y panel C, posible híbrido.

Con estos datos se puede observar que el contenido promedio de ADN es mayor en los posibles híbridos que en los posibles parentales, pero no hay

diferencias significativas, por lo que se considera que tienen el mismo nivel de ploidía.

Así mismo, se observó endoploidía en *N. macrocephala*, *N. mezcalaensis* y los posibles híbridos, con núcleos 2C, 4C, 8C y 16C (Figura 13).

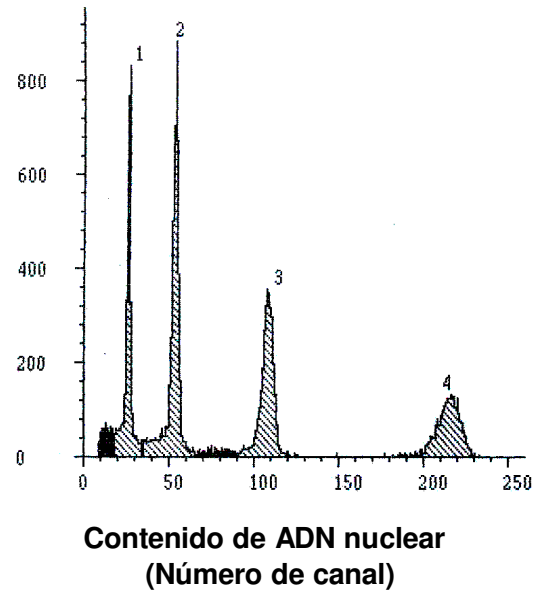


Figura 13. Histograma que representa núcleos con diferente nivel de ploidía en el híbrido tipo 2, obtenido por citometría de flujo mostrando endoploidía. Los picos 1, 2, 3 y 4, representan núcleos con 2C, 4C, 8C y 16C de ADN nuclear respectivamente.

4. DISCUSION

De acuerdo a las técnicas moleculares utilizadas, los individuos analizados presentan características morfológicas intermedias (Figura 2) debido a un proceso de hibridación entre *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis*. La viabilidad del polen y el tamaño del genoma sugieren que son híbridos fértiles.

Evidencia de hibridación con marcadores RAPD

Los marcadores RAPD es una herramienta que permite distinguir entre especies e híbridos (Paran *et al.*, 1995; Smith y Vuong 1996; Widmer y Baltisberger, 1999; Sánchez-Abarca *et al.*, 2003; Collins *et al.*, 2003). Aunque, el tamaño de muestra puede ser considerado bajo, la resolución de los marcadores RAPD permitió diferenciar a las especies y a los posibles híbridos, soportando la integridad de los datos analizados. Los híbridos mostraron similitud genética con *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis* pero no con *N. tetetzo* tanto en el agrupamiento con UPGMA como en el análisis de coordenadas principales (PCO) representando grupos con distintos genomas. Así mismo, no se observan diferencias entre los sitios analizados, San Juan Raya y San Martín que concuerda con los datos de Alejos (2002) y Rivera (2003) que sugieren que el flujo génico entre las poblaciones de estas especies, se mantiene por los polinizadores. Con el análisis de coordenadas principales no se observó segregación entre posibles híbridos, por lo que estos individuos no se encuentran aislados genéticamente de las especies analizadas.

El 26% de la variación es compartida entre *N. macrocephala*, *N. mezcalaensis* y los posibles híbridos y existe flujo génico (1.08) entre ellos (Cuadro 5). El flujo génico entre *N. macrocephala*, *N. mezcalaensis* fue de 0.5 (Cuadro 6), que implicaría que deben pasar dos generaciones para que un individuo emigre entre las especies, siendo poco frecuente la formación de individuos híbridos. Esto concuerda con la baja frecuencia de individuos con caracteres morfológicos intermedios, demandando una búsqueda exhaustiva en el campo para localizarlos. *N. macrocephala* presenta mayor similitud con los

posibles híbridos (4.62 fenotipo de *N. macrocephala* y 3.2 fenotipo de *N. mezcalaensis*) que *N. mezcalaensis* (1.92 fenotipo de *N. macrocephala* y 1.85 fenotipo de *N. mezcalaensis*), pero existe preferencia en el intercambio genético entre posibles híbridos que entre especies (24.97) (Cuadro 6). El flujo preferencial entre posibles híbridos, puede favorecer la presencia de nuevos genotipos que pueden establecer nuevos linajes evolutivos (Arnold y Hodges, 1995; Sites y Marshall; 2003), aunque por la longevidad de estas especies (más de 200 años) este proceso puede ser relativamente lento.

Evidencia de hibridación en la región de ADNcp

La región *trn* T-L, presentó un 9.93% de sitios informativos que fue mayor al documentado por Arias (2002) en la región *trn* L-F para el género *Pachycereus* (3.5%) en que incluyó especies del género *Neobuxbaumia*.

Se observaron haplotipos diferentes en *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis*. En los posibles híbridos se observa captura del cloroplasto de *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis*, que implica flujo bidireccional (Pellegrino, 2005). Se observan mutaciones puntuales que originan haplotipos distintos en los posibles híbridos. También se distingue la preferencia de *N. mezcalaensis* en el linaje materno durante la formación de los posibles híbridos (Figura 9), que puede guardar relación con el fenotipo dominante observado (12 de 17 individuos). Este fenotipo dominante parece responder al “efecto materno”, que da un mayor parecido con la especie receptora (González-Rodríguez *et al.*, 2004). En este punto cabe destacar que, *N. mezcalaensis* es una especie con poblaciones androdioicas (comentario personal Valiente-Banuet), que presenta un número de flores superior a las que presenta *N. macrocephala* que son hermafroditas. Por ello, los individuos de *N. mezcalaensis* tienen más posibilidades de ser visitados por los polinizadores que los individuos de *N. macrocephala* (Valiente-Banuet *et al.*, 1997) y esto se refleja en la captura del cloroplasto en los posibles híbridos que es considerada evidencia directa de

introgresión citoplasmática o especiación por hibridación (Wendel *et al.*, 1995; Rieseberg y Wendel, 1993; Rieseberg, 1995; Terry *et al.*, 2000).

Evidencia de hibridación en la región nuclear del ITS

La región nuclear fue más variable y presentó un 50.16% de sitios informativos. De 31 sitios polimórficos conservados entre especies, ninguno es compartido entre *N. mezcalaensis* y *N. macrocephala*. Existe mayor similitud entre *N. mezcalaensis* y *N. tetetzo* y entre *N. macrocephala* y *C. columna trajani* (Cuadro 7). De hecho *C. columna-trajani* comparte más sitios polimórficos con *N. mezcalaensis* y *N. tetetzo* que *N. macrocephala*. Esto permite reconsiderar a *N. macrocephala* como una especie del género *Neobuxbaumia* ya que además presenta un cefalio que no presenta ninguna otra especie del género y que comparte con *C. columna-trajani*. Es significativo resaltar, que *N. tetetzo* forma híbridos con *C. columna-trajani* (Vite *et al.*, 1997), pero no se han observado híbridos entre *N. tetetzo* y *N. mezcalaensis*.

Los posibles híbridos presentan secuencias en mosaico de *N. mezcalaensis* y de *N. macrocephala* (Cuadro 8) que es considerada evidencia de hibridación (Vriesendorp y Bakker, 2005). De los individuos analizados tres presentaron una secuencia con 27 sitios compartidos, que refuerzan la existencia de flujo génico entre ellos (Cuadro 9). Además existe un gradiente de caracteres morfológicos que puede observarse en flores y frutos (Figura 1) que hacen factible la existencia de retrocruzas (Milne *et al.*, 1999). De igual forma, la presencia de individuos que pueden agruparse con uno u otro parental permiten suponer que el proceso de hibridación sigue ocurriendo. La población parece ser muy dinámica y esto puede ser evidencia de que *N. mezcalaensis* y *N. macrocephala* no están aisladas genéticamente. De hecho, la familia Cactaceae ha sido clasificada y reclasificada varias veces, en 1958 se dividió en tres subfamilias Pereskioideae, Opuntioideae y Cactoidea (Clark, 2000). Está última incluye a la subtribu Pachycereinae a la que pertenecen las cuatro especies que se analizaron y que de acuerdo a datos bioquímicos, morfológicos y moleculares

tiene un origen monofilético (Cornejo y Simpson 1997; Clark, 2000; Arias, 2002), por lo que es posible que las diferencias genéticas no sean muy marcadas y que esto permita la hibridación entre sus especies.

Evidencia de fertilidad en los posibles híbridos por viabilidad del polen

Cuando los taxones involucrados son muy divergentes (Klips, 1999; Campbell et al., 2003) el porcentaje de viabilidad de polen en híbridos es bajo (4.3-33.9%, Tyagi, 2002 y Lu y Chen, 2001 respectivamente; Campbell et al., 2003). Las especies analizadas pertenecen a un grupo monofilético y por tanto existe poca divergencia entre ellas, esto se ve reflejado en el porcentaje de viabilidad encontrado en los posibles híbridos que fue entre un 60% y un 90% (Cuadro 10). Lo que sugiere que existe distribución normal de los cromosomas durante la microesporogénesis (Tyagi, 2002), por tanto, el nivel de ploidía debe ser constante y esto permite hibridación e introgresión con las especies receptoras *N. macrocephala*, *N. mezcalaensis* y entre posibles híbridos. Sin embargo, sería conveniente realizar pruebas de eficiencia en la fecundación con cada especie, para asegurar que existen la misma ventaja con cada una (Alarcón y Campbell, 2000; Campbell et al., 2003).

Evidencia de homología cromosómica por citometría de flujo

El tamaño promedio del genoma es constante (Cuadro 11 y Figura 12) y se considera que el nivel de ploidía se mantiene. Al no existir diferencias en el tamaño del genoma entre *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis*, se facilita la homología cromosómica (Pogio y Naranjo, 1990) y facilita que los posibles híbridos sean fértiles. Esto es evidente por la viabilidad de polen (60-90%), que implica y que existe un alto grado de homología entre las especies parentales (Coraway et al., 2001). De acuerdo a la evidencia generada por la viabilidad de polen y el patrón poliploide, podemos inferir que *N. macrocephala*, *N. mezcalaensis* y los híbridos son organismos diploides al igual que su congenero *N. tetetzo* (Avilés, 2003).

Así mismo, se observó endoploidía en *N. macrocephala*, *N. mezcalaensis* y los posibles híbridos, con núcleos 2C hasta 16C (Figura 13). Con estos datos podemos corroborar la presencia de endoploidia en plantas suculentas que habitan ambientes semiáridos. De acuerdo a la literatura las células endoploides permiten un mayor almacenamiento del agua (Nagl, 1978; De Rocher *et al.*, 1990; Cushman, 2001) que es escasa en estas zonas.

De acuerdo a los marcadores RAPD, el análisis de la región nuclear y del cloroplasto, la viabilidad del polen y el tamaño del genoma, las características morfológicas de los posibles híbridos, no se deben a plasticidad genética y son originadas por un proceso de hibridación entre *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis*. Por lo que los individuos con características morfológicas intermedias pueden ser considerados híbridos entre *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis*.

En nuestro estudio existe una clina ya que se observa un gradiente de características morfológicas (Figura 1) que al parecer es mantenida por un balance entre la dispersión y la selección de híbridos (Barton y Hewitt, 1985). Los híbridos no causaron problemas taxonómicos en la identificación de las especies utilizadas en el análisis que corresponde a los resultados obtenidos por Rieseberg *et al* (2006), que indican que cuando existe híbridos diploides contemporáneos, tienden a ser englobados dentro de la variación de las especies parentales durante las retrocruzadas.

Impacto de la hibridación en la integridad de las especies paternas

La hibridación es un fenómeno muy importante en la evolución de las angiospermas y se ha sugerido que la mayoría de las especies que conocemos actualmente derivaron de este proceso (Grant, 1981; Arnold, 1997). La evolución reticulada o especiación por hibridación es frecuente en especies que son polinizadas por el viento o que no presentan polinizadores especializados (Dobzhansky *et al.*, 1980; Milne *et al.*, 1999). En las cactáceas, las limitaciones

interespecíficas en algunos géneros son aún conflictivas (Cota y Wallace, 1996) y se ha documentado que la hibridación en esta familia es un proceso importante en el origen de nuevas especies (Moran 1962; Pinkava *et al.*, 1985; Vite *et al.*, 1997). En el caso de *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis* que son polinizadas preferentemente por *Leptonycteris curasoae* (Valiente-Banuet *et al.*, 1997) el proceso de hibridación acelera la presencia de una amplia variedad de combinaciones genéticas, incrementando la variabilidad (Anderson, 1948; Milne *et al.*, 1999; Widmer y Baltisberger, 1999; Orians, 2000). Un individuo de *N. macrocephala* (MaSJR3, Cuadro 8) comparte información genética con *N. mezcalaensis*, aunque el fenotipo no muestra evidencia de hibridación. Estas características son consideradas hibridación introgresiva y es un proceso que incrementa la variabilidad genética de las especies (Anderson, 1948; Milne *et al.*, 1999; Widmer y Baltisberger, 1999; Orians, 2000). Es probable que la hibridación haya incrementando la variabilidad en *N. macrocephala*, que al ser una especie endémica debería poseer baja variabilidad genética (Stebbins, 1980; Hamrick y Godt, 1990; Frankham, 1996; Archibal *et al.*, 2001) ó un valor similar al de *N. tetetzo*, que presenta tendencia a la estructuración (Chávez, 2000). Sin embargo, de acuerdo a los datos de Alejos (2002), presenta la misma variabilidad que *N. mezcalaensis* (Rivera, 2003) que es su congenero más disperso. Por tanto, el incremento de la diversidad genética en *N. macrocephala* puede ser favorecido por la hibridación con *N. mezcalaensis*.

La dinámica evolutiva de la zona híbrida depende preferentemente, del vigor de los híbridos en relación a las especies parentales y la selección (Harrison, 1993; Arnold, 1997; Perfectti, 2002). En este estudio, los híbridos del fenotipo 2 que son similares a *N. mezcalaensis* son los más abundantes y pueden presentar mayor eficacia biológica que *N. macrocephala*, porque producen mayor cantidad de polen y semillas viables y esto les proporciona superioridad híbrida (Barton y Hewitt, 1985) y hace factible el origen de una nueva especie por hibridación (Butlin, 1995; Arnold, 1997; Wolf *et al.*, 2001; Perfectti, 2002).

Impacto de la hibridación en la permanencia de las especies paternas

Las cactáceas son caracterizadas por un alto nivel de diversidad de hábitat, morfología vegetativa y síndromes de polinización, que son algunos factores que han contribuido a la riqueza de especies en la familia. Aunque la diferenciación a nivel taxonómico puede ser incierta en algunos casos (Cota y Wallace, 1995), la formación de híbridos es trascendental en la evolución de esta familia (Pinkava *et al.*, 1985). Para el caso de estudio, podemos encontrar híbridos de la F1 y retrocruzas que comienzan a diferenciarse del resto de los individuos en la región nuclear, más no en el resto del genoma, como se puede observar con los marcadores RAPD.

En la formación de híbridos puede existir flujo uni o bidireccional, en este estudio es bidireccional (Cuadro 9), pero se prefiere *N. mezcalaensis* como línea materna. Con la hibridación, las especies pueden adquirir caracteres que les permitan colonizar nuevos hábitat o que aumenten su aptitud de manera más rápida que con la mutación (Carney *et al.*, 2000). Lo anterior, puede originar la estabilidad de la zona híbrida, la especiación del híbrido, introgresión o extinción vía asimilación de una especie (Rieseberg y Wendel 1993). En contraste a su papel creativo, la hibridación puede ser una amenaza a la permanencia de una especie endémica a largo plazo (Levin, 1996), sobre todo si consideramos que no existen especies por hibridación contemporánea de acuerdo a Rieseberg *et al.*, (2006). Esto puede afectar a *N. macrocephala*, uno de los parentales, ya que esta especie requiere condiciones ambientales más específicas para su establecimiento (Godínez-Álvarez y Valiente-Banuet, 2004) y esto representa una desventaja frente a *N. mezcalaensis*. La fecundidad y producción de semillas de *N. macrocephala* es baja comparada con *N. tetetzo* y esto se debe a la limitación de polen, por el bajo número de flores y a la depredación pre-dispersión (Godínez-Álvarez y Valiente-Banuet, 2004) y por consecuencia *N. mezcalaensis* presenta mayor adecuación que *N. macrocephala*.

El resultado de la hibridación en este estudio puede involucrar, mayor plasticidad génica en los híbridos analizados que les confieran desde mayor resistencia a patógenos (Orians, 2000) hasta la facilidad de colonizar sitios geográficamente más distantes a los que habita *N. macrocephala*. Además, el número de flores y néctar que pueden ser ofrecidos a los polinizadores (sobre todo el fenotipo de *N. mezcalaensis*) es superior al que ofrece *N. macrocephala* y por ende los polinizadores deben preferir a los híbridos sobre esta especie. Este es un factor determinante en la dirección del flujo génico y la permanencia de *N. macrocephala* ya que no presenta reproducción asexual (Arias *et. al.*, 1997) y el establecimiento de nuevos organismos es limitado por el bajo número de semillas por planta comparado con *N. mezcalaensis* y *N. tetetzo* decreciendo la probabilidad de establecimiento de nuevos organismos y afectando su tasa de crecimiento poblacional (Godínez-Álvarez, 2000 y Vilchis, 2000).

Además, en el estudio realizado por Alejos (2002), *N. macrocephala* fue analizada con los criterios del Método de Evaluación del Riesgo de Extinción de las Especies Silvestres en México (MER) Nom-059-ECOL-2001, que evalúa la distribución de la especie, el efecto del hábitat sobre su desarrollo, la vulnerabilidad de acuerdo a su estrategia de reproducción así como, el impacto de la actividad humana sobre su desarrollo y el resultado indica que esta especie se encuentra en peligro de extinción, a pesar de que presenta variabilidad genética (Alejos, 2002).

El número de generaciones para excluir a *N. macrocephala*, no puede ser determinado, ya que son especies muy longevas (viven alrededor de 200 años) y sobre todo por que influyen muchos factores como las barreras reproductivas o adaptación de un polinizador diferente y el proceso puede llevar cientos o miles de años (Carney *et al.*, 2000; Levin, 1996). Aun cuando podrían permanecer los tres genotipos por un periodo de tiempo indeterminado, la selección natural puede favorecer a uno y se puede formar una nueva especie por colonización de otro hábitat o existir un polinizador diferente para los híbridos como los colibríes

y las abejas que pueden polinizar en bajo porcentaje las flores de las especies parentales (Valiente-Banuet *et al.*, 1997). El efecto final dependerá de las preferencias de hábitat del híbrido, su vigor, de las características de historia de vida de las especies y la formación de barreras reproductivas (Dobzhansky *et al.*, 1980 y Levin, 1996). No obstante, existen híbridos con secuencias nucleares homogéneas y la especiación parece ser un proceso en potencia que debe ser considerado así como la exclusión de *N. macrocephala*, ya que los genotipos que de otra forma requerirían de miles de generaciones en las zonas híbridas pueden limitarse a unas cuantas (Barton y Hewitt, 1985).

Asimismo, el estudio de la variabilidad genética permite entender la estructura genética de las poblaciones, las posibilidades de sobrevivencia y el potencial evolutivo de una especie (Frankham, 1996). Conociendo estos factores se pueden establecer estrategias para fomentar su estado de conservación que de acuerdo a sus características intrínsecas, es necesario en el caso de *N. macrocephala*. Una alternativa viable es la conservación *ex situ* mediante bancos del germoplasma que permitan a largo plazo realizar una conservación *In situ*, con la reintroducción de los organismos.

5. **CONCLUSIONES**

El proceso de hibridación ha sido estudiado en muy pocas especies longevas, sin embargo es claro que este proceso tiene relevancia en el proceso evolutivo y de especiación de angiospermas. En este trabajo, se encontraron individuos con secuencias mosaico en la región nuclear, similitud genética con *N. mezcalaensis* y *N. macrocephala* y alto flujo génico entre ellos que fue evidente por haplotipos constantes en algunos individuos. Se consideraron híbridos fértiles con base en el tamaño del genoma, la viabilidad del polen y los datos moleculares obtenidos. La hibridación es bifiletica pero, por las características intrínsecas de las especies parentales los híbridos con fenotipo de *N. mezcalaensis* tienen mayor adecuación por la capacidad de responder a factores ambientales y la eficacia reproductiva que les permiten un establecimiento más exitoso. Estos híbridos pueden tener una ventaja adaptativa sobre *N. macrocephala* y puede ser viable un proceso de especiación a partir del fenotipo de *N. mezcalaensis*.

Los híbridos que fueron analizados “molecularmente” en este trabajo no se habían descrito anteriormente y es necesaria su descripción y aceptación taxonómica. Así mismo, de acuerdo a la variación nucleotídica de la región nuclear, *N. macrocephala* guarda poca relación con las especies de su género y presenta más similitud genética con *C. columna trajani*, por lo que es deseable reconsiderar la permanencia de *N. macrocephala* en el género *Neobuxbaumia*.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Addinsoft.** 2006. XLSTAT 2006, Data analysis and statistics with Microsoft Excel. Paris, France.
- Alarcón, R.** and Campbell, D. R. 2000. Absence of conspecific pollen advantage in the dynamics of an *Ipomopsis* (polemoniaceae) hybrid zone. *American Journal of Botany*. 87(6): 819-824.
- Alberts, B.,** Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D. 1994. Molecular Biology of the Cell. 3 ed. Garland publishing. INC. NewYork and London. USA. 1294 pp.
- Alejos, V. L. P.** 2002. Estudio de la estructura poblacional de *Neobuxbaumia macrocephala* en Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, mediante el uso de marcadores moleculares. Tesis de licenciatura. UNAM. FES-Iztacala. 79pp.
- Allendorf, F. W.,** Leary, R. F., Spruel, P y Wenburg, J. K. 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology & Evolution*. Vol. 16(11): 613-622.
- Anderson, E.** 1948. Hybridization of the habitat. *Evolution*. 2 (1): 1-9.
- Archibal, K. J.,** Wolf, G. P., Tepedino, J. V. and Bair, J. 2001. Genetic relationship and population structure of the endangered steamboat buckwheat, *Eriogonum ovalifolium* var. *williamsiae* (Polygonaceae). *American Journal of Botany*. 88: 608-615.
- Arias, M. S.,** Gama, L. S. y Guzmán- Cruz, L. U. 1997. Cactaceae. In: Dávila P. et al., (eds.) *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. Fascículo 14. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 147 pp.

- Arias, M. A. S.** 2002. Filogenia del género *Pachycereus* (Pachycereeae, Cactaceae). Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Colegio de posgraduados. 185 pp.
- Arnheim, N.** 1983. Concerted evolution of multigene families. *In* M. Nei and R. K. Koehn (eds.). Evolution of genes and proteins. Sinauer, Sunderland, M. A. 38-61 pp.
- Arnold, M. L.** 1992. Natural hybridization as a evolutionary process. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 23: 237-261.
- Arnold, M. L.** 1994. Natural hybridization and *Louisiana irises*. *BioScience*. 44: 141-147.
- Arnold, M. L.** and Hodges S. A. 1995. Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? *Trends in Ecology and Evolution*. 10:67-70
- Arnold, M. L.** 1997. Natural hybridization and evolution. Oxford University Press. Oxford. UK.
- Avilés, N. F.** 2003. Análisis citogeográfico de *Neobuxbaumia tetetzo* (Coulter) Backeberg (Cactaceae) en el Sistema Fisiográfico Zapotitlán, Puebla, México. Tesis de licenciatura. UNAM. FES-Iztacala. 80pp.
- Baldwin, B. G.,** Sanderson, M. J., Porter, J. M., Wojciechowski, M. F., Campbell, C. S. and Donoghue, M. J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 82: 247-277.
- Barkman, T. J.** and Simpson, B. B. 2002. Hybrid origin and parentage of

Dendrochilum acuiferum (Orchidaceae) inferred in a phylogenetic context using nuclear and plastid ADN sequence data. *Sistematic Botany*. 27(2): 209-220.

Barton, N. H. and Hewitt, G. M. 1985. Analysis of hybrid zones. *Annual Review Ecology and Systematics*. 16: 113-148.

Bennett, M. D. and Smith, J. B. 1976. Nuclear DNA Amounts in Angiosperms. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London. Serie B*. 274: 227-274.

Bennett, M. D., Smith, J. B. and Harrison, J. S. 1982. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Proceedings of the Royal Society of London. Serie B*. 216: 179-199.

Bennett, M. D. 1987. Variation in genomic form in plants and its ecological implications. *New Phytol*. 106: 177-200.

Bennett, M. D. and Leitch, I. J. 1995. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Annals of Botany*. 76: 113-176.

Bennett, M. D. and Leitch, I. J. 1997. Nuclear DNA amounts in angiosperms-583 new estimates. *Annals of Botany*. 80: 169-196.

Bennett, M. D., Bhandol, P. and Leitch I. J. 2000. Nuclear DNA Amounts and their modern uses-807 New estimates. *Annals of Botany*. 86: 859-909.

Bennett, M. D. and Leitch, I. J. 2005. Plant DNA C-values database (release 4.0, October 2005). <<http://www.rbgekew.org.uk/cval/>> Disponible. [Consulta, 1 septiembre 2006].

- Butlin, R.** 1995. Reinforcement: an idea evolving. *Trends in Ecology and Evolution*. 10(11): 432-434.
- Cambell, D. R.,** Alarcón, R. and Wu, C. A. 2003. Reproductive isolation and hybrid pollen disadvantage in *Ipomopsis*. *Journal of Evolutionary Biology*. 16: 536-540.
- Carney, S. E.,** Gardner, K. A. and Rieseberg L. H. 2000. Evolutionary changes o the fifty-year history of a hybrid population of sunflowers (*Helianthus*). *Evolution*. 54(2): 462-474.
- Cebolla, A.,** Vinardell, J., Kiss, E., Oláh, B., Roudier, F., Kondorosi, A. and Kondorosi, E. 1999. The mitotic inhibitor *ccs52* is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *The European Molecular Biology Organization (EMBO Journal)*. 18: 4476-4484.
- Cerbah, M.,** Coulaud, J., Godelle, B., Siljak-Yakovlev, S. 1995. Genome size, fluorochrome banding, and karyotype evolution in some *Hypochoeris* species. *Genome*. 38: 689-695.
- Chávez, S. B.** 2000. Estudio de la variabilidad genética poblacional del cactus columnar *Neobuxbaumia tetetzo* en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla, México. Tesis de Licenciatura. UNAM. ENEP-Iztacala. 36 pp.
- Clark, R.** 2000. Estructura genética de dos catáceas columnares del desierto sonorense: *Stenocereus gummosus* y *S. eruca* (Cactaceae). Instituto de Ecología. Tesis de Maestría. UNAM. México.
- Collins, D.,** Mill, R. R. and Möller, M. 2003. Species separation of *Taxus baccata*, *T. canadensis*, and *T. cuspidata* (Taxaceae) and orings of their reputed hybrids inferred from RAPD and cpDNA data. *American Journal of Botany*.

90(2): 175-182.

Coraway, V., Corr, G. D. and Morden, C. W. 2001. Assessment of hybridization and introgression in lava-colonizing Hawaiian *Dubatia* (Asteraceae: Madiinae) using RAPD markers. *American Journal of Botany*. 88(9): 1688-1694.

Cornejo, O. D. and Simpson, B. B. 1997. Analysis of form and function in North American columnar cacti (Tribe Pachycereae). *American Journal of Botany*. 84(11): 1482-1501.

Cota, J. H. and Wallace, R. S. 1995. Karyotypic studies in the genus *Echinocereus* (Cactaceae) and their taxonomic significance. *Caryologia*. 48(2): 105-122.

Cota, J. H. and Wallace, R. S. 1996. La citología y la sistemática molecular en la familia Cactaceae. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. 41: 27-45

Crow, J. F. and Aoki, K. 1984. Group selection for a polygenic behavioral trait: Estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*. 81: 6073-6077.

Cushman, J. C. 2001. Crassulacean acid metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. *Plant Physiology*. 127: 1439-1448.

D'Amato, F. 1964. Endopolyploidy as a factor in plant tissue development. *Caryologia*. 17: 41-52.

Dean, A., Junhyong, K., Richard, J., Les, M., Dennis, E. S., and Jeff, W. 1998. Programming and other assistance with NTSYSpc. Applied Biostatistics Inc.

- De Rocher, E. J.,** Harkins, K., Galbraith, D. and Bohnert, H. 1990. Developmentally regulated systemic endopolyploidy in succulents with small genomes. *Science*. 250: 99-101.
- Del Angel, P. C. H.** 2005. Análisis cromosómico y determinación del tamaño del genoma por citometría de flujo en especies de *Mammillaria* de la serie *Supertextae* (Cactaceae). Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. 89pp.
- Dellaporta, S. L.,** Wood, J. and Hicks, J. B. 1983. A plant ADN minipreparation: *Version II. Plant Molecular Biology Reporter*. 1: 19-21.
- Dice, L. R.** 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*. 26: 297-302.
- Dobzhansky, T.,** Ayala, F. J., Stebbins, G. L. y Valentine, J. W. 1980. Evolución. *Universidad de California Ediciones Omega S.A.* 558 pp.
- Dolezel, J.** 1991. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochem. Anal.* 2: 143-154.
- Dolezel, J.** 1995. Flow cytometry- principles and applications in mutation breeding. Practical exercises in flow cytometry. International Atomic Energy Agency. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 14th IAEA/FAO, Interregional training course on advances in plant mutation techniques. 22 pp.
- Dolezel, J.** and Göhde, W. 1995. Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry*. 19: 103-106.

- Dolezel, J.** 1997. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal Applied Genetics*. 38(3): 285-302.
- Donald, A. L.,** Francisco-Ortega, F. and Jansen, K. R. 1996. Hybridization and the extinction of rare plant species. *Conservation Biology*. 10(1):10-16.
- Doolittle, F. W.** 1999. Phylogenetic classification and the universal tree. *Science*. 284: 2124-2128.
- Ellstrand, N. C.** and Elam, D. R. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 24: 217-242.
- Erbrich, P.** 1965. Über endopolyploidie und Kernstrukturen in endospermhaustorien. *Österreichische Botanische Zeitschrift*. 112: 197-262.
- Excoffier, L.** 1992. AMOVA: Computer Program. Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva. Czechoslovakia.
- Felsenstein, J.** 2001. PHYLIP, Phylogeny Inference Package. Version 3.6(alpha2).
- Frankham, R.** 1996. Relationship of Genetic Variation to Population Size in Wildlife. *Conservation Biology*. 10 (6): 1500-1508.
- Friedrich, H.** 1974. Hybridization as a factor in the evolution of the Cactaceae. *Cactus and Succulent Journal*. 46: 213-214.
- Galtier, N.,** Gouy, M. and Galtier, C. 1996. SEAVIEW and PHYLO-WIN: two graphic tools for sequences alignment and molecular phylogeny.

Computation Applied Bioscience. 12: 543–548.

- Geitler, L.** 1953. Endomitose and endomitotische polyploidisierung. In: Heilbrunn, L. V. and Weber, F. (eds.). *Protoplasmatologia*. VI-C. Springer-Verlag, Wien. 1-89 pp.
- Godínez-Álvarez, H. O.** 2000. Dispersión biótica de semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* (Coulter) Backeberg en el Valle de Tehuacán, Puebla. Tesis de Doctorado. Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del C. C. H. Instituto de Ecología. 200pp.
- Godínez-Alvarez, H.** y Valiente-Banuet, A. 2004. Demography of the columnar cactus *Neobuxbaumia macrocephala*: a comparative approach using population projection matrices. *Plant Ecology* 174:109-118.
- González-Rodríguez, A.**, Arias M. D., Valencia, S. and Oyama, K. 2004. Morphological and RAPD análisis of hybridization between *Quercus affinis* and *Q. laurina* (Fagaceae), two mexican red oaks. *American Journal of Botany*. 91(3): 401-409.
- Gower, J.** 1967. A comparison of some methods of cluster analysis. *Biometrics*. 23: 623-637.
- Grant, V.** 1981. *Plant speciation*. 2ª Edición. Columbia University Press, New York.
- Greuter, C. W.**, McNeill, V-C. J., Barrie, F. R., Burdet, H.-M., Demoulin, V., Filgueiras, T. S., Nicolson, D. H., Silva, P. C., Skog, J. E., Trehane, P., Turland, N. J., Hawksworth, D. L. International Code of Botanical Nomenclature (Saint Louis Code), Electronic version, Appendix I, Names of hybrids, Article H.3. Última actualización 12 de Febrero, 2001.

<<http://www.bgbm.org/IAPT/Nomenclature/Code/SaintLouis/0000St.Luistitle.htm>> Disponible. [Consulta, 2 Febrero 2006].

Hamrick, J. L. and Godt, M. J. W. 1990. Allozyme diversity in plant species. *In*: Schierwater, B., Streit, B., Wagner, G. P. and De Salle, D. (eds). *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications. Experientia Birkhäuser Verlag, Basel.* 69: 299-310.

Hardig, T. M., Soltis, P. S. and Soltis, D. E. 2000. Diversification of the north american shrub genus *Ceanothus* (Rhamnaceae): conflicting phylogenies from nuclear ribosomal DNA and chloroplast DNA. *American Journal of Botany.* 87(1): 108-123.

Hartl, D. L. and Clarck, A. C. 1989. Principles of population genetics. Sinauer associates, Inc. Publishers. U.S.A. 682 pp.

Hartmann, S., Nason, J. D., Bhattacharya, D. 2001. Extensive Ribosomal ADN Genic Variation in the Columnar Cactus *Lophocereus*. *Journal of Molecular Evolution.* 53: 124-134.

Harrison, R. G. 1993. Hybrid zones and the evolutionary process. Oxford University Press. Oxford, UK.

Harrison, R.G. 1998. Linking evolutionary pattern and process. *In*: D.J. Howard y S.H. Berlocher: *Endless Forms: Species and speciation.* Oxford University Press. New York. pps. 19-31.

Hedrén, M., Fay, M. F. and Chase, M. W. 2001. Amplified fragment length polymorphisms (AFLP) reveal details of polyploid evolution in *Dactylophiza* (Orchidaceae). *American Journal of Botany.* 88 (10): 1868-1880.

- Hewitt, G. M.** 1988. Hybrid zones -natural laboratories for evolutionary studies. *Trends in Ecology and Evolution*. 3: 158-167.
- Higgins, D. G.** and Sharp, P. M. 1988. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*. 73,237-244.
- Huff, D. R.**, Peakall, R. and Smouse, P. E. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss *Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm. *Theoretical and Applied Genetics*. 87: 416-422.
- Huson, D. H.** and Bryant, D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*. 23(2): 254–267.
- Jorgensen, J. L.**, Stehlik, I., Brochmann, C. and Conti, E. 2003. Implications of ITS sequences and RAPD markers for the taxonomy and biogeography of the *Oxytropis campestris* and *O. arctica* (Fabaceae) complexes in Alaska. *American Journal of Botany*. 90(10): 1470-1480.
- Jenkins, G.** and Rees, H. 1983. Synatonemal complex formation in *Festuca* hybrid. In Brandham, P. E. and Bennett, M. D. (eds.). Kew Chromosome conference. George Allen and Unwin, London. pps. 233-242.
- Keller, E. R. J.**, Schubert, I., Fuchs, J. and Meister, A. 1996. Interspecific crosses of onion with distant *Allium* species and characterization of the presumed hybrids by means of flow cytometry, karyotype analysis and genomic in situ hybridization. *Theoretical and Applied Genetics*. 92: 417-424.
- Kentner, K. E.** and Mesler, M. R. 2000. Evidence for natural selection in a fern hybrid zone. *American Journal of Botany*. 87 (8): 1168-1174.

- Kenton A.** 1984. Chromosome evolution in the *Gibasis linearis* group (Commelinaceae). III. DNA variation, chromosome evolution, and speciation in *Gibasis venustula* and *Gibasis heterophylla*. *Chromosoma* 90: 303-310.
- Klips, R. A.** 1999. Pollen competition as a reproductive isolating mechanism between two sympatric *Hibiscus* species (Malvaceae). *American Journal of Botany*. 86(2): 269-272.
- Kondorosi, E.,** Roudier, F. and Gendreau, E. 2000. Plant cell-size control: growing by ploidy?. *Current Opinion in Plant Biology*. 3: 488-492.
- Kowles, R. V.,** Yerk, G. L., Srienc, F. and Phillips, R. L. 1992. Maize endosperm tissue as an endoreduplication system. In Setlow, J. K. (ed.). Genetic Engineering. New York, *Plenum Press*. 14: 65-88.
- Kudo, N.** and Kimura, Y. 2001. Flow cytometric evidence for endopolyploidization in cabbage (*Brassica oleracea* L) flowers. *Sex Plant Reproduction*.13: 279-283.
- Larkins, B. A.,** Dilkes, B., Dante, R., Coelho, C., Woo, Y. and Liu, Y. 2001. Investigating the hows and whys of DNA endoreduplication. *Journal of the Experimental Botany*. 52: 183-192.
- Levin, D. A.** 1996. Hybridization and the extinction of rare plant species. *Conservation Biology*. 10: 10-16.
- Lu, B. R.** and Chen, J. K. 2001. A study of pollen viability and longevity in *Oriza rufipogon*, *O. sativa*, and their hybrids. *Genetic resources*. 26(2): 31-32.
- Mantel, N.** 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cáncer Research* 27: 209-220.

- Martínez, M.** 1997. Sistemática molecular: comparación entre diferentes métodos y sus aplicaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 60: 123-136.
- Mayr, E.** 1942. Systematics and the origins of Species. New York. Columbia University. Press.
- Milne, R. I.,** Abbott, R. J. Wolff, K. and Chamberlain, D. F. 1999. Hybridization among sympatric species of *Rhododendron* (Ericaceae) in Turkey: morphological and molecular evidence. *American Journal of Botany*. 86(12): 1776-1785.
- Miller, M. P.** 1998. *AMOVA-PREP 1.01* A program for the preparation AMOVA input files form dominat-marker raw date. Departament of Biological Sciences. Northern Arizona University. USA.
- Moran, R.** 1962 "The Unique *Cereus* of Rosario Bay". *Cactus and Succulent Journal. Allen Press, Inc. Lawrence*. 36(6): 184-188.
- Moulton, V.** 2003. SplitsTree: A network-based tool for exploring evolutionary relationships in molecular data. *In* Salemi, M. and Vandenberg, A. M. The phylogenetic handbook. A practical approach to ADN and protein phylogeny. Cambridge. University Press. pps. 312-328.
- Mráz, P.,** Chrtek, J., Fehrer, J., and Placková, I. 2005. Rare recent natural hybridization in *Hieracium* s. str.- evidence from morphology, allozymes and chloroplast DNA. *Lant Systematics and Evolution*. 255: 177-192.
- Nagl, W.** 1974. The *Phaseolus* suspensor and its polytene chromosome. *Z. Pflanzenphysiol.* 73: 1-44.

- Nagl, W.** 1976. Early embryogenesis in *Tropaeolum majus* L.: ultraestructure of the embryo-suspensor. *Biochimie and Physiologie der Pflanzen*. 170: 253-260.
- Nagl, W.** 1978. Endopolyploidy and polyteni in differentiation and evolution. North-Holland. Amsterdam. pps. 13-31.
- Narayan, R. K. J.** 1998. The role of genomic constraints upon evolutionary changes in genome size and chromosome organization. *Annals of Botany* 82(supplement A): 57-66.
- Nei, M.** 1973. Analysis of genetic diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 70: 3321-3323.
- Nybohm, H.** and Bartish, I. 2002. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plant. *Perspectives in Plant Ecology. Evolution and Systematics*. 3(2): 93-114.
- Ohri, D.** 1998. Genome size variation and plant systematics. *Annals of Botany*. 82(Suplemento A): 75-83.
- Orians, C. M.** 2000. The effects of hybridization in plants on secondary chemistry: implications for the ecology and evolution of plant-herbivore interaction. *American Journal of Botany*. 87(12): 1749-1756.
- Otero, A. A., Cruz, M. y Oyama, K.** 1997. El uso de los RAPDS como marcadores moleculares en plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica*. México. 60:85-117.

- Otto, F.** 1990. DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. *In* Crissman, H. A. and Darzynkiewicz (eds.). *Methods in cell biology*. New York. Academic Press. 33: 105-110.
- Palomino, H. G.** 1998. Análisis del genoma en plantas por citometría de flujo. *Sociedad Mexicana de Genética*. V congreso conjunto. Acapulco, Guerrero. México.
- Palomino, H. G.,** Dolezel, J., Cid, R., Brunner, I., Méndez, I. and Rubluo, A. 1999. Nuclear genome stability of *Mammillaria san-angelensis* (Cactaceae) regenerants induced by auxins in long-term in vitro culture. *Plant Science*. 141: 191-200.
- Palomino, H. G.** 2000. Genome analysis of Mexican flora. *Genetics and Molecular Biology*. 23(4): 921-924.
- Paran, I.,** Horowitz, M., Zamir, D. and Wolf, S. 1995. Random amplified polymorphic DNA markers are useful for purity determination of tomato hybrids. *HortScience*. 30(2): 377.
- Pellegrino, G.,** D'Emerico, S., Musacchio, A., Scrugli, A. and Cozzolino, S. 2005. Confirmation of hybridization among sympatric insular populations of *Orchis mascula* and *O. provincialis*. *Plant Systematics and Evolution*. 251: 131-142.
- Perfectti, F.** 2002. Especiación: Modos y mecanismos. En: Soler, M. (ed.). *Evolución. La base de la biología*. pps. 307-321.
- Pinkava, D. J.,** Baker, M. A., Parfitt, B. D., Mohlebrock, M. W. and Worthington, R. D. 1985. Chromosome numbers in some cacti of western North America-V. *Systematic and Botany*. 10: 471-483.

- Poggio, L.** y Naranjo, C. A. 1990. Contenido de ADN y evolución en plantas superiores. *Academia nacional de ciencias exactas, físicas y naturales.*, Buenos Aires. 5: 27-37.
- Quijada, A.**, Méndez-Cárdenas, G., Ortiz-García, S. y Álvarez-Buylla, E. 1997. La región de los ITS del ADN ribosomal del núcleo (nrADN), fuente de caracteres moleculares en la sistemática de las gimnospermas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México.* 60: 159-168.
- Reynolds, J.**, Weir, B. S. and Cockerham, C. C. 1983. Estimation of the coancestry coefficient: Basis for a short term genetic distance. *Genetics*, 105: 767-779.
- Rieseberg, L. H.** and Wendel, J. 1993. Introgression and its consequences in plants. *In: Harrison, R. Edr. Hybrid zones and the evolutionary process.* Oxford University Press. Oxford. 70-109.
- Rieseberg, L. H.** 1995. The role of hybridization in evolution: old wine in new skins. *American Journal of Botany.* 82: 944-953.
- Rieseberg, L. H.**, Word, T. E. and Baack, E. J. 2006. The nature of plant species. *Nature.* 440: 524-527.
- Rivera, M. I.** 2003. Estudio de la variabilidad genética de la cactácea columnar *Neobuxbaumia mezcalaensis*. Tesis de licenciatura. UNAM. FES-Iztacala. 84 pp.
- Salemi, M.** and Vandenberg, A. M. The phylogenetic handbook. A practical approach to ADN and protein phylogeny. Cambridge. University Press. 1207 pp.

- Sánchez-Abarca, C.**, Valadez-Moctezuma, E., Carballo, C. A. and Castillo, G. F. 2003. Differentiation of two tomato lines and their hybrid with molecular markers. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 26(1): 67-72.
- Sites, J. W.**, and Marshall, J. C. 2003. Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution*. 18(9): 462-470.
- Slatkin**. 1990. El flujo génico en poblaciones naturales. *Ciencias*, 17: 10-14.
- Smith, J. F.**, and Vuong P. T. 1996. Genetic diversity of the narrow endemic *Allium aaseae* (Alliaceae). *American Journal of Botany*. 83(6): 717-726.
- Snow, A. A.** and Parker, P. G. 1998. Molecular markers for population biology. *Ecology*. 79: 359-360.
- Soranzo, Z.**, Alia R., Provan J., Powell W. 2000. Pattern of variation at a mitochondrial sequence-tagged-site locus provides new insights into the postglacial history of European *Pinus sylvestris* populations. *Molecular Ecology*. 9: 1205-1211.
- Stebbins, G. L.** 1980. Rarity of plant species: a synthetic viewpoint. *Rhodora*. 82: 77-86.
- Swofford, D. L.** 2000. PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), version 4.0b4a. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Swofford, D. L.** and Sullivan, J. 2003. Phylogeny inference based on parsimony and other methods using PAUP. In Salemi, M. and Vandenberg, A. M. The phylogenetic handbook. A practical approach to ADN and protein phylogeny. Cambridge. University Press. 160-206.

- Taberlet, P.**, Gielly, L. Pautou, G. and Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast ADN. *Plant Molecular Biology*. 17: 1105-1109.
- Terry, R. G.**, Nowak, R. S. and Tausch, R. J. 2000. Genetic variation in chloroplast and nuclear ribosomal ADN in Utah juniper (*Juniperus osteosperma*, Cupressaceae): evidence for interspecific gene flow. *American Journal of Botany*. 87(2): 250-258.
- Tovar-Sánchez, E.** and Oyama, K. 2004. Natural hybridization and hybrid zones between *Quercus crassifolia* and *Quercus crassipes* (Fagaceae) in México: Morphological and Molecular evidence. *American Journal of Botany*. 91(9):1352-1363.
- Tyagi, A. P.** 2002. Cytogenetics and reproductive biology of mangroves in Rhizophoraceae. *Australian Journal of Botany*. 50: 601-605.
- Valiente-Banuet, A.**, Rojas-Martínez, A., Arizmendi, M. C. and Dávila, P. 1997. Pollination biology of two columnar cacti (*Neobuxbaumia mezcalaensis* and *Neobuxbaumia macrocephala*) in the Tehuacán Valley, central México. *American Journal of Botany*. 84(4): 452-455.
- Vilchis, A. B. E.** 2000. Estudio poblacional por edades de *Neobuxbaumia macrocephala* (Cáctaceae) en Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de ciencias 63 pp.
- Vite, G.**, Portilla, G., Zavala, H., Valde, P., Díaz, S. y Arias, M. 1997. *X Cephalobuxbaumia zapotitlana*, un híbrido natural de dos especies de cactáceas columnares de la región de Tehuacán-Cuicatlán. I Congreso Nacional sobre Cactáceas. Colegio de postgraduados, Montecillo, Estado

de México. 26 al 29 de noviembre 61 pp.

- Vriesendorp, B.** and Bakker, F. T. 2005. Reconstructing patterns of reticulate evolution in angiosperms: what can we do? *Taxon*. 54(3): 593–604.
- Wagner, D. B.,** Furnier, G. R., Saghai-Maroo, M. A., Williams, S. M., Dancik, B. P. and Allard, R. W. 1987. Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 84: 2097-2100.
- Waser, N. M.** 1983. Competition for pollination and floral character differences among sympatric plant species: a review of evidence. *In* Jones, C. E. and Little, R. S. (eds). *Handbook of experimental pollination biology*. New York, USA. pps. 277-793.
- Watano, Y.,** Kanai, A. and Tani, N. 2004. Genetic structure of hybrid zones between *Pinus pumila* and *P. parviflora* var. *pentaphylla* (Pinaceae) revealed by Molecular Hybrid index analysis. *American Journal of Botany*. 91(1): 65-72.
- Wendel, J. F.,** Schnabel A. and Seelanen T. 1995. Bi-directional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA. 92: 280-284.
- Whitham, P. A.,** Morrow, and B. M. Potts. 1991. Conservation of hybrid plants. *Science*. 254: 779-780.
- Widmer, A.** and Baltisberg, N. 1999. Molecular evidence for allopolyploid speciation and a single origin of the narrow endemic *Draba ladina* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*. 86(9): 1282-1289.

- Williams, N. H.** and Whitten, M. W. 2001. Checking an Orchid Hybrid's Background. The use of molecular data in determining parentage of hybrids. *Orchids. The magazine of the American Orchid Society*. 1056-1061.
- Wolf, P. G.,** Campbell, D. R., Waser, N. M., Sipes, S. D., Toler, T. R. and Archibald, J. K. 2001. Test of pre- and postpollination barriers to hybridization between sympatric species of *ipomopsis* (Polemoniaceae). *American Journal of Botany*. 88(2): 213-219.
- Yap, V. I.** and Nelson, J. R. 1996. WinBoot. A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confident limits of UPGMA-based dendrograms. International Rice Research Institute.

APÉNDICE 1

LOCALIZACIÓN GEOGRAFICA DE LOS POSIBLES HÍBRIDOS ANALIZADOS.

	Fenotipo	Localización
H 1 SJR	Híbrido tipo 1	18° 19' 46' 97° 35' 46'
H 2 SJR	Híbrido tipo 2	18° 19' 45' 97° 35' 47'
H 3 SJR	Híbrido tipo 2	18° 19' 45' 97° 35' 47'
H 4 SJR	Híbrido tipo 2	18° 19' 43' 97° 35' 45'
H 5 SJR	Híbrido tipo 1	18° 19' 43' 97° 35' 45'
H 6 SJR	Híbrido tipo 2	18° 19' 45' 97° 35' 47'
H 7 SJR	Híbrido tipo 2	18° 19' 46' 97° 35' 46'
H 8 SJR	Híbrido tipo 2	18° 19' 46' 97° 35' 46'
H 9 SJR	Híbrido tipo 2	18° 19' 44' 97° 33' 58'
H10 SJR	Híbrido tipo 1	18° 19' 36' 97° 33' 51'
H 11 SM	Híbrido tipo 2	18° 14' 46' 97° 32' 51'
H 12 SM	Híbrido tipo 2	18° 14' 37' 97° 32' 47'
H 13 SM	Híbrido tipo 2	18° 14' 43' 97° 32' 49'
H 14 SM	Híbrido tipo 2	18° 14' 46' 97° 32' 49'
H 15 SM	Híbrido tipo 1	18° 14' 45' 97° 32' 49'
H 16 SM	Híbrido tipo 1	18° 14' 44' 97° 32' 49'
H 17 SM	Híbrido tipo 2	18° 14' 44' 97° 32' 49'

APÉNDICE 2

EXTRACCIÓN DE ADN Dellaporta (1983) con modificaciones

Macerar muestra con nitrógeno líquido hasta pulverizar.

1. Agregar 500 μ l de buffer de mercaptoetanol (Tris 100mM, EDTA 50mM, NaCl 500 mM y mercaptoetanol 10 mM), a un tubo de 1.5 ml.
2. Añadir 1g muestra.
3. Agregar 34 μ l de SDS al 20% y agitar.
4. Mantener en baño de inmersión 10 min a 65°C.
5. Agregar 167 μ l de acetato de potasio 5M, agitar.
6. Mantener 20 min en hielo o en congelador a -20°C.
7. Centrifugar a 14,000 rpm 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 rpm durante 15 min.
11. Decantar el sobrenadante y secar la orilla del tubo con papel.
12. Resuspender la pastilla en 600 μ l de agua destilada estéril.
13. Agregar 500 μ l de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico 24:1:1.
14. Agitar por inversión, y dejar de 2- 5 min y volver a agitar.
15. Centrifugar a 14,000 rpm durante 20 min
16. Recobrar la fase acuosa (aprox. 500 μ l)
17. Agregar 50 μ l de acetato de Sodio 3 M, agitar.
18. Agregar 1 ml de etanol absoluto.y agitar.
19. Mantener 60 min a -20°C.
20. Centrifugar a 14,000 rpm por 30 min.
21. Lavar con etanol al 70%
22. Decantar el etanol y secar la orilla del tubo con papel.
23. Resuspender la pastilla resultante en 50 μ l de agua estéril o Tris-HCL 10mM
pH 8.5.

APÉNDIC E 3

PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA DETERMINAR EL CONTENIDO DE ADN NUCLEAR

1. Pesar 3 mg de hojas jóvenes sin nervadura de la planta de referencia internas y 550 mg de tejido del parénquima de la planta problema.
2. Picar finamente con una navaja de rasurar ambas muestras en una caja petri con 3 ml de solución Otto 1 (ácido cítrico 0.1M y 0.5% de Tween 20).
3. Incubar 10 min a temperatura ambiente y filtrar con malla nylon de 50 μm .
4. Centrifugar el filtrado a 1,000 rpm durante 3 min y eliminar el sobrenadante.
5. Resuspender los núcleos en 1 ml de solución Otto1.
6. Centrifugar a 1,000 rpm durante 3 min y eliminar el sobrenadante.
7. Resuspender los núcleos en 0.5 ml de solución Otto1.
8. Añadir 2ml de solución Otto2 (0.4 M Na_2HPO_4 , fosfato monobásico de sodio), e incubar 15 min a temperatura ambiente.
9. Agregar 125 μl de RNAsa y 125 μl de PI (ioduro de propidio).
10. Leer con citómetro de flujo.