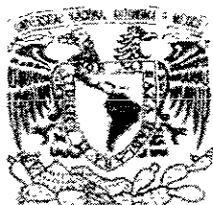


00381

22



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MARCADORES MOLECULARES EN EL GÉNERO  
*PROSOPIS*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS  
(BIOLOGÍA)

P R E S E N T A

JUANA JUÁREZ MUÑOZ

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE, 2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**

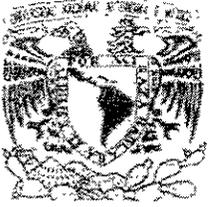


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MARCADORES MOLECULARES EN EL GÉNERO  
*PROSOPIS*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS  
(BIOLOGIA)

P R E S E N T A

JUANA JUÁREZ MUÑOZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. JOSE GERONIMO ABRAHAN RUBLUO ISLAS

## AGRADECIMIENTOS

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento durante mis estudios y por el apoyo a mi investigación, la cual formo parte del Proyecto CONACYT 27759B.

Al Dr. Guillermo Carrillo Castañeda, por su valiosa dirección durante el desarrollo de esta investigación, así como por su paciencia y comprensión en la revisión del escrito.

Al Dr. Abraham Rubluc Islas, por su dirección, apoyo y facilidades brindadas para la utilización del equipo.

Al Dr., Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros y Dr. Barbarin Arreguín Lozano, por su colaboración en la revisión de la tesis.

A la Dra. María Guadalupe Palomino Hasbach, por su colaboración en la revisión del manuscrito.

A la Dra. Den Claudia Rodríguez Vargas y Dra. Sonia Vásquez Santana, por su acertada revisión y sugerencias en la corrección del escrito.

A mis amigos: Ma. Elisa Alvarado Cano, Alfredo Carrillo Salazar, Arturo Ledesma Hernández y Ma. Elena Salazar Laureles, por su apoyo en la colecta del material biológico.

A mi amiga Sandra López Yescas, por su apoyo incondicional.

A mis compañeros de laboratorio: Yolanda Vega Pérez y Marcos Carrillo Sánchez

## DEDICATORIA

CON RESPETO Y AMOR A MIS PADRES, QUE CONSTITUYEN  
LO MÁS VALIOSO QUE TENGO EN LA VIDA.

CON CARIÑO A LOS NUEVOS Y VIEJOS AMIGOS, QUE ME HAN  
ESCUCHADO Y APOYADO EN LOS MOMENTOS DIFÍCILES

## CONTENIDO

	Pág.
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	iii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	iv
<b>LISTA DE TABLAS DEL APENDICE</b>	v
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	vi
<b>RESUMEN</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>I. INTRODUCCION</b> .....	1
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1. Generalidades sobre el género <i>Prosopis</i> .....	3
2.1.1. Origen y distribución geográfica .....	3
2.1.2. Clasificación taxonómica .....	7
2.1.3. Descripción morfológica .....	9
2.1.4. Ambito y papel ecológico del mezquite .....	10
2.1.5. Usos potenciales del mezquite .....	11
2.2. Concepto de especie .....	13
2.3. Fuentes de la variación genética en las poblaciones .....	19
2. 4. Detección de la variación genética .....	23
2.4.1. Metodologías utilizadas para la detección de polimorfismos del ADN ..	25
2.4.2. Técnicas basadas en hibridación de ADN .....	25
2.4.3. Técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa .....	27
2.4.4. Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD) .....	31
2.4.5. Microsatélites .....	33
2.4.6. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) ...	33
2.5. Construcción de dendrogramas a partir de datos moleculares aplicando la taxonomía numérica .....	35
<b>III. MATERIALES Y METODOS</b> .....	41
3.1. Material biológico y sitios de colecta .....	41

3.2. Aislamiento del ADN .....	41
3.3. Determinación de la pureza y concentración del ADN .....	43
3.4. Evaluación del grado de integridad del ADN .....	44
3.5. Optimización de la concentración de Mg <sup>2+</sup> y ADN .....	45
3.6. Amplificación del ADN .....	45
3.7. Separación e identificación de los productos amplificados .....	49
3.8. Análisis de agrupamiento .....	49
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>50</b>
4.1. Evaluación de la pureza y calidad del ADN .....	50
4.2. Optimización de la concentración de Mg <sup>2+</sup> y ADN .....	50
4.3. Selección de los iniciadores .....	51
4.4. Análisis de la variación genética en la población de Dolores Hidalgo Guanajuato .....	53
4.5. Análisis de la variación genética en la población de Santiago de Anaga Hidalgo .....	55
4.6. Análisis de la variación genética en las dos poblaciones de <i>P. laevigata</i> ....	58
4.7. Determinación de la variación genética en las especies de referencia .....	66
<b>V. PROYECCIONES FUTURAS .....</b>	<b>73</b>
<b>VI. CONCLUSIONES .....</b>	<b>74</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA .....</b>	<b>76</b>
<b>VIII. APENDICE .....</b>	<b>83</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	Distribución geográfica de las especies de <i>Prosopis</i> existentes en la República Mexicana.	5
2	Comparación de los marcadores moleculares más comúnmente utilizados	26
3	Mezclas de reacción para preparar una reacción utilizando el mismo iniciador y diferentes concentraciones de $Mg^{2+}$ y ADN.	46
4	Secuencias de los iniciadores utilizados en este trabajo.	47
5	Mezcla de reacción para una muestra.	48
6	Secuencias y porcentaje de GC (%) de los iniciadores utilizados en este trabajo.	54
7	Comparación de la constitución de las dos poblaciones de <i>P. laevigata</i> mediante sus patrones polimórficos de fragmentos amplificados (PCR-RAPD) de ADN, de las localidades de: Dolores Hidalgo, Guanajuato y Santiago de Anaga de la región del Mezquital en el estado de Hidalgo.	62
8	Fragmentos amplificados de pares de bases indicados (x) que no son compartidos con el fenotipo (a) y que identifican a cada uno de los otros fenotipos.	62
9	Análisis de las bandas generadas en las tres especies de <i>Prosopis</i> , con los 17 iniciadores seleccionados.	68

## LISTAS DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Secuencia del proceso de detección de los RFLPs. PstI = endonucleasa de restricción derivada de <i>Pseudomonas</i> .	28
2	Secuencia de pasos de Reacción en Cadena de la Polimerasa.	30
3	Estrategia general de la técnica de AFLP.	34
4	Mapa de la República Mexicana que muestra la localización geográfica de los ejemplares analizados.	42
5	Patrón de bandas obtenido en <i>P. laevigata</i> utilizando diferentes concentraciones de MgCl <sub>2</sub> y ADN.	52
6	Patrón de bandas de 10 ejemplares de <i>Prosopis</i> de la población de Dolores Hidalgo Guanajuato con los iniciadores 7, 8 y 9.	56
7	Dendrograma de 61 arbustos de <i>Prosopis</i> de la población de Dolores Hidalgo Gto. generado con el coeficiente de similitud de Jaccard y el análisis de agrupamiento UPGMA.	57
8	Dendrograma de 61 arbustos de <i>Prosopis</i> de la población de Santiago de Anaga Hidalgo, generado con el coeficiente de similitud de Jaccard y el análisis de agrupamiento UPGMA.	59
9	Patrón polimórfico identificado en cada uno de los subgrupos de las dos poblaciones de <i>Prosopis</i> .	61
10	Características morfológicas y patrón de bandas (RAPD) del ejemplar caracterizado taxonómicamente de <i>P. laevigata</i> utilizado como referencia.	65
11	Dendrograma de tres especies de <i>Prosopis</i> obtenido con el método de agrupamiento UPGMA y el coeficiente de similitud de Jaccard.	68
12	Polimorfismo detectado con 6 iniciadores Gibco y 11 iniciadores Roth en <i>P. laevigata</i> (L), <i>P. juliflora</i> (J), <i>P. glandulosa</i> (G).	69

## LISTA DE TABLAS DEL APENDICE

Tabla		Pág.
1A	Determinación de la pureza y concentración de ADN de 60 individuos de <i>Prosopis</i> de la localidad de Dolores Hidalgo, Guanajuato.	84
2A	Determinación de la pureza y concentración de ADN de 60 individuos de <i>Prosopis</i> de la localidad de Santiago de Anaga, Hidalgo.	85
3A	Matriz de la población de <i>P. laevigata</i> de Dolores Hidalgo, Guanajuato, generada con los fragmentos de ADN obtenidos mediante RAPD-PCR, con los iniciadores 7, 8, 9,17 y 18.	86
4A	Matriz de la población de <i>P. laevigata</i> de Santiago de Anaga, Hidalgo, generada con los fragmentos de ADN obtenidos mediante RAPD-PCR, con los iniciadores 7, 8, 9,17 y 18.	87
5A	Matriz de las tres especies de <i>Prosopis</i> generada con los fragmentos obtenidos con los 17 iniciadores seleccionados.	88

## LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	Polimorfismo en longitud de los fragmentos amplificados
AP-PCR	Iniciador arbitrario de la reacción en cadena de la polimerasa
DAF	Amplificación de huellas genómicas del ADN
RAPD	Amplificación aleatoria del ADN polimórfico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SSR	Simple secuencias repetidas
OTU	Unidades taxonómicas operativas
$N_{em}$	Número de migrantes por generación
mg	Miligramo
$\mu$ g	Microgramo
M	Concentración molar
mM	Milimolar
$\mu$ M	Micromolar
pmol	Picomol
$\mu$ L	Micro litro
%	Porcentaje
ng	Nanógramo
g	Gramo
L	Litro
mL	Mililitro
h	Hora
min	Minuto
s	Segundo
pb	Pares de bases
Ha	Hectárea
nm	Nanómetro
rpm	Revoluciones por minuto
$^{\circ}$ C	Grados centígrados
km	Kilómetro
$m^2$	Metro cuadrado
cm	Centímetro
mm	Milímetro
DO	Densidad óptica
UV	Radiación ultra violeta
pH	Concentración - $\log H^+$
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
TAE	Tris, ácido acético, EDTA
UPGMA	Método de ligamiento promedio (unweighted pair-group method with arithmetic averages)

## RESUMEN

El género *Prosopis* comprende especies con un gran potencial ecológico y económico en las regiones áridas y semiáridas del mundo. Algunas de ellas son consideradas como un recurso natural multipropósito, pueden ser usadas para reforestar zonas áridas y semiáridas, producción de madera, carbón, forraje y alimento humano. Para el establecimiento de programas de reforestación y explotación sustentable de este recurso se requiere conocer la variación genética de las poblaciones naturales. Se evaluó mediante RAPD la variación genética de dos poblaciones silvestres de *Prosopis laevigata* (mezquite) localizadas en Dolores Hidalgo, Guanajuato (población 1) y Santiago de Anaga Hidalgo, México (población 2). Para estimar con mayor objetividad el grado de la variación entre los individuos de las poblaciones, fueron tomados al azar 60 individuos de cada población, y como patrones de referencia se utilizaron ejemplares vivos de *P. laevigata*, *P. glandulosa* y *P. juliflora* plenamente caracterizados taxonómicamente provenientes del Jardín Botánico de la UNAM, de Guanajuato, Sinaloa y Chihuahua. De 22 iniciadores probados se seleccionaron los 5 con los que se observó mayor polimorfismo y definición de los fragmentos de ADN. En ambas poblaciones se detectaron 47 fragmentos de entre 450 a 2500 pb. Con éstos se llevó a cabo el análisis de agrupamiento de cada población. Para la construcción de los dendrogramas o árboles genealógicos se utilizó el coeficiente de similitud de Jaccard y el método de agrupamiento UPGMA. Los dendrogramas mostraron que en ambas poblaciones de *P. laevigata* los individuos se distribuyeron en dos grupos muy relacionados entre sí por sus altos coeficientes de similitud, los cuales fueron de 0.94 (población 1) y 0.92 (población 2). En la población 1 los dos grupos A y B fueron constituidos por 4 subgrupos mientras que 4 y 5 subgrupos constituyeron los grupos C y D de la población 2. El 66% de los fenotipos

conformó el grupo A y el 86% el grupo D. En la población 1 el ejemplar de referencia de *P. laevigata* taxonómicamente bien identificado se ubicó en el subgrupo más numeroso del grupo A, mientras que en la población 2 se localizó en el segundo subgrupo de mayor tamaño del grupo D. Los estrechos rangos de los valores de los coeficientes de similitud observados entre los grupos y subgrupos de las dos poblaciones y el hecho de que el patrón polimórfico en el 43% y 23% de los fenotipos de ambas poblaciones correspondiera al del ejemplar de referencia de *P. laevigata* sugiere que las poblaciones posiblemente tienen un origen común o que en el pasado constituían una población continua y que la selección natural pudo haber jugado un papel muy importante en la preservación de este fenotipo en ambas poblaciones. El hecho de que los rangos de valores de coeficientes de similitud (0.79 y 0.63) observados entre las especies de referencia *P. laevigata*, *P. glandulosa* y *P. juliflora* contrastan notablemente con los rangos de coeficientes de similitud (0.94 y 0.92) detectados en las dos poblaciones, indican que los valores detectados en las especies corresponden a rangos de similitud interespecíficos mientras que los valores encontrados entre los fenotipos de las poblaciones corresponden a rangos de similitud intraespecíficos. La variación genética presente en las poblaciones de *P. laevigata* puede atribuirse al carácter de protoginia de sus flores, sistema reproductivo y mutaciones.

## ABSTRACT

The genus *Prosopis* includes species that have high economic and ecological importance for arid and semiarid regions of the world. They are considered as a multipurpose natural resource because they can be used for reforestation of arid and semiarid regions, production of wood, charcoal, forage, and human food. In order to have a sustainable exploitation of this natural resource, a deep knowledge of the genetic variation is required. Thus, this research project aimed to compare the genetic variation of two natural populations of *P. laevigata*, from the Mexican States of Guanajuato (population 1) and Hidalgo (population 2) by using the RAPID technique. Sixty individuals of each population were randomly selected. Samples of *P. laevigata*, *P. glandulosa* and *P. juliflora* taxonomically characterized from the Botanic Garden from the UNAM were used as references to have a representative degree of variation between individuals of both populations. Five out of 22 initiators tested with the best polymorphism and the highest definition of fragments of DNA were selected. A total of 47 fragments from 450 to 2500 pb were detected in both populations, and used for the subsequent cluster analysis. The dendrograms were generated by the UPGMA grouping method and the Jaccard's similarity coefficient. Dendrograms showed that individuals of both populations were distributed in two closely related groups with similarity coefficients of 0.94 (Population 1) and 0.92 (Population 2). Groups A and B in the population 1 were grouped in 4 subgroups each, whereas groups C and D from Population 2 were grouped in 4 and 5 subgroups respectively. 66% of the genotypes formed group A, whereas 86% belonged to group D. *P. laevigata* which is the taxonomically identified reference was clustered in the largest subgroup of the population 1 while it was clustered in the second largest subgroup in the population 2. The high similarity in coefficients observed among groups and subgroups of the two

populations, and the polymorphic pattern of *P. laevigata* found in 43% and 23% of the samples of both populations respectively, suggest that both populations may have a common origin or that those populations may have constituted a continuous population in the past. Possibly, natural selection could have played an important role on the preservation of this phenotype in both populations. The considerable contrast between similarity coefficients (0.79 and 0.63) of the reference species *P. laevigata*, *P. glandulosa* and *P. juliflora* and the contrast between the similarity coefficients (0.94 and 0.92) detected in the two populations, indicate that the similarity coefficients from the species correspond to interspecific ranges of similarity, while the similarity coefficients from the phenotypes of the populations correspond to intraspecific ranges of similarity. Protogynous flowers, reproduction system and mutations may explain the genetic variation observed in the *P. laevigata* population.

## I. INTRODUCCION

El género *Prosopis* de la subfamilia Mimosoidae es uno de los más primitivos de la familia Leguminosoidae, se piensa que se originó en África a finales del Mesozoico e inicios del periodo terciario. Actualmente se encuentra distribuido ampliamente en las zonas áridas y semiáridas de América, norte de África y suroeste de Asia. El género incluye 44 especies, divididas en 5 secciones y 10 series. En América se ubican 40 de las especies conocidas, 31 se localizan en Sudamérica, de las cuales 29 son nativas de Argentina, principal centro de diversificación del *Prosopis* y 9 en Norteamérica (Burkart, 1976 a,b; Rzedowski, 1988). Las especies de este género son capaces de desarrollarse en suelos pobres y degradados y como todas las leguminosas contribuyen a mejorar la calidad de los suelos con la aportación de materia orgánica y la incorporación de nitrógeno atmosférico al suelo.

Algunas de las especies de la sección Algarobia son simpátricas en diversas regiones del mundo, lo cual da lugar a que se creen fenotipos nuevos por hibridación, que dificultan la clasificación taxonómica. Por tal razón en el caso de las especies argentinas se ha recurrido al uso de marcadores moleculares (isoenzimas, RFLP, RAPD), para la identificación de ciertas especies y para el establecimiento de sus relaciones filogenéticas (Saidman, 1986; Saidman y Vilardi, 1987; Solbrig y Bawa, 1975; Whitmore y Braag, 1979; (Saidman *et al*, 1998b; Ramírez *et al.*, 1999). En el caso de las especies mexicanas es necesario caracterizarlas con estos criterios ya que nuestro país es considerado el segundo centro de diversificación del género y en algunas especies existen problemas en su clasificación a nivel de serie.

En los últimos años se ha incrementado el interés por estudiar este género debido al potencial multipropósito de algunas especies para la reforestación de regiones áridas y

semiáridas, así como para la producción de madera, carbón, forraje y alimentación para el hombre. Sin embargo, para poner en práctica programas de reforestación, de mejoramiento o bien para la explotación racional del género se requiere conocer la constitución y variación genética de las poblaciones naturales. Para conservar la variación genética en las áreas reforestadas, también es necesario identificar las características morfológicas, fisiológicas y reproductivas que favorecen la variación genética en las poblaciones naturales.

Un gran número de técnicas basadas en el polimorfismo del ADN se han utilizado para determinar la variación genética en hongos (Huang *et al.*, 1997), plantas (Briand *et al.*, 1998; Coletta-Filho *et al.*, 1998; Paran *et al.*, 1998) y animales (Zhang *et al.*, 2001). Estas técnicas tienen diferente grado de sensibilidad para detectar el polimorfismo y niveles de variación genética. Como cualquier técnica, presentan ventajas, limitaciones, grados de dificultad y costos. La técnica de RAPD además de ser relativamente fácil y económica ha permitido estimar la variación genética intra e interespecífica (Wilkie *et al.*, 1993; Nkonholo, 1999; Fuentes *et al.* 1999), razones por las que se utilizó esta técnica en el presente trabajo, el cual ha tenido como objetivo determinar mediante RAPD la variación genética de dos poblaciones silvestres de *P. laevigata*, localizadas en Dolores Hidalgo, Guanajuato (población 1) y Santiago de Anaga Hidalgo (población 2), mediante el análisis del número y proporción de fenotipos en éstas, grado de similitud existente entre los individuos y entre las poblaciones. Para estimar con mayor objetividad los rangos de similitud entre los individuos de las poblaciones, se utilizaron como patrones de referencia ejemplares caracterizados taxonómicamente de *P. laevigata*, *P. glandulosa* y *P. juliflora* provenientes del Jardín Botánico de la UNAM y de los estados de Guanajuato, Sinaloa y Chihuahua

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Generalidades sobre el género *Prosopis*

#### 2.1.1. Origen y distribución geográfica

El género *Prosopis* es uno de los más primitivos de la familia Leguminosidae, subfamilia Mimosoideae, se piensa que se originó en Africa a finales del Mesozoico e inicios del periodo terciario, donde se encuentra el representante menos especializado de este género (*P. africana*), además de tres especies que en su conjunto forman la sección *Prosopis*, las cuales habitan las zonas áridas desde el norte de Africa hasta el Cáucaso y la India (Burkart, 1976 a,b; Rzedowski, 1988).

Actualmente el género se encuentra ampliamente distribuido en las zonas áridas y semiáridas del Sur de Asia, Norte y Sur de América. Su extensa distribución en las zonas áridas y semiáridas tropicales sugiere que el ancestro de las especies actuales pudo haber migrado del este al oeste. A esto se atribuye el hecho de que en América el principal centro de origen de diversificación del género se encuentre en Argentina, aunque un segundo centro de origen de diversificación se localiza en México. En América se conocen 40 especies, las cuales están distribuidas desde el norte de Estados Unidos hasta Sudamérica, llegando a Chile y Argentina (Burkart, 1976 a,b). De las 40 especies conocidas 9 existen en México (Tabla 1) con la siguiente distribución geográfica en América (Rzedowski, 1988): 1) *P. articulata* conocida como mezquite amargo se localiza en los alrededores de Guaymas, Sonora, así como a lo largo del Mar de Cortés del lado de Baja California Sur. 2) *P. juliflora* se encuentra del lado del Pacífico desde el centro de Sinaloa hasta Panamá y en forma más aislada en Ecuador y Perú. 3) *P. laevigata* se

encuentra desde Sonora hasta Oaxaca, pasando por todos los estados del centro, este y oeste. 4) *P. glandulosa* conocido como mezquite dulce se localiza en el norte del país y en el sureste de los Estados Unidos de América. De esta última se conocen dos variedades bien diferenciadas en la mayor parte de sus áreas de distribución, con una franja de contacto donde prevalecen individuos híbridos. La variedad típica *P. glandulosa* var. *glandulosa* es característica de Texas, y en las entidades federativas de México, al este de Coahuila, en Nuevo León y norte de Tamaulipas. Sin embargo, Johnston (1962) concentra la distribución de *P. glandulosa* var. *torrellana* hacia el oeste en particular en California, Baja California, Nuevo México y Chihuahua extendiéndose hasta el estado de Nevada de EUA, Sinaloa, San Luis Potosí y Texas. 5) *P. tamaulipana* se encuentra en la región Huasteca, en los límites de Tamaulipas, San Luis Potosí y Veracruz. 6) *P. velutina* se distribuye en el centro y sur de Arizona, extendiéndose hasta Sonora y Nuevo México. 7) *P. palmeri* es endémica de Baja California. 8) *P. reptans* se encuentra en el región meridional de Texas y en áreas adyacentes de Tamaulipas y por último *P. pubescens* llamado tornillo se distribuye desde el sur de California hasta el norte de Chihuahua y el suroeste de Texas incluyendo pequeñas áreas en Nevada, Utah y Baja California Norte (Rzedowski, 1988).

Los problemas para definir correctamente la taxonomía del grupo y establecer su filogenia ha dificultado entender e interpretar su correcta distribución geográfica.

En Norteamérica las discontinuidades observadas en los patrones de la distribución del género indican una considerable antigüedad del grupo en términos de su permanencia en las zonas áridas de esta región. Entre los hechos interesantes se encuentra la distribución geográfica de *P. velutina* en el norte de la República Mexicana donde divide en dos el área de distribución de *P. glandulosa* var. *torrellana*. De acuerdo con la hipótesis de Johnston, el

origen de *P. velutina* es más reciente y lo relaciona con la orogenia del Terciario que afectó drásticamente la región permitiendo que *P. velutina* desplazara a *P. glandulosa* var. *torrellana* de su área original.

Tabla 1. Distribución geográfica de las especies de *Prosopis* existentes en la República Mexicana.

Sección	Especie	Distribución geográfica
Strombocarpa	<i>P. palmeri</i>	Baja California
	<i>P. reptans</i>	Tamaulipas
	<i>P. pubescens</i> var. <i>cinerascens</i>	Baja California, Chihuahua
Algarobia	<i>P. articulata</i>	Baja California Sur, Sonora
	<i>P. juliflora</i>	Se localiza en los estados situados del lado del Pacífico, desde Sinaloa hasta Chiapas
	<i>P. laevigata</i>	Se localiza desde Sonora hasta Oaxaca, pasando por todos los estados del centro, este y oeste
	<i>P. glandulosa</i> var. <i>glandulosa</i>	Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas
	<i>P. glandulosa</i> var. <i>torrellana</i>	Baja California, Chihuahua, Sinaloa y San Luis Potosí.
	<i>P. tamaulipana</i>	Tamaulipas, San Luis Potosí y Veracruz.
	<i>P. velutina</i>	Sonora

La disyunción de *P. articulata* en Baja California sur y en los alrededores de Guaymas, Sonora, puede atribuirse a la dispersión de polen y semillas a larga distancia o a la reducción de áreas originalmente continuas que se extendían hasta la desembocadura del Río Colorado. Aunque es más probable que estas especies existieran ahí antes de la separación de la península del resto del continente (Karig y Jenksy, 1972).

La distribución de *P. laevigata* en tres segmentos separados (Altiplanicie, Depresión del Balsas y Planicie Costera Nororiental) indica que la antigüedad de la especie debe remontarse a épocas en que las montañas no obstaculizaban su dispersión, aunque es factible que la Planicie Costera se comunicara anteriormente con la de la Altiplanicie vía Nuevo León y Coahuila (Rzedowski, 1988).

La distribución discontinua de *P. juliflora* observada desde el lado del Pacífico desde Centroamérica a la Costa del Caribe y luego hacia algunos valles interiores de Colombia y Perú, así como al litoral Ecuatoriano y las Islas Galápagos se atribuye al establecimiento del istmo centroamericano durante el Plioceno (Rzedowski, 1988).

Todas estas disyunciones no parecen ser muy espectaculares comparadas con las discontinuidades observadas más al sur del Ecuador (Argentina, Chile y Bolivia). Esta distribución en las zonas áridas a ambos lados del Ecuador en América no es exclusiva del género *Prosopis*, sino que incluye a muchos otros géneros y especies. Existen varias hipótesis para explicar el posible origen de estas áreas tan ampliamente separadas, aunque ninguna se ha llegado a probar. Las tres principales teorías son: a) la existencia de una mayor continuidad de regiones de clima árido en épocas pasadas, b) la dispersión de polen a larga distancia, c) la evolución convergente de ancestros propios de clima más húmedo. El género *Prosopis* ha sido utilizado para explicar este último mecanismo, basándose sobretodo en la presencia de *P. juliflora* en áreas próximas al Ecuador (Axelrod, 1948; Solbrig, 1972). En relación a esta última teoría el análisis de flavonoides indica que la evolución convergente pudo jugar un papel importante en la gran similitud morfológica observada por un lado entre las especies Sudamericanas *P. fleuxosa* y *P. chilensis* y por otro lado en las especies Norteamericanas *P.*

*glandulosa*, *P. laevigata* y *P. velutina*, todas pertenecientes a la sección Algarobia, pero sin que existan pruebas de que *P. juliflora* haya sido el progenitor común de ambos conjuntos (Carman, 1973). Si bien en algunas especies de las secciones Algarobia y Strombocarpa el análisis de flavonoides indica la posibilidad de la evolución convergente, Rzedowski (1988) señala que aunque no es imposible el origen del complejo *Prosopis* en América a partir de un ancestro local propio de climas húmedos, no es probable que éste haya generado directamente un desarrollo convergente en regiones áridas a ambos lados del trópico, ya que la situación actual refleja un periodo largo de evolución de un grupo esencialmente xerófilo. No obstante el vigor y las tendencias invasoras de algunas de sus especies, considerándolo en conjunto. El registro fósil del género del Eoceno-Oligoceno también apunta hacia esta idea (MacGinitie, 1953). Sin embargo, no hay que descartar la posibilidad de que a pesar de su origen Godwaniano y de la actual concentración de la diversidad de especies de *Prosopis* en Argentina, estas plantas hayan llegado a finales del Cretácico o en el Eoceno a Norteamérica por la ruta de Laurisia meridional y posteriormente migraron hacia el sur. También no hay que perder de vista el hecho de que la distribución geográfica actual de *P. juliflora* parece sugerir una vía migratoria que pudo haber usado más de un linaje de xerófitas a través de los trópicos en épocas en que climas no tan húmedos como el actual dominaban esa región (Rzedowski, 1988).

### **2.1.2. Clasificación taxonómica**

En la clasificación del género *Prosopis*, Leguminosoidae de la subfamilia Mimosoidae, existen desacuerdos a nivel de especies, secciones y series, las dificultades para la clasificación adecuada, se deben a la amplia variabilidad morfológica que presentan las especies, producto de

la hibridación e introgresión genética que existe entre ellas, lo cual al generar fenotipos intermedios en las zonas de simpatria hacen más difícil su clasificación (Burkart, 1976a; Galindo-Almanza *et al.*, 1992).

Las especies del género a través del tiempo han estado sujetas a diferentes sistemas de clasificación debido a la diversidad morfológica interespecífica e intraespecífica (Benson, 1941; Johnston, 1962). Bentham, en 1875, incluyó la mayoría de las formas polimórficas del mezquite dentro de la sección *Algarobia* como una especie, situación que fue vigente hasta que Burkart (1940) las separó en diferentes especies.

En la actualidad el sistema de clasificación más aceptado es la propuesta por Burkart (1976). Este autor considera que las características morfológicas más importantes para la subdivisión seccional del género son la presencia de espinas en los tallos y ramas de la planta. Basado en esto, dividió el género en las siguientes cinco secciones :

La sección *Anonychium* comprende una sola especie sin espinas, frutos largos y aplanados, pétalos glabros y ovarios pubescentes (Burkart, 1976a; Burkart y Simpson, 1977).

La sección *Prosopis* incluye 3 especies, las cuales tienen espinas en forma de púas a lo largo de los tallos, frutos redondos cafés, pétalos y ovarios glabros (Burkart, 1976a; Burkart y Simpson, 1977).

La sección *Monilicarpa* comprende una especie con espinas axilares individuales en, fruto rojo brillante con glóbulos pronunciados, pétalos y ovarios pubescentes (Burkart, 1976; Burkart y Simpson, 1977).

La sección *Strombocarpa* con 9 especies, las cuales presentan espinas en pares formadas de estípulas modificadas, frutos en forma espiral o cortos redondos, pétalos y ovarios pubescentes (Burkart, 1976; Burkart y Simpson, 1977).

La sección *Algorabia* constituida por 30 especies, con espinas terminales o axilares en pares o individuales, vainas con diferentes formas y ligeramente aplanadas, pétalos y ovarios pubescentes (Burkart, 1976; Burkart y Simpson, 1977). En las especies de Norteamérica de esta sección se presentan las mayores confusiones morfológicas. Para México Burkart (1976) reconoce la existencia de 3 especies de la sección *Strombocarpa* (*P. palmeri*, *P. reptans* y *P. pubescens*) y 6 de la sección *Algorabia* (*P. articulata*, *P. tamaulipana*, *P. velutina*, *P. juliflora*, *P. laevigata*, *P. glandulosa* Torr.). Sin embargo, Johnston (1962) sólo reconoce para el territorio mexicano la existencia de cinco de las especies de la sección *Algorabia*. Si bien estos sistemas de clasificación son los más fundamentados todavía están sujetos a cambios debido a los problemas que se tienen para definir correctamente al grupo a nivel de series, lo cual implica la necesidad de efectuar estudios bioquímicos, citogenéticos y moleculares para reunir el mayor número de herramientas que aunadas a los estudios taxonómicos permitan definir con mayor claridad las series del género.

### **2.1.3. Descripción morfológica**

A los mezquites se les puede encontrar en forma arbustiva con una altura de un metro o arbórea alcanzando hasta 15 m de altura. La corteza de los troncos es de color oscura o negra. Tiene sistema de raíces profundo y extendido. La raíz principal puede alcanzar profundidades de más de 50 m y las laterales hasta 15 m a los lados del árbol (Burkart, 1976a; Johnston, 1962). Las hojas son de color verde oscuro, compuestas, bipinadas con 6 a 17 folíolos de tamaño variado

(oblongos o lineares) glabros o pubescentes, con o sin estípulas, a veces con glándulas en el pecíolo y raquis (Burkart, 1976a; Burkart y Simpson, 1977). Los tallos y ramas delgadas tienen espinas axilares o terminales (con excepción de la especie de la sección *Anonychium*) en pares o individuales, de tamaño variado llegando a alcanzar hasta 10 cm de longitud (Burkart, 1976a; Burkart y Simpson, 1977). Las flores son perfectas, pequeñas de color amarillo verdoso, pentámeras, hermafroditas, protóginas, con estambres libres y anteras con una glándula pequeña, el cáliz es gamosépalo levemente dentado y los pétalos están unidos muy cerca de la base, generalmente las flores se encuentran agrupadas en espigas cilíndricas de 5 a 10 cm de largo, rara vez en racimos ovoídes o esféricos (Burkart, 1976a). El fruto es una vaina amarilla-violácea, alargada, recta o arqueada y en algunos casos en forma de espiral, indehiscente, de 3 a 30 cm de longitud, aplanadas o cilíndricas en la madurez y pueden contener de 10 a 30 semillas (Burkart, 1976a; Burkart y Simpson, 1977). Las semillas son de forma oblonga o aplastada, duras de color café claro u oscuro dependiendo de la especie, de 2 a 7 mm de longitud (Burkart, 1976a; Burkart y Simpson, 1977).

#### **2.1.4. Ambito y papel ecológico del mezquite**

Los mezquites son considerados como plantas termo-xerófitas debido a su resistencia a la sequía y a altas temperaturas. Si bien son especies que comúnmente se desarrollan en climas secos, sus características morfológicas y fisiológicas les han permitido prosperar en diferentes ambientes ecológicos, se pueden encontrar en climas cálidos, secos, tropicales y subtropicales (Simpson y Solbring, 1977). En nuestro país se desarrollan tanto a nivel del mar como a altitudes mayores de 200 m sobre el nivel del mar, a un rango de precipitación anual de 50 a 600 mm. y temperaturas medias anuales de 15 hasta 45°C (Rzedowski, 1988).

En el ámbito ecológico en el que *Prosopis* prospera, éste juega un papel muy importante en la composición y dinámica de desarrollo de la vegetación y la fauna (Pandit, 1996). En las regiones áridas y semiáridas donde comúnmente se localiza, su dosel actúa como un nicho de colonización que permite el establecimiento y desarrollo de especies epífitas herbáceas y leñosas que al formar grandes conglomerados contribuye a la formación del bosque espinoso. A la fauna le proporcionan refugio y sustento, generalmente un gran número de insectos se alimentan del polen y el néctar de sus flores, las cuales también utilizan como sitios de apareamiento, sus frutos constituyen una fuente de alimento para algunos roedores y vertebrados (Ramírez *et al.*, 1997). Además como toda leguminosa mejora la fertilidad y estructura de los suelos, mediante la acumulación de materia orgánica (Garg, 1998) y la incorporación de nitrógeno atmosférico al suelo, como resultado de la interacción de bacterias fijadoras de nitrógeno con las raíces de los mezquites (Aiazzi *et al.*, 1996; Ovalle *et al.*, 1996).

### **2.1.5. Usos potenciales del mezquite**

El uso del mezquite se remonta a la época prehispánica, evidencias arqueológicas han mostrado que varias especies de *Prosopis* fueron utilizadas por los pobladores del continente Americano como fuente de alimento, medicina, leña y para la construcción de viviendas (Felger, 1977). En la actualidad se considera como un género multipropósito (Goel y Behl, 1996), con grandes posibilidades de utilización comercial (Durso *et al.*, 1973). La National Academy of Science lo ha propuesto como un material de alto valor económico (USA, 1981) y la FAO ha sugerido utilizarlo para la reforestación de zonas áridas y semiáridas. Actualmente en algunos

países ya se han establecido con éxito programas de reforestación utilizando este género (Agrawal, 1996; Agrawal, 1996a; Goel y Behl, 1996).

Datos de un estudio realizado en México muestran que el aprovechamiento del mezquite generó ingresos de 35,2 millones de pesos, equivalentes a 2.8 millones de dólares en un periodo de 10 años (1956-1965), por concepto de la producción de carbón, leña y la exportación de 47 toneladas de frutos utilizados para forraje (Gómez, 1970).

La calidad de su madera es superada por muy pocas especies forestales. Sin embargo, la madera de *P. laevigata* es preferida a la de otras especies forestales, para la construcción de puertas, marcos, ventanas, para mangos de herramientas, y muebles, por poseer un bajo contenido de humedad, lo cual le confiere una alta estabilidad dimensional (Wolf, 1986). Además la madera también se usa en escala industrial para la producción de duela, madera aserrada, hormas para zapatos, leña (por su alto valor calorífico) y carbón de alta calidad (Wolf y Vogel, 1986).

Las vainas y hojas son aprovechadas como forraje por su alto valor nutritivo (Bosch *et al.*, 1997; Jhala, 1997). En las zonas áridas y semiáridas de México, su uso contribuye a reducir el costo de la alimentación del ganado y cuando se pierden los cultivos como maíz y frijol también los habitantes de estas zonas utilizan la semilla como complemento de su alimentación. Debido a todo lo anteriormente expuesto el mezquite tiene gran importancia desde el punto de vista socioeconómico.

Estudios recientes indican que si bien en la época de los años 60, se consideraba como más redituable el aprovechamiento de sus frutos para forraje, en la actualidad la producción de carbón parece ser la activada más redituable (Chellamuthu *et al.*, 1996; Pathan, 1998).

Si bien el mezquite tiene gran potencialidad económica de aprovechamiento, también hay que reconocer que existen una serie de problemas que hay que enfrentar para su uso correcto, tales como su introducción a nuevas áreas, lo que podría convertirlo en una plaga, ya que tiende a presentar un comportamiento más agresivo en medios más favorables a los que generalmente se desarrolla, la susceptibilidad de las vainas al ataque de insectos puede originar pérdidas de hasta 70% de la semilla (Agrawal, 1996). Además también se requiere eliminar de las hojas la presencia de sustancias tóxicas como tiramina y triptamina entre otras que limitan su aprovechamiento como forraje.

## **2.2. Concepto de especie**

En los dos últimos siglos los seres vivos se han ordenado conforme a la clasificación de Linneo. Si bien la unidad básica de este sistema de clasificación es la especie, a través de la historia de la Biología se han propuesto diferentes conceptos de especie dependiendo del enfoque del autor y/o de los organismos con los que se trabaje.

La conceptualización esencialista de la especie predominó desde el siglo XVII hasta mediados del siglo XIX. Durante este periodo los criterios utilizados para agrupar a los individuos en especies fueron básicamente morfológicos y las especie se definían como grupos de individuos semejantes, provistos de características que se mantienen en sus descendientes (Crisci, 1994; Grant, 1981). Después de publicarse la obra “El origen de las especies” en

donde Darwin dio una explicación coherente de cómo la adquisición gradual de pequeñas diferencias a través del tiempo puede explicar la gran diversidad observada en ese entonces y en el presente, el concepto de especie se concibió como una idea abstracta en la que ya no se hablaba de unidades concretas y objetivas, sino de posibles subdivisiones arbitrarias de un continuo orgánico distribuido no sólo en espacio sino también en tiempo. Estos criterios dieron la pauta para el desarrollo del concepto biológico de especie, el cual comprende los cuatro puntos esenciales siguientes: 1) La especie biológica surge solo entre formas que se reproducen sexualmente, 2) Todas las especies se componen de una o más poblaciones de individuos mutuamente relacionados, 3) La interrelación de los miembros de toda población en una especie proviene de su mutua dependencia para fines de reproducción, 4) La condición definitiva de una especie biológica es que sus poblaciones pueden reproducirse separadamente (Mettler *et al.*, 1988). En resumen la especie biológica se define como grupos de poblaciones naturales cuyos individuos se cruzan o pueden cruzarse y que se hallan aisladas reproductivamente de otros grupos (Mayr, 1940). Este concepto difiere del de la Escuela Esencialista en que ve a las especies como poblaciones y no como tipos, las considera en grados de distinción de acuerdo con el aislamiento reproductivo y no en términos de grados de diferencias, las define por su relación con otras especies coexistentes y no únicamente por sus propiedades intrínsecas (Tovar y Ballesteros, 1994). Si bien este concepto ha sido dominante por mucho tiempo en Biología, algunos autores al analizarlo han indicado que presenta una serie de limitaciones y que este concepto sólo funciona para organismos que se reproducen sexualmente. Las dificultades más comunes en la aplicación práctica de este concepto son:

a) La insuficiente información con respecto a las potencialidades reproductivas de muchas de las poblaciones que componen una especie. La dificultad que existe para determinar de manera

precisa si se presenta el entrecruzamiento entre poblaciones, ha llevado a intentar cruzar en el laboratorio poblaciones diferentes para determinar el intercambio genético potencial y decidir si se trata de una misma especie o no. Un ejemplo de este tipo de experimento es el realizado con *Drosophila arizonensis* y *D. mojavensis* en el cual cada especie se compone de tres principales poblaciones separadas. En este caso las pruebas de laboratorio demuestran que los miembros de las tres poblaciones alopatricas de *D. mojavensis* se cruzan fácilmente y producen prole abundante, viable y fértil. A pesar de que esta demostración es indirecta, indica que tales poblaciones separadas pertenecen a la especie *D. mojavensis*. Otras pruebas han demostrado que los miembros de las poblaciones de *D. mojavensis* aisladas tienen reproducción híbrida con las de *D. arizonensis* y generan un pequeño número de descendientes viables y fértiles. Además, se ha observado que la prole F2 conserva la vida y algunos resultan superiores en su capacidad de adaptación a ambas formas parentales (Mettler *et al.*, 1988). Si bien en éstas y en otras especies mediante pruebas de laboratorio se ha podido determinar su potencialidad reproductiva, debe de considerarse que en la naturaleza el intercambio genético real puede ser inexistente y en el laboratorio se eliminan no sólo aspectos geográficos de alopatría, sino también otras barreras reproductivas de naturaleza etológica y ecológicas. Habitualmente en la naturaleza no se puede probar la compatibilidad reproductiva, solamente puede inferirse con reglas relativamente subjetivas como por ejemplo similitudes morfológicas.

b) Los casos de especiación incompleta donde los mecanismos de aislamiento reproductivo no están bien establecidos. La existencia de hibridación tanto en plantas como en animales indican que no existe un aislamiento reproductivo en el sentido de la definición, por lo que es sumamente difícil determinar las barreras reproductivas. La existencia de flujo génico

interespecífico no implica para algunos el rompimiento de la independencia biológica de la especie. Sin embargo para quienes piensan en la especiación como un fenómeno gradual sí se rompe la identidad específica.

Mettler y colaboradores (1988) señalan que hay pocas dudas de que las poblaciones contiguas que intercambian genes libremente en sus áreas de contacto son coespecíficas, mientras las formas simpátricas completamente aisladas en el aspecto reproductivo son especies diferentes. Sin embargo, la norma de aislamiento reproductivo no siempre se puede aplicar de modo tan objetivo, pues el aislamiento reproductivo es un carácter de las poblaciones que se adquiere generalmente por cambios evolutivos graduales. Por lo tanto, en algunas poblaciones puede haber barreras incompletamente formadas, lo cual permite que ocurra apareamiento y se produzcan híbridos. También señalan que los mecanismos de aislamiento pueden fallar, permitiendo algunos cruzamientos eficaces y así las que en un tiempo se consideraron como especies (completamente aisladas), se podrán transformar en casos fronterizos. Entre otros aspectos también debe considerarse que el aislamiento dependiente de la ecología es un mecanismo débil para mantener la diferencia entre poblaciones y puede destruirse por pequeñas alteraciones del medio.

c) El hecho de que sólo incluya a los organismos con reproducción sexual constituye otras de sus limitaciones debido a que deja fuera a los organismos de reproducción asexual. Las formas asexuales no se incluyen en la definición porque en éstas no se cumplen las condiciones de flujo génico ni entrecruzamiento (Mettler *et al.*, 1988).

Aunque el concepto biológico de especie ha estado sujeto a críticas por las limitaciones que presenta, ha sido uno de los más ampliamente utilizados. Sin embargo, en la historia de la biología se han utilizado diferentes conceptos algunos de los cuales se presentan a continuación:

- a) Concepto taxonómico o morfológico de especie: se refiere al conjunto de individuos morfológicamente similares y separados de otros conjuntos por discontinuidad morfológica. El problema práctico de la aplicación de este concepto está en que no se ha establecido el tamaño de las discontinuidades morfológicas que separan las especies y la incapacidad de reconocer mediante este concepto determinados fenómenos de diversidad (Crisci, 1994; Grant, 1981).
  
- b) Concepto fenético de especie: este concepto se refiere a grupos de poblaciones fenéticamente similares en muchos tipos de caracteres (morfológicos, ecológicos, químicos, etc.) cuyos límites se establecen por una evaluación numérica. La dificultad en la aplicación de este concepto reside en que no se ha llegado a un acuerdo con respecto al tamaño de la discontinuidad necesaria para reconocer una especie y no hay un acuerdo con respecto a las técnicas numéricas a utilizar (Crisci, 1994).
  
- c) Concepto ecológico de especie: es un linaje o conjunto de linajes afines que evolucionan separadamente de otros y que ocupan una determinada zona adaptativa o nicho ecológico. El problema de la aplicación de este concepto radica en que no existen definiciones operativas de nicho ecológico o zona adaptativa (Crisci, 1994).

d) Concepto evolutivo de especie: es un conjunto de poblaciones que comparten un destino evolutivo común a lo largo del tiempo y evolucionan por separado de otros linajes semejantes, es decir, de otras especies. El problema de este concepto consiste en determinar que se entiende por destino evolutivo común al considerar organismos vivos (Simpson, 1981; Grant, 1981).

e) Concepto cohesivo de especie: incluye a la mayoría de poblaciones de individuos que tienen el potencial para la cohesión de fenotipos a través de mecanismos de cohesión intrínsecos (capacidad de intercambio genético)(Templeton, 1989).

El análisis de estos conceptos muestra que ninguno puede adoptarse como concepto universal de especie ya que todos presentan limitaciones.

En resumen, puede decirse que los problemas en el concepto de especie en biología se deben a que este se ha utilizado en dos sentidos: 1) Como base para describir y catalogar la diversidad biológica, lo cual ha constituido la base de la sistemática y 2) Para representar las relaciones filogenéticas de los organismos como base de la teoría evolutiva.

Considerando lo anteriormente expuesto y que no todos los organismos de la naturaleza se ajustan a los conceptos de especie postulados. Desde un punto de vista práctico quizás el concepto taxonómico sea el más apropiado para distinguir a los organismos ya que éste representa un procedimiento común de catalogar a los diversos grupos de organismos que se encuentran en la naturaleza y son morfológicamente distinguibles.

### 2.3. Fuentes de la variación genética en las poblaciones

La cantidad de variación genética que hay en una población depende de la información genética disponible, la cual está en función de los tipos de alelos de todos los loci, sus frecuencias entre los individuos y sus combinaciones particulares como genotipos. La cantidad y clase de variación genética en una población son potencialmente afectados por diferentes factores tales como la mutación, flujo genético (migración), recombinación, deriva genética y selección natural. Estos factores pueden tener efectos particulares, por ejemplo las mutaciones casi siempre incrementan la cantidad de variación, mientras que la deriva genética la reduce. La selección natural, el flujo genético y la recombinación pueden incrementar o reducir la variación genética dependiendo de la situación que enfrente la población en un momento dado. La combinación de dos o más de estos factores puede generar diferentes cantidades y patrones de variación (Ayala y King 1984; Marzocca, 1985).

La variación genética constituye la base de la evolución. Para que el cambio evolutivo tenga lugar, debe existir una fuente de variación genética y una fuerza impulsora. La selección natural constituye esta fuerza, y se ha definido como el mecanismo por el cual las poblaciones se modifican en respuesta al ambiente. La selección natural opera a través de la reproducción diferencial de ciertos genotipos. Los genotipos favorecidos son aquellos que tienen éxito reproductivo y por consecuencia contribuyen con una alta proporción de individuos en la siguiente generación. Las adaptaciones de las plantas que les permiten vivir exitosamente en determinados ambientes, involucran una combinación de los caracteres. La selección natural establece y preserva las combinaciones genéticas favorables que pueden ir desde el color de la

flor hasta los cambios que involucran el hábito de la planta (Marzocca, 1985; Mettler *et al.*, 1988).

EL flujo genético y la recombinación son consideradas como las fuentes principales e inmediatas de la variación genética. El flujo genético se describe como el intercambio de genes entre poblaciones que se cruzan (Mettler *et al.*, 1988; Marzocca, 1985).

La recombinación produce nuevos arreglos en los genes por medio de la fecundación cruzada y del intercambio (entrecruzamiento) de segmentos de los cromosomas homólogos, seguido de la distribución independiente de los cromosomas durante la meiosis. Muchas de las variaciones genotípicas y fenotípicas que se presentan en una población pueden atribuirse a la recombinación de las diferencias génicas que han existido en el sistema poblacional a lo largo de muchas generaciones (Marzocca, 1985).

La hibridación y la introgresión en los organismos son resultado de la recombinación genética. La hibridación natural proviene del flujo de genes entre individuos de poblaciones divergentes a niveles infraespecífico y específicos (Radford, 1986).

La deriva se refiere a cambios en las frecuencias genéticas debido a la variación en el muestreo de generación en generación. En teoría, en ausencia de selección natural, las frecuencias genéticas permanecerían relativamente constantes en las poblaciones naturales. Sin embargo las frecuencias genéticas pueden fluctuar debido al muestreo aleatorio de los genes que se transmiten en cada generación. Este efecto es mayor en las poblaciones pequeñas y aisladas, en estas poblaciones la deriva genética puede tener un papel importante al permitir

que los genotipos nuevos lleguen a ser más frecuentes de lo que regularmente permitiría la selección natural (Marzocca, 1985; Ayala y Kinger 1984).

La mutación es la ocurrencia de cambios heredables en el genotipo de un organismo que no es heredado de su ancestro y es considerada como la última fuente de la variación genética. Las mutaciones pueden ser pequeñas como es la sustitución de un simple par de nucleótidos en la molécula de ADN o mayores como cambios en la estructura o número de cromosomas (mutaciones puntuales o cromosómicas respectivamente). Las mutaciones cromosómicas pueden ser por: 1) la poliploidía o multiplicación de los juegos cromosómicos; 2) la aneuploía o pérdida o ganancia de cromosomas en el juego cromosómico y 3) los cambios en la estructura general, duplicaciones de segmentos cromosómicos, translocaciones o intercambio de segmentos cromosómicos entre cromosomas no homólogos o inversiones de segmentos de los cromosomas. Los cambios estructurales en los cromosomas no producen nuevos genes, pero su función radica en proporcionar combinaciones de genes únicas, nuevos arreglos en los genes y diferentes grupos de ligamento (Marzocca, 1985; Ayala y Kinger, 1984).

Si bien las mutaciones son consideradas la última fuente de variación en las especies, éstas proveen en forma abundante los recursos para la variación genética. Las mutaciones pueden originarse espontáneamente durante la replicación del ADN o inducirse por factores medioambientales como la radiación UV, compuestos químicos y altas temperaturas. Una mutación se define como un cambio en la secuencia de nucleótidos de un gen, que puede dar como resultado la producción de una proteína modificada con una secuencia de aminoácidos alterada o puede afectar el control de la síntesis del producto del gen. Si la proteína modificada difiere funcionalmente de la forma silvestre, puede ocasionar un cambio correspondiente en un

carácter observable y producir un organismo mutante. La diferencia puede encontrarse en la actividad o estabilidad enzimática, o puede afectar la función de la proteína como portador o componente estructural de la célula. La mutación es heredable y está sujeta a la selección natural. Las mutaciones constituyen la base para los cambios evolutivos. Las mutaciones que provocan cambios desventajosos a los individuos tienen poca probabilidad de manifestarse y perpetuarse, de tal manera que sus niveles son bajos en una población natural. Si un carácter fenotípico no es desventajoso, el mutante puede establecerse en una población junto con el tipo silvestre como un polimorfismo (Smith y Wood, 1998).

Las mutaciones génicas o puntuales son alteraciones en la secuencia de los nucleótidos, originadas por transición, transversión, inserciones o deleciones de bases. El papel de las mutaciones puntuales en el cambio evolutivo depende de la magnitud de su efecto sobre el organismo, la ventaja o desventaja adaptativa de los individuos mutantes, así como del papel del gen mutado en las interacciones entre la población y el ambiente.

A nivel de especie o entre especies la diversidad morfológica observada se ha atribuido a la acción de cambios en un gen o múltiples genes. Estudios genéticos han demostrado que cambios en patrones de crecimiento, estructura, forma, orientación en hojas, partes florales y frutos son gobernados por uno o dos genes, mientras que aquellas diferencias en la dimensión, peso y número son influenciados por múltiples genes (Gottlieb, 1984). Así por ejemplo en *Cucurbita pepo* se encontró que las diferencias entre un fruto aplanado y esférico se originan por cambios en un gen, mientras que en *Nicotiana tabacum* se observó que los alelos del locus *Sl* afectan la forma de diferentes órganos. El alelo dominante dirigió el incremento en longitud de peciolo, cáliz, anteras, lóbulos de la corola y alargamiento de las cápsulas,

mientras el alelo recesivo en estado homocigoto mostró efectos opuestos. Si bien en éstas y otras especies hay evidencias genéticas claras de algunos cambios morfológicos, aún existen problemas en la estimación del número de cambios genéticos responsables de la diversidad morfológica ya que en muchos casos las evidencias disponibles no permiten aclarar si una diferencia morfológica se debe a uno o más cambios genéticos (Gottlieb, 1984; Coyne y Lande, 1985).

En resumen, la variabilidad molecular originada por las diferentes fuentes de variación discutidas anteriormente se puede dividir básicamente en dos tipos: variación en proteínas y ácidos nucleicos. En el primer caso la variación puede manifestarse o atribuirse a la presencia o ausencia de una determinada proteína en un individuo, población o especie, diferencias en peso molecular, longitud (número de aminoácidos), la sustitución (o cambio) de un aminoácido por otro en ciertas posiciones de proteínas homólogas. Con respecto al ácido desoxirribonucleico la fuente primaria de la variación resulta de cambios en las secuencias de bases de las cadenas homólogas, estos cambios se pueden manifestar desde la variabilidad en sitios de restricción que refleja un patrón de segmentos de diferentes pesos moleculares, hasta diferencias de secuencias homólogas detectadas por medio de un secuenciador.

#### **2. 4. Detección de la variación genética**

La variación genética y la caracterización de las especies se han estimado generalmente con base a las características morfológicas. En los últimos años se ha incrementado el uso de los marcadores moleculares como una herramienta más en la caracterización de los individuos, ya que en casos como el de la evolución convergente, donde la morfología coincide aún

cuando las diferencias genéticas sean muy grandes es difícil definir a las especies únicamente en función de los caracteres morfológicos. Los marcadores moleculares considerados como un carácter adicional en los estudios taxonómicos a diferencia de los caracteres morfológicos, no están influenciados por el ambiente y proporcionan un número ilimitado de caracteres moleculares que pueden ser de gran valor en la diferenciación de especies y establecimiento de relaciones filogenéticas. Un marcador molecular se define como la secuencia de ADN o de proteína que puede ser fácilmente detectado y cuya herencia puede ser monitoreada. Este término hace referencia al polimorfismo de bandas obtenido a través de las técnicas moleculares isoenzimáticas o las basadas en el análisis del ADN.

La variación genética a nivel molecular puede ser detectada mediante el análisis directo del ADN o mediante el de sus productos genéticos, es decir analizando cambios en sus proteínas o enzimas. La variabilidad genética con base en los productos del ADN se ha determinado mediante análisis isoenzimáticos. Esta técnica involucra la separación electroforética de isoenzimas en geles de almidón o poliacrilamida, seguida de la tinción del gel con un substrato específico para la detección de la enzima. Esta metodología es relativamente económica, permite detectar varios loci en poco tiempo y detectar la herencia codominante. En organismos diploides, ambos alelos son claramente identificados y los heterocigotos pueden ser claramente distinguidos de los homocigotos, lo cual es un prerequisite para la estimación de frecuencia de alelos en estudios de genética de poblaciones (Weising *et al*, 1995). El análisis isoenzimático se ha utilizado para estimar la variabilidad genética interespecífica e intraespecífica, en estudios de estructura de poblaciones, delimitación de especies, y la caracterización de modelos de introgresión (Harrison, 1991). No obstante sus aplicaciones biológicas el análisis isoenzimático se ve limitado debido a que la

expresión de las isoenzimas es influenciada por el medio ambiente, así también porque su expresión puede ser temporal u órgano específica ya que los genes que las codifican sólo se expresan en estadios específicos del desarrollo y bajo determinadas condiciones medioambientales. Además de que el análisis isoenzimático sólo permite analizar una porción del genoma. A diferencia de las isoenzimas los marcadores moleculares basados en el ADN tienen la ventaja de que sus polimorfismos son mucho más abundantes, ya que se encuentran distribuidos por todo el genoma, tienen un mayor grado de reproducibilidad, no son afectados por condiciones ambientales y su expresión no está limitada a ciertos tejidos (Ramírez *et al.*, 1991).

#### **2.4.1. Metodologías utilizadas para la detección de polimorfismos del ADN**

En los últimos años se han desarrollado una gran variedad de técnicas para la detección de polimorfismos del ADN, las cuales difieren en su principio y su potencialidad para detectar niveles de variación genética, así como en otros factores tales como reproducibilidad y costo (Tabla 2), los cuales tienen que ser considerados para seleccionar la metodología que nos permita resolver el problema que se esté planteando resolver de manera satisfactoria.

Las técnicas utilizadas para la detección de polimorfismos se han dividido en los siguientes dos grupos: 1) Técnicas basadas en hibridación de ADN y 2) Las basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

#### **2.4.2. Técnicas basadas en hibridación de ADN**

Estas técnicas involucran el corte del ADN con enzimas de restricción, separación electroforética de los fragmentos de ADN de acuerdo a su tamaño y la detección de patrones

Tabla 2. Comparación de los marcadores moleculares más comúnmente utilizado

Características	RFLP	RAPD	Microsatélites	AFLP
Tipo de sonda	ADN	Iniciadores 10 pb	Secuencias repetidas específicas de ADN	Secuencias específicas de ADN
Polimorfismo	medio	alto	alto	Muy alto
Detección de alelos	si	no	si	no
Nº de loci detectados	1-3	1-10	1-5	50-100
Genoma analizado	parte del genoma	genoma completo	genoma completo	genoma completo
Herencia	codominante	dominante	codominante	dominante
Dificultad	intermedia	simple	simple	intermedia
Reproducibilidad	alta	intermedia	alta	alta
Cantidad de ADN	2-30 µg	1-10 ng	50-100 ng	100 ng
Radioisótopos	si	no	no	si
Costo	alto	intermedio	alto	alto
Tiempo	intermedio	rápido	rápido	intermedio

Tomado de Demeke, *et al.*, 1997.

polimórficos por hibridación con una secuencia específica de ADN marcada con algún elemento radiactivo. En este grupo se incluyen los RFLP, los cuales se generan por rearrreglos en el genoma que originan alteraciones en los sitios de reconocimiento para la endonucleasa que se utiliza en la digestión (Figura 1). Los RFLP expresan herencia codominante, permiten detectar alelos, son altamente reproducibles y detectan polimorfismo intermedio. Este tipo de marcadores han sido utilizados para localizar genes específicos, para discriminar individuos muy relacionados y para establecer mapas genómicos (Demeke *et al.*, 1997).

#### **2.4.3. Técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa**

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue desarrollada por Mullis en 1985. Esta técnica se aplicó exitosamente en el diagnóstico clínico de pacientes con anemia falciforme y desde entonces se ha utilizado en diferentes áreas de la ciencia. La metodología de PCR es el proceso bioquímico *in vitro* mediante el cual las cadenas complementarias individuales del ADN blanco son duplicadas por la enzima ADN polimerasa en cada uno de los ciclos (20 a 35) que integran la reacción y al final de cada uno las nuevas cadenas vuelven a ser duplicadas por la misma enzima obteniéndose así la producción exponencial de millones de copias de los segmentos de ADN específico sometidos al proceso (Figura 2). Para la reacción se requiere de ADN blanco, iniciadores (oligonucleótidos) específicos, los cuatro desoxirribonucleótidos, la enzima ADN polimerasa y cloruro de magnesio. Cada uno de los ciclos de la reacción consta de tres pasos (desnaturalización, alineamiento y extensión), determinados por temperaturas y tiempos específicos. En el paso de desnaturalización las cadenas complementarias del ADN blanco se separan o se desnaturalizan, empleando rangos de temperaturas de 92 a 98 °C y tiempos de 30 a 90 segundos. Sin embargo, generalmente se

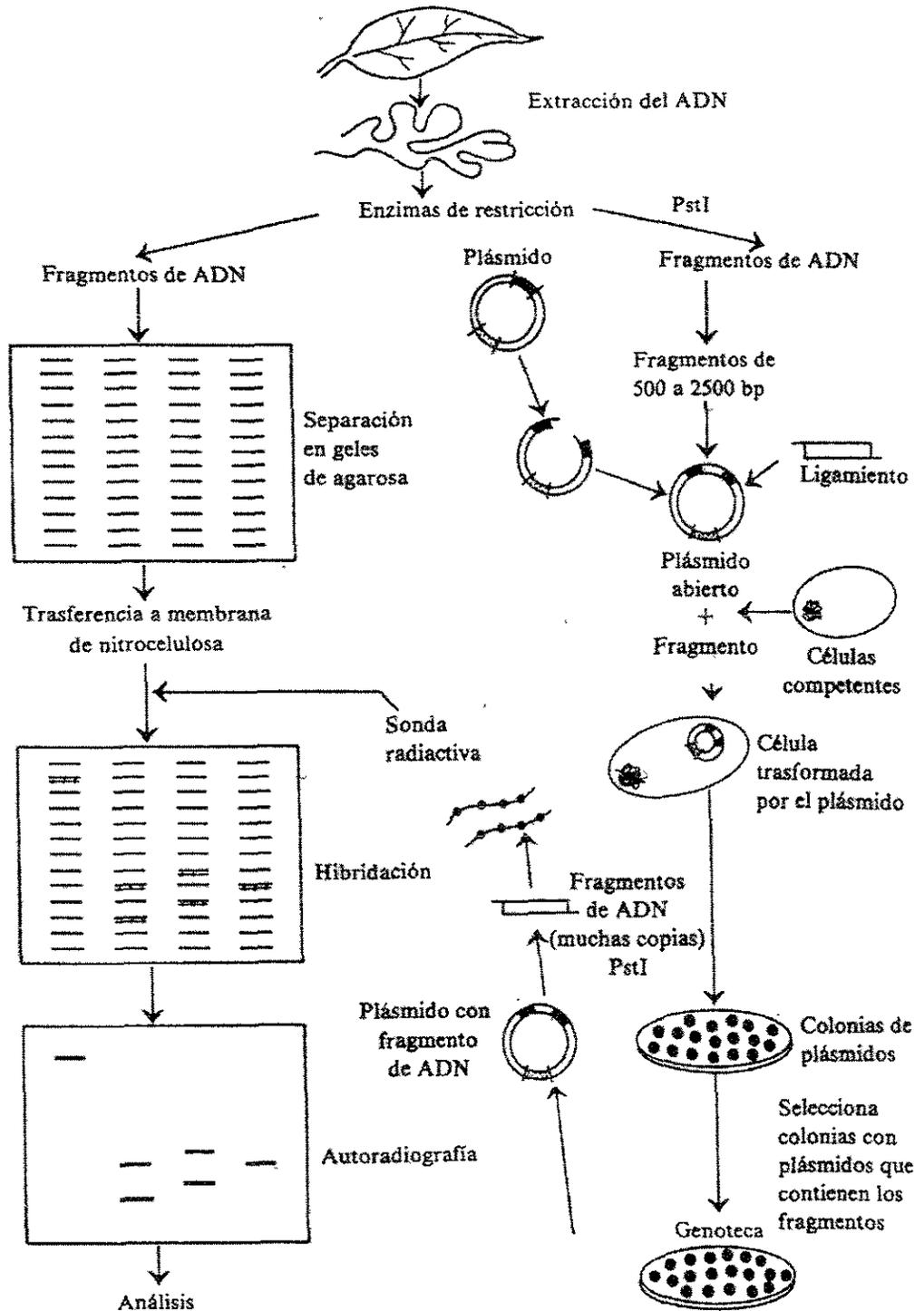


Figura 1. Secuencia del proceso de detección de los RFLPs. *PstI* = endonucleasa de restricción derivada de *Pseudomonas*. Tomado de Ramírez *et al.*, 1991.

utiliza la temperatura de 94°C y tiempos de 30 segundos, condiciones en que se ha demostrado se logra un balance adecuado que permite la completa disociación del ADN genómico sin afectar la actividad de la ADN polimerasa, ya que a temperaturas y tiempos mayores puede reducirse su actividad. En el paso de alineamiento se realiza el apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas del ADN blanco desnaturalizado. En este paso se pueden utilizar rangos de temperatura de 35 a 60 °C y tiempos de 30 a 60 s. Esta fase es considerada la más crítica, ya que a temperaturas muy bajas de alineamiento existe mayor probabilidad de que los iniciadores se apareen a regiones no específicas del ADN y puede originar inespecificidad en la amplificación. La temperatura de alineamiento se determina con base a la longitud del iniciador, contenido relativo de G-C, secuencia de los nucleótidos y estructura secundaria de los iniciadores. La temperatura óptima de alineamiento es la temperatura media de fusión ( $T_m$ ) de los oligonucleótidos o iniciadores, la cual se calcula con la siguiente fórmula:  $T_m = [2(A + T) + (G + C)]$ . El tiempo de duración de este paso está en función de factores tales como la estructura secundaria y la concentración del iniciador. En el paso de extensión la ADN polimerasa extiende la longitud de los iniciadores apareados al ADN blanco, al ir polimerizando los desoxinucleótidos libres lo cual dará origen a la formación de las nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas presentes al inicio de la reacción. En este último paso se utilizan rangos de temperatura de 70 a 74°C y tiempos de 30 a 90 s. (Palumbi,1996).

Con la sucesión de ciclos se logra una síntesis exponencial del segmento de ADN blanco cuyo tamaño se define desde los primeros ciclos de la reacción. La longitud del segmento amplificado por la PCR es resultado de la suma de la longitud del iniciado más la longitud del ADN blanco flanqueada por dos iniciadores.

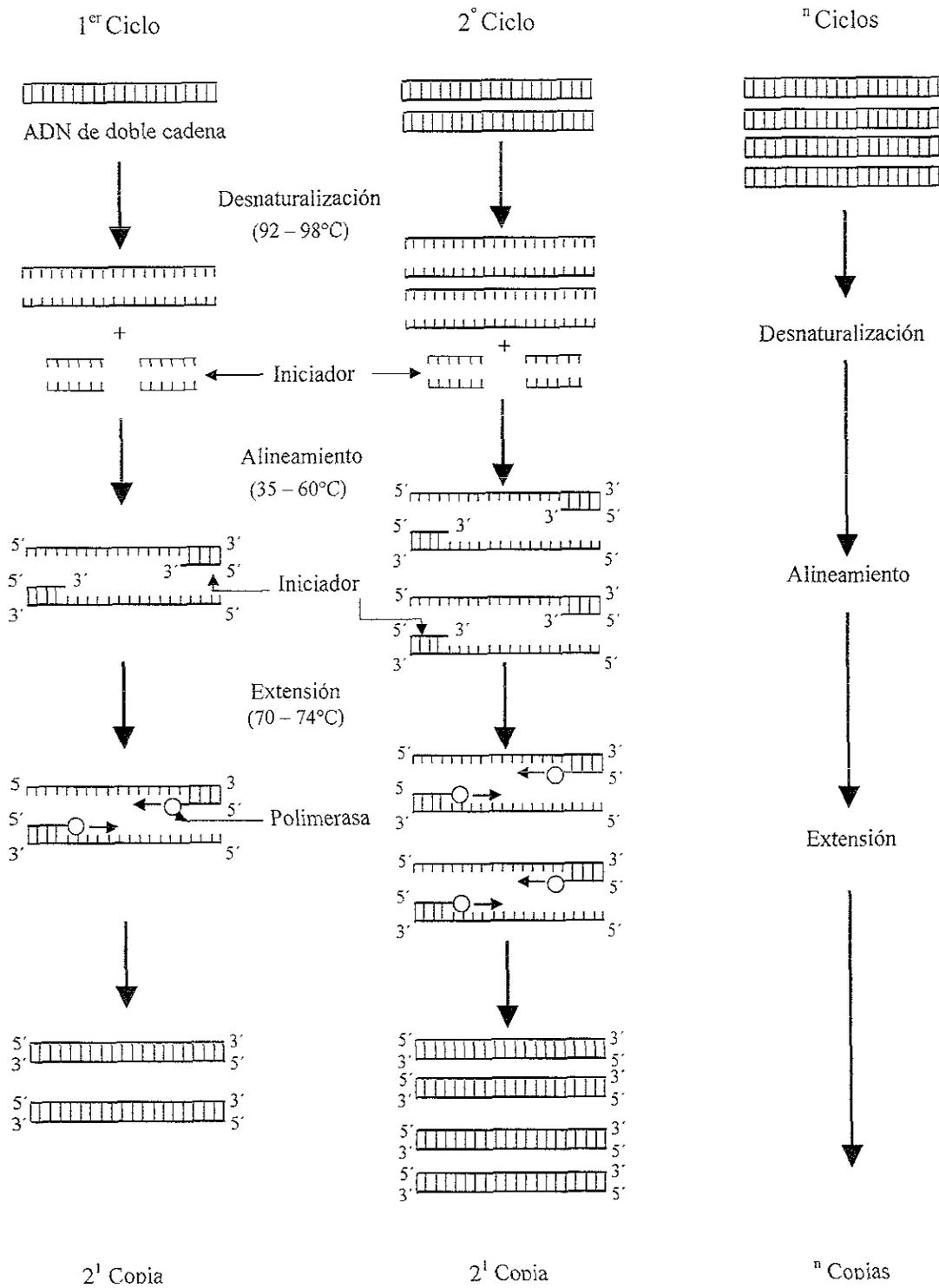


Figura 2. Secuencia de pasos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (modificado de Barnum, 1998) .

Las metodologías basadas en PCR involucran la amplificación *in vitro* de una secuencia particular de ADN con ayuda de un iniciador que puede ser aleatoria, semialeatoria o específica, la separación de los fragmentos amplificados y la detección de patrones polimórficos por métodos de tinción. En este grupo se incluyen las técnicas de RAPD, AP-PCR, DAF, microsatélites y AFLP entre otras.

#### **2.4.4. Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD)**

Esta metodología fue desarrollada simultáneamente por dos grupos de investigadores: 1) Williams y colaboradores (1990) del grupo de DuPont Co. (Wilmington, USA) quienes la denominaron Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), y 2) Welsh y McClelland (1990) del Instituto de Investigación de California USA, los cuales la llamaron Arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). Posteriormente Caetano-Anollés y colaboradores (1991) al realizar estudios de las huellas genómicas de plantas la nombraron DNA amplification fingerprinting (DAF).

En la metodología de RAPD a diferencia de la de PCR no se requiere conocer la secuencia del ADN blanco y para la amplificación del ADN genómico sólo se utiliza un iniciador con secuencias aleatorias de 10 nucleótidos. Los fragmentos se separan mediante electroforesis en geles de agarosa y se tiñen con bromuro de etidio para evidenciarlos. El polimorfismo obtenido de RAPD resulta de cambios en las secuencias del sitio de unión del ADN blanco con el iniciador originadas por mutaciones puntuales (inserciones y deleciones), las cuales impiden la asociación estable con el iniciador o producen cambios que alteran el tamaño del fragmento amplificado o pueden impedir la amplificación del ADN blanco. Con esta metodología es posible detectar herencia dominante y un alto grado de polimorfismo. Sin

embargo, no es posible detectar alelos y el grado de reproducibilidad entre laboratorios es intermedio debido a que los patrones de RAPDs pueden cambiar al modificarse la concentración de algunos de los componentes de la mezcla de reacción tales como el ion  $Mg^{2+}$ , ADN, iniciador y ADN polimerasa, así como las condiciones de amplificación (desnaturalización, alineamiento y extensión). Debido a este problema, al iniciar un estudio con una nueva especie o al cambiar de laboratorio es necesario estandarizar las condiciones experimentales de la técnica.

Esta técnica se ha utilizado para estimar variabilidad genética interespecífica (Wilkie *et al.*, 1993; Nkongolo, 1999; Shen *et al.*, 1998) o intraespecífica (Paran *et al.*, 1998; Fuentes *et al.*, 1999), en estudios taxonómicos para delimitación de especies y para el establecimiento de las relaciones filogenéticas (Demeke *et al.*, 1997; Weising *et al.*, 1995), estudios de hibridación e introgresión (Crawford *et al.*, 1993; Arnold *et al.*, 1991), resistencia a enfermedades (Martin *et al.*, 1991).

En la metodología AP-PCR se emplean iniciadores de 20 a 34 pb. Los fragmentos se separan en geles de poliacrilamida y se visualizan por autoradiografía y el grado de resolución es moderado.

La técnica de los DAF a diferencia de los RAPD se utilizan iniciadores aleatorios de 5 a 8 pb y se aplica un ciclo corto de alineamiento, dos temperaturas en el programa de amplificación en lugar de tres. Los fragmentos son separados en geles de poliacrilamida y visualizados con una solución de plata. Esta técnica es altamente reproducible y se ha utilizado para establecer mapas genéticos (Caetano-Anollés *et al.*, 1991).

### 2.4.5. Microsatélites

Microsatélites o SSR pueden constar de 2 a 6 nucleótidos pero generalmente constan de 2 a 3 secuencias de nucleótidos (CAT) que se repiten muchas veces, las cuales pueden variar en número y secuencia en los diferentes individuos. La principal ventaja que los microsatélites ofrecen para el análisis del genoma es su abundancia y dispersión en el ADN. Los microsatélites son marcas codominantes con un alto grado de polimorfismo y reproducibilidad. Con esta técnica se ha logrado detectar la diversidad genética de líneas de trigo muy relacionadas (Demeke *et al.*, 1997).

### 2.4.6. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados ( AFLP)

La técnica de AFLP es una combinación de las metodologías basadas en hibridación y PCR. Esta metodología involucra la digestión del ADN con dos endonucleasas (Eco R1 y Mse). Los fragmentos de restricción son ligados en sus extremos por dos diferentes adaptadores de doble cadena de 25 a 30 pb. Posteriormente se lleva a cabo una amplificación pre-selectiva utilizando para la reacción de PCR iniciadores específicos con una base extra en el extremo 3'. Finalmente los fragmentos resultantes de esta primera amplificación son sujetos a una segunda selección más rigurosa, en donde se consideran iniciadores con dos o tres bases extras (Figura 3). Los fragmentos resultantes de esta segunda amplificación son complementarios al iniciador y a las extensiones consideradas, razón por la cual sólo una porción del genoma fragmentado es amplificada en la reacción de AFLP. En esta técnica uno de los iniciadores es marcado radiactivamente y los fragmentos pueden ser detectados después de su separación en geles de poliacrilamida con autoradiografía. Esta técnica permite detectar herencia dominante, un alto grado de polimorfismo y reproducibilidad. Los AFLP se han

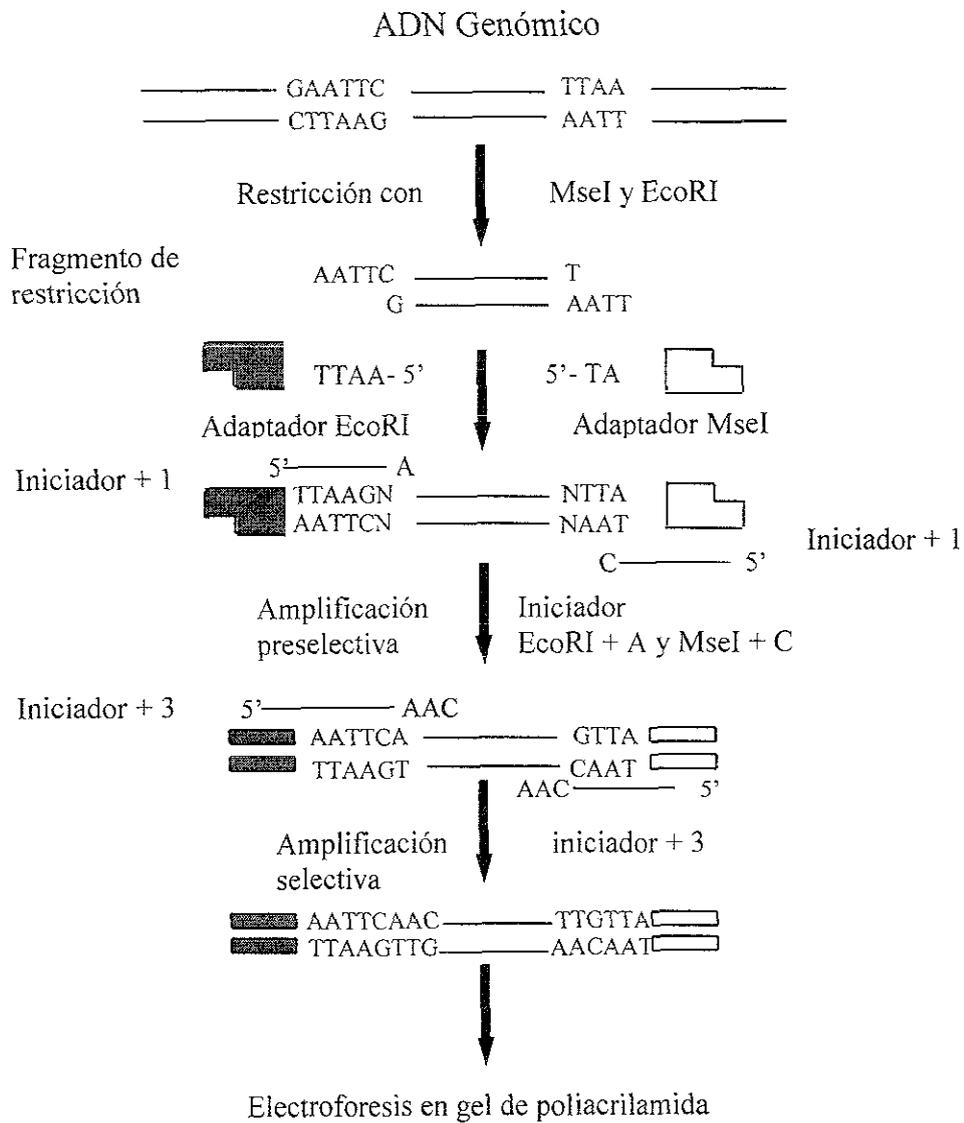


Figura 3. Estrategia general de la técnica de AFLP (modificado de Mueller y Wolfenbarger, 1999). Secuencias adaptadoras: MseI EcoRI

utilizado en estudios de diversidad genética, establecimiento de mapas genéticos e identificación de genes específicos ( Vos *et al.*, 1995; Demeke *et al.*, 1997), en estudios de variación genética y estructura de poblaciones (Muller *et al.*, 1999).

## **2.5. Construcción de dendrogramas a partir de datos moleculares aplicando la taxonomía numérica**

Los datos moleculares generados de los patrones isoenzimáticos, RFLP, RAPD, AFLP entre otros, son utilizados para el análisis del genoma y para hacer inferencias taxonómicas y filogenéticas. Los patrones de bandas observados después de la electroforesis son comparados entre los diferentes taxa, en la mayoría de estos estudios la similitud en patrones de bandas sugieren o indican un mismo genoma, mientras que patrones diferentes indican genomas diferentes. Las bandas son tratadas como características individuales (variables) y se registran como presentes (asignando valor de 1 ) o ausentes (asignando valor de 0) en los taxa analizados. Los datos resultantes son analizados utilizando los métodos numéricos aplicados en la taxonomía numérica.

La taxonomía numérica se define como el agrupamiento por métodos numéricos de unidades taxonómicas con base en el conjunto de sus caracteres o como un sistema de clasificación basado en la similitud total de los organismos (Sneath y Sokal, 1973; Sokal, 1986). La taxonomía numérica tiene como objetivo colocar a los taxa (género, especie etc.) o unidades taxonómicas operativas (OTU = Operationa Taxonomic Unit) en grupos con base en caracteres tales como tamaño, color, forma, secuencia de nucleótidos y patrón de bandas generados por las diferentes técnicas moleculares, usando métodos numéricos aplicados a los estados de los

caracteres o matrices de distancias entre ellos, para generar el árbol de relaciones de semejanzas o dendrograma.

La construcción de los dendrogramas puede realizarse a partir de caracteres cuantitativos o cualitativos. Los patrones de bandas (tamaño de fragmento o posición en el gel) y los caracteres morfológicos (como la forma de la hoja) son considerados caracteres cualitativos. Una vez definidos los caracteres, se codifican en una matriz básica de datos (MBD) para estimar el grado de similitud entre las OTU analizadas. Existen diferentes coeficientes para estimar el grado de similitud, la selección de uno u otro tipo dependerá de los caracteres utilizados y de la manera en que éstos se codifiquen. Entre los coeficiente más comúnmente utilizados se encuentran los siguientes:

1) Coeficientes de distancia: estos miden la distancia entre las OTU en espacios definidos de diferentes maneras. La medida más familiar de distancia es la euclidiana, la cual se basa en el teorema de Pitágoras, por lo que la distancia entre las OTU  $i$  y la OTU  $j$  estará dada por la siguiente ecuación:

$$d_{ij} = \sqrt{\sum_{k=1}^p (x_{ik} - x_{jk})^2}$$

donde  $d_{ij}$  representan la distancia entre las OTU's  $i$  y  $j$ ,  $x_{ik}$  el estado del carácter  $k$  para el OTU  $i$  y  $x_{jk}$  el estado del carácter  $k$  para el OTU  $j$ . Este tipo de coeficiente se recomienda cuando los caracteres son continuos o multiestado ordenados. Esta expresión considera que los caracteres no se encuentran correlacionados, lo cual no ocurre en la práctica, por lo que el empleo de estas

distancias no se justifica ya que representaría una medida inadecuada de las OTUs. Este problema puede resolverse realizando una transformación a componentes principales.

2) Coeficientes de asociación: En general estos coeficientes estiman coincidencia y diferencias en los estados de caracteres entre dos OTUs. Estos coeficientes requieren que los datos sean de tipo binario, aunque algunos como el Simple Matching Coefficient (SMC) puede utilizarse con datos multiestado cualitativos. Existe un gran número de coeficientes de asociación, entre los más utilizados está el mencionado anteriormente y el de Jaccard (Romesburg, 1984).

El SMC se calcula de la siguiente manera:

$$C_{jk} = \frac{a + d}{a + b + c + d} \quad 0.0 \leq C_{jk} \leq 1.0$$

donde  $C_{jk}$  indica el grado de similitud entre las OTU's  $j$  y  $k$ ,  $a$  es el número de caracteres en el cual el mismo estado es compartido por ambas OTU (1, 1),  $b$  es el número de caracteres en los cuales un estado es poseído por la primera OTU pero no por la segunda (1, 0),  $c$  es el número de caracteres en los cuales un estado está ausente en la primera OTU pero no en la segunda (0, 1) y  $d$  es el número de caracteres en los cuales el mismo estado está ausente en ambas OTU (0, 0). Este coeficiente da el mismo peso al número de coincidencias  $a = (1, 1)$  y  $d = (0, 0)$ . El máximo valor de  $C_{jk} = 1.0$  indica una similitud perfecta, la cual ocurre cuando  $b = c = 0$ .

El coeficiente de Jaccard excluye las coincidencias negativas y al igual que el anterior varía en su magnitud de 0 a 1. Este coeficiente se define de la siguiente manera:

$$C_{jk} = \frac{a}{a + b + c} \quad 0.0 \leq C_{jk} \leq 1.0$$

Este coeficiente representa la proporción del número de coincidencias negativas contra el total del número de caracteres, menos el número de coincidencias negativas. En este coeficiente *d* se omite del cálculo por considerar ilógico que exista similitud entre las OTU por la ausencia de una característica.

3) Coeficientes de correlación: Estos coeficientes cuantifican la similitud a partir de la separación angular formada por dos líneas que parte del origen de las coordenadas y pasa por las OTU *i* y *j*. El coeficiente de Pearson está en función de esos ángulos y representa la correlación producto- momento. Está representado por la ecuación siguiente:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_{ik} - \bar{x})(x_{ij} - \bar{x}_i)}{\sqrt{\left[ \sum_{i=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_i)^2 \right] \left[ \sum_{i=1}^n (x_{ik} - \bar{x}_k)^2 \right]}}$$

Donde  $\bar{x}_j$  es la media de todos los valores de los estados de las OTU *j* y  $\bar{x}_k$  es la media de todos los valores de los estados de la OTU *k*. Los valores de este coeficiente oscilan entre 1 y -1 para la máxima y la mínima respectivamente (Kohlmann, 1994).

Una vez calculados los índices de similitud utilizando cualquiera de los coeficientes expuestos anteriormente se efectúan los análisis de agrupamiento, los cuales representan las similitudes obtenidas de la matriz de unidades taxonómicas bajo un arreglo en forma de árbol llamado dendrograma. Los métodos de agrupamiento sintetizan la información de la matriz de

similitud y arregla a las OTU de una manera jerárquica sin solapamientos por medio de algoritmos SAHN (secuenciales, aglomerativos, jerárquicos, excluyentes). Existen varias técnicas para formar los algoritmos, los métodos más comúnmente utilizados son las técnicas jerárquicas aglomerativas. Estos métodos se basan en una serie de fusiones sucesivas en donde las OTU se fusionan en grupos. Estas técnicas requieren para operar una matriz de proximidad inter-OTU, en donde cada OTU se considera un agrupamiento de un único miembro. Se comienza por agrupar a las dos OTU de máxima similitud (o distancia menor), posteriormente se calculan las proximidades de cada OTU restante con este primer grupo de dos miembros de acuerdo con un algoritmo específico, el proceso continúa hasta que todas las OTU lleguen a formar un sólo agrupamiento. Entre los métodos más comúnmente utilizados se encuentran los siguientes:

1) Método de ligamiento promedio (UPGMA, Unweighted Pair-group Method using arithmetic Averages) define la proximidad entre dos agrupamientos como el promedio entre todos los pares de las OTU que conforman uno de los agrupamientos (Kohlmann, 1994; Romesburg, 1984).

2) Método de ligamiento de centroides (UPGMC, Unweighted Method using Centroids) define la proximidad entre dos grupos como la distancia entre los centroides (medias aritméticas) de los dos grupos, es decir cada grupo es representado para efectos de agrupamiento, por un punto que es la media aritmética de los elementos de dicho grupo (Kohlmann, 1994; Romesburg, 1984).

3) Método de ligamiento simple o del vecino más cercano. En este caso la distancia entre dos grupos se calcula como el mínimo de las distancias entre todos los posibles pares de elementos en ambos grupos (Romesburg, 1984).

4) Método de ligamiento completo o del vecino más lejano. En este método la distancia entre dos grupos es definida como el máximo de las distancias entre todos los posibles pares de entidades en los dos grupos (Romesburg, 1984).

De estos métodos el más recomendado es el UPGMA porque puede usarse con cualquier coeficiente de similitud y juzga la similitud entre pares de grupos de manera menos extrema o drástica que los otros.

### III. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Material biológico y sitios de colecta

En terrenos de la Universidad del Norte de Guanajuato, ubicada en Dolores Hidalgo Guanajuato, México (población 1) y en la localidad de Santiago de Anaga, Hidalgo (población 2), México, fueron colectados, por población hojas de 60 árboles adultos de *P. laevigata* seleccionados al azar dentro de una área de 5 Ha, en la que se trazaron cuadrantes de 25 X 25 m<sup>2</sup> en diferentes sitios. También se colectaron hojas de 15 ejemplares de referencia ( caracterizados taxonómicamente) de *P. glandulosa* en el estado de Chihuahua , *P. juliflora* en Culiacán Sinaloa y de un ejemplar de *P. leavigata* en el Jardín Botánico de la Universidad Nacional Autónoma de México. La localización de los sitios de colecta de las poblaciones e individuo de referencia se muestra en Figura 4. En todos los casos especímenes de herbario fueron colectados y posteriormente depositados en el herbario de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las hojas colectadas se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta el momento de procesarse.

#### 3.2. Aislamiento del ADN

El ADN genómico de las plantas fue aislado a partir de 2g de tejido foliar siguiendo el método de Dellaporta (1983) modificado como se describe a continuación:

1. Adicionando nitrógeno líquido, 2g de tejido foliar fresco fue macerado en un mortero previamente congelado a -20 °C.

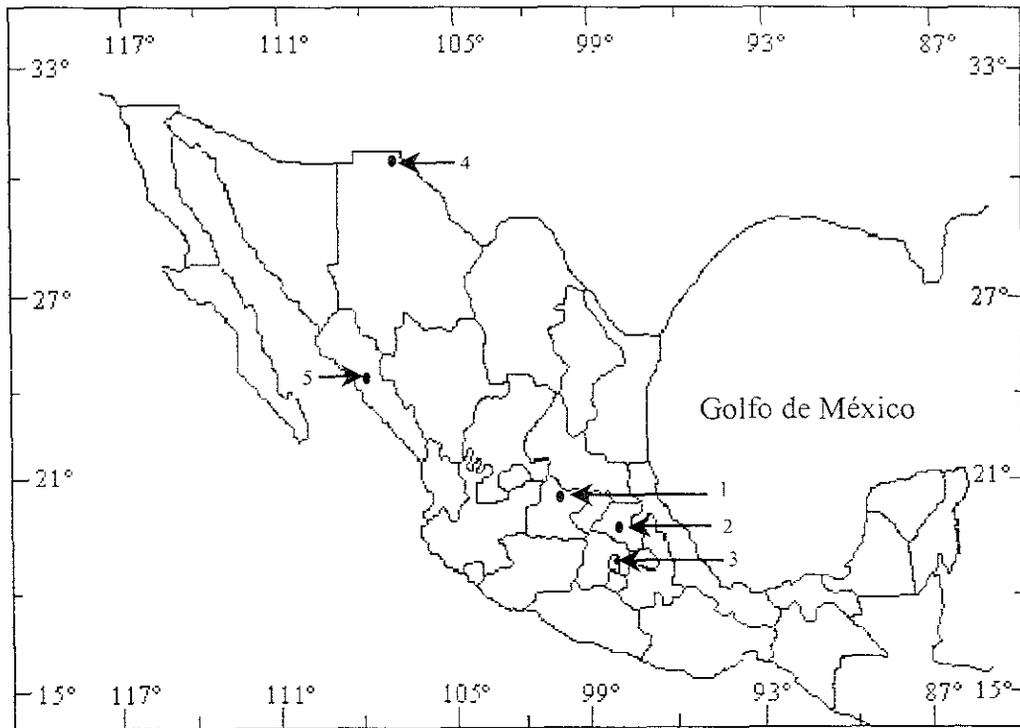


Figura 4. Mapa de la República Mexicana que muestra la localización geográfica de los ejemplares analizados. (1) población silvestre de *Prosopis*, Dolores Hidalgo Gto, (2) población silvestre de *Prosopis*, Santiago de Anaga Hidalgo. , (3) *P. laevigata*, Jardín Botánico de la UNAM, México D.F., (4) *P. glandulosa*, Ciudad Juárez Chihuahua. , (5) *P. juliflora*, Culiacá Sinaloa.

2. La muestra pulverizada se transfirió a un tubo Falcon de 50 mL de capacidad, se agregaron 20 mL de amortiguador de extracción (500 mM de NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA, 1.3 % de SDS, 0.2 % de  $\beta$ -Mercaptoetanol y 1% de polivinilpirolidona) y se incubó a 65 °C durante 15 min. Posteriormente se agregaron 6.5 ml de la solución A (5 M de acetato de potasio), mezclando suavemente y se incubó en hielo escarchado por 30 min.
3. Las muestras se centrifugaron a 10 °C durante 30 min. a 4000 rpm.
4. El sobrenadante se transfirió a otro tubo Falcon y se adicionaron 25 mL de isopropanol frío e incubó a -20 °C por 60 min.
5. Con un gancho de vidrio se transfirió el ADN a un tubo Eppendorf de 1.5 mL de capacidad. Inmediatamente se agregaron 700  $\mu$ L de solución B (50 mM de Tris-HCl pH8, 10 mM de EDTA) y 4  $\mu$ L de una solución de RNasa (10 mg/mL) mezclando suavemente y se incubó a 37 °C por 2 horas
6. La reacción enzimática se detuvo agregando 75  $\mu$ L de acetato de sodio 3M y 500  $\mu$ L de isopropanol frío e incubando a -20 °C durante 2 horas.
7. Con un gancho de vidrio el ADN se colectó y transfirió a otro tubo Eppendorf de 1.5 mL de capacidad, después se lavó dos veces con etanol al 80%.
8. Las muestra o muestras se mantuvieron en un desecador con vacío durante 12 h, posteriormente el ADN se resuspendió en 0.5 mL de TE pH 8 (10 mM de Tris-HCl pH 8 y 1 mM de EDTA) y se guardó a 4 °C.

### **3.3. Determinación de la pureza y concentración del ADN**

La pureza y concentración del ADN se determinó por métodos espectrofotométricos. Para determinar la pureza de las preparaciones se tomaron muestras alícuotas de 10  $\mu$ L y se

disolvieron en 1.5 mL de agua destilada estéril. Posteriormente se determinaron las lecturas a longitudes de onda de 260 y 280 nm, en un espectrofotómetro Spectronic 2000. Con el cociente obtenido entre estas lecturas se estimó la pureza de los ácidos nucleicos en cada una de las muestras (Tabla 1A, y 2A del apéndice). Los valores entre 1.8 y 2.0 de densidad óptica (DO) indican alto grado de pureza. Considerando que la concentración de ADN de una solución puede ser determinada con los valores de absorbencia a 260 nm ( $A_{260}$ ) y que un valor de  $1.0 A_{260} = 50 \mu\text{g/mL}$  de ADN, la concentración de ADN en las muestras se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración ADN } (\mu\text{g/mL}) = \left( \frac{1500 \mu\text{L}}{x \mu\text{L}} \right) \left( \frac{50 \mu\text{g}}{\text{mL}} \right) \text{DO}_{260}$$

Donde:

$x$  = volumen de ADN usado

1500  $\mu\text{L}$  = volumen de agua utilizado para disolver la muestra de ADN. EL volumen puede variar en función de la capacidad de las celdas utilizadas para medir la absorbencia.

50  $\mu\text{g/mL}$  = concentración de ADN determinada para un valor de  $1.0 A_{260}$

$\text{DO}_{260}$  = valor obtenido en las muestras a esta longitud de onda.

### 3.4. Evaluación del grado de integridad del ADN

El grado de degradación del ADN se estimó mediante la separación electroforética de las muestras de ADN en geles de 0.8 % de agarosa. La electroforesis fue realizada a 40 Voltios y 40 Amperes, durante 4 h (tiempo en que el frente del gel recorrió seis cm.), en amortiguador 1X TAE. Utilizando una fuente de poder LKB 2103 (Biochrom) y una cámara de electroforesis

horizontal. En los posos del gel se carga un volumen de 25  $\mu\text{L}$ . Este volumen estuvo constituido por 5  $\mu\text{L}$  de la muestra de ADN, 5  $\mu\text{L}$  de colorante de carga (50 % de glicerol, 1 % de azul de bromofenol y 1% de xilen cianol) y 15  $\mu\text{L}$  de amortiguador TE, pH 8. Para evidenciar el ADN el gel se colocó en una charola de plástico (20 x 20 cm) y se sumergió en una solución de bromuro de etidio (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 30 minutos, posteriormente se colocó sobre un transiluminador de luz ultravioleta (UV). El ADN de alto peso molecular aparece como una banda compacta y el ADN degradado presenta un barrido de bandas a lo largo del carril.

### 3.5. Optimización de la concentración de $\text{Mg}^{2+}$ y ADN

Antes de iniciar los análisis de RAPD del ADN de las muestras de las dos poblaciones y de los ejemplares utilizados como patrones de referencia se realizaron pruebas de estandarización (tres repeticiones independientes) utilizando diferentes concentraciones de ADN y  $\text{Mg}^{2+}$  (Tabla 3) para determinar las concentraciones óptimas para la reacción de polimerización en cadena.

### 3.6. Amplificación del ADN

Después de definir las concentraciones óptimas de la mezcla de reacción se efectuó la amplificación con 22 iniciadores (Tabla 4) en cuatro muestras de ADN en las que se incluyó el del ejemplar de referencia *P. laevigata* del jardín botánico, para seleccionar los mejores iniciadores basándose en la intensidad, tamaño y número de productos amplificados. Posteriormente con los iniciadores seleccionados se realizó la amplificación de las muestras de ADN de las dos poblaciones de mezquite y de los ejemplares de referencia de las tres especies de *Prosopis*. Para los ensayos de amplificación de los ejemplares de las tres especies utilizadas

Tabla 3. Mezclas de reacción para preparar una reacción utilizando el mismo iniciador y diferentes concentraciones de  $Mg^{2+}$  y ADN

	Mezcla de reacción			
	A	B	C	D
	( $\mu L$ )			
H <sub>2</sub> O destilada estéril	7.0	6.0	6.5	5.5
dNTPs (200 $\mu M$ )	10	10	10	10
Amortiguador PCR 10x	2.5	2.5	2.5	2.5
Taq ADN polimerasa	0.3	0.3	0.3	0.3
Iniciador (20 pmol)*	2.2	2.2	2.2	2.2
2 mM	1.0	1.0		
MgCl <sub>2</sub>				
3 mM			1.5	1.5
40 ng	2.0	2.0		
ADN				
60 ng			3.0	3.0
Volumen final			25	

\* El iniciador tenía una concentración inicial de 9.1 pmol /  $\mu L$

Tabla 4. Secuencias de los iniciadores utilizados en este trabajo

Número	Nombre del iniciador	Secuencia (5' - 3')
1	GIBCO 1	GGT GCG GGA A
2	GIBCO 2	GTT TCG CTC C
3	GIBCO 3	GTA GAC CCG T
4	GIBCO 4	AAG AGC CCG T
5	GIBCO 5	AAC GCG CAA C
6	GIBCO 6	CCC GTC AGC A
7	ROTH-H 01	GGT CGG AGA A
8	ROTH-H 02	TCG GAC GTG A
9	ROTH-H 03	AGA CGT CCA C
10	ROTH-H 04	GGA AGT CGC C
11	ROTH-H 05	AGT CGT CCC C
12	ROTH-H 06	ACG CAT CGC A
13	ROTH-H 07	CTG CAT CGT G
14	ROTH-H 12	ACG CGC ATG T
15	ROTH-H 13	GAC GCC ACA C
16	ROTH-G 02	GGC ACT GAG G
17	ROTH-G 04	AGC GTG TCT G
18	ROTH-G 06	GTG CCT AAC C
19	ROTH-G 08	TCA CGT CCA C
20	ROTH-G 09	CTG ACG TCA C
21	ROTH-G 15	ACT GGG ACT C
22	ROTH-G 18	GAA TCG GCC A

como referencia, se preparó para cada especie una mezcla de ADN poniendo cantidades iguales del ADN purificado de los 15 individuos colectados. En el caso de *P. laevigata* esta mezcla se conformó con el ADN aislado del ejemplar del jardín botánico y con el de 14 individuos de la población de Dolores Hidalgo. En todos los casos la mezcla de reacción contenía en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  (Tabla 5): 10 mM de Tris HCl pH 8, 50 mM de KCl (amortiguador 10x de la taq polimerasa), 3mM de  $\text{MgCl}_2$  (Gibco), 200  $\mu\text{M}$  de cada dNTP (Gibco), 20 pmol de primer ( Roth o Gibco ), 1.5 unidades de Taq ADN polimerasa, 60 ng de ADN y agua destilada estéril (Gibco). A la mezcla de reacción se le agregaron con 20  $\mu\text{L}$  de aceite mineral para evitar la evaporación. La amplificación se efectuó en un termociclador MJ Research modelo PTC 100, programado con un ciclo inicial de desnaturalización de 1 min. a 94 ° C. Seguido de 38 ciclos cada uno con un paso de desnaturalización a 94 °C ( por 30 s. del ciclo 1 al 3 y de 15 s. del ciclo 4 al 38), alineamiento a 35 °C por 30 s. y extensión a 72 °C por 1. 30 min.

Tabla 5. Mezcla de reacción para una muestra.

Compuesto	Concentración	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
H <sub>2</sub> O destilada estéril		3.2
Mezcla de dNTPs	200 $\mu\text{M}$	10.0
Amortiguador PCR	10X	2.5
$\text{MgCl}_2$	3 mM	1.5
Iniciador Roth	20 pmol	2.5
ADN polimerasa	1.5 Unidades	0.3
ADN	100 ng	5.0
		Vf = 25.0

### 3.7. Separación e identificación de los productos amplificados

Los productos amplificados fueron separados mediante electroforesis en geles de 1.2 % de agarosa. La electroforesis se realizó a 60 Voltios y 60 Amperes, durante 4 h (tiempo en que el frente del gel recorre ocho cm.) utilizando una fuente de poder LKB 2103 (Biochrom) y una cámara de electroforesis horizontal. En los posos del gel se depositaron las muestras que contenían, en un volumen de 25  $\mu\text{L}$ , 20  $\mu\text{L}$  de la muestra amplificada y 5  $\mu\text{L}$  de colorante de carga. Para la electroforesis se utilizó el amortiguador TAE 1X. Para evidenciar las bandas los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio durante 30 minutos, posteriormente fueron fotografiados y capturados en computadora utilizando el Molecular Analyst/PC gel documentatation, version 1.4.1 de Bio-Rad. Un marcador de 100 pb (Gibco) se utilizó como referencia de pesos moleculares.

### 3.8. Análisis de agrupamiento

El tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos con los RAPD fue calculado a partir de una curva estándar generada de los fragmentos de tamaño conocido del marcador de 100 pb. Después de definir los pesos moleculares de los patrones de bandas generados con los diferentes iniciadores se construyó una matriz en la que se codificó presencia (1) o ausencia (0) de bandas de ADN. En esta matriz los fragmentos obtenidos con los diferentes iniciadores se agruparon de mayor a menor número de pares de bases (Tabla 3A, 4A y 5A del apéndice). El análisis de agrupamiento se efectuó con el método UPGMA y el coeficiente de similitud de Jaccard usando el software NTSYS-PC versión 1.8 (Rohlf, 1993). Para el análisis de las dos poblaciones estudiadas así como para el de las tres especies utilizadas como patrones de referencia las matrices se construyeron en forma independiente.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1. Evaluación de la pureza y calidad del ADN

Al determinar la pureza del ADN de las muestras de *Prosopis*, mediante la relación de longitud de onda 260 /280 nm, se encontraron valores de 1.4 a 2.0 (Tabla 1A y 2A del apéndice). Si bien los valores en el 100% de las muestras no estuvieron en el rango de 1.8 a 2.0, el cual es indicativo de un alto grado de pureza de los ácidos nucleicos, los valores obtenidos se consideran aceptables para utilizarse en la técnica de RAPD, dado que ésta no requiere alto grado de pureza del ADN y los valores inferiores a 1.8 indican que la contaminación es por restos de proteínas, lo cual a diferencia del SDS y fenol (valores superiores a 2.0 indican contaminación con estos compuestos) no interfieren con la reacción de PCR (Roux, 1995). Al evaluar la integridad o calidad del ADN en los geles de agarosa se observó que en la mayoría de las muestras el ADN se resolvió en una banda más o menos uniforme y en muy pocos casos se observó un alto grado de barrido a lo largo del gel de agarosa. En las muestras en que se observó un alto grado de degradación y valores de pureza inferiores a 1.6 se realizó nuevamente el aislamiento de ADN. Estos resultados muestran que el método de Dellaporta (1983) en esta especie permite obtener muestras de ADN con un alto grado de pureza e integridad.

### 4.2. Optimización de la concentración de $Mg^{2+}$ y ADN

Al iniciar experimentos de PCR con una nueva especie o al cambiar de laboratorio, se requiere uniformar las condiciones de reacción de PCR debido a que el número,

reproducibilidad, tamaño e intensidad de los fragmentos generados mediante esta técnica dependen de factores tales como la concentración de ADN,  $Mg^{2+}$ , iniciador y ADN polimerasa, así como de las condiciones de amplificación (temperatura de desnaturalización, alineamiento y extensión). En el presente trabajo únicamente se definieron las concentraciones óptimas de ADN y  $Mg^{2+}$ , ya que estos factores se consideran extremadamente críticos en la reacción de PCR.

En los experimentos en los que se analizó la influencia de la concentración de ADN y  $Mg^{2+}$  se observó que a concentraciones de 40 ng y 2 mM respectivamente, la resolución de los fragmentos fue muy deficiente. Esta respuesta posiblemente se deba a que a bajas concentraciones de ADN se reduzca la iniciación de la amplificación, lo cual ocasiona una ineficiencia en los eventos de alineamiento (Welsh y McClelland, 1990). La deficiencia en la resolución de las bandas también pudo deberse a que a bajas concentraciones del ion  $Mg^{2+}$  se disminuye la actividad del ADN polimerasa, lo cual puede afectar el proceso de extensión. Sin embargo al aumentarse la concentración del ion  $Mg^{+2}$  (3 mM) y ADN (60 ng) se observó un mejoría en la resolución de bandas, a la vez que también se incrementaron (Figura 5), posiblemente a altas concentraciones se incrementa la estabilidad entre la hibridación del iniciador y el ADN.

### 4.3. Selección de los iniciadores

De los 22 iniciadores probados en la amplificación del ADN de las cuatro muestras en las que se incluyó el ejemplar de referencia identificado taxonómicamente de *P. laevigata*, con

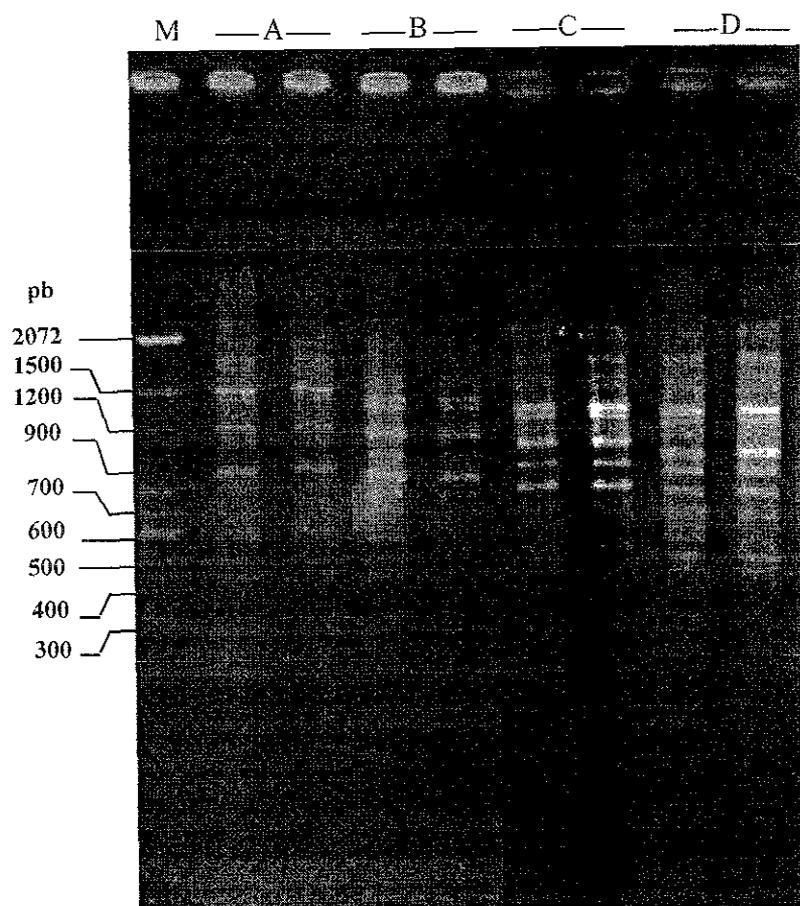


Figura 5. Patrón de bandas obtenido en *P. laevigata* utilizando diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub> y ADN. A (2 mM MgCl<sub>2</sub>; 40 ng de ADN), B (2 mM MgCl<sub>2</sub>; 60 ng ADN), C (3 mM MgCl<sub>2</sub>; 40 ng ADN), D (3 mM MgCl<sub>2</sub>; 60 ng ADN), M (marcador).

17 iniciadores (Tabla 6) se observaron patrones con buena resolución y un alto grado de reproducibilidad. Sin embargo, para estimar la variabilidad genética de los 60 genotipos de cada una de las poblaciones analizadas y el ejemplar de referencia *P. laevigata* se seleccionaron los cinco iniciadores (7,8, 9, 17 y 18) en los que se observó el mayor número de bandas, así como el más alto grado de resolución y reproducibilidad. Para el análisis de las tres especies utilizadas como patrones de referencia, se utilizaron los 17, con la idea de detectar el mayor número de fragmentos polimórficos para diferenciarlas con mayor claridad. Aunque todos los iniciadores tenían una longitud de 10 pb y 60 a 70% de GC (Tabla 6), características recomendadas para temperaturas de alineamiento de 34 a 37°C en RAPD-PCR. Es posible que en los iniciadores en los que observó el mayor número de bandas, resolución y reproducibilidad, existiera un mayor porcentaje de homología de sus secuencias con las del ADN blanco en donde se inicia la polimerización y que la temperatura de alineamiento utilizada favoreció la estabilidad en el alineamiento de estos iniciadores con el ADN. También es posible que otras características de los iniciadores influyeran, ya que la temperatura de alineamiento para las reacciones de PCR se define por la longitud, contenido de GC y orden de los nucleótidos en el iniciador (Hoelzel y Green, 1992; Guevara-García et al., 1997)

#### **4.4. Análisis de la variación genética en la población de Dolores Hidalgo Guanajuato**

Para el estudio de la variabilidad genética de la población silvestre de *P. laevigata* de Dolores Hidalgo, Guanajuato (población 1), se seleccionaron de los 22 iniciadores probados el 7, 8, 9, 17 y 18 (Tabla 6) para analizar los 60 genotipos de la población así como un ejemplar de *P. laevigata* plenamente caracterizado taxonómicamente. En el análisis de RAPD de los 61

Tabla 6. Secuencias y porcentaje de GC (%) de los iniciadores utilizados en este trabajo.

Número	Nombre del iniciador	Secuencia (5' - 3')	GC (%)
1*	GIBCO 1	GGT GCG GGA A	70
2*	GIBCO 2	GTT TCG CTC C	60
3*	GIBCO 3	GTA GAC CCG T	60
4*	GIBCO 4	AAG AGC CCG T	60
5*	GIBCO 5	AAC GCG CAA C	60
6*	GIBCO 6	CCC GTC AGC A	70
7*	ROTH-H 01	GGT CGG AGA A	60
8*	ROTH-H 02	TCG GAC GTG A	60
9*	ROTH-H 03	AGA CGT CCA C	60
10	ROTH-H 04	GGA AGT CGC C	70
11	ROTH-H 05	AGT CGT CCC C	70
12	ROTH-H 06	ACG CAT CGC A	60
13	ROTH-H 07	CTG CAT CGT G	60
14*	ROTH-H 12	ACG CGC ATG T	60
15*	ROTH-H 13	GAC GCC ACA C	70
16*	ROTH-G 02	GGC ACT GAG G	70
17*	ROTH-G 04	AGC GTG TCT G	60
18*	ROTH-G 06	GTG CCT AAC C	60
19*	ROTH-G 08	TCA CGT CCA C	70
20*	ROTH-G 09	CTG ACG TCA C	60
21*	ROTH-G 15	ACT GGG ACT C	60
22	ROTH-G 18	GAA TCG GCC A	60

\* Iniciadores seleccionados que presentaron patrones bien definidos.

individuos analizados con los cinco iniciadores seleccionados se detectaron un total de 47 bandas bien definidas y reproducibles de las cuales el 5% fueron polimórficas. Los patrones amplificados mostraron fragmentos de entre 6 a 15 bandas por iniciador con un rango de tamaños de entre 450 a 2250 pb. En la Figura 6 se muestra el polimorfismo de RAPD observado en algunas de las muestras analizadas. Con los 47 fragmentos detectados se generó la matriz (Tabla 3A del apéndice) para obtener el dendrograma que muestran la relaciones de similitud entre los fenotipos. El dendrograma se desarrollo usando el coeficiente de similitud de Jaccard y el análisis de agrupamiento UPGMA. En la Figura 7 se muestra que el ejemplar de referencia *P. laevigata* y los 60 individuos de mezquite de la población fueron agrupados en 2 grupos principales (A, B) por un coeficiente de similitud de 0.94. El grupo A estuvo constituido por el 66% del total de los fenotipos (individuos), los cuales fueron separados en 4 subgrupos (a, b, c, d). El ejemplar caracterizado taxonómicamente como *P. laevigata*, utilizado como patrón de referencia en este estudio coincidió con los individuos del subgrupo más numeroso (a) el cual estuvo constituido por 46% de los fenotipos, mientras que los subgrupos b, c y d estuvieron formados respectivamente por 3%, 5% y 10% de los individuos. El grupo B fue formado por el 34 % de individuos de esta población los cuales también fueron distribuídos en 4 subgrupos (e, f, g, h). El 26 % de estos genotipos forma el segundo subgrupo (e) de mayor tamaño de este grupo.

#### **4.5. Análisis de la variación genética en la población de Santiago de Anaga Hidalgo**

En el estudio de la variación genética de la población de Santiago de Anaga del estado de Hidalgo (población 2) se emplearon los mismos iniciadores que se utilizaron en el análisis de

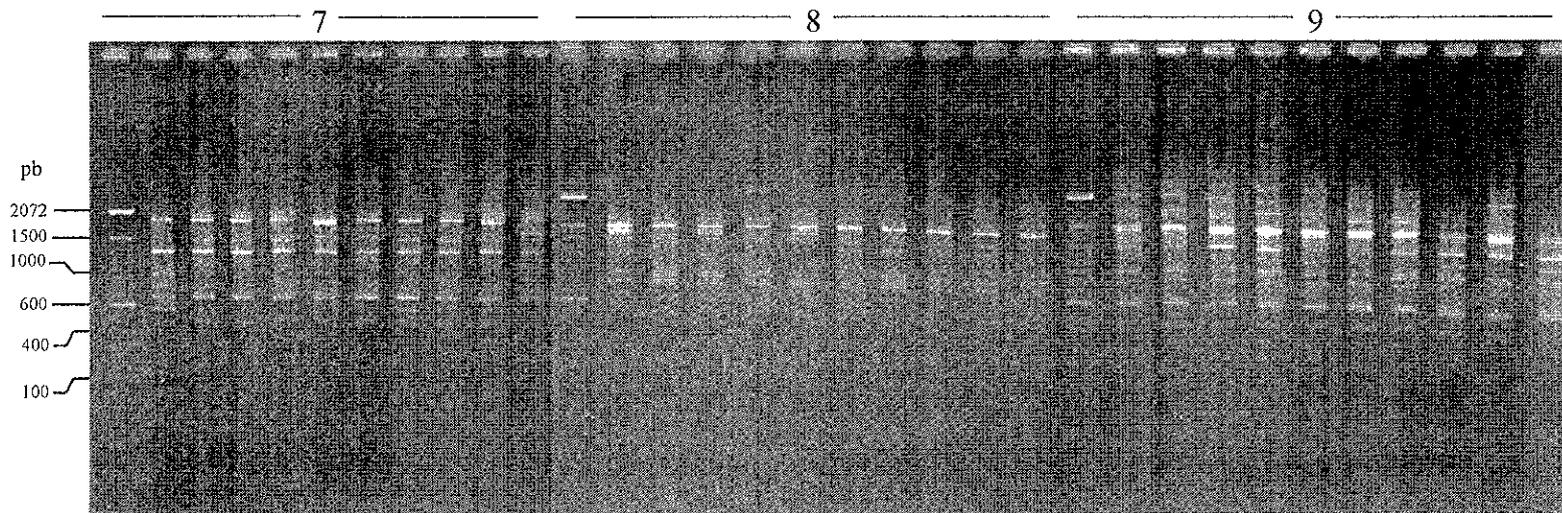


Figura 6. Patrón de bandas de 10 ejemplares de *Prosopis* de la población de Dolores Hidalgo Guanajuato con los iniciadores 7, 8 y 9.

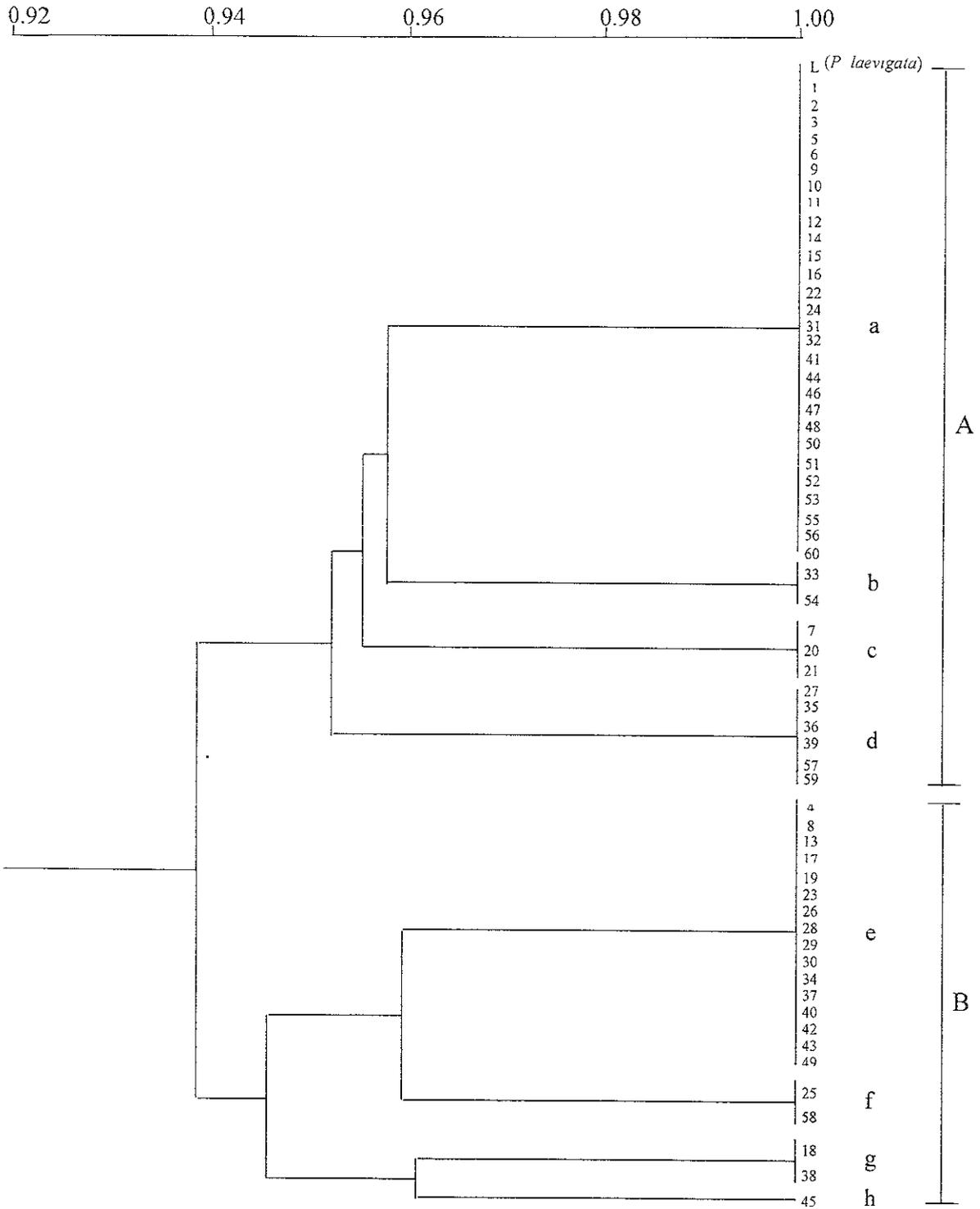


Figura 7. Dendrograma de 61 arbustos de *Prosopis* de la población de Dolores Hidalgo Gto. generado con el coeficiente de similitud de Jaccard y el análisis de agrupamiento UPGMA. Las letras mayúsculas indican los grupos y las minúsculas los subgrupos.

la población 1. En el análisis de RAPD de los 60 individuos analizados de esta población también se detectaron un total de 47 bandas bien definidas y reproducibles de las cuales el 5% fueron polimórficas. El número y rangos de tamaño de los fragmentos amplificados fueron similares a los observados en los patrones de la población 1. Con los fragmentos detectados se generó la matriz (Tabla 4A del apéndice) para obtener su dendrograma mediante el coeficiente de similitud de Jaccard y el análisis de agrupamiento UPGMA. En la Figura 8 se muestra que el ejemplar de referencia *P. laevigata* y los 60 individuos de mezquite de esta población también fueron distribuidos en 2 grupos (C, D) por un coeficiente de similitud de 0.92 (Figura 8). El grupo C fue integrado por el 15% de los fenotipos, los cuales se separaron en 4 subgrupos (i, j, k, l) constituidos por no más de 3 individuos. El grupo D estuvo formado por el 85% del total de los fenotipos, los cuales fueron reunidos en cinco subgrupos (m, n, o, p, q). En este caso el ejemplar de referencia *P. laevigata* fue agrupado con los miembros del segundo subgrupo más numeroso (q) el cual fue formado por el 23% de los individuos analizados. El subgrupo más numeroso (m) estuvo formado por el 35% y el subgrupo de menor número (o) de este grupo fue constituido por el 2% de los individuos analizados.

#### **4.6. Análisis de variación genética en las dos poblaciones de *P. laevigata***

El análisis de la variación genética existente en las dos poblaciones está basado en el número de subgrupos identificados, así como en la proporción de fenotipos identificados en estas poblaciones. Los resultados de este análisis muestran que un total de 11 subgrupos (fenotipos) fueron claramente identificados de los cuales 6 subgrupos estuvieron presentes en ambas poblaciones (Figuras 7, 8 y Tabla 7). Es notable que la mayor parte de los subgrupos de la población 1 estén incluidos en el grupo D de la población 2, también es evidente que en la

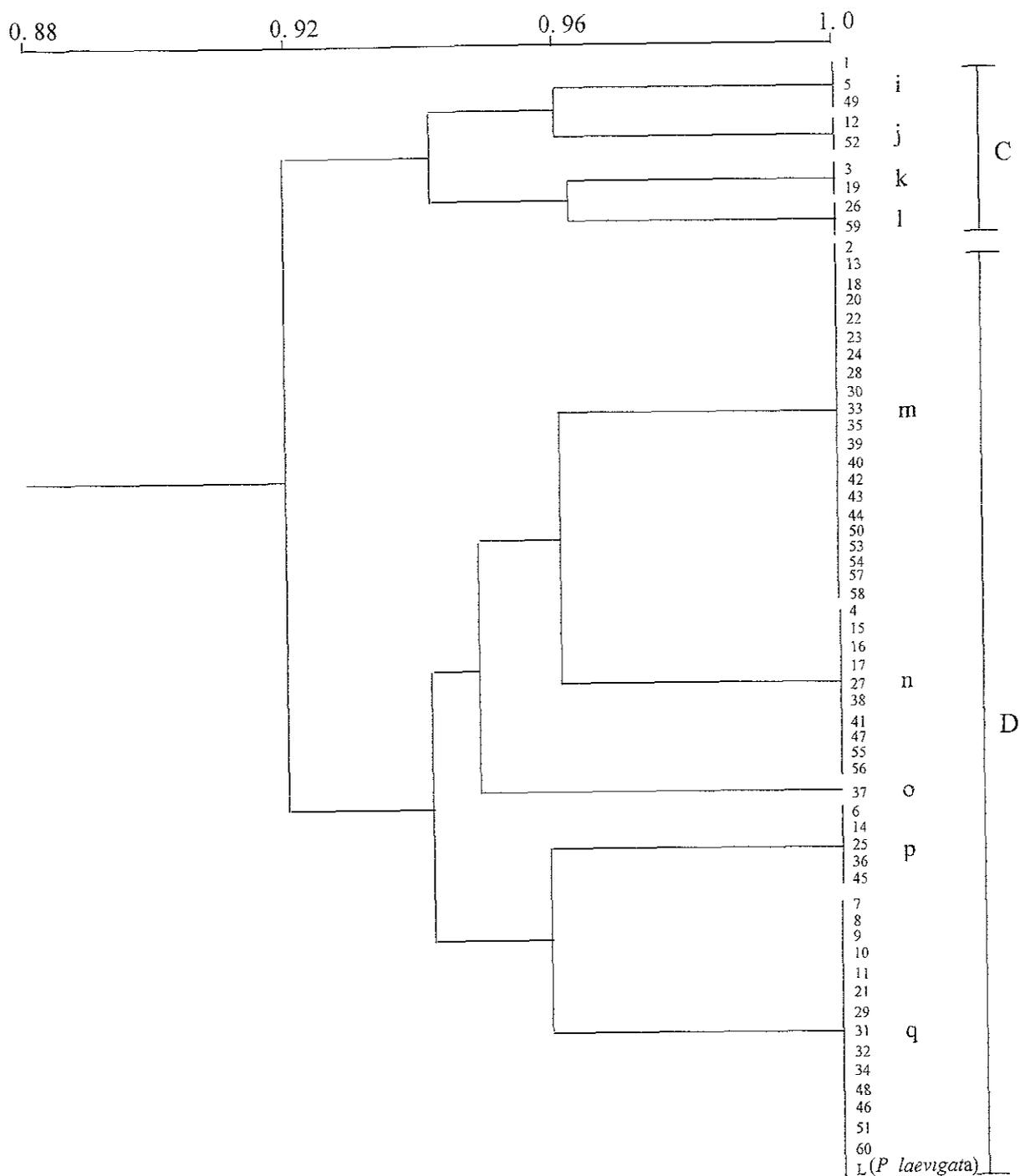


Figura 8. Dendrograma de 61 arbustos de *Prosopis* de la población de Santiago de Anaga Hidalgo, generado con el coeficiente de similitud de Jaccard y el análisis de agrupamiento UPGMA. Las letras mayúsculas indican los grupos y las minúsculas los subgrupos.

población 1 no están representados los subgrupos j, k y l mientras que en la población 2 el b y el h están ausentes (Tabla 7). Todos los subgrupos identificados con las bandas que los caracterizan se muestran en la Figura 9 y Tabla 8. Las características morfológicas y patrón de bandas obtenido mediante RAPD en el ejemplar de referencia de *P. laevigata* caracterizado taxonómicamente se muestran en la Figura 10.

El grado de diferenciación en la variación genética existente entre las dos poblaciones ésta definido por la proporción de fenotipos que comparten (6 de un total de 11) así como por la proporción de individuos que comparten entre ellas. Los resultados de este análisis indican que entre estas poblaciones existe poca diferenciación genética ya que comparten el 92% de los individuos. También muestran que dentro de las poblaciones la variación genética es mayor dado que solamente el 54% de los fenotipos son compartidos. La alta relación de los coeficientes de similitud observada en las dos poblaciones y el hecho de que la mayoría de los subgrupos de la población 1 estuvieran incluidos en el grupo D de la población 2 sugieren que probablemente estas poblaciones tienen: 1) un origen común, 2) en el pasado constituían una población continua, 3) las condiciones ambientales no han cambiado drásticamente en cada una de las localidades. Estas ideas se apoyan en el hecho de que posee un gran número de alelos comunes, los cuales probablemente codifiquen para características ventajosas por lo que la selección natural pudo haber jugado un papel importante en la preservación de estos fenotipos y en el mantenimiento la variación genética observada (diferentes fenotipos) mediante este criterio. Probablemente los subgrupos de menor número de individuos correspondan a los fenotipos más recientes, originados por cambios genéticos ventajosos individuales resultantes de la tasa de mutaciones e intercambio genético a través de varias

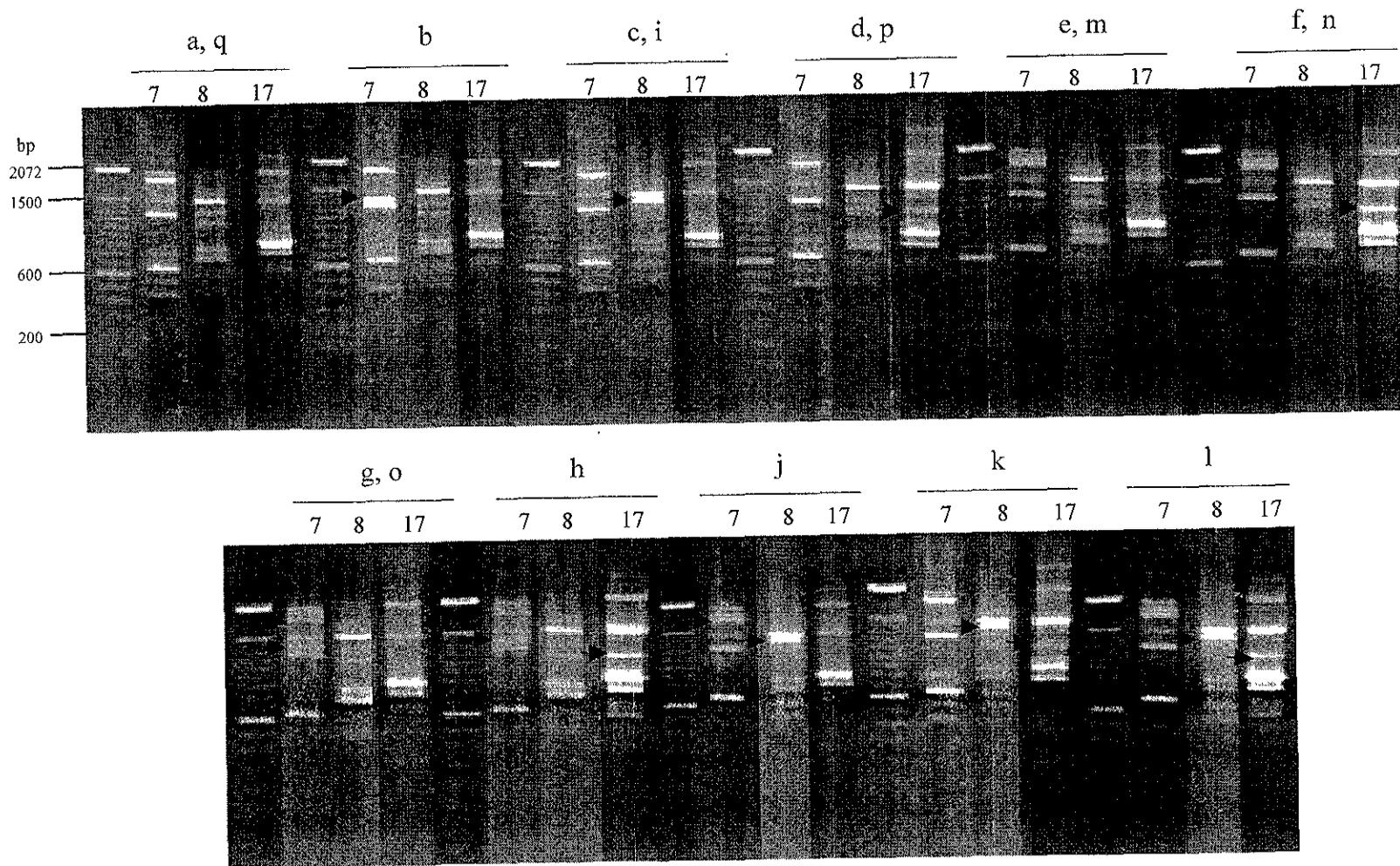


Figura 9. Patrón polimórfico identificado en cada uno de los subgrupos de las dos poblaciones de *Prosopis*. El subgrupo está indicado por las letras, la línea define los subgrupos y los números corresponden al iniciador utilizado en cada caso. El fenotipo (patrón de bandas) del ejemplar de referencia *P. laevigata* está representado en el subgrupo a, q. Las flechas muestran las bandas que distinguen a los subgrupos.

Tabla 7. Comparación de la constitución de las dos poblaciones de *P. laevigata* mediante sus patrones polimórficos de fragmentos amplificados (RAPD- PCR) de DNA, de las localidades de: Dolores Hidalgo, Guanajuato y Santiago de Anaga de la región del Mezquital en el estado de Hidalgo.

Número de individuos y (%) de las poblaciones que presentaron el mismo patrón polimórfico o patrón único			
Subgrupo	Dolores Hidalgo	Subgrupo	Santiago de Anaga
a	28 (46)*	a (q)	14 (23)*
b	2 (3)		
c	3 (5)	c (i)	3 (5)
d	6 (10)	d (p)	5 (8)
e	16 (27)	e (m)	21 (35)
f	2 (3)	f (n)	10 (17)
g	2 (3)	g (o)	1 (2)
h	1 (2)		
		j	2 (3)
		k	2 (3)
		l	2 (3)

\* El patrón polimórfico de la planta de *P. laevigata* de referencia (Jardín Botánico UNAM, D:F) coincide con los de los subgrupos indicados. Los subgrupos se ordenaron con base a la identidad del patrón polimórfico de las dos poblaciones.

Tabla 8. Fragmentos amplificados con los iniciadores indicados que no son compartidos con el fenotipo (a) y que identifican a cada uno de los otros fenotipos.

Subgrupo (fenotipo)	Fragmentos identificados	Fragmentos (pb) que identifican el subgrupo	Iniciador
a	38		
b	39	1350	7
c	39	1380	8
d	39	1130	17
e	39	1700	7
f	38	1700	7
		1130	17
g	38	1700	7
		1380	8
h	40	1700	7
		1350	8
		1130	17
i	38	1700	7
		1380	8
j	38	1380	8
		1130	17
k	40	1700	7
		1380	8
		1130	17

Los fragmentos que distinguen a los subgrupos se observan en la Figura 8 marcados con flechas

generaciones. Rzedowski (1988) ha señalado que la distribución actual de *P. laevigata* en tres segmentos separados (Altiplanicie, Depresión del Balsas y Planicie Costera) indica que la antigüedad de esta especie se remonta a épocas en que las montañas no obstaculizaban su dispersión. El hecho de que el patrón polimórfico en el 46% (población 1) y 23% (población 2) de los fenotipos de las poblaciones analizadas correspondiera al del ejemplar de referencia *P. laevigata* existente en el Jardín Botánico de la UNAM y proveniente de una localidad diferente a las estudiadas, refuerzan la idea de que en el pasado esta especie constituía una población continua. Esta idea también se apoya en el hecho de haber detectado flujo genético entre estas dos poblaciones ( $N_e m = 3.2$ ) a pesar de que están aisladas por aproximadamente 200 km. (Juárez *et al.*, datos no publicados).

La variación genética intraespecífica en *Prosopis* depende fundamentalmente de las características morfológicas de la flor, así como de su sistema reproductivo, por ejemplo su capacidad de autocruzamiento, así como del carácter de incompatibilidad detectado en poblaciones de algunas especies de este género (Burkart, 1976a; Genisse *et al.*, 1990). Keys y Smith (1994) encontraron en poblaciones de *P. velutina* un rango de autocruzamiento de aproximadamente 90%. Mientras que Galindo-Almanza *et al.*, (1992) en poblaciones mexicanas de *P. laevigata* y *P. glandulosa* var. *torreyana* relacionó la variación genética con el predominante carácter de protoginia de sus flores. Considerando lo anterior, la variación genética presente en las poblaciones estudiadas de *P. laevigata* puede atribuirse al grupo de características de sus flores y puede pensarse que cada una puede influenciarla en diferente nivel de acuerdo a la naturaleza de las poblaciones y a las condiciones medioambientales.

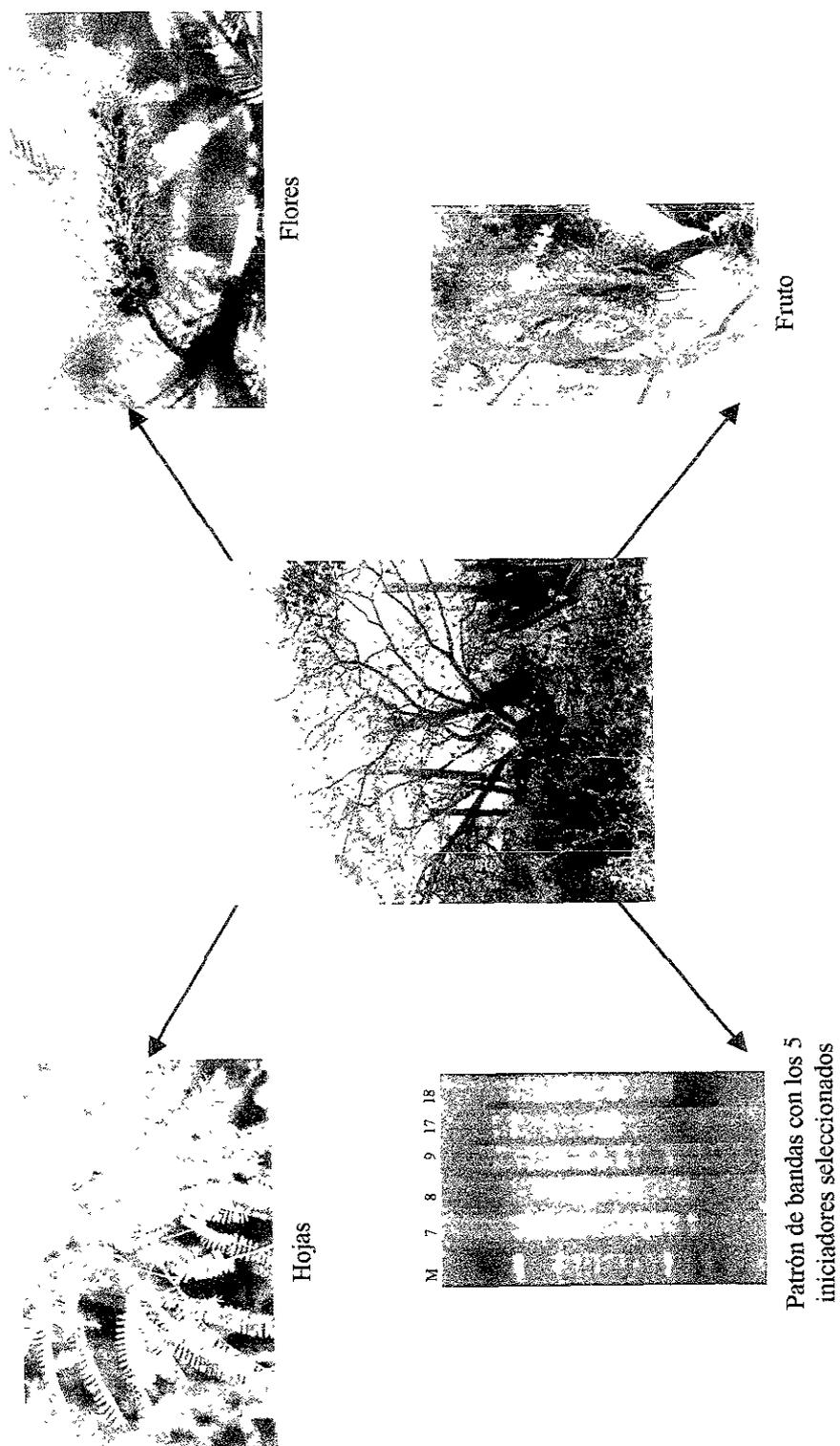


Figura 10. Características morfológicas y patrón de bandas (RAPD) del ejemplar caracterizado taxonómicamente de *P. laevigata* utilizado como referencia.

Para los programas de reforestación y explotación basada en un principio sustentable de este recurso natural es importante conocer la constitución de las poblaciones naturales, así como los factores que pueden contribuir a mantener su variación genética. El número, frecuencia y proporción de fenotipos observados en este primer estudio de la variación genética en estas dos poblaciones de *P. laevigata*, pueden ser utilizados como modelos en los programas de reforestación de zonas áridas, con la idea de asegurar el mantenimiento de la variación genética y la explotación sustentable de este recurso. La madera de esta especie es considerada de alta calidad y posee un bajo contenido de humedad lo cual le confiere una alta estabilidad dimensional, por la que se utiliza a escala comercial para la producción de dueña, madera aserrada, puertas, ventanas y como leña por su alto valor calorífico y producción de carbón de alta calidad. Por sus múltiples usos potenciales, características de sus flores y variación genética detectada en este estudio, esta especie se puede considerar un buen candidato para incluirla en los programas de reforestación. La reforestación con esta especie además de permitir la recuperación de las zonas áridas, podría constituir al mismo tiempo una fuente de ingresos para las comunidades de escasos recursos de esas zonas.

#### **4.7. Determinación de la variación genética en las tres especies de referencia**

Al estudiar la variación genética en estas tres especies del género *Prosopis*, mediante RAPD y con los 17 iniciadores indicados (Tabla 6), un total de 57 bandas bien definidas con tamaños de entre 250 a 2800 pb se detectaron. De éstas el 37% fueron polimórficas. Las 57 bandas detectadas se utilizaron para formar la matriz (Tabla 5A del apéndice) con la cual se construyó el dendrograma utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard y el análisis de agrupamiento UPGMA. En el dendrograma (Figura 11) puede observarse que *P. laevigata* y

*P. glandulosa* conforman un grupo por un coeficiente de similitud de 0.79 mientras que *P. juliflora* se separó de estas dos especies por un coeficiente de similitud de 0.63.

*P. juliflora* se diferenció de las otras 2 especies por la presencia de 7 bandas específicas, mientras *P. laevigata* se diferencia de *P. glandulosa* por presentar 2 bandas específicas (Tabla 9). El polimorfismo de RAPD detectado en *P. laevigata*, *P. glandulosa* y *P. juliflora* se muestra en la Figura 12.

Recientemente Ramírez *et al.*, (1999) al analizar mediante RAPDs la variación genética existente en 15 especies de *Prosopis* de Argentina, India y Senegal, distinguieron claramente las 5 secciones que constituyen el género, las cuales se agruparon dentro de un rango de coeficientes de similitud que varió de 0.05 a 0.8. Sin embargo en las especies del viejo mundo de las diferentes secciones del grupo, los coeficientes de similitud determinados fueron menores. En las especies de la sección Algarobia se detectaron coeficientes de similitud de alrededor de 0.68 entre *P. alba* y *P. chilensi*, así como de 0.59 en *P. nigra* y *P. flexuosae*. El valor de estos coeficientes están en el rango de los encontrados en nuestro trabajo al analizar las relaciones interespecíficas entre las especies de *P. laevigata*, *P. glandulosa* y *P. juliflora*, las cuales forman parte del grupo de las 6 especies norteamericanas que son incluidas también en la sección Algarobia (Burkart, 1976a, 19976b). Los resultados de nuestra investigación permiten diferenciar rangos de valores de coeficientes de similitud a nivel de relaciones interespecíficas así como intraespecíficas. Por lo tanto en el caso de las poblaciones silvestres de *P. laevigata* analizadas, el estrecho rango de valores encontrados entre 0.92 y 0.94 corresponden a valores de coeficientes de similitud intraespecíficos, mientras que el rango valores de coeficientes de similitud obtenidos entre *P. laevigata*, *P. glandulosa* y *P. juliflora*

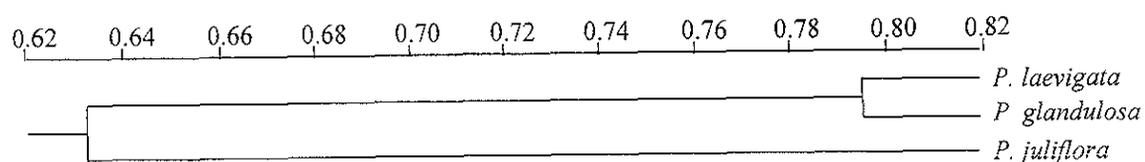


Figura 11. Dendrograma de tres especies de *Prosopis* obtenido con el método de agrupamiento UPGMA y el coeficiente de similitud de Jaccard.

Tabla 9. Número de fragmentos identificados en cada una de las tres especies de *Prosopis* y fragmentos específicos obtenidos con los iniciadores indicados que diferenciaron cada especie.

Especies	Fragmentos identificados	Fragments (pb) específicos	Iniciador
<i>P. laevigata</i>	46	510	3
		390	4
<i>P. glandulosa</i>	44	1020	18
		910	18
		790	18
<i>P. juliflora</i>	43	1850	7
		1430	8
		780	2
		690	20
		590	1
		490	20
		310	18

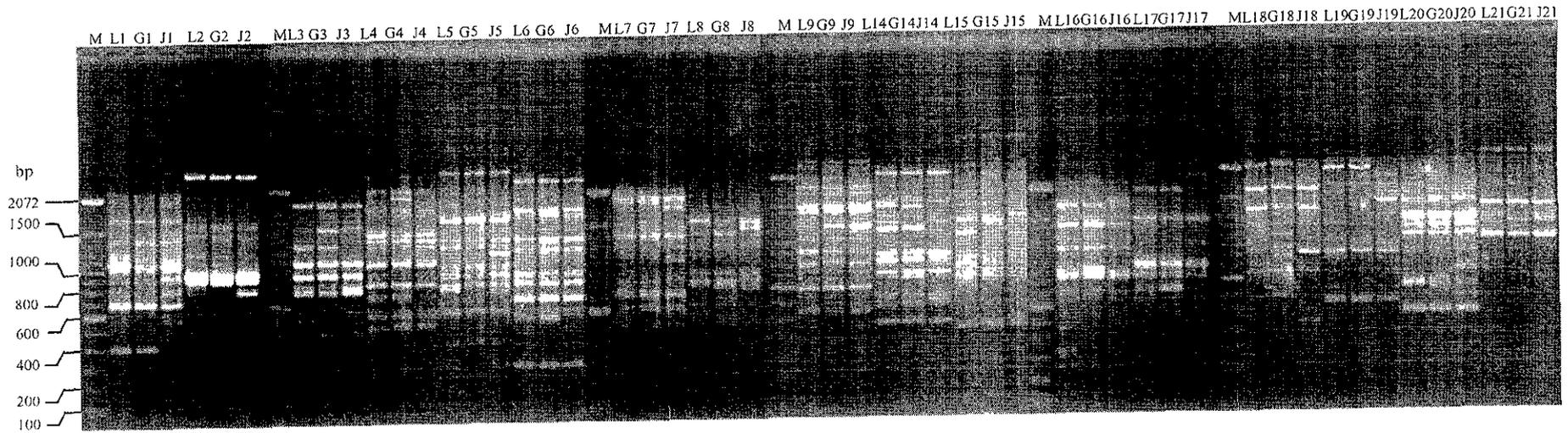


Figura 12. Polimorfismo detectado con 6 iniciadores Gibco y 11 iniciadores Roth en *P. laevigata* (L), *P. glandulosa* (G), *P. juliflora* (J). El número indica el iniciador utilizado y M el marcador.

indican valores de coeficientes de similitud interespecíficos (Saidman *et al.*, 1996; Saidman y Vilardi, 1987).

Al analizar mediante la técnica de RFLP la relación entre algunas especies de la sección Algarobia y Strombocarpa (Saidman *et al.*, 1998b) se encontró que las especies *P. rusifolia*, *P. flexuosa* y *P. Chilensis* de la sección Algarobia se agrupan en un rango de valores de coeficientes de similitud de 0.75 a 0.85. Ramírez *et al.*, (1999) mediante RAPD obtuvo en especies de la sección Algarobia valores de entre 0.5 a 0.8. Los determinados en las tres especies analizadas en nuestro trabajo también están dentro de estos rangos de similitud

Mediante el análisis isoenzimático se ha determinado la variación genética en *P. ferox*, *P. torquata*, *P. pubescens* y *P. reptans*, detectándose coeficientes de similitud dentro de un rango de 0.49 a 0.96. (Saidman *et al.*, 1996). Otros autores (Saidman y Vilardi, 1987) utilizando también isoenzimas diferenciaron individuos de *P. ruscifolia* mediante coeficientes de similitud que variaron dentro de un rango de 0.90 a 1.0, similares a los obtenidos con RAPDs en las poblaciones analizadas en el presente estudio.

De manera general no es posible establecer la magnitud de un rango de similitud que defina a partir de que punto los organismos se puedan considerar como especies diferentes utilizando solo un criterio (técnicas moleculares) ya que en los diferentes grupos los rangos para la diferenciación de las especies pueden ser diferentes, dado que los grupos de organismos existentes en la naturaleza presentan diferencias en el grado de variación genética, estrategias adaptativas y sistema reproductivo etc. No obstante los resultados obtenidos en este trabajo y los de los autores mencionados anteriormente indican que en el género *Prosopis*, no deben de

esperarse rangos muy grandes y que aunque la magnitud entre los rangos es muy estrecha (rangos de 0.65 a 0.85) permiten distinguir a las especies a este nivel y constituyen una valiosa herramienta que aunada a los estudios taxonómicos, bioquímicos, citogenéticos entre otros, puede contribuir aclarar la taxonomía del grupo.

Los estrechos rangos de los coeficientes de similitud observada entre las especies estudiadas en este trabajo podría atribuirse a la alta capacidad de hibridación que existe entre las especies del género de la sección *Algarobia*, a consecuencia de la ausencia de aislamiento reproductivo, fenológico, hábitat y débiles barreras geográficas. Este idea está apoyada en la ocurrencia de hibridación de las especies en las zonas en que sus áreas de distribución hacen contacto, en la cual la mayoría de los árboles presentan características intermedias (Johnston, 1962, Palacios y Bravo, 1981, Rzedowski, 1988). En estas áreas puede haber una tendencia hacia la homogenización de las frecuencias alélicas, lo cual podría reducir la diferenciación de las especies u originar la pérdida de la identidad de las especies. Los altos rangos de hibridación detectados a nivel morfológico en varias especies de la sección *Algarobia* en las zonas en que entran en contacto, han dado pauta a suponer que estas especies pueden constituir un *ring* y que no caen dentro del concepto biológico de especie, considerando que las barreras reproductivas son incompletas el concepto que mejor se ajusta a la condición de estas entidades podría ser el concepto cohesivo de especie propuesto por Templeton (1989).

El estrecho rango de los valores de los coeficientes de similitud observado en las especies analizadas también, podría atribuirse a que solamente se está analizando una parte del genoma y que posiblemente los alelos detectados no correspondan a los que codifican las

características morfológicas que las diferencian. Considerando que con RAPD solo pueden detectarse de 1 a 10 loci por iniciador (Demeke, *et al.*, 1997), en trabajos futuros debe contemplarse como una alternativa utilizar la técnica de AFLP con la cual pueden detectarse de 50 a 100 loci y un mayor grado de polimorfismo, con la idea de ver si es posible encontrar rangos de coeficientes de similitud más amplios entre las especies de las diferentes series del género en donde existan controversias y que con los resultados de RAPD no se pudieran distinguir.

Los resultados de este trabajo muestran que con la técnica empleada en este estudio se pudieron diferenciar las tres especies de *Prosopis* estudiadas hecho que muestra que es una valiosa herramienta. Con este tipo de criterios aunados a los de tipo taxonómico, bioquímico, citogenético, biogeográficos el científico puede aclarar la ubicación taxonómica del grupo a nivel de series de la sección Algarobia en la cual se presentan los mayores problemas.

Los resultados de esta investigación también muestran que en el género *Prosopis* esta tecnología también representará una valiosa herramienta para conocer la variabilidad genética a diferentes niveles (individual, de poblaciones y especies). EL conocimiento de la variación genética de las poblaciones naturales permitirá en el futuro establecer programas de reforestación y explotación sustentable de este recurso.

## V. PROYECCIONES FUTURAS

1) Estudiar el sistema reproductivo de las especies del género existente en México, para tratar de establecer con mayor claridad en que grado las características de protoginia y autoincompatibilidad de sus flores promueven y mantienen la variación genética.

2) Analizar la variación genética en diferentes poblaciones de las especies de *Prosopis* existentes en México.

3) Estimar la variación genética en poblaciones simpátricas y alopátricas de *P. laevigata* y *P. glandulosa* con la idea de definir si en las zonas en que las especies hacen contacto hay homogenización de las frecuencias alélicas. Para realizar este tipo de estudios la técnica de RFLP podría ser más apropiada por que permite diferenciar heterocigotos, lo cual no es posible con RAPD y AFLP. Así como diferentes programas estadísticos como Amova o Biosys que permiten estimar niveles de heterocigosis, número de alelos por locus y proporción de flujo genético.

4) Realizar estudios insoenzimáticos, morfológicos, citogenéticos, bioquímicos, anatómicos, biogeográficos, moleculares y análisis cladísticos en las especies de nuestro país. El estudio interdisciplinario permitirá establecer las relaciones del género, lo cual aunado a estudios ecológicos con relación al papel y requerimientos de las especies, permitirán sugerir las mejores estrategias para la explotación racional y reforestación de zonas áridas.

## VI. CONCLUSIONES

Mediante la técnica de RAPDs fue posible detectar la variabilidad genética existente a nivel intraespecífico en los fenotipos estudiados, con lo cual se logró conocer la constitución de dos poblaciones en término de proporciones y subgrupos que las componen.

Los rangos de valores de los coeficientes de similitud detectados entre los subgrupos de las poblaciones silvestres de *P. laevigata* en comparación con los rangos de coeficientes de similitud encontrados entre las especies de referencia *P. laevigata*, *P. glandulosa* y *P. juliflora*, muestran claramente que los valores de similitud detectados en las poblaciones corresponden a rangos de similitud intraespecíficos mientras que los observados entre las especies de *Prosopis* corresponden a rangos de similitud interespecíficos más que a similitudes intraespecíficas.

La variabilidad genética intrapoblacional detectada con base a los coeficientes de similitud número y proporción de fenotipos indican que es mayor la variación genética dentro de las poblaciones que entre ellas.

Los estrechos rangos de valores de los coeficientes de similitud entre los grupos y subgrupos de las dos poblaciones, así como el hecho de que el patrón de bandas detectado en el ejemplar de *P. laevigata* plenamente identificado taxonómicamente esté representado en el subgrupo más numeroso de la población 1 y en el segundo subgrupo de mayor tamaño de la población 2, sugiere que estas poblaciones tienen un origen común o que en el pasado constituían una población continua.

La variación genética observada puede atribuirse a la autoincompatibilidad y al carácter de protoginia de sus flores, así como a mutaciones que se han acumulado durante la dispersión gradual de la especie.

Los RAPDs tienen un gran potencial en la complementación de los estudios taxonómicos e identificación de especies del género en los que existen controversias.

Estos resultados pueden ser utilizados como base para una mejor comprensión de la variación genética y para el establecimiento de programas de reforestación y explotación sustentable de este recurso natural.

## VII. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- Agrawal, A.A. 1996. Natural history, seed predation, and germination of *Prosopis juliflora* relative to a reforestation project in southwestern Ecuador. *Trop. Ecol.* 37: 193-201.
- Agrawal, A.A. 1996a. Reforestation in Ecuador's dry forest. *Desert Plants* 12: 12-14.
- Aiazzi, M.T.J., A. Arguello, A. Abril. 1996. Nodulated and non-nodulated *Prosopis chilensis* (Mol) St. Seedlings: economy of carbon and nitrogen. *For. Ecol. Management.* 89: 25-29.
- Arnold, M.L., C.M. Bucher, and J.J. Robinson. 1991. Pollen mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 1398-1402.
- Axelrod, D.I. 1948. Climate and evolution in western North American during Middle Pliocene time. *Evolution* 2: 127-144.
- Ayala, F.J., J.A. King Jr. 1984. *Genética moderna*. Fondo Educativo Interamericano, España. 822pp.
- Barnum, S.R. 1998. *Biotechnology an introduction*. Wadsworth Publishing Company, Canada. 60-61pp.
- Bosch, S.V.D., J.C. Guevara, F.M. Tacchini, and O.R. Estevez. 1997. Nutrient content of browse species in the arid rangelands of Mendoza plain, Argentina. *J. Arid. Environ.* 37: 285-298.
- Briand, L., A.E Brown, J.M. Lenné, and D.M. Teverson. 1998. Random amplified polymorphic DNA variation within and among bean landrace mixtures (*Phaseolus vulgaris* L.) from Tanzania. *Euphytica* 102: 371-377.
- Burkart, A. 1976a. A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfam. Mimosoideae). *J. Arnold. Arbor.* 57: 219-249.
- Burkart, A. 1976b. A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfam. Mimosoideae). *J. Arnold. Arbor.* 57: 450-525.
- Burkart, A., B.B. Simpson. Appendix: The genus *Prosopis* and annotated key to the species of the word. In. B.B. Simpson (Ed.). *Mesquite its Biology in two desert scrub ecosystems*. US/IBP Synthesis series 4. 201-216pp.
- Caetano-Anollés, G., B.J. Bassam, P.M. Gresshoff. 1991. DNA amplification fingerprinting using short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technology* 9: 553-557.

- Carman, N.J. 1973. Systematic and ecological investigation in the genus *Prosopis* (Mimosaceae) emphasizing the natural products chemistry. Thesis. University of Texas. Austin, Texas. 220pp.
- Coletta-Filho, H.D., M.A. Machado, M.L.P.N. Targon, M.C.P.Q.D.G. Moreira, and J. Pompeu Jr. 1998. Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus* spp.) using RAPD markers. *Euphytica* 120: 133-139.
- Coyne, J.A., and R. Lande. 1985. The genetic basis of species differences in plants. *Amer. Nat* 126: 141-145.
- Crawford, D.J., S. Brauner, M.B. Cosner, and T.F. Steussy. 1993. Use of RAPD markers to document the origin of the intergeneric hybrid *Margyraciaena skottsbergii* (*Rosaceae*) on the Juan Fernandez Islands. *Am. J. Bot.* 80: 89-92.
- Crisci, J. 1994. La especie: realidad y conceptos. En: J.L.L. Bousquets., y I. Luna (Eds.). *Taxonomía biológica*. Ediciones Científicas Universitarias, UNAM, México. 53-64 pp.
- Chellamuthu, V., T.N. Balasubramanian and S.P. Palaniappan. 1996. Charcoal recovery from *Prosopis juliflora* fuelwood and rootstock. *Madras Agric J.* 83: 713-715.
- Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- Demeke, T., B. Sasikumar, P. Hucl, and R.N. Chibbar. 1997. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) in cereal improvement. *Maydica* 42: 133-142.
- Durso, D.F., T. J. Allen, and J. Ragsdale. 1973. Possibilities for commercial utilization of mesquite. In: *Mesquite growth and development management economics control and uses*. The Texas Agric. Exp. St. Texas A & M University. 20-23 pp
- Felger, R.S. 1977. Mesquite in Indian cultures of southwestern North American. In: B.B. Simpson (Ed.). *Mesquite its biology in two desert scrub ecosystems*. US/ IBP Synthesis series (4). 150-175 pp.
- Fuentes, J.L., F. Escobar, A. Alvarez, G. Gallego, M. C. Duque, M. Ferrer, J. E. Deus, and J.M. Tohme. 1999. Analyses of genetic diversity in Cuban rice varieties using isozyme, RAPD and AFLP markers. *Euphytica* 109: 107-115.
- Galindo-Almanza, S., E.M. García, T.L. Wendt and F.V.C González. 1992. Potencial de hibridación natural en mesquite (*Prosopis laevigata* y *P. glandulosa* var. *Torreyana*, Leguminosae) de la altiplanicie de San Luis Potosí. *Acta Botánica mexicana* 20: 101-117.
- Garg, V.K. 1998. Interaction of tree crops with a sodic soil environments: potential for rehabilitation of degraded environments. *Land Degra. Dev.* 9: 81-93.

- Genisse, J., R.A. Palacios, P.S. HOC, R. Carrizo, L. Moffat, M.P. Mom, M.A Agullo, and S. Torregosa. 1990. Observaciones sobre la biología floral de *Prosopis* (Leguminosae, Mimosoidae). II Fases florales y visitantes en el distrito Chaqueño Serrano. *Darwiniana* 30: 71-85.
- Goel, V.L. and H.M.Behl. 1996. Fuelwood quality of promising tree species for alkaline soil sites in relation to tree age. *Biomass and Bioenergy*. 10: 57-61.
- Gómez, L. 1970. Importancia económica de los mezquites (*Prosopis* spp.) en algunos Estados de la República Mexicana. En. *Mezquites y Huizaches*. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables, México, D.F., 1-69 pp.
- Gottlieb, L.D. 1984. Genetics and morphological evolution in plants. *Amer. Nat.* 123: 681-707.
- Grant, V. 1981. *Especiación vegetal*. Limusa, México. 91-107 pp.
- Guevara-García, A., L. Herrera-Estrella, and G. Olmedo-Alvarez. 1997. Cloning from genomic DNA and production of libraries. In. M.S. Clark (Ed.). *Plant molecular biology-a laboratory manual*. Springer, New York. 54-73 pp.
- Karig, D.E and W. Jensky. 1972. The proto-Gulf of California. *Earth and Planet. Sci. Letters* 17: 169-174.
- Harrison, R. 1991. Molecular changes at speciation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22: 281-308.
- Hoelzel, A.R., and A. Green. 1992. Analysis of population-level variation by sequencing PCR-amplified DNA. In. A.R. Hoelzel (Ed.) *Molecular genetic analysis of populations a practical approach*. OIRL Press, Oxford. 159-186 pp.
- Huang, R., M. Galperin, Y. Levy, and R. Perl-Treves. 1997. Genetic diversity of *Fusarium moniliforme* detected by vegetative compatibility groups and random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Pathol.* 46: 871-881.
- Jhala, Y.V. 1997. Seasonal effects on the nutritional ecology of blackbuck Antilope cervicapra. *J. Appl. Ecol.* 34: 1348-1358.
- Johnston, M.C. 1962. The North American mesquites, *Prosopis* sect. *Algarobia* (Leguminosae). *Brittonia* 14:72-90.
- Keys, R.N., and S.E. Smith. 1994. Mating system parameters and population genetic structure in pioneer populations of *Prosopis velutina* (Leguminosae). *Amer. J. Bot.* 81: 1013-1020.
- Kohlmann, B.C. 1994. Algunos aspectos de la taxonomía numérica y sus usos en México. En. J.B. Llorento, and I.V. Luna (Eds.). *Taxonomía biológica*. Ediciones Científicas Universitarias, UNAM. México. 65-82 pp.

- Martin, G.B., J.G.K. Williams, and S.D. Tanksley. 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near isogenic lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 2336-2340.
- MacGinitie, H.D. 1953. Fossil plants of florissant beds, Colorado. *Carn. Inst. Wash. Publ.* 599: 188pp.
- Marzocca, A. 1985. *Taxonomía vegetal*. IICA, San José Costa Rica. 168-169pp.
- Mayr, E. 1940. Speciation phenomena in birds. *Amer. Nat.* 74: 249-278.
- Mettler, L.E., T.G. Gregg, and H.E. Schaffer. 1988. *Population genetics and evolution*. Prentice-Hall, Inc. New Jersey. 10-129pp.
- Muller, U. G., and L.L. Wolfenbarger. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Tree* 14: 389-394.
- National Academy of Science (USA). 1981. Forage tamarugo. In: *Underexploited tropical plants with promising economic value*. 128-131 pp.
- Nkongolo, K.K. 199. RAPD and cytological analyses of *Picea* spp. From different provenances: genomic relationships among taxa. *Hereditas* 130: 137-144.
- Ovalle, C., L. Longeri, J. Aronson, A. Herrera, and J. Avendano. 1996. N<sub>2</sub> fixation, nodule efficiency and biomass acumulation after two years in three Chilean legume trees and *Tagasaste Chamaecytisus proliferus* subsp. *palmensis*. *Plant and Soil* 179: 131-140.
- Palacios, R.A., y L.D. Bravo. 1981. Hibridación natural en *Prosopis* (Leguminosae) en la región chaqueña argentina. *Evidencias morfológicas y cromatográficas*. *Darwiniana* 23: 3-35.
- Palumbi, S.R. 1996. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In: D.M. Hillis., C. Moritz, B.K. Mable (Eds.). *Molecular systematics*. Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, USA. 205-247.
- Pandit, B.R. 1996. An ordination of plant communities in a reserved forest near Bhavnagar. *Indian J. for.* 19:278-282.
- Paran, I., E. Aftergoot, and C. Shiffriss. 1998. Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. *Euphytica* 99: 167-173.
- Pathan, B. 1998. Govt wakes up to illegal charcoal manufacture. *Indian Express Newspapers*. October, 27. <http://www.financialexpress.com/ie/daily/19981027/30050054.html>
- Radford, A.E. 1986. *Fundamentals of plant systematics*. Harper & Row Publisher. INC. New York. 498pp.

- Ramírez, H., A. Calderón, W.M. Roca. 1991. Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal. En W.M. Roca, and L.A. Mroginski (Eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura. CIAT. Colombia. 825-851pp.
- Ramírez, L., A. de la Vega, N. Razkin, V. Luna, and P.J.C. Harris, 1999. Analysis of the relationships between species of the genus *Prosopis* revealed by the use of molecular markers. *Agronomie* 19: 31-43.
- Ramírez, R.G., J.B. Quintanilla, J. Aranda. 1997. White tailed deer food habits in northeastern Mexico. *Small Ruminant Res.* 25: 141-146.
- Rohlf, F.J. 1993. NTSYS-PC Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.8. Applied Biostatistics Inc., New York.
- Romesburg, H.C. 1984. Cluster Analysis for researchers. Lifetime Learning Publications. USA. 334pp.
- Roux, K.H. 1995. Optimization and troubleshooting in PCR. Manual supplement. *PCR Methods and Applications* 4: 185-194.
- Rzedowski, J. 1988. Análisis de la distribución geográfica del complejo *Prosopis* (Leguminosae, Mimosoideae) en Norte América. *Acta Bot. Méx.* 3: 7-19.
- Saidman, B.O. 1986. Isoenzymatic studies of alcohol dehydrogenase and glutamate oxalacetate transaminase in four South American species of *Prosopis* and their natural hybrids. *Silvae Genet* 35: 3-10.
- Saidman, B.O., C. Bessega, L.I. Ferreyra, and J.C. Vilardi. 1998a. Random amplified polymorphic DNA (RAPDs) variation in hybrid swarms and pure populations of the genus *Prosopis* (Leguminosae). In . S. Bruns, S. Mantell, C. Tragardh & A.M. Viana (Eds), Recent advances in biotechnology for tree conservation and management. Proceedings of an IFS Workshop. Florianopolis, Brazil. 122-134 pp.
- Saidman, B. O., and J.C. Vilardi. 1987. Analysis of the genetic similarities among seven species of *Prosopis* (Leguminosae: Mimosoideae). *Theor. Appl. Genet.* 75: 109-116.
- Saidman, B. O., J.C. Vilardi., S. Montoya, M.J. Dieguez, and H.E. Hopp. 1998b. Molecular markers: A tool for understanding the relationships among species of *Prosopis* (Leguminosae, Mimosoideae). In S. Puri (Ed.). *Tree improvement: applied research and technology transfer.* Oxford & IBH, New Delhi. 311-324 pp.
- Saidman, B. O., J.C. Vilardi, , M.I. Pocovi, and N. Acreche. 1996. Genetic divergence among species of the section *Strombocarpa*, genus *Prosopis* (Leguminosae). *J. Genet.* 75: 139-149.

- Shen, Y., B.V. Ford-Lloyd, and H. J. Newbury. 1998. Genetic relationships within the genus *Beta* determined using both PCR-based marker and DNA sequencing techniques. *Heredity*. 80: 624-632.
- Simpson, B.B. and O. Solbrig. 1977. Introduction. In. B.B. Simpson (Ed.). *Mesquite its Biology in two desert scrub ecosystems*. US/IBP Synthesis series 4. 44-60 pp.
- Smith, C.A., y E.J. Wood. 1998. *Biología molecular y biotecnología*. Addison Wesley Longman, México. 156-182 pp.
- Sneath, P.H.A., and R.R. Sokal. 1973. *Numerical taxonomy*. W.H. Freeman and Company. San Francisco. 573 pp.
- Solbrig, O.T. 1972. The floristic disjunctions between the "Monte" in Argentina and the "Sonora desert" in Mexico and the United States. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 59: 218-223.
- Solbrig, O.T., and K.S. Bawa. 1975. Isozyme variation in species of *Prosopis* (Leguminosae). *J. Arnold. Arbor.* 56: 398-412.
- Templeton, A.R. 1989. The meaning of species and speciation: a genetic perspective. In. D. Otte, and J.A. Endler (Eds.). *Speciation and its consequences*. Sinauer, Sunderland, Mass. 3-27 pp.
- Tovar, T.S., y M.M. Ballesteros. 1994. El concepto de especie en organismos fósiles. En. J.B. Llorento, and I.V. Luna (Eds.). *Taxonomía biológica*. Ediciones Científicas Universitarias, UNAM. México. 65-82 pp.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Paleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Weising, K., H. Nybom, K. Wolff, and W. Meyer. 1995. *DNA fingerprinting in plants and fungi*. CRC, Press. USA. 500p.
- Wilkie, S.E., P. G. Isaac, R.J. Slater. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theor. Appl. Genet.* 86: 497-504.
- Welsh, J., and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18: 7213-7219.
- Whitmore, D. H., and L.H. Bragg, 1979. Isozymal differentiation between two species of *Prosopis*. *Biochem. Syst. Ecol.* 7: 299-302.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski & S.V Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.

- Wolf, F. 1986. Humedad de equilibrio de la madera para el Noreste de México. Reporte Científico 5.15-25.
- Wolf, F. and E. Vogel. 1986. Characteristics of charcoal from some timbers of northeast Mexico. *Ciencia For.* 11: 181-189.
- Zhang, S.M., H. Deng, D.G.Wang, and L.N. Yu. 2001. Population structure and genetic diversity of silver carp and grass carp from population of yangtze river system revealed by RAPD. *Acta Hydrobiol. Sini.*25: 324-330.

Tabla 1A. Determinación de la pureza y concentración de ADN de 60 individuos de *P. laevigata* de la localidad de Dolores Hidalgo, Guanajuato.

MUESTRA	PUREZA (A260/280)	CONCENTRACION (ng/ $\mu$ l)
1	1.6	395
2	2.0	100
3	1.9	220
4	1.9	445
5	1.9	380
6	1.8	785
7	1.6	390
8	1.8	575
9	1.8	460
10	1.6	515
11	1.9	650
12	1.8	685
13	1.8	430
14	1.7	860
15	1.7	745
16	1.5	990
17	1.7	555
18	1.7	865
19	1.6	735
20	1.6	265
21	1.7	935
22	1.6	400
23	1.6	465
24	1.7	745
25	1.5	645
26	1.7	795
27	1.8	735
28	1.4	595
29	1.8	520
30	1.7	720
31	1.8	505
32	1.7	925
33	1.6	685
34	1.7	855
35	1.6	390
36	1.7	715
37	1.7	960
38	1.8	705
39	1.6	375
40	1.7	700
41	1.6	860
42	1.6	515
44	1.7	670
45	1.9	770
46	1.8	805
47	1.7	250
48	1.7	560
49	1.6	635
50	1.6	650
51	1.8	400
52	1.7	505
53	1.7	990
54	1.9	260
55	1.8	210
56	1.8	320
58	1.8	675
59	1.6	365
60	1.7	480

Tabla 2 A. Determinación de la pureza y concentración de ADN de 60 individuos de *P. laevigata* de la localidad de Santiago de Anaga, Hidalgo

MUESTRA	PUREZA (A260/280)	CONCENTRACION (ng/ul)
1	1.7	300
2	1.5	960
3	1.0	680
4	1.3	665
5	1.6	915
6	1.4	560
7	1.8	215
8	1.3	295
9	1.5	530
10	1.3	430
11	1.7	610
12	1.9	270
13	1.3	500
14	1.6	840
15	1.7	700
16	1.8	255
17	1.8	535
18	1.8	310
19	1.5	578
20	1.5	715
21	1.7	480
22	1.6	510
23	1.7	750
24	1.4	420
25	1.0	500
26	1.7	390
27	1.6	710
28	1.5	570
29	1.6	465
30	1.8	720
31	1.8	215
32	1.5	250
33	1.5	330
34	2.0	100
35	1.7	270
36	1.7	435
37	1.6	335
38	1.9	240
39	1.8	920
40	1.9	265
41	1.5	700
42	1.5	410
43	1.6	485
44	1.5	605
45	1.7	765
46	1.8	195
47	1.9	375
48	1.7	530
49	1.6	395
50	1.6	330
51	1.8	155
52	1.3	260
53	1.5	410
54	1.6	280
55	1.8	210
56	1.8	235
57	1.6	285
58	1.9	235
59	1.5	490
60	1.9	215

Tabla 3A. Matriz de la población *P. laevigata* de Dolores Hidalgo, Guanajuato, generada con los fragmentos de ADN obtenidos mediante RAPD-PCR, con los iniciadores 7, 8, 9, 17 y 18.

Muestra	Tamaño de los fragmentos de ADN (pb)																											
	2250	2100	2072	1950	1850	1750	1700	1650	1600	1500	1450	1380	1350	1300	1200	1130	1100	900	850	800	750	700	650	600	550	500	450	
1	1						0	1				0	0			0	1											
2	1	1					0	1				0	0	1	1	0	1											
3	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
4	1						1	1				0	0	1	1	0	1											
5	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
6	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
7	1						0	1				1	0	1	1	0	1											
8	1						1	1				0	0	1	1	0	1											
9	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
10	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
11	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
12	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
13	1						1	1				0	0	1	1	0	1											
14	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
15	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
16	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
17	1						1	1				0	0	1	1	0	1											
18	1						1	1				0	1	1	1	0	1											
19	1						1	1				0	0	1	1	0	1											
20	1						0	1				1	0	1	1	0	1											
21	1						0	1				1	0	1	1	0	1											
22	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
23	1						1	1				0	0	1	1	0	1											
24	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
25	1						1	1				0	0	1	1	1	1											
26	1						1	1				0	0	1	1	0	1											
27	1						0	1				0	0	1	1	1	1											
28	1						1	1				0	0	1	1	0	1											
29	1						1	1				0	0	1	1	0	1											
30	1						1	1				0	0	1	1	0	1											
31	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
32	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
33	1						0	1				0	1	1	1	0	1											
34	1						1	1				0	0	1	1	0	1											
35	1						0	1				0	0	1	1	1	1											
36	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
37	1						1	1				0	0	1	1	0	1											
38	1						1	1				0	1	1	1	0	1											
39	1						0	1				0	0	1	1	1	1											
40	1						1	1				0	0	1	1	0	1											
41	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
42	1						1	1				0	0	1	1	0	1											
43	1						1	1				0	0	1	1	0	1											
44	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
45	1						1	1				0	1	1	1	1	1											
46	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
47	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
48	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
49	1						1	1				0	0	1	1	0	1											
50	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
51	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
52	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
53	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
54	1						0	1				0	1	1	1	0	1											
55	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
56	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
57	1						0	1				0	0	1	1	1	1											
58	1						1	1				0	0	1	1	1	1											
59	1						0	1				0	0	1	1	1	1											
60	1						0	1				0	0	1	1	0	1											
L	1						0	1				0	0	1	1	0	1											

\* L: *P. laevigata* ejemplar de referencia

Tabla 4A. Matriz de la población *P. laevigata* de Santiago de Anaga, Hidalgo, generada con los fragmentos de ADN obtenidos mediante RAPD-PCR, con los iniciadores 7, 8, 9,17 y 18.

Muestra	Tamaño de los fragmentos de ADN (pb)																										
	2250	2100	2072	1950	1850	1750	1700	1650	1600	1500	1450	1380	1350	1300	1200	1130	1100	900	850	800	750	700	650	600	550	500	450
1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
7	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
11	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
19	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
21	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
25	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
29	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
31	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
32	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
33	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
34	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
35	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
36	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
37	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
39	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
40	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
41	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
42	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
43	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
44	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
45	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
46	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
47	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
48	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
49	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
50	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
51	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
52	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
53	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
54	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
55	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
56	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
57	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
58	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
59	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
60	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

\* L= *P. laevigata* ejemplar de referencia

Tabla 5A. Matriz de las tres especies de *Prosopis* generada con los fragmentos obtenidos con los 17 iniciadores seleccionados (Tabla 4).

Tamaño del fragmento (pb)	<i>P. laevigata</i>	<i>P. glandulosa</i>	<i>P. juliflora</i>
2300	1	1	1
2200	1	1	1
2100	1	1	1
2082	1	1	1
2072	1	1	0
2070	1	1	0
2068	1	1	1
2060	1	1	1
1850	0	0	1
1800	1	1	1
1750	1	0	1
1700	1	1	1
1600	1	1	1
1500	1	1	1
1480	0	1	1
1450	1	1	0
1430	0	0	1
1400	1	1	1
1350	1	1	1
1300	1	1	1
1250	1	1	1
1240	1	1	0
1210	1	0	1
1200	1	1	1
1190	1	1	0
1180	1	1	0
1150	1	1	1
1100	1	1	1
1050	1	1	1
1020	0	1	0
1000	1	1	1
990	1	1	1
950	1	1	1
910	0	1	0
850	1	1	1
810	1	0	1
800	1	1	1
790	0	1	0
780	0	0	1
700	1	1	1
690	0	0	1
680	1	1	0
650	1	1	1
600	1	1	1
590	0	0	1
550	1	1	1
510	1	0	0
490	0	0	1
475	1	1	0
450	1	1	1
400	1	1	0
390	1	0	0
350	1	1	1
340	1	0	1
310	0	0	1
300	1	1	1
280	1	1	1

## Preparación de las soluciones utilizadas:

- Iniciadores

Los iniciadores liofilizados Gibco y Roth se disolvieron respectivamente en 500 y 1000  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril para obtener soluciones de entre 5 a 10  $\text{pmol}/\mu\text{L}$ . La cantidad de pico moles obtenida depende del peso molecular del iniciador. Las casas comerciales que distribuyen estos productos proporcionan al adquirirlos una forma en la que especifican el peso molecular del iniciador y otras características importantes.

- Mezcla de dNTPs

En un tubo Eppendorf se añadieron 5  $\mu\text{L}$  de cada una de las soluciones concentradas de los 4 desoxirribonucleótidos (dNTPs) de la casa Gibco los cuales están a la concentración de 100 mM, posteriormente se agregaron 980  $\mu\text{L}$  de agua destilada estéril, para obtener una solución 200  $\mu\text{M}$  de dNTPs.

- Amortiguador TAE 10X

24.0 g de tris (hydroximetil aminometano)

5.71 mL de ácido acético glacial

10 mL de EDTA ( 0.5 M, pH 8.0)

Aforar a un volumen de 500 mL con agua destilada.

- Amortiguado TAE 1X

Tomar 10 mL de TAE 10X y aforar a 100 mL con agua destilada.

- Gel de agarosa

En un matraz Erlenmeyer de 500 mL de capacidad se agregan 1.2 g de agarosa tipo II (Sigma) y 100 mL de amortiguador TAE 1X. La agarosa se funde en un horno de microondas, durante 1.40 min. y se dejar enfriar hasta una temperatura aproximada de 30 °C. Posteriormente se vierte en la cámara de electroforesis la cual previamente se prepara (sellando los extremos y colocando el peine), para formar el molde que constituirá el gel. Estas cantidades son las requeridas para formar un gel de 15 x 15 cm. de diámetro y 7mm. de espesor.

- Colorante de carga: cantidades para 10 mL.

50% Glicerol                      10 mL

0.1% Azul de bromofenol    10 mg

0.1% Xilen cianol                10 mg

En un vaso de precipitados de 15 mL de capacidad, se colocan los tres componentes y para disolver se colocan durante 15 min en una parrilla eléctrica con agitación.

- Marcador 100 bp DNA (50 µg; 1µg/µL): cantidades para 100 µL.

En un tubo Eppendorf de 1mL de capacidad, se agrega 10µL del marcador y se diluye en 90 µL de colorante de carga, para tener una solución de 0.1 µg/µL.

- Bromuro de Etidio

5mg/mL

La preparación de esta solución debe hacerse con guantes y en un recipiente pequeño destinado para este fin, para evitar la contaminación del material, debido a que este compuesto es cancerígeno.