



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala



Análisis de la variabilidad genética de *Prosopis laevigata* (Fabaceae) en la región del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla, utilizando marcadores moleculares RAPD y caracteres morfométricos

T E S I S
que para obtener el título de
B I Ó L O G A
p r e s e n t a
Wendy Cano Domínguez

Director de Tesis: Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras

Laboratorio de Bioquímica Molecular, UBIPRO

Los Reyes Iztacala, Estado de México. 2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala



IZTACALA

Análisis de la variabilidad genética de *Prosopis laevigata* (Fabaceae) en la región del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla, utilizando marcadores moleculares RAPD y caracteres morfométricos

T E S I S
que para obtener el título de
B I Ó L O G A
p r e s e n t a
Wendy Cano Domínguez

Director de Tesis: Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras

Laboratorio de Bioquímica Molecular, UBIPRO

Los Reyes Iztacala, Estado de México. 2003





U.N.A.M. FES
IZTACALA

	página
ÍNDICE	i
ÍNDICE DE CUADROS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
INTRODUCCIÓN	1
<i>Prosopis</i> spp.	1
El mezquite en México	3
<i>Prosopis laevigata</i>	9
Marcadores morfológicos y genéticos	15
RAPD	19
ANTECEDENTES	21
OBJETIVOS	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
Zona de estudio	24
Obtención de muestras	26
Fase de estudio genético	26
Fase de análisis morfológico	29
RESULTADOS	32
Obtención de muestras	32
Fase de análisis genético	32
Fase de análisis morfológico	37
ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	50
LITERATURA CITADA	51

ÍNDICE DE CUADROS

	página
CUADRO 1 Especies nativas de mezquite (<i>Prosopis</i> spp.) en México	2
CUADRO 2 Clasificación del mezquite <i>Prosopis laevigata</i>	9
CUADRO 3 Localización de los sitios de muestreo	26
CUADRO 4 Caracteres considerados para el análisis morfológico	30
CUADRO 5 Diversidad genética y flujo génico de <i>Prosopis laevigata</i>	35
CUADRO 6 Matriz de correlación de las Φ_{st} pareadas	37
CUADRO 7 Marcadores con mayor participación en el PCO	41

ÍNDICE DE FIGURAS

	página
FIGURA 1 <i>Prosopis laevigata</i> , detalles de la vaina e inflorescencia	10
FIGURA 2 Mezquite del Jardín Botánico de Zapotitlán Salinas, Puebla	13
FIGURA 3 Zona de estudio	24
FIGURA 4 <i>Prosopis laevigata</i> en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla	25
FIGURA 5 . Dendrograma obtenido con el coeficiente de Jaccard	33
FIGURA 6 PCO obtenido a partir del coeficiente de similitud de Jaccard	34
FIGURA 7 Dendrograma de Φ_{st} pareadeas	21
FIGURA 8 Ejemplar de herbario de <i>Prosopis laevigata</i>	37
FIGURA 9 Fenograma obtenido a partir del coeficiente de distancia.	39
FIGURA 10 PCO obtenido con el coeficiente de distancia	40
FIGURA 11 <i>Prosopis laevigata</i> muestreados en Zapotitlán Salinas	42

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos Amplificados
AMOVA	Análisis Molecular de Varianza
CG	Granjas
dATP	Trifosfato desoxiadenosina
dCTP	Trifosfato desoxicitosina
dGTP	Trifosfato desoxiguanosina
dTTP	Trifosfato desoxitimina
H	Huertos
H _{pop}	Diversidad dentro de las poblaciones
H _{sp}	Diversidad de la especie
IS	Isla S
JB	Jardín Botánico
L.	Linneo
MBD	Matriz Básica de Datos
Nm	Flujo génico
O	San Antonio Texcala
OTU	Unidad Taxonómica Operativa
P	Panteón
PCO	Coordenada Principal
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RAPD	Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico
RFLP	Polimorfismos en la longitud de fragmentos de ADN
spp.	Especie
SSR	Secuencias Simple Repetidas
UPGMA	Agrupamiento por Promedio Aritmético no Ponderado
UV	Ultravioleta
var.	Variedad

El objetivo del presente estudio fue investigar la variabilidad genética de *Prosopis laevigata* en la región del Valle de Zapotitlán Salinas Puebla. Los mezquites se encuentran bien adaptados para habitar en zonas áridas y semiáridas y son utilizados como leña, madera, carbón y permite que se desarrolle vida silvestre en su dosel (Juárez-Muños *et al.*, 2002). La variabilidad genética de la especie fue determinada mediante la amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD) y utilizando 25 caracteres morfométricos. Se muestrearon seis zonas de Zapotitlán Salinas y un total de 36 individuos fueron muestreados. Los datos se procesaron con el programa NTSYS, y se utilizaron los estadísticos de Jaccard, DIST, UPGMA, PCO, MST y AMOVA. Para el análisis genético y morfométrico se obtuvo un dendrograma y PCO que permitieron observar el agrupamiento de los individuos, observándose que no existe una correlación de los individuos con los sitios de colecta. El AMOVA muestra que existe una mayor varianza entre individuos dentro de las poblaciones (81.4%) que entre las poblaciones (18.60%). Se obtuvo un ϕ_{st} de 0.186 lo cual corresponde a un $N_{em} > 1$, indicando un alto flujo génico. Ambos análisis, revelan que existe variabilidad entre los individuos de cada zona, principalmente entre los individuos colectados en la zona de Huertos (H). Por lo anterior y con base en la información obtenida, se propone que para diseñar planes y programas adecuados para la conservación de biodiversidad de esta especie, se deberá colectar el germoplasma de individuos presentes en todas las zonas, para asegurar que se conserve la mayor diversidad posible.

The aim of the present study is to investigate the genetic variability of *Prosopis laevigata* in Zapotitlán Salinas; Puebla. Mesquites are well adapted to grow in arid and semiarid regions, they are currently utilized for wood, fuel wood, fodder, honey and acts as a support to wild life (Juárez-Muñoz *et al.*, 2002). The genetic variability of this specie was determined using random amplified polymorphic DNA (RAPDs) and 25 morphometric parameters. Six areas (36 mesquites trees) of Zapotitlán Salinas were sampled. The genetic diversity based on the RAPDs pattern variation was determined by analyzing the molecular variance (AMOVA), it was also analyze with Jaccard, DIST, UPGMA, PCO, and MST (NTSYS Ver 2). For both analysis a dendrogram and a PCO were obtained and allowed to determine the different groups. No correlation was found between the collect zone and the sampled mesquites. AMOVA within populations was significantly higher (81.4%) than among populations (18.60%). The genetic variation found corresponds to a high gene flow ($\phi_{st} = 0.186$; $N_e m > 1$). It was found that there is variability between all the zones, mainly in the Huertos (H). Thus, the genetic diversity and the information obtained, can be useful to design conservation plans and programs to preserve the diversity of this specie, maybe the germoplasm of all the areas can be collected and preserved to ensure the conservation of the most diversity.

INTRODUCCIÓN

Prosopis spp.

Prosopis L. es un género primitivo dentro de la familia de las Mimosaceae. El género probablemente se originó en África tropical, donde actualmente sólo persiste *P. africana*, la especie menos especializada (Burkart, 1976). Los miembros norteamericanos del género pertenecen a cuatro líneas evolutivas, todas representadas también en América del Sur (Rzedowski, 1984).

Los antecesores de *Prosopis* pudieron migrar mediante un puente terrestre desde el centro de África hacia el este y oeste, a finales del Mesozoico o comienzos del Terciario (Rzedowski, 1988). La evolución de diversos linajes del género se debió realizar al promoverse una mejor funcionalidad en distintos hábitats, preferentemente en aquéllos con características de aridez (Burkart, 1976 y Rzedowski, 1988). Muy probablemente estas plantas hayan llegado a finales del Cretácico o en el Eoceno al norte de América vía Laurasia meridional (Tapia *et al.*, 1999).

La presencia de *Prosopis* en América es muy antigua, según se evidencia por la existencia de especies endémicas, tanto en el norte como en el sur del continente (Burkart, 1976).

Gradualmente se originaron 40 especies americanas y sus diversas variedades. En la actualidad han sido descritas 45 especies del género, de las cuales 41 son americanas, tres asiáticas y una africana (Burkart, 1976 y Schinini, 1981).

Se ha sugerido que Argentina es el principal centro de dispersión de *Prosopis* en América y que el México-texano es secundario; sin embargo, también se ha considerado que ambos centros sean de la misma edad (Burkart, 1976).

La distribución actual de *Prosopis* corresponde principalmente a ambientes de matorrales xerófilos (Rzedowski, 1988).

El género crece mejor cerca de orillas de ríos, valles con suelos profundos y en lugares donde el manto freático es elevado. México tiene una amplia variedad de especies nativas de *Prosopis* (Cuadro 1), y es en muchas regiones áridas la vegetación más común en varios kilómetros, formando bosques denominados mezquitales. En el país estas especies cubren una superficie de 4,092,178 hectáreas en un total de 17 estados (Cavazos, 1999). En México las comunidades de este género tienen una amplia distribución geográfica y ecológica, que va de los 0 a los 2500msnm (Maldonado-Aguirre, 1991).

Cuadro 1. Especies nativas de mezquite (*Prosopis* spp.) en México.

Especies	Distribución en México
<i>Prosopis laevigata</i> var. <i>laevigata</i>	San Luis Potosí, Centro y Sur de Tamaulipas
<i>Prosopis glandulosa</i> var. <i>glandulosa</i>	Noroeste
<i>Prosopis glandulosa</i> var. <i>torreyana</i>	Pacífico noroeste
<i>Prosopis juliflora</i> var. <i>juliflora</i>	Baja California
<i>Prosopis velutina</i>	Noreste
<i>Prosopis reptans</i> var. <i>cinerascens</i>	Noreste
<i>Prosopis pubescens</i>	Baja California
<i>Prosopis articulata</i>	Guaymas, Sonora, Tamaulipas, Veracruz, Baja California
<i>Prosopis tamaulipana</i>	Tamaulipas, Veracruz
<i>Prosopis palmeri</i>	Baja California
<i>Prosopis pazensis</i>	Baja California
<i>Prosopis bcharis</i>	Desierto Altar, Sonora

Tomado de Maldonado-Aguirre, 1991.

El mezquite prospera mejor en suelos arenosos profundos de buen drenaje. Los suelos donde existe una mayor distribución del mezquite, por lo general, tienen un alto contenido de sales. Los tipos de suelos son "Sierozem" y Chest nut, bien drenados, poco profundos, con alto contenido de arena, aunque también se desarrolla en suelos arcillosos (Gómez, 1970).

En la mayor parte de las regiones áridas de México, el mezquite se encuentra como arbusto, y solamente en ecosistemas o ambientes con abundancia de agua se desarrolla como árbol (Cavazos, 1999).

Aunque generalmente crece a lo largo de cursos de agua, las especies de *Prosopis* con frecuencia forman extensos matorrales densos. Pueden tolerar desiertos extremos y aun crecer rápidamente, si hay suficiente agua subterránea. Usualmente necesitan una lluvia anual de 250mm, pero algunos especímenes se han encontrado bien establecidos en lugares con lluvias anuales tan bajas como 50mm anuales (Villanueva, 1993).

Las adaptaciones que ha sufrido *Prosopis* para adquirir y retener la humedad están básicamente en el sistema radicular, la morfología de la hoja, y en las tolerancias fisiológicas de la planta; la capacidad que tiene el mezquite para absorber agua bajo fuerzas de tensión altas es una adaptación especial y muy eficiente en esta planta. Otra de las modificaciones del mezquite para poder retener el agua, es la reducción del tamaño de los estomas de las hojas (Felker, 1981).

El mezquite en México

El nombre común del mezquite es derivado de la lengua Náhuatl, en la cual la planta fue denominada *mizquitl* que significa "corteza utilizada para curtir", y el nombre del género *Prosopis* proviene del griego antiguo que significa corteza usada para curtir pieles de oveja. El mezquite en México ha estado sujeto a la acción

humana y hasta ahora permanece como un recurso biológico con una amplia distribución constituyendo parte importante de la flora nacional, alcanzando inclusive carácter predominante en ciertas regiones, estando ligado con la vida del campesino mexicano desde tiempos remotos (Villanueva, 1993).

Los usos del mezquite han variado a través del tiempo debido a los cambios culturales y los avances tecnológicos. Sin embargo, algunos de los usos más importantes se han mantenido constantes hasta la fecha.

En México las culturas prehispánicas que utilizaban el mezquite eran principalmente los Seris y los Yaquis (Baja California y Sonora). Con las vainas molidas preparaban atole el cual utilizaban con fines medicinales (Felger *et al.*, 1979).

Los Purépechas (Michoacán, Guanajuato, Querétaro, Guerrero, Colima, Jalisco y Nayarit) esculpían el mezquite para realizar figuras religiosas y la leña era ocupada principalmente en ceremonias religiosas (Moncayo, 1981).

Los Chichimecas (Centro de México) como importante grupo guerrero, ocupaban el mezquite para la fabricación de armas, flechas y arcos, dada la resistencia y durabilidad de la madera (Galindo, 1983).

En 1767, Solís, un fraile católico que visitaba las misiones localizadas en la parte Norte de la Nueva España, describió la presencia de *Prosopis* (González, 1979). En 1951, Hernández reporta de manera escrita al género *Prosopis* en México. Clavijero en su estudio de la flora de California, menciona al género *Prosopis* (Galindo, 1983).

Los grupos étnicos del norte del país consumen el mezquite de distintas formas como piloncillos, atoles (mezquiatole), panecillos (mezquitamal), queso de mezquite, golosinas, bebidas fermentadas y pinoles (Martínez, 1994).

En muchas regiones de México el mezquite se ha utilizado de diversas formas debido a sus múltiples cualidades; sus características le permiten ser aprovechado en forma directa, o bien, transformado.

Utilizado como leña, es un recurso muy aprovechado por los campesinos de zonas áridas y semiáridas del país. Cuando menos un 30% de los campesinos hacen uso de este recurso. El mezquite produce la mejor leña que se pueda obtener en la región semidesértica. Su madera es pesada y densa, lo que la hace ser una fuente de alto valor calorífico. Su combustión es estable y constante, impartiendo además un sabor agradable a los alimentos. Por consiguiente, el mezquite es el recurso energético preferido y esencial entre los habitantes de las regiones áridas y semiáridas. Sin embargo, el aprovechamiento constante de este tipo de vegetación es el que ha reducido aún más sus poblaciones, por lo que sus fuentes de aprovechamiento se están agotando aceleradamente, presentándose una fuerte escasez de combustible con adecuado poder calorífico (Felker, 1993).

El carbón de mezquite ha sido por muchos años, un importante producto para uso doméstico, además de contar con una amplia aceptación de mercado. Actualmente se está incrementando su popularidad para su uso en las cocinas de muchos hogares, áreas recreativas, restaurantes y algunos establecimientos especializados. El carbón de mezquite es preferido, en general, sobre cualquier otro tipo de carbón vegetal. Presenta una relativamente alta cantidad de calor, el cual se extiende por prolongados períodos de tiempo, siendo su combustión limpia (De la Garza, 1987).

La producción de carbón de mezquite en México fue de aproximadamente 2000 toneladas anuales hasta el año de 1980, cuando la producción se elevó a 10,000 toneladas. Hacia el año de 1985, esta producción se incrementó a 35 mil toneladas, de las cuales se exportan anualmente alrededor de 20 mil toneladas a los Estados Unidos (De la Garza, 1987).

En situaciones críticas como cuando se pierden los cultivos de maíz, frijol, trigo, o se reduce la porción de palma, lechuguilla o la obtención de cera de candelilla, los campesinos de las zonas áridas y semiáridas se dedican a la recolección de la vaina del mezquite, teniendo una gran importancia socioeconómica en estas áreas (INIF, 1985).

Prosopis es el género silvestre más ampliamente utilizado para obtener una alimentación esencial y segura en las regiones áridas y semiáridas de la República Mexicana. Los nativos de estas áreas en el pasado dependían de la miel de mezquite y de las vainas como componente principal de sus dietas.

La abundante secreción del estigma floral permite ser utilizada en apicultura, un árbol de mezquite es capaz de producir néctar para que las abejas elaboren 1kg de miel de buena calidad (Maldonado-Aguirre, 1991).

Las vainas de mezquite contienen grandes cantidades de azúcar y proteína, por lo que en la actualidad son consumidas como fruta fresca o hervidas en su miel. Ya secas se obtiene un polvo harinoso dulce que se puede consumir como pinole, galletas, pan, pastel, en atole con leche, como sustituto del café, o como piloncillos, los que son objeto de comercio local (Galindo, 1983).

Junto con el forraje del mezquite, las vainas sirven de alimento para el ganado, especialmente durante las sequías o escasez de otros forrajes. En México, miles de toneladas de vainas son colectadas anualmente de poblaciones naturales y vendidas como forraje o concentrado en raciones para el ganado (Felker, 1981).

Las vainas de mezquite tienen valores de proteína que alcanzan promedios de 9 a 17% según la especie (*P. velutina* = 17.8%; *P. glandulosa* = 15.1%; *P. alba* = 11.4%). Con respecto al contenido de azúcares promedian de 15 a 40% (*P. velutina* = 25.5%; *P. glandulosa* = 38.3%; *P. alba* = 35.7%) (Oduol *et al.*, 1986). La

producción de vainas varía considerablemente entre años, especies, sitios, y aún entre árboles de la misma especie.

La madera del mezquite tienen características de dureza, textura, color, estabilidad, la belleza de su acabado y grano de la madera que son de importancia esencial para su uso en la fabricación de muebles y artesanías, fabricación de pisos, así como para otros muchos usos (Barger & Ffolliot, 1972).

Estas características la hacen una de las mejores maderas. La madera de *Prosopis* spp. es algo más dura que especies como el cedro (*Quercus*), cerezo (*Prunus*) y nogal (*Juglans*), ya que tiene una densidad superior a 0.7, pero su ventaja real es que su cambio volumétrico máximo del 3 a 4% se encuentra entre los más bajos que cualquier otra especie en el mundo, lo cual significa que tiene una tendencia menor a contraerse con los cambios de humedad ambiental, si se le compara con alguna especie fina (Felker, 1993).

Debido a las características de los árboles de mezquite, en México no existen medidas comerciales de madera, ya que su dureza, malformaciones, etc. la hacen difícil de estandarizar y de trabajar; pero, precisamente esas mismas cualidades hacen que los artículos fabricados con esa madera sean muy apreciados entre las personas que pueden adquirirlos, debido a su gran durabilidad. Los resultados del trabajo artesanal con la madera del mezquite son de excelente calidad (Villanueva, 1993).

Por las características y cualidades técnicas de la madera de mezquite, ésta debería de tener un precio de 5 a 10 veces mayor como madera que el que se paga actualmente en los Estados Unidos por la leña de la especie, por lo tanto, se debería de considerar seriamente el desarrollo y manejo del *Prosopis* con el objetivo de producir madera para muebles o pisos finos (Felker, 1993).

Como uso medicinal, se obtiene un extracto de las vainas del mezquite y de las hojas fermentadas, el cual tiene un efecto antibacterial contra *Staphylococcus* spp. y *Escherichia coli*. Una infusión hecha de la corteza es utilizada para provocar vómito. Las resinas del tronco ayudan a aliviar la irritación de la garganta, en el tratamiento contra la disentería, dolor de muelas y problemas estomacales. Los folíolos utilizados como compresas sobre los ojos, ayudan a combatir infecciones (Maldonado-Aguirre, 1991).

El mezquite también ha sido utilizado para recuperar áreas salinas debido a su alta tolerancia a la salinidad. Un ejemplo de este uso es la reforestación y desalinización del Lago de Texcoco, donde los mezquites son utilizados por ser uno de los pocos árboles tolerantes a las grandes cantidades de sales (Singh, 1995).

Actualmente, la goma de mezquite es utilizada como emulsificante y sustituto de la goma arábiga, con lo cual se logran considerables ahorros. El Dr. Jaime Vernon Carter de la Universidad Autónoma Metropolitana y la Sociedad Cooperativa Trabajadores de Pascual, S. C. L. compran la goma de mezquite a campesinos de zonas áridas y semiáridas para desarrollar este nuevo emulsificante (Investigación y Desarrollo, 1999).

El bioprocesamiento de la vaina de mezquite para la producción de biomasa fungal, es también uno de los usos actuales del mezquite. Es una forma de aprovechar la vaina (fruto) como material forrajero y mediante éste someterla a un proceso y desarrollo fermentativo, fomentando así la utilización de la flora, promoviendo la siembra y preservación del mezquite y, finalmente, contribuyendo a evitar el avance de la desertificación (González *et al.*, 1999).

Prosopis laevigata

Prosopis laevigata (Humb. & Bonpl. ex Willd) M. C. Johnston (Cuadro 2) es el mezquite típico del centro y sur de México (Tapia *et al.*, 1999). Su morfología y afinidades ecológicas no son uniformes (Rzedowski, 1988) debido a la plasticidad fenotípica de un sitio a otro o de un año al siguiente (Galindo *et al.*, 1992).

Se distribuye en las isoyetas de 300 a 900mm y a altitudes hasta de 2300msnm, principalmente entre los 1800 y 1900msnm; se presenta en forma de árboles con alturas de 6 a 7m, así como formas arbustivas de 2 a 3m (Villanueva, 1993).

Cuadro 2. Clasificación del mezquite *Prosopis laevigata* (Cronquist, 1981).

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Fabales
Familia	Mimosaceae
Género	<i>Prosopis</i>
Especie	<i>Prosopis laevigata</i>

Los mezquites, *Prosopis laevigata* (Fig. 1) son árboles o arbustos, generalmente armados de púas o espinas; estípulas pequeñas, espinosas o ausentes, folíolos pequeños, en número variables; flores reunidas en espigas o racimos axilares, rara vez forman cabezuelas; flores pequeñas, pentámeras, de color amarillento; cáliz acampanado y brevemente dentado; pétalos unidos muy cerca de la base, valvados; estambres 10, libres, brevemente salientes, anteras con una glándula pequeña y decidua en el ápice; ovario sésil o estipitado, multiovulado, estilo filiforme, estigma pequeño y terminal; legumbre linear, recta o falcada, a veces

enroscada, comprimida o túrgida, indehiscente, el exocarpio delgado o coriáceo, el mesocarpio esponjoso o endurecido y el endocarpio cartilaginoso o papiráceo; semillas ovadas o comprimidas (Johnston, 1962).

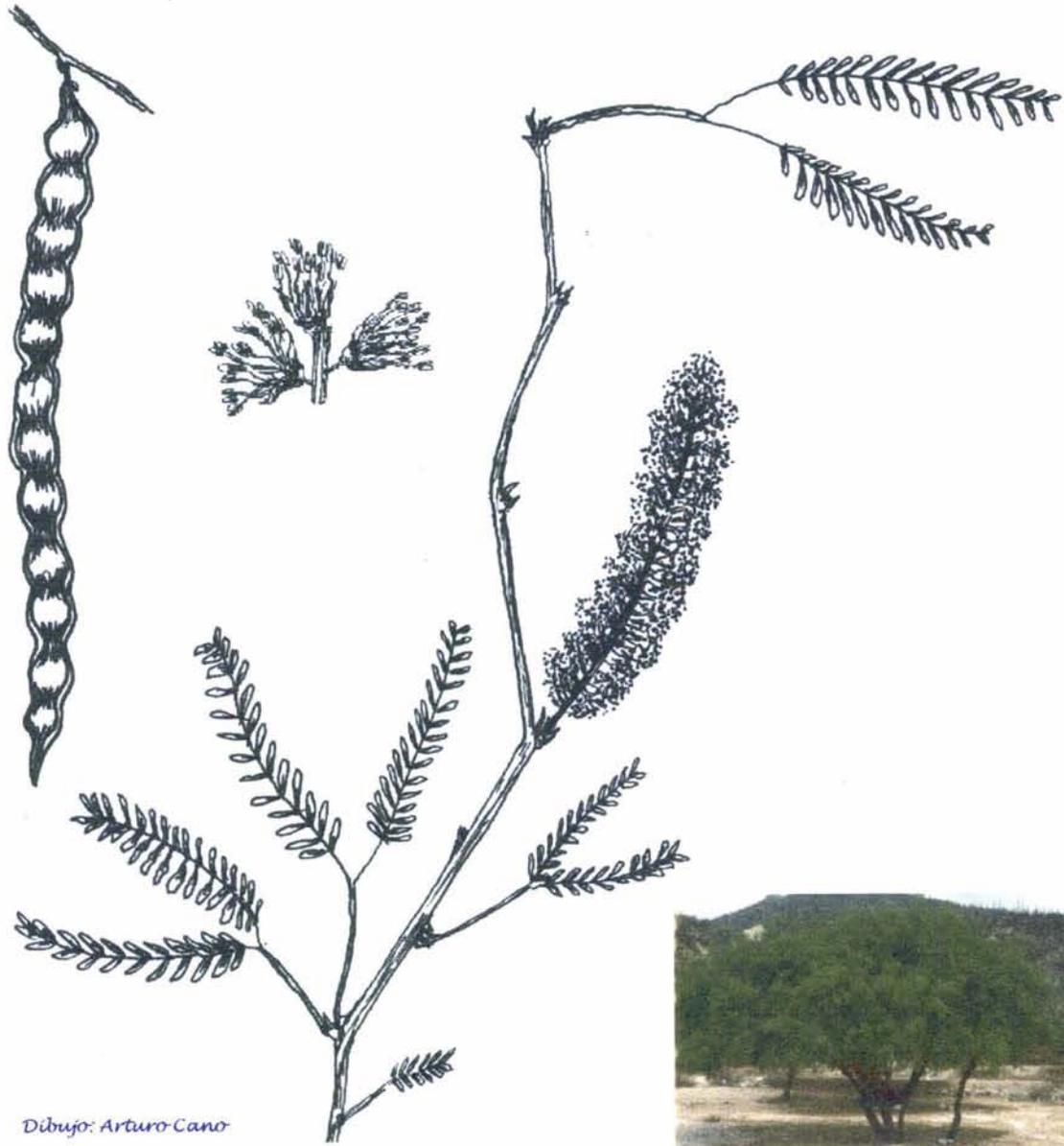


Figura 1. *Prosopis laevigata*, detalles de la vaina e inflorescencia. En el recuadro inferior se muestra fotografía de la planta.

Florece de febrero a mayo, la floración está influenciada por el fotoperíodo y la precipitación pluvial, los frutos maduran de junio a julio. *Prosopis laevigata* tiene un número cromosómico de $2n=28$ (Tapia *et al.*, 1999).

En las zonas áridas y semiáridas de México, las actividades agropecuarias realizadas son principalmente extensivas y de temporal. En estas regiones la ganadería se practica en las áreas de matorral, siendo las cabras, por su buena adaptación a las condiciones de aridez, el principal tipo de ganado en estas regiones (Mena & Gall, 1987). Estos y otros animales ayudan a la dispersión del mezquite, ya que la forma de reproducción de las plantas de mezquite es endozoocora, es decir, sus frutos deben pasar por el tracto digestivo de herbívoros (aves y mamíferos) para poder germinar. El papel de los herbívoros domésticos y silvestres en la dispersión de las plantas de mezquites es de suma importancia, ya que estos son los que consumen el nutritivo fruto, cuyas semillas son capaces de mantenerse viables hasta 44 años, y sus líquidos digestivos actúan positivamente sobre la germinación de las semillas, que pueden ser dispersadas en el excremento (Howe & Smallwood, 1982). El excremento de estos animales representa un medio adecuado para el desarrollo de la plántula debido a sus condiciones de humedad y temperatura (Bogusch, 1951).

La fenología de la semilla y las plántulas hacen que sean las partes más vulnerables del ciclo de vida de *Prosopis*. Debido al limitado suplemento de agua de los ambientes desérticos, es particularmente importante que las semillas sean dispersadas a los micrositos en los que puede germinar exitosamente y que las semillas posean adaptaciones para un rápido desarrollo de los tejidos radiculares, ya que la humedad en el desierto está disponible en la capa superficial del suelo únicamente durante un periodo limitado del año (Mooney *et al.*, 1997).

Una plántula emergente es completamente dependiente del corto periodo en que la humedad rodea a la semilla y la selección ha favorecido un mecanismo preciso que aprovecha un intervalo de humedad-temperatura relativamente estrecho

como señal para asegurar la germinación. La alta temperatura como requisito para la germinación es probablemente resultado de que *Prosopis* evolucionara en regiones con veranos lluviosos (Mooney *et al.*, 1997).

Los mezquites como especies freatofitas, no dependen de las lluvias directas para subsistir, ya que pueden extender su sistema radicular hasta 50m de profundidad (Nielsen *et al.*, 1987). No obstante para el desarrollo de la plántula es necesaria una buena cantidad de humedad en el suelo.

Junto al efecto positivo sobre la propagación de *Prosopis laevigata* mediante el paso de las semillas a través del tracto digestivo de las cabras, se presenta también un factor importante de efectos negativos para su propagación. Esto es producido por la actividad trófica de las cabras, mediante el ramoneo de las plántulas, lo cual puede destruirlas o bien favorecer a la forma de crecimiento policaulinar arbustiva. Por lo tanto, el efecto de las cabras con respecto a la dinámica poblacional del mezquite es ambivalente (Cantú, 1990). También la propagación y la poca regeneración del mezquite se debe, fundamentalmente, a la apertura de áreas agrícolas, a la explotación irracional y al pastoreo. El pastoreo origina que las plantas en estado juvenil sean consumidas por los animales, por lo que no alcanza a llegar a una etapa en la que se encuentre fuera del alcance de los animales (Villanueva, 1993).

Una vez establecida la plántula, si las condiciones ambientales fueron favorables, comienza a desarrollarse el sistema radicular del mezquite que depende del tipo de suelo y de la profundidad de penetración de la humedad. Los mezquites jóvenes desarrollan una fuerte raíz pivotante, generando posteriormente el sistema radicular lateral (Villanueva, 1993).

Ya establecido el mezquite en su etapa juvenil, éste puede adaptarse exitosamente para crecer y reproducirse. En sitios bajo condiciones extremas, la presencia de elementos leñosos, como el mezquite y otras especies arbóreas o

arbustivas desérticas, generan microclimas y condiciones edáficas favorables que permiten el establecimiento de otras especies (Fig. 2). A este proceso se le conoce como nodrizaje vegetal (Nobel, 1991), siendo una importante interacción de mutualismo, por la cual estos árboles y arbustos generan un microambiente por debajo del dosel facilitando el establecimiento de otras plantas perennes (Valiente-Banuet, 1991).



Figura 2. Mezquite del Jardín Botánico de Zapotitlán Salinas, Puebla.

El establecimiento de nuevos individuos bajo condiciones de campo, únicamente ocurre de manera exitosa bajo la copa de plantas nodrizas. Las plántulas sólo pueden sobrevivir en condiciones de sombra, ya que en sitios descubiertos mueren por desecación a los pocos días de haber emergido de las semillas (Valiente-Banuet & Ezcurra, 1991). La llegada de la semilla a dichos sitios

seguros es fundamental para el mantenimiento de las poblaciones en las comunidades (Valiente-Banuet *et al.*, 1995).

Se ha mostrado para el Valle de Tehuacán que las semillas de las cactáceas como *Neobuxbaumia tetetzo* y *Neobuxbaumia mezcalaensis*, sólo pueden germinar a la sombra de árboles o arbustos (nodrizas) en donde las condiciones microambientales, en especial la temperatura, no son tan extremas, lo que permite que las pequeñas semillas sobrevivan y germinen. Al igual que las cactáceas, otras especies de plantas de los desiertos requieren de la sombra de arbustos para sobrevivir (Valiente-Banuet *et al.*, 1991).

Una gran cantidad de especies vegetales de los desiertos se establecen a la sombra de otras, formando parches, los cuales son los escenarios de las interacciones bióticas de un gran número de especies. La dinámica de una comunidad desértica podría ser representada por el establecimiento de especies que pueden hacerlo en espacios desprovistos de vegetación, como es el caso de las plantas nodrizas, las cuales a su vez favorecen el establecimiento de otras especies debajo de su copa. Sin embargo, las especies que se han establecido y crecido bajo la copa de otra van a desplazar competitivamente a sus plantas nodrizas (Valiente-Banuet *et al.*, 1995).

Además, el mezquite tiene interacciones mutualistas importantes con un gran número de vertebrados e invertebrados, como por ejemplo, las abejas del género *Perdita* spp. (Simpson *et al.*, 1977). Se sabe que los mezquites son visitados, por lo menos, por 200 especies de invertebrados herbívoros (Wisdom, 1991). Además ofrece a los artrópodos un ambiente apropiado para su desarrollo (Gardner *et al.*, 1995) y tiene asociación con nemátodos (Freckman & Virginia, 1989) y bacterias simbióticas (Jenkins *et al.*, 1987).

Debido a estas interacciones asociadas a *Prosopis*, el mezquite tiene una gran importancia ecológica, especialmente al proveer recursos para muchas especies, tanto animales como vegetales (Golubov *et al.*, 2001).

Ecológicamente, el mezquite es un magnífico mejorador de suelos, sus hojas depositan un mantillo orgánico de importancia considerable; fija nitrógeno al suelo volviéndolo disponible a las plantas, sus raíces controlan el movimiento de dunas contrarrestando la erosión del suelo (Maldonado-Aguirre, 1991). Protege cuencas hidrográficas y es un elemento susceptible de manejo integral junto con la flora y fauna de las zonas áridas (Cavazos, 1999).

Marcadores morfológicos y genéticos

Los marcadores son las características distintivas de un organismo o población que se manifiestan de manera constante. Esas características son las que hacen que cada individuo sea diferente a otros individuos de su misma especie. Para evaluar esas características se utilizan diferentes tipos de marcadores, como pueden ser los marcadores morfológicos y moleculares, incluyendo los bioquímicos y genéticos (Rivera *et al.*, 1991).

Las características morfológicas de los organismos son el primer indicador visible para la identificación y diferenciación de genotipos (Montalvo, 1998). Para estimar la variación en una población se utilizan características morfológicas que permiten observar y analizar variaciones fenológicas significantes en cada individuo y hacer una comparación entre individuos de zonas distintas (Hansen *et al.*, 2000).

Morfológicamente las plantas están sometidas a diversos factores que son los que determinan su forma y apariencia física, éstas son determinadas por la precipitación, la temperatura de invierno, el sustrato, la orientación y el estrés mecánico (experiencia) y por la estatura, arquitectura de ramificación y filotaxis

(ancestrales), por medio de los cuales la planta se podrá adaptar o no a su medio ambiente (Cody, 1998).

Los caracteres morfométricos han sido utilizados básicamente para estudios taxonómicos, como las clasificaciones fenéticas (Kaplan, 2001). En este tipo de estudios son considerados caracteres cuantitativos, cualitativos, discretos, continuos, micro-caracteres, macro-caracteres, variantes, no variantes y la utilidad del carácter a diferentes rangos (específicos, genéricos o familias) (Sneath & Sokal, 1973). Estos caracteres son sometidos a análisis multivariados para determinar qué tanto la variación morfológica total es discontinua y así, poder conciliar información con los caracteres taxonómicamente significativos (Fjellheim *et al.*, 2001).

Las descripciones basadas en datos morfológicos no son tan veraces para proveer información real para el cálculo de distancias genéticas o validación de pedigrís, sobre todo en materiales colectados en diferentes años o localidades (Montalvo, 1998). Esto se debe básicamente a que genotipos diferentes pueden dar fenotipos aparentemente similares (Smith & Smith, 1992). Además que el ambiente en el cual se encuentre la población determinada puede influir y contribuir a la modificación de su fenotipo (Tapia *et al.*, 1999).

La variación de caracteres tales como hojas, frutos, metabolitos secundarios e isoenzimas ha dado una idea de variabilidad intra e interespecífica, tanto en el fenotipo como en el genotipo. Así se han establecido correlaciones positivas entre modificaciones en hojas y frutos y el incremento de aridez (Tapia *et al.*, 1999).

Debido a lo anterior, actualmente los estudios morfométricos han sido complementados con técnicas moleculares, que se basan en el análisis de los constituyentes químicos y/o la caracterización de macromoléculas (Otero *et al.*, 1997).

Desde el punto de vista de la genética de poblaciones, existen también caracteres métricos que determinan las características de las plantas. Básicamente éstos son determinados por los genes, teniendo que el efecto de cada gen individual es pequeño en comparación con el efecto total, éstos son altamente influenciados por el ambiente al expresarse o desactivarse. Como consecuencia de estas características, su manifestación fenotípica ofrece una variación continua que demuestra variabilidad (Márquez, 1991).

Por lo tanto, se tiene en la variabilidad genética un modo más efectivo, que la plasticidad fenotípica, para que los individuos en una comunidad se enfrenten con ambientes que son cambiantes en tiempo y espacio, además de ser un prerrequisito para la evolución a largo plazo (Tapia *et al.*, 1999).

Cada individuo experimenta a través de su vida múltiples cambios en la morfología, en la fisiología, en el comportamiento y en otros aspectos. Estos cambios carecen de permanencia ya que desaparecen con el individuo (características morfológicas). Sin embargo, los cambios que tienen lugar en el material hereditario pasan de un individuo a sus descendientes, siendo acumulativos a lo largo de las generaciones. Los cambios evolutivos que se producen a lo largo de la historia de vida son el resultado de cambios genéticos acumulados (Ayala, 1980).

En la mayoría de los organismos la información genética está codificada en el ácido desoxirribonucleico (ADN). La utilización de fragmentos de ADN como marcadores genéticos refleja los polimorfismos que son la base molecular que determina genéticamente las diferencias fenotípicas entre los individuos (Berumen, 1993).

Las poblaciones silvestres poseen relativamente altas frecuencias de polimorfismos debido a pequeños cambios en la molécula de ADN, tales como mutaciones puntuales, sustituciones en las bases nucleotídicas, inserciones,

deleciones y translocaciones, que pueden ser el resultado de la presión de selección que ejercen diversos factores tanto naturales como antropogénicos (Chakraborty & Bogemans, 1997).

Por lo que el uso de marcadores genéticos ofrece la posibilidad de realizar el análisis de la diversidad genética de las poblaciones vegetales, así como estudios detallados de la constitución genética entre las poblaciones. (Lynch & Milligan, 1994; Kijas *et al.*, 1995; De Greef & Triest, 1997) y flujo de genes entre estas poblaciones (Assmussen & Schnabel, 1991; Ennos, 1994).

Recientemente el desarrollo de los sistemas de marcadores moleculares genéticos ha llevado a una intensa investigación y caracterización en el ámbito genético tanto de plantas cultivadas como silvestres. Estas técnicas, junto con programas estadísticos, ofrecen una poderosa ventaja para evaluar la diversidad genética y poder diseñar programas de conservación de especies.

El análisis de organismos desde el punto de vista genético y morfométrico, permite elucidar varios aspectos sistemáticos-taxonómicos de flujo genético, variabilidad genética y niveles de perturbación que tienen los individuos en una comunidad determinada (Fjellheim, 2001).

El uso de marcadores moleculares como indicadores de acciones ejercidas por factores físicos y antropogénicos resulta muy útil. La ventaja al emplearlos radica en la resolución para seleccionar y utilizar información basada en los polimorfismos fenotípicamente neutros que se encuentran presentes en forma natural dentro de una población.

Existen varios tipos de marcadores moleculares, algunos son más adecuados para ciertas aplicaciones que otros. Las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) presentan un gran número de marcadores generados en una reacción simple (radio múltiple) y el número efectivo de alelos

que pueden ser detectados por cada marcador en un set determinado de individuos (información contenida), hacen que sea una de las técnicas más utilizadas para el estudio de poblaciones (Van Eck *et al.*, 1995).

IZT.

Algunos tipos de sistemas de marcadores moleculares son: RFLP (del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (del inglés Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (del inglés Amplified Fragment Length Polymorphism) y los SSRs (del inglés Simple Sequence Repeats) o microsatélites; los cuales han sido utilizados ampliamente y su desarrollo ha permitido aumentar las perspectivas de diferentes proyectos de investigación genética. El desarrollo y el uso de estas técnicas moleculares han revolucionado el estudio del genoma, su organización y su función en un corto tiempo. Cada uno de estos son más adecuados para ciertas aplicaciones que otros (Breyne *et al.*, 1997).



RAPD

El análisis de Amplificación Aleatorio del ADN Polimórfico (RAPD) está basado en la técnica de PCR y es uno de los sistemas cuya demanda y aceptación se ha incrementado por ser versátil, útil y económico en la generación de marcadores moleculares (Waugh & Powell 1992).

Para estudios de variación genética es una de las técnicas más utilizadas. En lugar de utilizar un par de oligonucleótidos se utiliza un solo oligonucleótido corto, capaz de unirse a diferentes loci lo que producirá la amplificación de secuencias aleatorias de un complejo de ADN utilizado como templado (Breyne *et al.*, 1997). El polimorfismo será el resultado de cambios en el sitio de unión del oligonucleótido o por cambios que alteran el tamaño o evitan la amplificación del ADN. El polimorfismo obtenido es utilizado como un marcador molecular para diferentes propósitos (Montalvo, 1998). Los productos de amplificación individuales

representan un alelo por locus y son transmitidos como marcadores dominantes (Breyne *et al.*, 1997).

El procedimiento de los RAPD es relativamente rápido y sencillo; se emplean pequeñas cantidades de ADN, no requiere radioactividad, ni el conocimiento previo del genoma del organismo a estudiar (Williams *et al.*, 1990).

Por medio de la técnica RAPD se puede estimar la variación genética. Actualmente la diversidad genética es utilizada para describir, estudiar, conservar y analizar la riqueza biológica (Eguiarte, 1993).

El conocimiento de la estructura genética de las poblaciones y la caracterización de la variación genética, son factores preponderantes para la definición de estrategias efectivas en los programas de mejoramiento y para la comprensión de las consecuencias de la manipulación de esa variabilidad (López *et al.*, 2001).

ANTECEDENTES

Los marcadores moleculares han sido muy utilizados para estudios de géneros o especies, tal es el caso del género *Medicago*, una leguminosa (Brumer *et al.*, 1995) y de forma particular en la especie *Medicago truncatula*, en donde se realiza un análisis jerárquico de la variación de sus componentes (Bonnin *et al.*, 1996).

Otras especies como *Acanthopanax brachypus* han sido trabajadas con la técnica de RAPD, analizando su diversidad genética intra-poblacional (Yan *et al.*, 1997).

En *Lilium martagon*, se estimó la variación genética entre poblaciones domésticas y no domésticas (Persson *et al.*, 1998).

De seis poblaciones de *Isotoma petraea* (Lobeliaceae) en Australia, Bussell (1999) aplicó RAPD para separar a las poblaciones y entender el origen, mantenimiento y distribución de la diversidad genética en plantas. Lo que permitió comprender mejor los patrones de especiación, adaptación y dinámica poblacional.

Bessegá *et al.* (2000) estimaron la variabilidad genética en poblaciones de *Prosopis glandulosa* y *Prosopis velutina* (Leguminosae, Mimosoideae) mediante isoenzimas y RAPD, para un estudio genético y de taxonomía en Argentina.

Un estudio de genética de poblaciones fue el realizado por Sales y colaboradores (2001), con *Digitales minor* (Scrophulariaceae), una planta endémica de las Islas Baleáricas utilizando marcadores tipo RAPD.

En el 2002 Juárez-Muñoz *et al.*, investigaron la estructura y variabilidad genética dentro y entre cuatro poblaciones de *Prosopis* en México, así como la relación de las poblaciones basado en el análisis de los marcadores RAPD.

Los trabajos en los que se relacionan los caracteres morfométricos con los caracteres moleculares son escasos.

En el 2000, Hansen y colaboradores combinaron el análisis molecular y el morfológico para obtener variaciones taxonómicas en algunos miembros árticos de *Potentilla* (Rosaceae).

En un trabajo posterior Fjellheim y colaboradores (2001) realizaron estudios morfológicos y moleculares de *Festuca brachyphylla* en Svalbard. Se muestra que la combinación detallada de análisis moleculares y morfológicos representan una poderosa herramienta para estudios taxonómicos.

Oflet *et al.* (2001) resaltan la importancia y la utilidad de los marcadores genéticos y morfométricos al utilizarlos para establecer parámetros para realizar estrategias de conservación de taxas, ya que ambos marcadores ofrecen un alto grado de confiabilidad en los resultados. Utilizando RAPD y 37 caracteres morfométricos para *Sedum integrifolium* (Crassulaceae).

En el 2002, Casiva *et al.* realizaron un estudio fenético de tres especies Argentinas de *Acacia* (Fabaceae) utilizando caracteres morfométricos, isoenzimas y marcadores tipo RAPD. En este estudio se trata de complementar la información que se obtiene con cada una de las diferentes técnicas, obteniendo que el dendrograma de RAPD muestra cierta correlación a nivel intraespecífico con el morfológico y el de isoenzimas.

En el caso de la planta en estudio, *Prosopis laevigata*, y la aplicación de las técnicas morfométricas y moleculares se espera establecer una comparación entre ambos resultados, y poder establecer diferencias entre individuos silvestres y los individuos que se encuentran en los huertos, ya que al menos morfológicamente los individuos de los huertos presentan diferencias marcadas con los individuos silvestres.

OBJETIVOS

Objetivo general



Analizar la variabilidad genética de *Prosopis laevigata* mediante el uso de marcadores moleculares RAPD y caracteres morfométricos, en la región del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla.

Objetivos particulares



Estimar la diversidad genética de *Prosopis laevigata* mediante el sistema de marcadores moleculares RAPD y el análisis morfométrico.



Estimar el índice de flujo génico entre los sitios de muestreo de *Prosopis laevigata* mediante el sistema de marcadores moleculares RAPD.



Establecer una comparación de resultados obtenidos para individuos silvestres e individuos conservados en huertos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Zona de estudio

El Valle de Zapotitlán Salinas forma parte del Valle de Tehuacán en el Estado de Puebla, México. Tiene una superficie aproximada de 3000 hectáreas y se encuentra ubicado entre los 18° 20' N, 97° 28' W (Fig. 3). La aridez de la región es debida principalmente al efecto de la sombra orográfica producida por la Sierra Madre Oriental (Smith, 1965). Tiene una precipitación de 380mm anuales, con una temperatura media anual de 21°C (García, 1973).

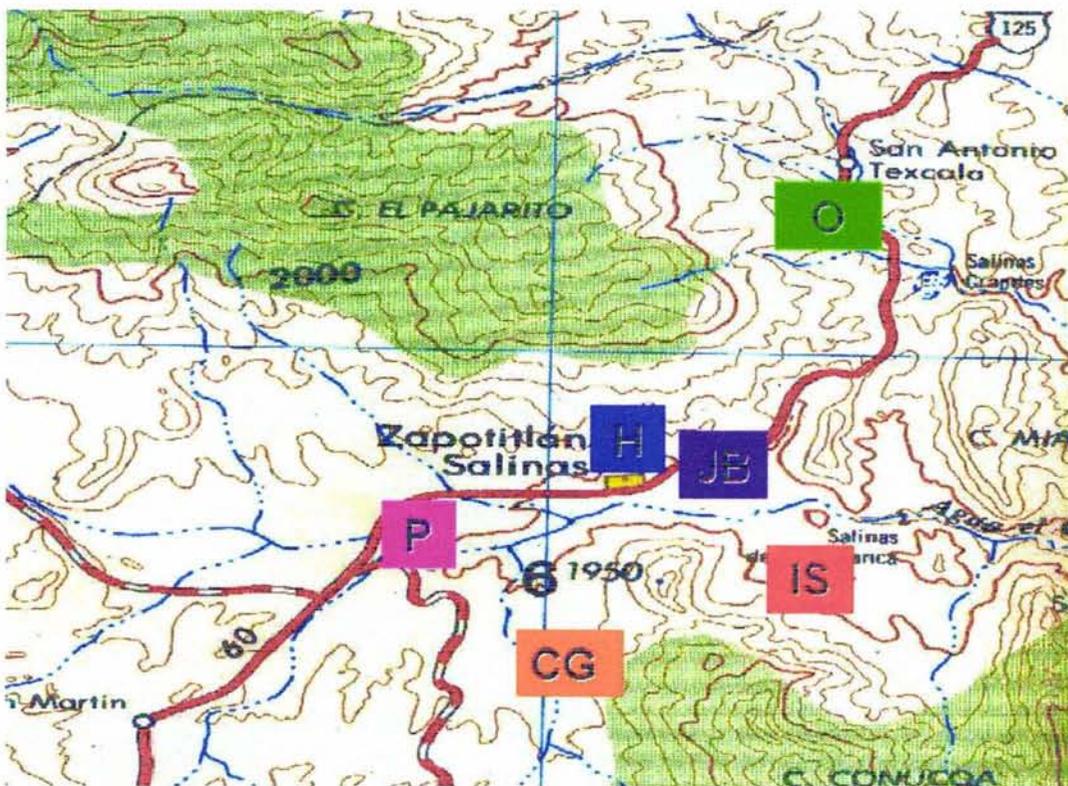


Figura 3. Zona de estudio. Los recuadros representan los sitios de colecta, representados por: Huertos H, San Antonio Texcala O, Cultivo Granjas CG, Isla S IS, Panteón P, Jardín Botánico JB.

El Valle de Zapotitlán Salinas está considerado como un centro de megadiversidad y endemismo a nivel mundial (www.tehuacán.com, 2001). Cuenta con lugares severamente deteriorados, así como, con otros cubiertos por mezquitales que se encuentran en condiciones menos alteradas, tanto en cubierta vegetal, como en las condiciones edáficas presentes (Dávila *et al.*, 1993).

Esta región ha sido una de las partes más estudiadas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, al cual pertenece el Valle de Zapotitlán Salinas. Sin embargo, los trabajos a nivel de riqueza, diversidad y ecología de comunidades estudiados desde el punto de vista genético aún son escasos y mucho más aquéllos especializados en el conocimiento de la biología de algunos elementos vegetales y en lo relacionado al conocimiento de las condiciones abióticas.

El presente trabajo trata de contribuir con el estudio de los recursos vegetales de la región del Valle de Zapotitlán Salinas Puebla y toma como modelo de estudio a *Prosopis laevigata* mezquite (Fig. 4), por la importancia que tiene dentro del Valle de Zapotitlán Salinas.

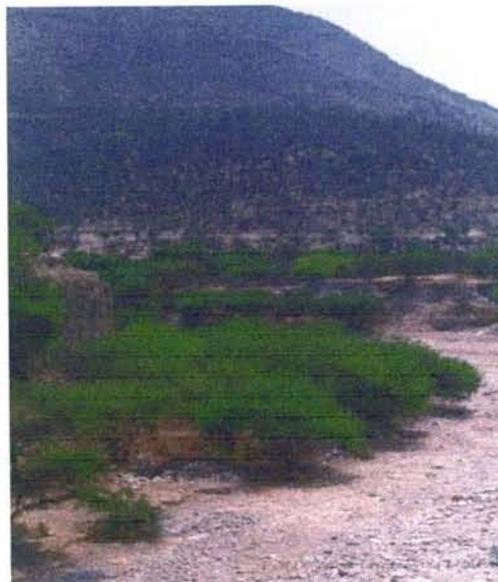


Figura 4. *Prosopis laevigata* en la región del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla.

Obtención de muestras

Se colectaron muestras de 36 individuos localizados en seis lugares del Valle de Zapotitlán Salinas (Cuadro 3 y Fig. 3). Estos sitios fueron previamente elegidos en función del grado de perturbación que presentan, ya que dada la degradación de la zona se encuentran áreas que al menos fisonómicamente son diferentes (López, 2001). Se utilizaron los mismos individuos colectados tanto para el análisis genético como para el análisis morfométrico.

Cuadro 3. Localización de los sitios de muestreo y número de muestras de *Prosopis laevigata* en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla.

Zona	No. individuos muestreados	Latitud (° N)	Longitud (° W)
San Antonio Texcala (O)	5	18°23'309"	97°26'712"
Jardín Botánico (JB)	5	18°20'30"	97°28'40"
Huertos (H)	10	18°20'27"	97°29'24"
Cultivo Granjas (CG)	5	18°18'55"	97°29'37"
Isla S (IS)	6	18°20'29"	97°28'37"
Panteón (P)	5	18°20'47"	97°28'36"

Fase de estudio genético

I. Obtención de muestras

Se colectaron folíolos jóvenes de ramas laterales terminales de cada mezquite (aprox. 30g). Las ramas seleccionadas eran las que presentaban los folíolos de color verde más intenso (folíolos jóvenes) y no presentaban alteraciones por insectos, parásitos u otros factores. Los folíolos se desprendieron del raquis y se colocaron en papel aluminio para su congelamiento en nitrógeno líquido y su posterior transportación y almacenamiento en un ultracongelador Revco a -70°C para su procesamiento.

II. Aislamiento de ADN genómico

El ADN se extrajo utilizando el método de Dellaporta *et al.* (1983). El ADN fue resuspendido en agua destilada estéril y almacenado a 4°C. La cuantificación de ADN se realizó en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer lambda 2S. La lectura se realizó a una absorbancia de 260nm (cuantificación de ADN), 280nm (cuantificación de proteínas) y a 320 (cuantificación de contaminantes). La concentración de ADN total se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\mu M}{\mu L} = (A_{260} - A_{320}) \cdot (50)$$

donde: A_{260} y A_{320} = lecturas a estas absorbancias

50 = Coeficiente de extinción Molar del ADN

III. Amplificación

La reacción de amplificación se desarrolló en 25 μ l, conteniendo: Tris HCl 10mM (pH 8.3), KCl 50mM, MgCl₂ 2mM; así como 100mM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP); 0.2mM de primer, de 50 a 200ng de DNA genómico y 0.1 unidades de amplitaq polimerasa. Se utilizaron cuatro primers de las series OPERON™: A13 5' CAGCACCCAC 3', C07 5' GTCCCGACGA 3', C08 5' TGGACCGGTG 3' y J05 5' CTCCATGGGG 3'. La amplificación se realizó en un termociclador de ADN programado a 40 ciclos, cada ciclo establecido como sigue: 1min a 94°C para la desnaturalización, 1min a 37°C para la alineación y finalmente 1min a 72°C para la polimerización.

Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2% teñidos con bromuro de etidio. Los polimorfismos (bandas) fueron revelados con luz ultravioleta (UV) y las imágenes de los geles se

almacenaron digitalmente para su análisis con el programa Alphamager utilizando el Multimage™ Light Cabinet.

IV. Análisis de resultados

Las bandas visualizadas fueron codificadas en una matriz de ausencia (0)/presencia (1) de bandas. El alelo dominante representa la presencia de la banda en la que los individuos $+/+$ y $+/-$ tienen el fenotipo (1) y los individuos $-/-$ tienen el fenotipo (0) (Crisci, 1983). A partir de la matriz se estimó la similitud genética por medio del índice de Jaccard (Vierling & Nguyen, 1992).

La matriz de similitud se analizó utilizando el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) con el programa Ntsys Versión 2.

Se realizó el análisis de coordenadas principales (PCO) para observar las relaciones entre individuos. Para la evaluación del flujo génico entre poblaciones se utilizó un análisis de varianza molecular (AMOVA). Mediante el índice de Shannon se estimó la diversidad genética para observar el grado de variación entre cada población. Se calculó el flujo génico ($N_e m$) mediante la siguiente fórmula:

$$N_e m = [(1/4a) (1/\Phi_{st}) - 1]$$

$$\text{donde: } a = [n/(n-1)^2]$$

n = número de poblaciones analizadas

Fase de análisis morfológico

I. Obtención de ejemplares

De los mismos individuos del análisis genético se tomó una rama terminal lateral que fue prensada. Se seleccionó una rama por individuo teniendo en consideración que dicha rama tuviera inflorescencia y/o vaina. Se evitó que las ramas colectadas presentaran algún tipo de daño y se tratara de ramas terminales laterales ubicadas en la parte media del árbol o el arbusto. Cada individuo fue considerado como una Unidad Taxonómica Operativa (OTU siglas en inglés).

Los ejemplares fueron prensados para más tarde ser montados para ejemplar de herbario.

II. Elección de los caracteres

Se eligieron 25 caracteres de acuerdo a la descripción del mezquite (Rzedowski *et al.*, 1985). Se consideraron los caracteres que eran más variables físicamente entre una zona de colecta y otra (Cuadro 4). El tipo de carácter fue determinado de acuerdo a las unidades que estos presentaban, los caracteres continuos fueron los que presentaban unidades en el sistema métrico decimal o aquellos que requerían de conteos directos (características cuantitativas), mientras que los caracteres discontinuos fueron porcentajes o características cualitativas. La estandarización se realizó de acuerdo al tipo de carácter, para los caracteres discontinuos se realizó una transformación lineal.

Para estimar la altura de la planta se utilizó un clinómetro, cinta métrica, regla y un vernier para obtener las mediciones. Posteriormente se registró el estado de los caracteres presentes.

El hábito de la planta se determinó considerando la presencia o ausencia de ramificación en la base del tronco.

Cuadro 4. Caracteres considerados para el análisis morfológico del mezquite. Tipo de caracter C: Continuo, D: discontinuo.

No.	Caracter	Tipo de Caracter	Descripción
1	Largo del peciolo	C	mm
2	Pubescencia	D	% de tricomas en el foliolo
3	Largo de la espina estipular	C	mm
4	Ancho de la espina estipular	C	mm
5	Pubescencia periférica	D	% de tricomas alrededor del foliolo
6	Pubescencia en el raquis	D	% de tricomas en el raquis
7	Número de pinas	C	Conteo
8	Largo de raquis	C	mm
9	Largo de la espícula	C	mm
10	Número de pares de foliolos	C	Conteo
11	Ancho de foliolos 1	C	mm Parte basal de la pina
12	Ancho de foliolos 2	C	mm Parte media de la pina
13	Ancho de foliolos 3	C	mm Parte superior de la pina
14	Largo de foliolos 1	C	mm Parte basal de la pina
15	Largo de foliolos 2	C	mm parte media de la pina
16	Largo de foliolos 3	C	mm parte superior de la pina
17	Pubescencia en nervadura abaxial	D	% de tricomas
18	Pubescencia en la parte abaxial	D	% de tricomas
19	Pubescencia en nervadura adaxial	D	% de tricomas
20	Pubescencia en la parte adaxial	D	% de tricomas
21	Diámetro del tronco	C	cm
22	Diámetro de la rama	C	cm
23	Hábito de la planta: árbol/ arbusto	D	1= árbol 2= arbusto
24	Altura de la planta	C	m
25	Abundancia de estomas	D	% de estomas en la parte abaxial

III. Construcción de una matriz básica de datos

Con la información obtenida en los pasos anteriores se construyó una matriz básica de datos (MBD) de OTU por estados de caracter. Posteriormente se estandarizó la MBD utilizando el programa Ntsys Versión 2.

IV. Análisis de resultados

La MBD estandarizada se analizó por medio del índice de distancia, el método de agrupamiento SAHN (Sequential Agglomerative Hierarchical and Nested) permitió realizar un comparativo de agrupamiento con el que se construyó un dendrograma obtenido con el método UPGMA, basados en los promedios aritméticos de los caracteres evaluados de la planta. Se realizó un análisis de ordenación por PCO para identificar que estados de caracter presentan una mayor puntuación y por lo tanto producen la mayor separación o diferenciación entre los individuos estudiados. De la misma forma se calculó una matriz de correlación entre las variables y se obtuvieron los vectores característicos para cada estado de caracter. A partir de estos vectores se calcularon los componentes que presentaron una mayor participación y se graficaron con respecto a las OTUs con el fin de ordenar a los individuos en los ejes de variación. Observándose así, los estados de caracter más eficaces en la discriminación de los individuos, seleccionando los caracteres que tuvieron el valor más alto, independientemente del signo que presentaran.

RESULTADOS

Obtención de muestras

Se muestrearon un total de 36 individuos de *Prosopis laevigata*. Los individuos colectados fueron marcados en el campo para su localización y recolectas posteriores.

Los individuos colectados en la zona de San Antonio Texcala (○) se encuentran fuera de la cuenca del Valle de Zapotitlán Salinas, esta colecta se realizó para tener una referencia externa y ver las diferencias existentes entre estos y los individuos del Valle de Zapotitlán Salinas. Los individuos de Granjas (CG), de la Isla S (S) y del Panteón (P) son silvestres ya que no se les da ningún manejo, al igual que los individuos ubicados en el Jardín Botánico (JB), que a pesar de encontrarse en un área protegida no cuentan con cuidados especiales, como riegos, poda, aplicación de abonos, etc. En contraste, los individuos de Huertos (H) al encontrarse ubicados dentro de las casas de los pobladores, reciben algún tipo de manejo o al menos son tolerados.

Fase de análisis genético

Las muestras fueron colectadas por duplicado, una de las cuales se utilizó para realizar la extracción de ADN y la otra se congeló para futuras extracciones y como referencia. El ADN se extrajo de las 36 muestras de los individuos muestreados. Se utilizaron 2g de tejido aproximadamente para la extracción de ADN de cada individuo, obteniéndose una cantidad de 800 a 5000ng de ADN/□l por muestra. Para la amplificación se obtuvieron un total de 60 bandas polimórficas de los 36 individuos utilizando los cuatro primers.

En la figura 5, se muestra el dendrograma obtenido a partir del coeficiente de similitud de Jaccard.

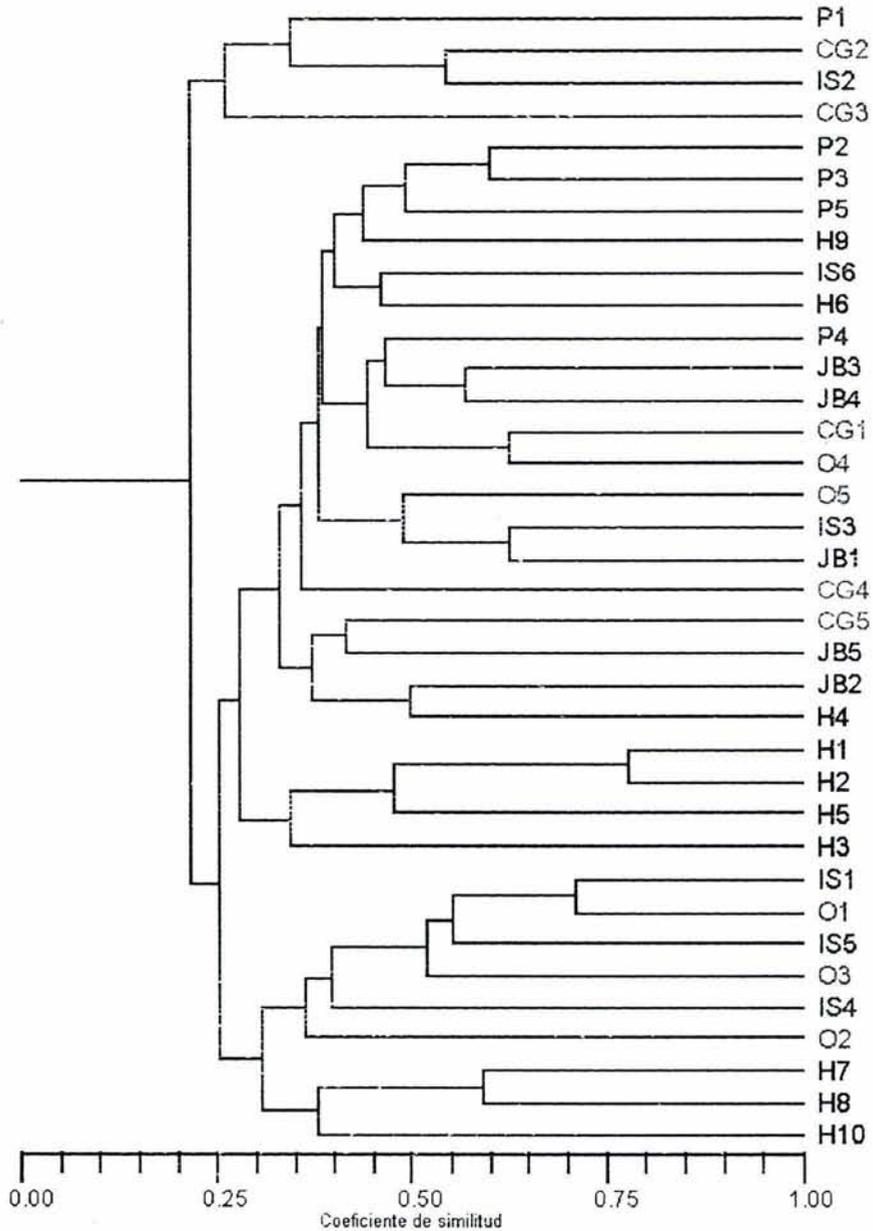


Figura 5. Dendrograma obtenido a partir del coeficiente de similitud de Jaccard.

Se obtuvo un coeficiente de correlación de $r = 0.82$.

Donde: H = Huertos, O = San Antonio Texcala, CG = Cultivo Granjas, IS = Isla S, P = Panteón y JB = Jardín Botánico.

El dendrograma permitió observar el agrupamiento de los individuos, obteniéndose una $r = 0.82$, lo cual es un buen indicador sobre la robustez del árbol. Mientras que el PCO (Fig. 6) nos da una imagen en tres dimensiones (coordenadas) del agrupamiento de los individuos. De la misma forma que para el dendrograma, no hay una agrupación clara y bien definida para cada uno de los grupos.

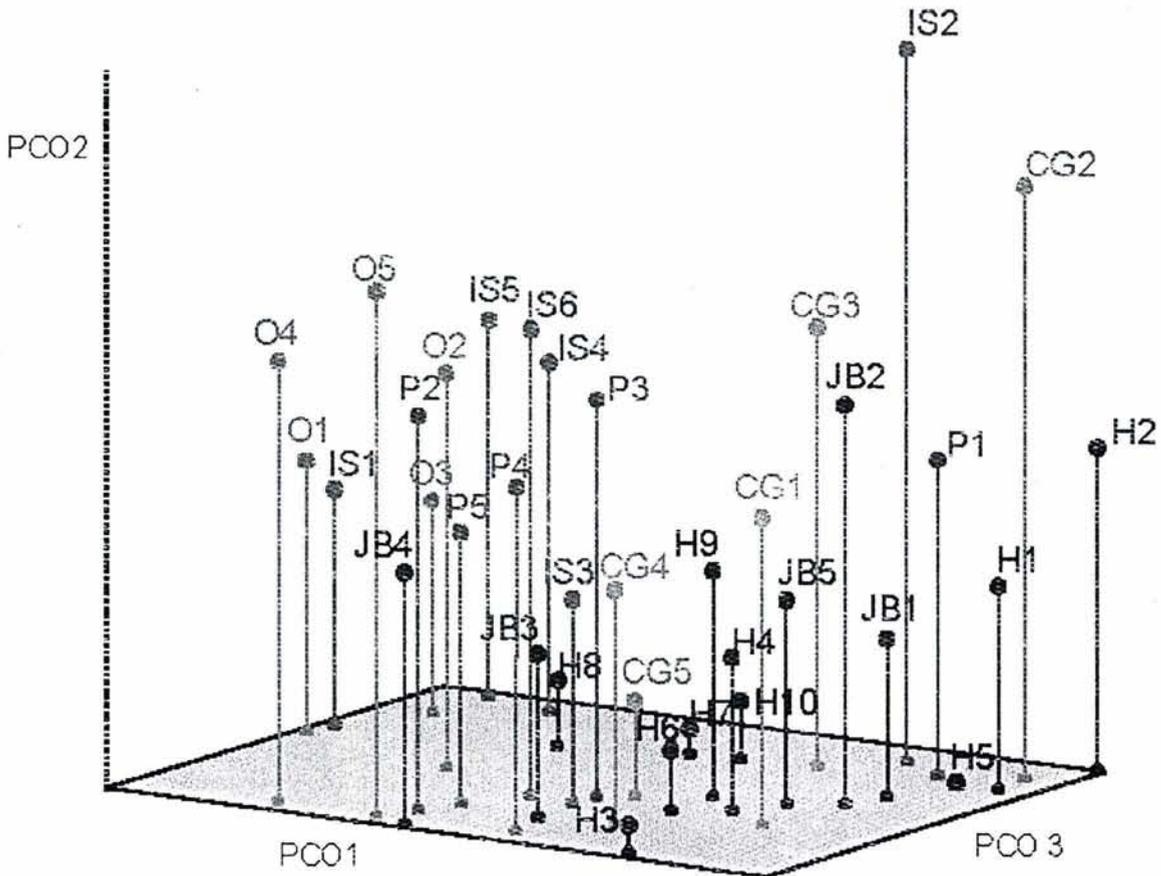


Figura 6. PCO obtenido a partir del coeficiente de similitud de Jaccard.

Donde: H = Huertos, O = San Antonio Texcala, CG = Cultivo Granjas, IS = Isla S, P = Panteón y JB = Jardín Botánico.

Se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA), obteniéndose una varianza entre poblaciones, $V(A)$: 18.60%, una varianza dentro de las poblaciones, $V(B)$: 81.40%, una Phi-estadística: $\Phi_{st} = 0.186$ y un Flujo génico: $N_m = 4.6$ (Cuadro 5). El índice de Shannon cuantifica los niveles de diversidad entre las poblaciones por medio de los RAPD.

Cuadro 5. Diversidad genética y flujo génico de *Prosopis laevigata*. H_{pop} : diversidad dentro de las poblaciones; H_{sp} : diversidad dentro de las especies; H_{pop}/H_{sp} : proporción de diversidad dentro de las poblaciones; $(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}$: proporción de diversidad entre poblaciones, N_{em} : Flujo génico.

AMOVA		Índice de Shannon				Flujo génico
Varianza entre poblaciones	$V(A) = 18.60\%$					
Varianza dentro de poblaciones	$V(B) = 81.40\%$	H_{pop}	H_s	H_{pop}/H_s	$(H_{sp}-H_{pop})/H_{sp}$	$N_{em} = 4.6$
Phi-estadística	$\Phi_{st} = 0.186$	2.616	4.626	0.566	0.434	

Para observar la relación que existe entre una zona de colecta y otra se realizó un dendrograma mediante la matriz de Φ_{st} pareadas obtenidas con el AMOVA (Cuadro 6 y Fig. 7). La matriz de correlación de las Φ_{st} pareadas entre las poblaciones muestra un porcentaje de significancia con una probabilidad de $p > 0.05$. Donde los valores que se encuentran sobre la diagonal y sean mayor a 0.05 no son estadísticamente significativos por lo que esa relación no se considera para el análisis de resultados.

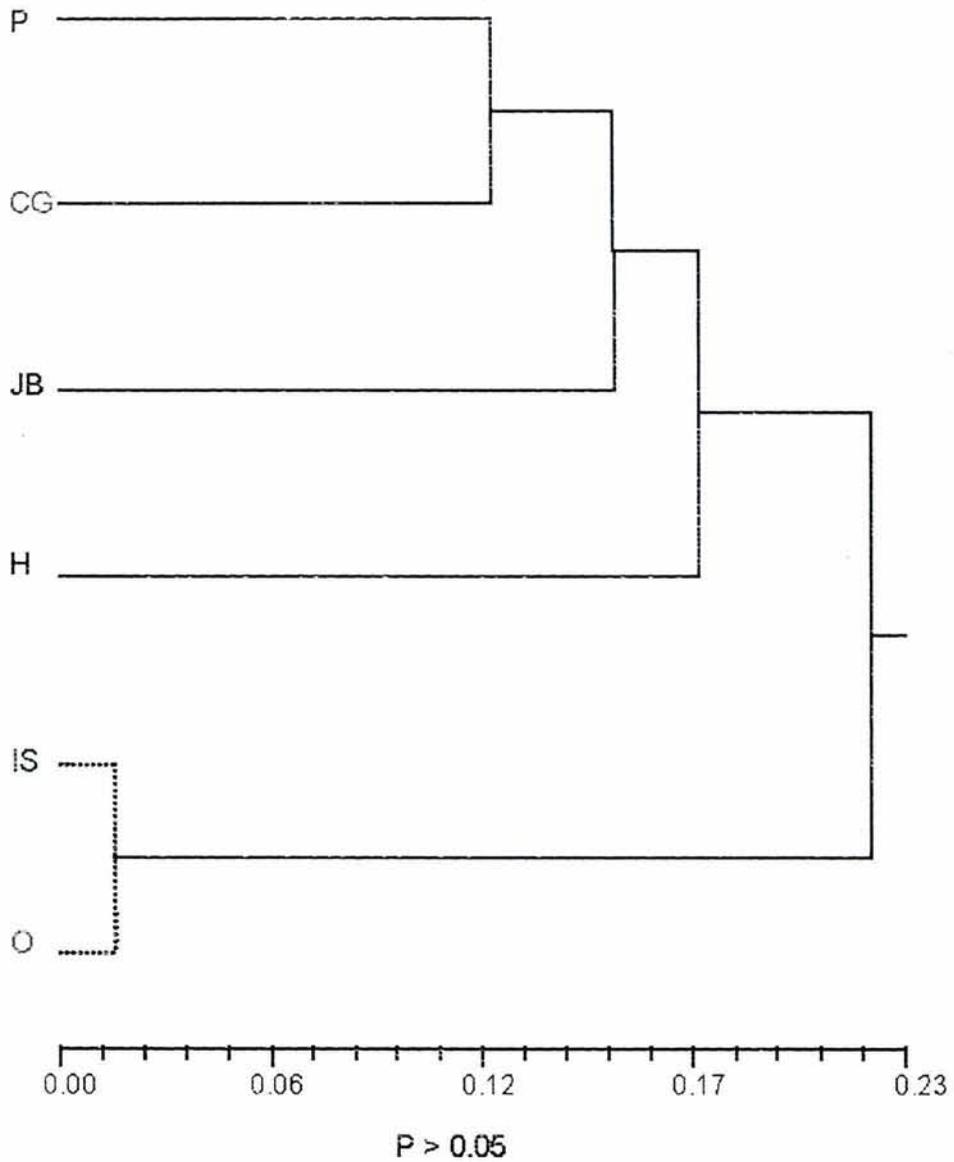


Figura 7. Dendrograma construido a partir de las Φ_{st} pareadas entre los seis sitios de colecta de *Prosopis laevigata*. La línea punteada indica las ramas del dendrograma no significativas ($P > 0.05$). Donde: H = Huertos, O = San Antonio Texcala, CG = Cultivo Granjas, IS = Isla S, P = Panteón y JB = Jardín Botánico.

Cuadro 6. Matriz de correlación de Φ_{st} pareadas obtenidas con AMOVA.

Se tiene un porcentaje de significancia con una $p > 0.05$.

Donde: H = Huertos, O = San Antonio Texcala, CG = Cultivo Granjas, IS = Isla S, P = Panteón y JB = Jardín Botánico.

	P	CG	JB	IS	O	H
P	0.0000	0.0460	0.0000	0.0450	0.0000	0.0000
CG	0.1176	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
JB	0.1575	0.1443	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
IS	0.1412	0.2142	0.2169	0.0000	0.2098	0.0000
O	0.1818	0.2857	0.2615	0.0148	0.0000	0.0000
H	0.1711	0.1887	0.1628	0.1915	0.2728	0.0000

Fase de análisis morfológico

De los individuos muestreados se llevó un ejemplar de *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd) M. C. Johnston al Herbario IZTA de la FES Iztacala para su herborización e identificación, el cual quedó registrado con el número 28915 (Fig. 8).



Figura 8. Ejemplar de herbario de *Prosopis laevigata* colectado en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla el 04 de abril de 2002.

De la matriz estandarizada se obtuvo una MBD con la cual se creó un fenograma (Fig. 9) mediante el programa de Ntsys, en el cual se muestran las distancias entre cada individuo y su agrupación. Se puede observar que los individuos de la zona de Panteón (P) y del Jardín Botánico (JB) se encuentran más agrupados de acuerdo a su zona de colecta, mientras que los demás individuos se encuentran más dispersos en todo el fenograma, especialmente los individuos de los Huertos (H).

De la misma manera se obtuvo el PCO (Cuadro 7 y Fig. 10) en el cual se puede observar claramente el agrupamiento en tres dimensiones (tres coordenadas) que presentan los individuos muestreados en las seis zonas de colecta. En el PCO los individuos de Huertos (H) se comportan de manera dispersa en comparación con los demás, que se encuentran de manera más agrupada. Se puede observar en el PCO que la tercer coordenada (PCO 3) es la que mejor separa a los individuos y hace que los individuos de Huertos (H) se encuentren más alejados que el resto de los individuos de las demás zonas de colecta.

Al observar los marcadores que tienen mayor participación dentro del PCO (Cuadro 7): pubescencia, largo y ancho de espina estipular, altura de la planta, diámetro del tronco, diámetro de la rama, hábito de la planta y ancho de los folíolos, se encuentra una coincidencia con las observaciones realizadas en el campo (Fig. 11). Esos marcadores en el análisis estadístico se hacen más evidentes y reiteran la información de las observaciones realizadas en campo y de la que se tenía con las colectas que se realizaron con anterioridad.

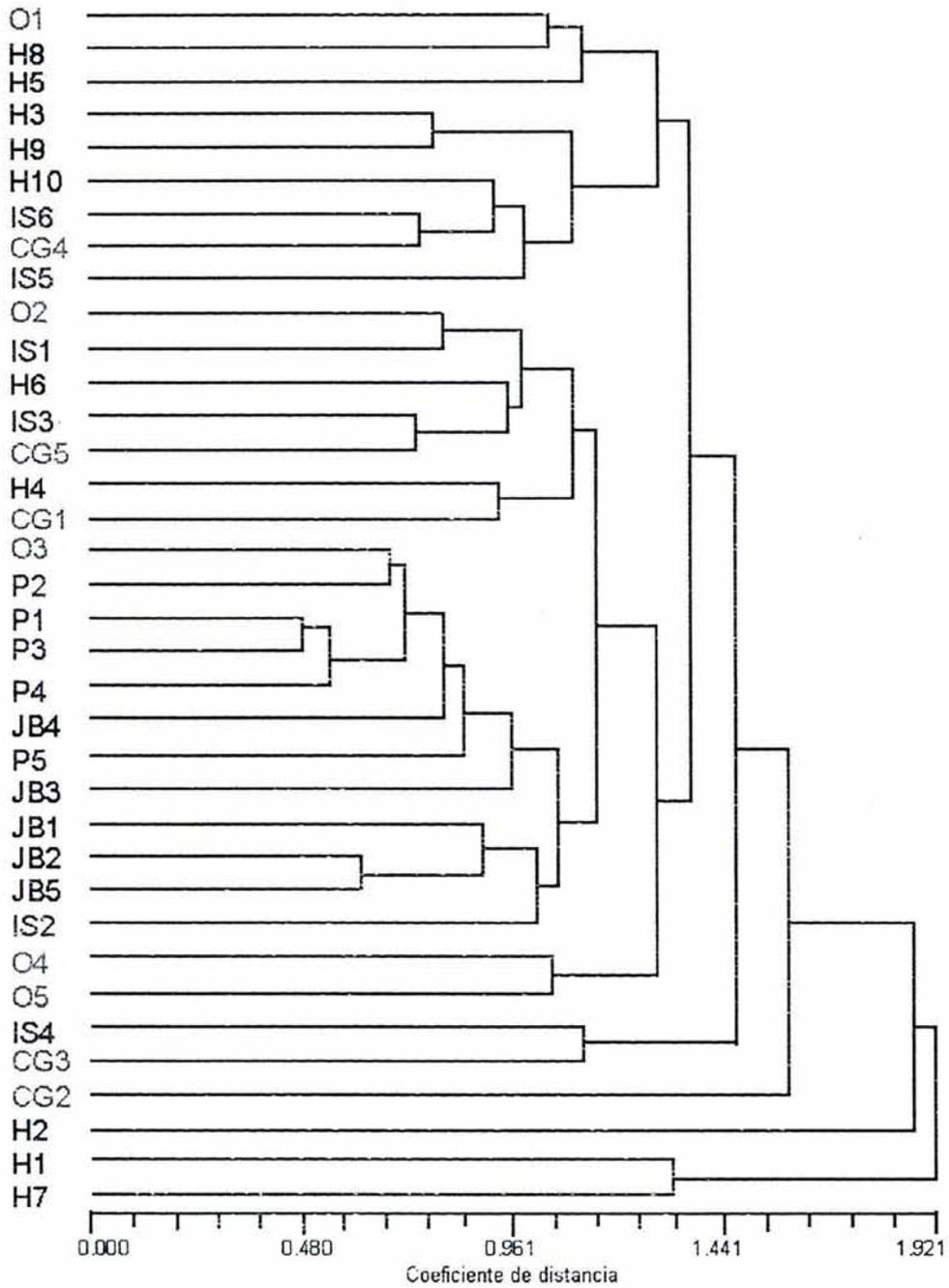


Figura 9. Fenograma obtenido a partir del coeficiente de distancia.

Se obtuvo un coeficiente de correlación de $r = 0.84$. Donde: H = Huertos, O = San Antonio Texcala, CG = Cultivo Granjas, IS = Isla S, P = Panteón y JB = Jardín Botánico.

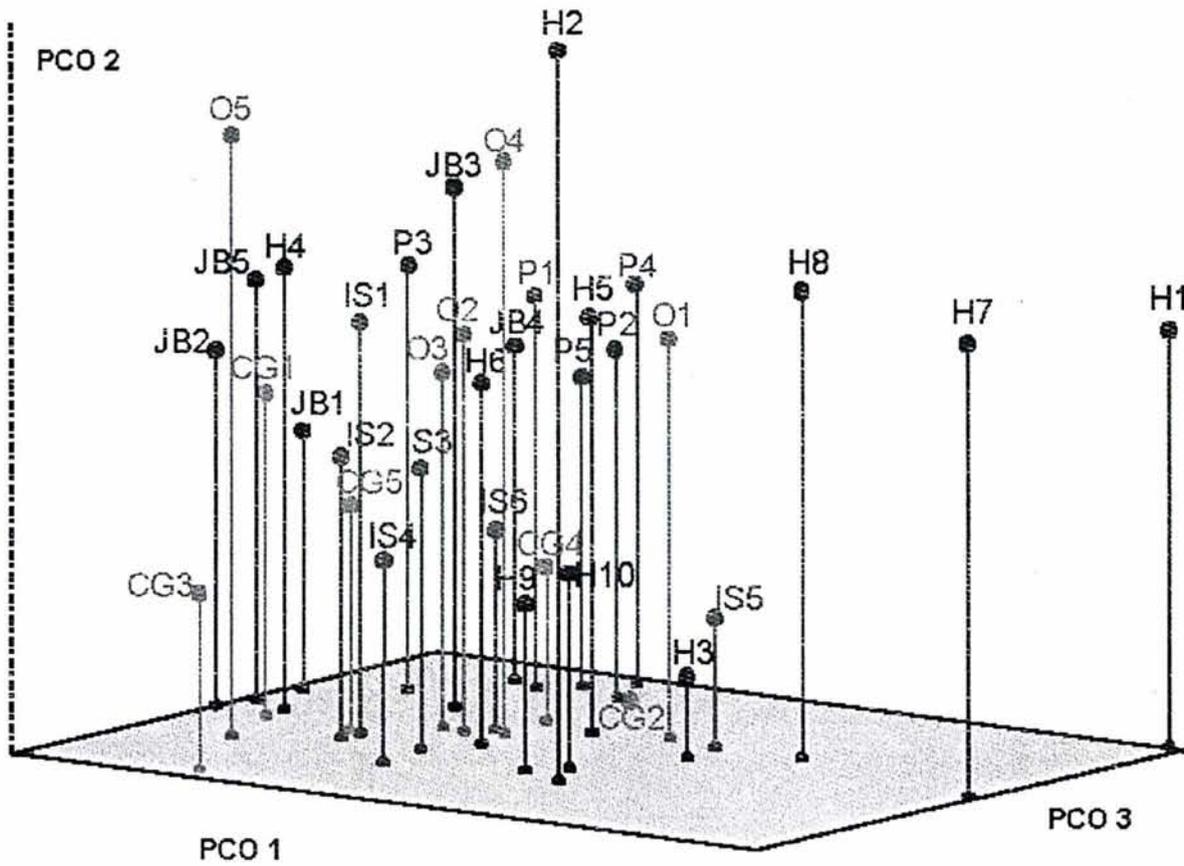


Figura 10. PCO obtenido a partir del coeficiente de similitud de distancia.

Donde: H = Huertos, O = San Antonio Texcala, CG = Cultivo Granjas, IS = Isla S, P = Panteón y JB = Jardín Botánico.

Cuadro 7. Marcadores que presentan mayor participación en el PCO.

Carácter	CPO 1	CPO 2	CPO 3
Largo del peciolo	0.079	0.086	0.126
Pubescencia	-0.507	0.521	0.094
Largo de la espina estipular	-0.092	-0.724	-0.417
Ancho de la espina estipular	-0.083	-0.795	-0.448
Pubescencia periférica	-0.556	0.528	0.265
Pubescencia en el raquis	-0.396	0.610	-0.305
Número de pinas	-0.140	-0.064	-0.195
Largo de raquis	0.249	-0.109	0.373
Largo de la espícula	0.092	0.041	-0.057
Número de pares de folíolos	-0.213	-0.129	0.078
Ancho de folíolos 1	0.569	0.191	-0.236
Ancho de folíolos 2	0.559	0.220	-0.205
Ancho de folíolos 3	0.670	0.126	-0.143
Largo de folíolos 1	0.568	-0.061	0.103
Largo de folíolos 2	0.465	-0.081	0.230
Largo de folíolos 3	0.542	0.054	0.102
Pubescencia en nervadura abaxial	-0.526	-0.138	0.451
Pubescencia en la parte abaxial	-0.010	0.247	0.490
Pubescencia en nervadura adaxial	-0.322	-0.041	0.384
Pubescencia en la parte adaxial	-0.659	-0.266	0.280
Diámetro del tronco	-0.013	-0.721	0.326
Diámetro de la rama	-0.139	0.560	-0.487
Hábito de la planta: árbol/ arbusto	-0.337	-0.427	-0.575
Altura de la planta	0.072	0.211	0.466
Abundancia de estomas	0.130	0.164	-0.171

De las observaciones de campo se puede apreciar que la morfología de los mezquites colectados era diferente entre una zona de colecta y otra. Con los resultados del PCO se puede ver claramente que esos marcadores son los que presentan una mayor participación, para este fin se seleccionaron los caracteres que tuvieran el valor más alto (independientemente del signo). En este caso se señalan cuatro caracteres por cada coordenada, dos valores con signo positivo y dos con signo negativo (Cuadro 7).

En la figura 11 se observa la diferencia entre un individuo recolectado en el Jardín Botánico (JB) y otro recolectado en los Huertos (H). Ambos individuos fueron

recolectados en la misma salida al campo (04 abril 2000) y se pueden observar diferencias muy marcadas como el tamaño de las espinas e inflorescencia, presencia de vaina y número de foliolos.



Figura 11. *Prosopis laevigata* muestreados en Zapotitlán Salinas, Puebla.
a) individuo muestreado en la zona de Huertos (H) y b)
individuo muestreado en la zona del Jardín Botánico (JB). Las

ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por diversidad genética se entiende la variación de los genes dentro de las especies, esto abarca poblaciones determinadas de la misma especie o la variación genética de una población. La variedad de genes existente en una especie concreta es la suma de información existente en los genes de un organismo individual. Con el muestreo de algunos individuos de la población se pueden obtener resultados precisos mediante el uso de marcadores moleculares, siendo el reflejo de la población total. Es por eso, que la caracterización de la diversidad genética, su estructura y sus relaciones con su origen geográfico y ambiental, es crítica para su conservación y utilización. Los análisis moleculares del ADN de plantas, combinado con herramientas estadísticas, ofrecen una poderosa ventaja para evaluar la diversidad genética (Hansen *et al.*, 2000; Nybom & Bartish, 2000).

Esta diversidad genética representa todas las diferencias determinadas genéticamente que ocurren entre los individuos de las especies en la expresión de una característica en particular o un conjunto de características. Desde que las especies están compuestas por poblaciones que existen de alguna forma independientes unas de otras, la diversidad genética existe entre y dentro de las poblaciones de las especies. La diversidad genética de caracteres morfométricos es difícil de medir en poblaciones naturales puesto que los caracteres están influenciados por factores ambientales y un alto grado de interacciones genéticas que contribuyen a su expresión. La medición de la diversidad genética mediante marcadores moleculares se sobrepone a este problema ya que estos caracteres moleculares tienen virtualmente ningún componente ambiental y sólo uno o pocos genes están involucrados en su expresión.

Para el análisis molecular *Prosopis laevigata* no presenta dificultad al realizar la extracción del ADN, ya que se obtiene gran cantidad de ADN y de buena calidad, esto es también reportado por Bessega y colaboradores (2000) que trabajaron con *Prosopis glandulosa* y *P. velutina*. Así mismo reportaron una mayor diferenciación al utilizar los marcadores moleculares tipo RAPD que con isoenzimas, recomendando el uso de los marcadores RAPD. Juárez-Muñoz y colaboradores (2002) utilizan la técnica de RAPD por la sensibilidad que tiene para detectar polimorfismos y por haber sido utilizada para el análisis de algunas especies de *Prosopis* en África y en Sudamérica y haber obtenido buenos resultados.

Mediante la técnica de los RAPD's se pudieron detectar 60 marcadores polimórficos utilizando los cuatro primers. Juárez-Muñoz y colaboradores (2002) utilizan cinco primers con los que detectan 43 bandas polimórficas para tres especies de *Prosopis* en México, mientras que en el estudio realizado por Bessega y colaboradores (2000) encontraron 46 bandas polimórficas de las cinco poblaciones estudiadas, de las cuales cuatro poblaciones pertenecían a la especie de *Prosopis glandulosa* y una población correspondía a *Prosopis velutina* estudiadas, utilizando cuatro primers. Datos similares son los obtenidos por Casiva y colaboradores (2002) en cuatro especies de *Acacia* (Fabaceae), en donde se encontraron 34 marcadores polimórficos utilizando dos primers. Para el caso de *Prosopis laevigata* en el Valle de Zapotitlán Salinas, el número de marcadores encontrados fue mayor a los reportados para especies similares y con un número similar de primers utilizados.

El agrupamiento de los individuos no muestra una correlación con los sitios de colecta tanto en UPGMA como en PCO, a diferencia de otros estudios (Juárez-Muñoz *et al.*, 2002 y Casiva *et al.*, 2002) en los existe la tendencia de las diferentes poblaciones a agruparse con respecto a su sitio de colecta y formar grupos definidos dentro de los dendrogramas. Genéticamente se pueden distinguir diferencias entre las diferentes poblaciones analizadas en otros estudios, esto es debido a que se analizan especies diferentes y la tendencia a separarse en grupos definidos es

mayor. Sin embargo, al analizar diferentes sitios en una misma área de muestreo, como sucede para el caso en estudio, dificulta la diferenciación de los individuos por sitio de muestreo, obteniendo un dendrograma con los individuos de diferentes sitios dispersos en todo el dendrograma.

El AMOVA de *Prosopis laevigata* en el Valle de Zapotitlán Salinas, muestra una mayor varianza entre individuos dentro de las poblaciones (81.4%). Comparando este resultado con el obtenido por Juárez-Muñoz *et al.* (2002) para sus dos poblaciones de *P. laevigata*, se observa que la variación entre ellas fue de 92.85%, mientras que la variación intra poblacional fue del 7.15%, obteniendo resultados similares en ambos estudios. Para el caso de Bessega y colaboradores (2000) la variabilidad genética encontrada dentro de las poblaciones fue alta, mientras que entre especies resulto ser baja, mediante estos resultados obtenidos resaltan la importancia de los marcadores moleculares tipo RAPD al ser una herramienta muy útil para analizar relaciones genéticas y consecuencias de hibridación entre especies de *Prosopis* de América del Norte. Así mismo, encuentran que utilizando un número pequeño de plantas (cinco) por población, la mayoría de los alelos se encontraban representados en las poblaciones analizadas como consecuencia de la fecundación cruzada que presenta la especie, por lo que utilizando pocos individuos se pueden obtener resultados contundentes con los RAPD. Según Busell (1999), reporta que con un mínimo de 17 individuos muestreados por población o sitio de muestreo se obtienen resultados significativos, de la misma manera reporta que si el número de bandas polimórficas es buena, el número de individuos se puede reducir, esto también lo relaciona con la biología específica de la planta en estudio. Para la planta en estudio, se hizo un muestreo de 5 a 10 individuos por sitio de colecta, pero se obtuvo un número significativo de bandas (60) utilizando cuatro primers.

La Φ_{st} representa la correlación de dos gametos dentro de una subpoblación con respecto a la población completa y es usada como una medida del grado de diferenciación entre poblaciones relacionadas. En este caso se obtuvo una Φ_{st} de

0.186 lo cual corresponde a un $N_{em} > 1$, el cual es un estimador indirecto de flujo génico, teniendo un intercambio mayor de genes dentro de las poblaciones y con los de otras poblaciones. Por lo tanto, existe intercambio de información con otras poblaciones, lo que explica la dispersión de los individuos dentro del dendrograma. Juárez-Muñoz y colaboradores (2002) obtuvieron para las dos poblaciones de *P. laevigata* que estudiaron una N_{em} de 3.2, que según varios autores es un valor relativamente bajo, encontrando que el nivel de variación genética encontrado entre esas dos poblaciones (92.85%) podría ser atribuida al sistema de fecundación cruzada que el mezquite presenta.

Los individuos colectados en Zapotitlán Salinas presentan una distribución dispersa en el dendrograma, siendo el sitio de los Huertos (H) el que se encuentra con una distribución más heterogénea y dispersa. Los individuos de las Islas (IS) no tienen una estructuración muy notable por lo que se encuentran distribuidos en todo el dendrograma. La $r = 0.82$ nos da la certeza que el dendrograma es una buena representación de los datos obtenidos. El PCO demuestra que no existe un agrupamiento de los individuos que corresponda con su zona de colecta, mostrando que los individuos de las diferentes poblaciones están relacionados unos con otros y se puede observar de mejor manera la distribución que tiene en tres dimensiones, de manera gráfica.

Para la parte morfométrica se obtuvo un fenograma de los 36 individuos colectados en el campo, en el cual se muestran las distancias entre cada individuo. En general los individuos no se agrupan de acuerdo a su zona de colecta, como sucedió en los resultados con los RAPD's, tanto con UPGMA como con PCO. Sin embargo, hay dos zonas de colecta que presentan una mayor agrupación, la zona del Panteón (P) y la del Jardín Botánico (JB), que al menos morfológicamente presentan características físicas más uniformes entre ellos.

En el PCO se observa claramente la distribución de los individuos y permite observar los marcadores que tienen una mayor participación: pubescencia, largo y

ancho de espina estipular, altura de la planta, diámetro del tronco, diámetro de la rama, hábito de la planta y ancho de los foliolos. Las características morfológicas en la diferentes zonas de estudio presentan una gran variación, la cual es más notable en la zona de los Huertos (H), observándose en todos los casos la presencia de árboles robustos con foliolos grandes y anchos. En este caso la diversidad de los mezquites de los Huertos (H) se ve afectada por factores antropogénicos. En el PCO los individuos de Huertos (H) se comportan de manera dispersa en comparación con los demás, que se encuentran de manera más agrupada. Lo que indica que los individuos de los Huertos (H) presentan la mayor variabilidad entre si. Esto parece indicar que el efecto antropogénico es muy marcado para los individuos de Huertos (H), ya que morfológicamente se destacan características muy distintas entre los individuos muestreados en los Huertos (H) y los individuos muestreados en los otros sitios. Al comparar ambos árboles, tanto el genético como el morfológico se puede observar que existe un comportamiento muy similar de los individuos de Huertos (H), que se comportan de una manera más dispersa.

El reclutamiento de individuos en el Valle de Zapotitlán es escaso ya que no se presentan individuos jóvenes o plántulas (observaciones personales). Posiblemente debido al ramoneo del ganado caprino que se encuentra en la zona. Las semillas que logran germinar, resultan ser muy atractivas para el ganado que las ingiere, evitando que pasen de su etapa de plántula (Cantú, 1990). Por otro lado, el ganado también tiene un efecto positivo como propagadoras mediante el paso de las semillas a través de su tracto digestivo, permitiendo que se dispersen por las zonas en las que el animal defecue.

Así mismo, se ha encontrado que puede existir pocos rebrotes del mezquite debido a la presencia de plagas que atacan tanto a las flores como a los frutos (Villanueva 1993), impidiendo que lleguen a sobrevivir.

Ambos análisis, revelan que existe una alta variabilidad entre los individuos de cada zona, tratándose de una población en la que aún no se detecta un proceso

de estructuración. Siendo un resultado positivo al todavía no presentarse, al menos genéticamente, un proceso de fragmentación marcado en la zona. De presentarse en la especie, la llevaría a un deterioro, no sólo de la especie en estudio sino también de todas aquellas interacciones biológicas que presenta con muchas otras especies del Valle de Zapotitlán.

Los polinizadores del mezquite siguen contribuyendo a que exista un flujo génico adecuado con las especies que se encuentran dentro del Valle y con los que están fuera de este, como se observa que sucede con los individuos tomados como referencia externa (O) que se distribuyen de manera dispersa tanto en el dendrograma como en el fenograma.

La caracterización de la estructura de las poblaciones es crítica para la contribución ecológica y puede ser hecha efectivamente con los marcadores moleculares, sobre todo cuando se complementan con los estudios morfométricos.

Las medidas de la diversidad genética son relevantes para valorar el riesgo de extinción de las poblaciones estableciendo niveles de diversidad genética. En la zona de Zapotitlán Salinas, para las poblaciones de mezquite se puede contribuir a la sustentabilidad a largo plazo, por la habilidad de las poblaciones para adaptarse a los cambios ambientales siendo directamente dependiente a la cantidad de diversidad genética que estas poseen. Sin embargo, para las poblaciones pequeñas que pierden diversidad genética experimentarán una reducción en su número y un incremento de riesgo de extinción debido a una crisis de procreación. Este caso es evidente en la zona del Jardín Botánico (JB) donde hay un deterioro ambiental muy marcado y el reclutamiento de nuevos individuos es escaso.

De acuerdo con Juárez-Muñoz y colaboradores (2002) el conocimiento de el número de fenotipos diferentes y sus frecuencias en poblaciones silvestres del género *Prosopis* utilizando información generada por los RAPDs, podría ser útil para diseñar estrategias de siembra de nuevos individuos en zonas áridas y semiáridas

utilizando diferentes especies o fenotipos de mezquite y así mantener una alta diversidad genética.

IZT.

Otra estrategia de conservación que se propone con base en la información obtenida en este estudio, es que para diseñar planes y programas adecuados para la conservación de biodiversidad de esta especie, se deberá coleccionar el germoplasma de individuos presentes en todas las zonas del Valle de Zapotitlán Salinas, para asegurar que se conserve la mayor diversidad posible.



CONCLUSIONES



Se encontró un flujo génico alto ($Nm = 4.6$) lo que se refleja en la agrupación de los individuos en los dendrogramas.



El agrupamiento de los individuos no muestra una correlación con los sitios de colecta tanto en UPGMA como en PCO.



Los individuos de los Huertos (H) son los que presentan la mayor variabilidad entre sí (entre ellos mismos).



Al parecer, el efecto antropogénico es marcado para los Huertos (H), modificando la fenología de los mezquites en los huertos.

LITERATURA CITADA

-  Aizen, M. A., and Feinsinger P. 1994. Forest fragmentation, pollination, and plant reproduction in a chaco dry forest, Argentina. *Ecology* 75 (2): 330-351.
-  Assmusen, M. A., and Schnabel A. 1991. Comparative effects of pollen and seed migration on the citonuclear structure of plants populations. I. Maternal cytoplasmatic inheritance. *Genetics* 128: 639-654.
-  Ayaia, J. 1980. Evolución molecular. Omega. Barcelona, España. 285 pp.
-  Barger, R. L., and Ffolliot P. F. 1972. Physical characteristics and utilization of major woodland tree species in Arizona. U.S.D.A.- F.S. Research Paper RM-83. Fort Collins, Colorado.
-  Berumen, C. J. 1993. El análisis del ácido desoxirribonucleico –ADN– en la identificación de individuos. *Ciencia y Desarrollo*. No. 111: 34-42.
-  Bessega, C., Saidman B. O., and Vilardi J. C. 2000. Isozyme and RAPD studies in *Prosopis glandulosa* and *P. velutina* (Leguminosae, Mimosoideae). *Genetics and Molecular Biology* 23: (3) 1-5.
-  Bogusch, E. R. 1951. Climatic limits affecting distribution of mesquite (*Prosopis juliflora*) in Texas. *Texas Journal of Science* 3: 554-558.
-  Bonnin, I., Prospero J. M., and Oliveri I. 1996. Genetics markers and quantitative genetic variation in *Medicago truncatula* (Leguminosae): A comparative analysis of population structure. *Genetics* 143: 1795-1805.
-  Breyne, P., Buyschaert C., Kremer A., Van Montagu M., and Van Gysel A. 1997. Distribution of genetic diversity within pilot species of the tropical forest. *Belgian Journal of Botany* 129:160.
-  Brummer, E. C., Bouton J. H., and Kochert G. 1995. Analysis of annual *Medicago* species using RAPD markers. *Genome* 38 (2): 362-367.
-  Burkart, A. 1976. A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfam. Mimosoideae). *Journal of the Arnold Arboretum* 57: 217-249; 450-458.
-  Bussell, J. D. 1999. The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). *Molecular Ecology* 8, 775-789.

-  Cantú, A. C. M. 1990. Fenología de la floración y fructificación del mezquite *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) M. C. Johnst. en Nuevo León y el efecto de las cabras sobre la dispersión de sus semillas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Forestales. 38 p.
-  Casiva, P. V., Saidman B. O., Vilardi J. C., and Cialdella A. M. 2002. First comparative phenetic studies of Argentinean species of *Acacia* (Fabaceae), using morphometric, isozymal, and RAPD approaches. *American Journal of Botany* 89: 843-853.
-  Cavazos, D. R. 1999. Programa Nacional de Investigación de Mezquite. INIFAP. México.
-  Chakraborty, R., and Bagemans J. 1997. Determination of relatedness of different ecotypes of *Aster tripolium* germoplasm by RAPD analysis. *Belgian Journal of Botany* 83: 51-57.
-  Cody, M. L. 1998. Nichos estructurales de especies de cactáceas columnares: Memorias del taller internacional de la evolución, ecología y conservación de las cactáceas columnares. Tehuacán, Puebla. México.
-  Crisci, 1983J. V. y López A. M. F. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Cátedra de introducción a la Taxonomía. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de la Plata. La Plata, Argentina. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, D. C. 132 pp.
-  Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York.
-  Dávila, P., Villaseñor J. L., Medina R., Ramírez, Salinas A., Sánchez-Ken J. y Tenorio P. 1993. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Listados florísticos de México X. Instituto de Biología, UNAM, México.
-  De Greef, B., and Triest L. 1997. Genetic diversity assessment in *Primula* populations. *Belgian Journal of Botany* 129:161.
-  De la Garza, F. E. 1987. Economic potentials for mesquite charcoal production in northern Mexico for exportation to the U.S.A. M. Sc. Thesis. Arizona State University. U.S.A. 55 p.
-  Dellaporta, S. L., Wood, J., and Hicks, J. B. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21.

-  Eguiarte, F. L. E. 1993. El arca de Noé y la genética de la conservación. *La Jornada Ecológica* 12-13 pp.
-  Ennos, R. A. 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity* 72: 250-259.
-  Felger, R. S., Oscar C. D., Leigh S. L., y Stigers C. 1979. Semillas mágicas del desierto: Un modelo de agricultura apropiado del desierto Sonorense. En: *Memorias del IV Simposio sobre el medio ambiente del Golfo de California*. Sinaloa, México. pp. 70-80.
-  Felker, P. 1981. Uses of tree legumes in semiarid regions. *Economic Botany* 35 (2):174-186.
-  Felker, P. 1993. Capturing and managing the genetic variation in *Prosopis* spp. for economically useful characters. CSFR Caesar Kleberg Research Institute. Texas A & I Univ. Kingsville, Texas.
-  Fjellheim, S., Elven R., and Brochmann C. 2001. Molecules and morphology in concert. II. The *Festuca brachyphylla* complex (Poaceae) in Svalbard. *American Journal of Botany* 88 (5): 869–882.
-  Freckman, D. W., and Virginia R. A. 1989. Plant-feeding nematodes in deep-rooting desert ecosystem. *Ecology* 70: 1665-1678.
-  Galindo, A. S., García M. E. y Wendt T. L. 1992. Potencial de hibridación natural en mezquite (*Prosopis laevigata* y *P. glandulosa* var. *Torreyana*, Leguminosae) de la altiplanicie de San Luis Potosí. *Acta Botánica Mexicana* 20: 101-117.
-  Galindo, S. A. 1983. Caracterización de la variación en el mezquite y sus usos en el Altiplano Potosino. Tesis Profesional. Universidad Autónoma de Nuevo León.
-  García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köpen. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
-  Gardner, S., Cabido M. R., Valladares G. R., and Díaz S. 1995. The influence of habitat diversity in Argentine semi-arid Chaco forest. *Journal of Vegetation Science* 6: 349-356.
-  Golubov, J., Mandujano M. C., and Eguiarte L. E. 2001. The paradox of mesquites (*Prosopis* spp.): Invading species or biodiversity enhancers? *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 69: 23-30.

-  Gómez, F. 1970. Mezquites y Huizaches, algunos aspectos de la economía, ecología y taxonomía de los géneros *Prosopis* y *Acacia* en México. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables, A. C. México.
-  González, H. E. E., Ramírez A. M. V. y Álvarez del Rivero J. C. 1999. Bioprocesamiento de la vaina de mezquite *Prosopis* spp. para la producción de biomasa fungal. Instituto de Ecología y Alimentos, UAT. México.
-  González, L. L. A. 1979. La necesidad de integrar un catálogo de plantas útiles de las regiones áridas y semiáridas de México, en: Memorias del IV Simposio sobre el medio ambiente del Golfo de California. Sinaloa, México. pp. 67-69.
-  Hansen, K. T., Elven R., and Brochmann C. 2000. Molecules and morphology in concert: tests of some hypotheses in arctic *Potentilla* (Rosaceae). *American Journal of Botany* 87: 1466–1479.
-  Howe, H. F., and Smallwood J. 1982. Ecology of seed and dispersal. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13: 201-228.
-  Investigación y desarrollo. Periodismo de ciencia y tecnología. Nueva sustancia para su refresco. <http://www.invdes.com.mx/suplemento/anteriores/Junio1999/htm/mezquite.html>
-  INIF. 1985. Reunión sobre manejo y utilización de las plantas de zonas áridas. Rocky Mountain Forest and Range Experiment Station, USDA Forest service. Mezquite 91 pp. Saltillo, Coahuila, México.
-  Jenkins, M. B., Virginia R. A., and Wesley J. M. 1987. Rhizobial ecology of the woody legume mesquite (*Prosopis glandulosa*) in the Sonoran Desert. *Applied and Environmental Microbiology* 53: 36-40.
-  Johnston, M. C. 1962. The North American mesquites; *Prosopis* section *Algarobia* (Leguminosae). *Brittonia* 14 (1): 72-89.
-  Kaplan, D. R. 2001. The science of plant morphology: definition, history, and role in modern biology. *American Journal of Botany* 88 (10): 1711-1741.
-  Kijas, J., Fowler J., and Thomas M. 1995. An evaluation of sequences tagged microsatellites site markers for genetic analysis within citrus and related species. *Genome* 38: 349-355.
-  López, C., Maldonado A. y Salim V. 2001. Variación genética de progenies de *Prosopis alba*. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales* Vol. 10 (1).
-  López, F. 2001. Datos del Laboratorio de Edafología, UBIPRO, FES-Iztacala, UNAM.

- 

Lynch, M., and Milligan B. G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.
- 

Maldonado-Aguirre, L. J. 1991. El género *Prosopis*, elemento para el manejo integrado de los recursos forestales de las zonas áridas de México. Horizonte Año 2000. Quinta reunión regional América Latina y del Caribe, Red de Forestación, Conservación y mejoramiento de especies del género *Prosopis*. Mendoza, Argentina 18p.
- 

Márquez, F. 1991. Genotecnia vegetal. Tomo I. AGT Editor, México. 357 pp.
- 

Martínez, L. M. J. 1994. El mesquite (*Prosopis laevigata*): evaluación experimental de métodos de producción de plántulas en vivero. Tesis de Licenciatura. División de Ciencias Forestales. Chapingo, México.
- 

Mena, G. L. y Gall Ch. 1987. Producción caprina y ovina. Primera parte: producción caprina. División de Ciencias Agropecuarias y Marítimas. ITESM. Monterrey, N. L. México. 4-10 pp.
- 

Moncayo, R.F. 1981. Relación de algunas cosas de los montes de México. Subsecretaría Forestal y de la Fauna. Serie Premio Nacional Forestal #2. México. 220 pp.
- 

Mooney, H. A., Simpson B. B., and Solbrig O. T. 1997. Phenology, Morphology, Physiology. In: B. B. Simpson Mesquite, its biology in two desert scrub ecosystems. Dowdwn, Hutchinson & Ross, Pennsylvania, 26-43 pp.
- 

Montalvo, H. L. 1998. Caracterización molecular y morfológica de tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa*, Brot.). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 110 p.
- 

Nielsen, E. T., Sharifti M. R., Virginia R. A., and Rundel P. W. 1987. Phenology of warm desert phreatophytes: seasonal growth and herbivory in *Prosopis glandulosa* var *torreyana* (honey mesquite). *Journal of Arid Environments* 13: 217-229.
- 

Nobel, P. S. 1991. Physicochemical and environmental plant physiology. Academic Press. San Diego, CA. 633 pp.
- 

Nybom, H., and Bartish i. V. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. Voi. 3/2. 93-144.
- 

Oduol, P. A., Felker P., McKinley C. R., and Meier C. E. 1986. Variation among selected *Prosopis* family for pod sugar and pod protein contents. *Forest Ecology and Management* 16:423-431.

-  Olfelt, J. P., Glenn R. F., and Luby J. J. 2001. What data determine whether a plant taxon is distinct enough to merit legal protection? A case study of *Sedum integrifolium* (Crassulaceae). *American Journal of Botany* 88 (3): 401-410.
-  Otero, A. A., Cruz M. y Oyama K. 1997. El uso de los RAPDS como marcadores moleculares en plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 60: 85-117.
-  Persson, H. A., Lundquist K., and Nybom H. 1998. RAPD analysis of genetic variation within and among populations of Turk's-cap lily (*Lilium martagon* L.). *Hereditas* 128: 213- 220.
-  Rivera, B. R. I., Torres P. J. A., Garzón T. y Herrera E. L. 1991. Introducción a la biología molecular e ingeniería genética en plantas. Ed COMP. CINVESTAV-IPN. Unidad Irapuato. México. 222p.
-  Rzedowski, J. 1984. An analysis of the geographical distribution of *Prosopis* complex in North America. *Bulletin IGSM* 12:49 (Abstract).
-  Rzedowski, J. y Rzedowski G. 1985. Flora fanerogámica del Valle de México. Vol. II. Dicotyledoneae (Euphorbraceae-Compositae) Escuela Nacional de Ciencias Biológicas e Instituto de Ecología. México.
-  Rzedowski, J. 1988. Análisis de la distribución geográfica del complejo *Prosopis* (Leguminosae, Mimosoideae) en Norteamérica. *Acta Botánica Mexicana* 3: 7-19.
-  Sales, E., Nebauer S. G., Mus M., and Segura J. 2001. Population Genetic Study In The Balearic Endemic Plant Species *Digitalis Minor* (Scrophulariaceae) Using RAPD Markers. *Systematic Botany* 16: 553-583.
-  Schinini, A. 1981. Contribución a la flora de Paraguay. *Bonplandia* 5: 101-108.
-  Simpson, B. B., Neff J. L., and Moldenke A. R. 1977. *Prosopis* flowers as a resource. In: Simpson B. B. Ed. Mesquite: Its biology in two desert ecosystems. US/IBP Synthesis Series 4. Dowdwn, Hutchinson and Ross, Inc., Stroudsberg, Pennsylvania, 1-25.
-  Singh, G. 1995. An agroforestry practice for the development of salt lands using *Prosopis juliflora* and *Leptochloa fusca*. *Agroforestry Systems* 29: 61-75.
-  Smith, C. E. 1965. Flora Tehuacan Valley. *Fieldiana Botany* 31: 107-143.
-  Smith, C. J. S., and Smith C. S. 1992. Fingerprinting crop varieties. *Advances in Agronomy* Vol. 47: 85-140.
-  Sneath, P. H. A., and Sokal R. R. 1973. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman, San Francisco, California, USA.

-  Tapia, P. F., Mercado-Ruaro P. y Monroy A. A. 1999. Cambios en la longitud cromosómica total en tres poblaciones de *Prosopis laevigata* (Fabaceae). Implicaciones genecológicas y evolutivas. *Anales del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica* 70 (1): 13-28.
-  Valiente-Banuet, A. 1991. Dinámica del establecimiento de cactáceas: patrones generales y consecuencias de los procesos de facilitación por plantas nodriza en desiertos. Tesis Doctoral, UACPyP DEL CCh-Centro de Ecología, UNAM.
-  Valiente-Banuet, A., Arizmendi A. Ma. del C., Rojas-Martínez A., and Domínguez-Canseco L. 1995. Ecological relationship between columnar cactus and nectar feeding bats in Mexico. *Journal of Tropical Ecology* 11:1-17.
-  Valiente-Banuet, A., and Ezcurra E. 1991. Shade as a cause of the association between the cactus *Neobuxbaumia tetetzo* and the nurse shrub *Mimosa luisana*. *Journal of Vegetation Science* 2: 15-20.
-  Van Eck, H. J., Rouppe vander Voort J., Draaistra J., van Zandvoort P., van Enckevoort E., Segers B., Pelman J., Jacobsen E., Helder J., and Bakker J. 1995. The inheritance and chromosomal localization of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Molecular Breeding* 1:397-410.
-  Vierling, R. A., and Nguyen H. T. 1992. Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of diploid wheat genotypes. *Theoretical and Applied Genetics* 87:835-838.
-  Villanueva, D. J. 1993. Distribución actual y características ecológicas del mezquite (*Prosopis laevigata* H & B. Johnst.), en el estado de San Luis Potosí. Series INIFAP. División Forestal. Boletín Divulgativo 74, 34pp.
-  Waugh, R., and Powell W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Trends in Biotech.* 10:186-191.
-  Williams, J. G. K., Kubelk A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., and Tingey S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18:6531-6535.
-  Wisdom, C. S. 1991. Patterns of heterogeneity in desert herbivorous insect communities. In: Polis, G. A. Ed. *The Ecology of desert communities*. University of Arizona Press, Tucson, Arizona, 159-179.
-  Yan, H. J., Dai S. L., and Wu N. H. 1997. RAPD analysis of natural populations of *Acanthopanax brachypus*. *Celi Research* Jun. 7 (1): 99-106.