



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“Diversidad genética de *Cephalocereus columna-trajani*  
en cuatro regiones del Valle de Tehuacán-Cuicatlán,  
con diferentes rangos de temperatura”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**BIÓLOGO.**  
PRESENTA

**Ricardo Fernando Vázquez Montiel**

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras.  
Laboratorio de Bioquímica Molecular, UBIPRO. UNAM.

LOS REYES IZTACALA ESTADO DE MEXICO.

2005.



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.

## **DEDICATORIA.**

### **A mis Padres:**

**Fernando Vázquez y Margarita Montiel, por todo su apoyo, paciencia y comprensión. Gracias a su esfuerzo, desvelos y sacrificio, pude alcanzar este logro que también es suyo.**

### **A mis hermanos:**

**Ale, Beto, Elena, Manuel, Eric, Antonio y Luis. Porque siempre me han apoyado en sus posibilidades para alcanzar mis metas, y portado lo que hemos vivido juntos.**

**A todos mis maestros compañeros y amigos, sin los cuales este trabajo no sería posible.**

**GRACIAS A TODOS.**

## **AGRADECIMIENTOS.**

- A Dios, por darme la sensatez de guiar mi vida por el camino correcto y por el carácter que me da la fuerza e inteligencia para superarme y salir adelante.
- Al Dr. Jorge E. Campos C., Dra. Martha Martínez G. y Biol. Alejandro Monsalvo C. por dirigir mi trabajo de tesis y por compartir sus conocimientos conmigo así como enseñarme algo más que solo lo académico.
- Agradeceré eternamente a mis padres, por todo su amor y dedicación, por sus desvelos, consejos y la oportunidad de ser alguien en la vida.
- A todos mis tíos y familiares que de alguna forma me han guiado y apoyado para concluir mis metas.
- A mi tía Felipa Alvarado Islas, por su apoyo incondicional que me permitieron salir de los momentos difíciles. Muchas gracias.
- A mis revisores Dra. María del Coro, Dr. Sergio Chazado y Dr. Oswaldo Telles, por su orientación y comentarios que ayudaron a la conclusión de este trabajo.
- A Nancy por haber estado conmigo en momentos buenos, malos y difíciles, a través de esta aventura, gracias por tu amor, confianza y locuras, que hacen que muchas cosas de la vida valgan la pena.
- A mis amigos, compañeros y a toda la banda de los "Gabos", por compartir todas las locuras que hicieron más divertida la carrera.
- A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Bioquímica Molecular, por su apoyo y compañía en el arte de la Biología Molecular.
- A todas esas personas que aportaron un granito de arena para poder alcanzar mis metas.

## ÍNDICE

Abreviaturas	III
Resumen	IV
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Biodiversidad	1
1.2 Especies Endémicas	1
1.3 Desiertos	2
1.4 Cactáceas	2
1.5 El Género <i>Cephalocereus</i>	5
1.6 <i>Cephalocereus columna-trajani</i>	5
1.7 Cambio climático	7
1.8 Variación genética	11
1.9 Detección de variación genética	12
1.10 Marcadores moleculares tipo RAPD	14
2. Hipótesis	17
3. Objetivos	18
<b>4. METODOLOGÍA.</b>	<b>19</b>
4.1 Área de Estudio	19
4.2 Trabajo de Campo	21
4.3 Trabajo de Laboratorio	22
4.3.1 Extracción de DNA	22
4.3.2 Amplificación por PCR	24
4.4 Análisis Estadístico	24
4.4.1 Distancia Genética	25

4.4.2 Relaciones Espaciales	25
4.4.3 Estructura Genética	26
4.4.4 Diversidad Genética	27
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>29</b>
5.1 Trabajo de Campo	29
5.2 Trabajo de Laboratorio	30
5.2.1 Extracción de DNA	30
5.2.2 Amplificación	31
5.3 Análisis Estadístico	34
5.3.1 Porcentaje de polimorfismo	35
5.3.2 Distancias Genéticas	35
5.3.3 Relaciones Espaciales	37
5.3.4 Estructura Genética	38
<b>6 DISCUSIÓN</b>	<b>44</b>
<b>7 CONCLUSIONES</b>	<b>48</b>
<b>8 BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>50</b>

## RESUMEN

Unas de las prioridades de los biólogos, es el estudio de las especies potencialmente vulnerables, las cactáceas endémicas son un ejemplo de estas. *Cephalocereus columna-trajani*, es una cactacea columnar que puede medir 10.0 m de alto, con un ápice que se inclina ligeramente para proteger el cefalio y es endémica al Valle de Tehuacán-Cuicatlán. En esta reserva, se estudio la variación regional de los cambios de temperatura entre la parte sudeste de Puebla y al noreste de Oaxaca, pronosticando un incremento de 2°C en los próximos 50 años, disminuyendo la humedad relativa en un 15%, lo que ocasionaría que especies endémicas (principalmente cactáceas) desaparezcan por no poder adaptarse a estos cambios. Los estudios de marcadores moleculares permiten interpretar la estructura genética de las poblaciones y observar variaciones no evaluadas por otros métodos, que pueden favorecer la adaptación. Con el objetivo de determinar los parámetros de la variación genética en las poblaciones de *C. columna-trajani* en Tehuacán, Puebla y relacionar los parámetros de diversidad genética con los patrones climatológicos, se analizaron poblaciones de esta especie que se localizan en cuatro diferentes rangos climáticos, se hizo la extracción del DNA genómico y utilizando la Amplificación Aleatoria del DNA Polimórfico (RAPD) se obtuvieron los diferentes parámetros genéticos para su análisis estadístico.

Se analizaron 102 individuos pertenecientes a 5 poblaciones en cuatro regiones con diferente rango climático. Mediante el uso de la técnica RAPD y usando 9 primers se obtuvieron 142 bandas polimórficas, observándose

diferencias en el patrón de bandeo de los individuos; con las cuales se obtuvo un nivel de polimorfismo promedio del 60%, a partir de estas 142 bandas, se hizo el análisis estadístico; se aplicó el índice de Jaccard y se visualizó un dendrograma con el método de UPGMA, agrupándose los individuos por sitio de colecta, reflejando que las poblaciones con el mismo rango climático no son las más cercanas genéticamente. El AMOVA realizado indica que el 31.53% de la variación es intrapoblacional y el 68.47% es intrapoblacional, con una  $\Phi_{ST}$  de 0.28 el cual está dentro de los rangos de las plantas con fertilización cruzada. Usando el índice de Shannon por cada primer se obtuvo un buen nivel de variabilidad genética entre las poblaciones con un  $G'st = 0.288$ .

A partir del AMOVA, se determinó que las poblaciones se encuentran estructuradas genéticamente, con una alta diversidad genética, lo que implica que, de darse un cambio climático, podría disminuir drásticamente la diversidad genética de esta especie. Sin embargo, dado que las poblaciones no presentan correlación entre su diversidad genética, y el rango climático en el que se encuentran, se podría asumir que esta especie tendría la capacidad de adaptarse al cambio climático.



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Biodiversidad.

La ubicación latitudinal de la República Mexicana, su localización entre dos provincias biogeográficas (Neártica y Neotropical), su compleja topografía y climatología, así como su origen geológico son factores que dan origen a una variada riqueza biológica, por lo que México es considerado el séptimo entre los doce países megadiversos del planeta. En términos generales México alberga cerca del 10% de la biodiversidad del planeta (Toledo, 1994).

La biodiversidad se refiere a la riqueza o variedad de formas vivientes: plantas, animales y microorganismos (diversidad de especies) que existen en un territorio, organizados en diferentes ecosistemas (diversidad de ecosistemas) y sostenidos como entes vivientes por una cantidad de información genética aún mayor (diversidad genética).

## 1.2 Especies endémicas.

Una de las principales prioridades de los biólogos conservacionistas es el análisis de especies endémicas que sobreviven en ambientes y condiciones biológicas y climáticas restringidas, como en el caso de las zonas de montaña húmeda y desiertos (Eguiarte y Piñero, 1990). Se asume que en estas especies la variación genética puede ser muy escasa, aunque existen casos en la literatura en que las plantas raras o endémicas de distribución restringida, poseen mayor variación que en sus congéneres con distribución amplia, contradiciendo las predicciones teóricas (Karron, 1987; Hamrick y Godt, 1990; Ranker, 1994, Smith y Vuong, 1996; Otero *et al.*, 1997). Las explicaciones dadas a esta observación

son, la reciente especiación de estos grupos a partir de especies con mayor dispersión, cambios recientes en la distribución o hábitat, eficientes sistemas reproductivos, mutaciones somáticas, múltiples eventos de fundación o bien que las especies se encuentran en regiones que fueron refugios Pleistocénicos (Smith y Vuong 1996). Evidencia experimental a favor de estas consideraciones no son del todo contundentes y son muy pocos los estudios realizados en las especies endémicas para generalizar (Alejos, 2002).

### **1.3 Los Desiertos**

La mayor parte de las plantas endémicas que se encuentran en los desiertos y en ellos habitan el 14% de las plantas vasculares que hay en México (Moreno y Sánchez, 1990; Rzedowski, 1991). Por lo que la mayor parte del territorio nacional es ocupado por desiertos (60%) prevaleciendo este tipo de especies y dominando el escenario ambiental de nuestro país (Valiente-Banuet *et al.*, 1995).

### **1.4 Cactáceas**

En los desiertos, dentro de las especies dominantes se encuentran las cactáceas, originarias del continente americano. En nuestro país se encuentran alrededor del 52% de los géneros y el 57% de las especies (Becerra, 2000). Diferentes factores como los niveles altos de endemismo, gran especificidad del hábitat, poblaciones reducidas, sobrecolecta y destrucción o modificación de su hábitat, determinan que gran parte de sus especies estén incluidas en la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) como especies raras, vulnerables o en peligro de extinción (Sánchez-Mejorada, 1982; Arias, 1993 y Hunt, 1992). A pesar de esta problemática son muy pocos los estudios ecológicos y

todavía mas escasos los estudios de Genética poblacional de esta familia, que podrían encaminar a estrategias de conservación adecuadas (Alejos, 2002).

Un centro de diversidad de esta familia es el Valle de Tehuacán-Cuicatlán situado en el centro del país. Este es considerado un centro de megadiversidad y endemismo de plantas y animales en el ámbito mundial (Dávila *et al.*,1993). Es una zona semiárida cuya importancia biológica ha sido reconocida internacionalmente al ser nominada como Reserva de la Biósfera (Diario Oficial, 1998).

Las Cactáceas comprenden cerca de 110 géneros y 960 especies de las cuales 720 habitan en las regiones áridas y semiáridas de México. En particular, en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán habitan 24 géneros y 81 especies de esta familia, de las cuales 20 son endémicas de la región (Arias *et al.*, 1997; Dávila *et al.*, 1993). Las Cactáceas representan los elementos dominantes de algunas comunidades de plantas en esta reserva, y muestran patrones de distribución bien definidos. Estas plantas también juegan un importante papel social para las comunidades cercanas o que habitan en la reserva, dado a que estos organismos son usados como alimento, material de construcción y combustible (Casas *et al.*, 2000).

Muchas cactáceas y otras plantas son cultivadas o aprovechadas en estado silvestre a partir de sus para alimentar el ganado entre los que se encuentran los géneros *Cephalocereus*, *Ferocactus*, *Mammillaria*, etc. y constituyen un recurso fundamental al encontrarse en zonas muy áridas donde la presencia de plantas "más tiernas" es prácticamente nula. Muchas de estas especies son aprovechadas para construir cercados donde guardar los animales o para separar los campos (García- Lahera. 2000).

Las cactáceas presentan un crecimiento muy lento, siendo el periodo más crítico de su ciclo de vida el establecimiento de las plántulas, por lo que cualquier alteración en el sustrato o la falta de humedad en el mismo evita su establecimiento (Valiente-Banuet, 1991; Godínez-Álvarez, 2000).

La familia Cactaceae presenta gran complejidad taxonómica que genera una importante riqueza de especies, siendo México uno de los centros de diversidad para varios grupos Taxonómicos, como las tribus Cactaceae, Hylocerae y Pachycerae. Esta última presenta 13 géneros y 58 especies de cactáceas columnares (Arias, 1993; Cornejo y Simpson, 1997).

### **1.5 Género *Cephalocereus*.**

EL género *Cephalocereus*, comprende tres especies, *C. senilis*, *C. palmeri*, y *C. columna-trajani*, las plantas de este género son usadas como alimento, principalmente el fruto; en algunas regiones de México se usa como alimento de temporada o como adorno para alimentos; además tiene importancia ecológica, debido a que en algunas comunidades vegetales, llega a ser la especie dominante (Téllez y Dávila 2003).

### **1.6 *Cephalocereus columna-trajani*.**

Esta es una especie endémica columnar que se desarrolla sobre laderas de roca caliza, entre los 1500 y 1700 m.s.n.m. Esta cactácea llega a medir hasta 10 metros de altura, no tiene ramificaciones de manera natural y presenta un ápice siempre inclinado con dirección al norte. En los individuos mayores de dos metros, se puede observar una franja oscura continua en donde se forman las flores. Esta estructura denominada cefalio, representa el tejido especializado para la producción de las flores. Los individuos de esta especie se pueden encontrar asociados a matorrales y vegetación arbolada con especies como *Mimosa liui siana*, *Hechtia podantha*, *Agave cockii*, *Caesalpinia melanadenia*, *Agave macroacantha*, *Euphorbia antisiphilitica*, *Fouquieria formosa*, *Mascagnia parvifolia*, *Lippia graveolens*, *Ipomoea arborescens*, *Beaucarnea gracilis*, *Karwinskia humboldtiana* y *Morkillia mexicana* (Valiente-Banuet *et al.*, 1995).

Sus tallos generalmente sin ramificaciones, ensanchados en la base, ápice inclinado ligeramente, verdes a gris claros; costillas 16-34, 0.6-1.5 cm de altura; areolas elípticas, distantes entre sí 3.0-5.0 mm; espinas radiales 12-18, 0.4-1.0 cm, subuladas. Extendidas, blancas; espinas centrales 5-8, 0.5-8.0 cm de largo, setosas a subuladas, más gruesas y rígidas que las radiales, blancas; zona fértil apical a lateral, amarillo-grisácea, con pelos abundantes, ca 5.0 cm largo, cerdas 4.0- 6.0 cm de largo. Flores 6.2-7.5 cm largo; pericarpelo 1.2-1.5 cm largo, 1.0-1.2cm de ancho, blanco, brácteas ca 1.0 mm largo, angostamente deltoides, mucronadas, pardas, pelos escasos, limitados a la base del pericarpelo; tubo receptacular 3.5 -3.8 cm largo, blanco brácteas 0.4- 2.0 cm largo, angostamente deltoides, mucronadas, tépalos externos 1.3-1.5 cm largo, 0.4-0.5 cm ancho, lineales, ápice acuminado, rosa a blanco; tépalos internos ca 1.5 cm largo, ca 0.7 cm de ancho, espatulados, ápice abruptamente acuminado, blanco-amarillento; margen

denticulado; estambres 0.5-1.0 cm largo, filamentos Blanco-Amarillento; estilo 4.2- 5.0 cm largo, blanco, lóbulos del estigma ca. 5, ca. 2.0 mm largo, amarillo claro. Frutos 3.0-4.0 cm de largo, 2.0-2.8 cm ancho, ovoides, pardo claros a oscuros, cicatriz del parianto amplia y dura brácteas pequeñas, lana escasa y corta; semillas ca. 2.0 mm largo; testa lisa, intersticios no punteados. Distribución: Especie endémica del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Hábitat: Bosque espinoso, bosque tropical caducifolio y matorral xerófilo, sobre suelos calizos. En algunas comunidades vegetales, llega a ser la especie dominante y se les llama “Cardonales”. En elevaciones de 600-1800 m.s.n.m. Fenología: Florece entre marzo y mayo (ocasionalmente hasta julio). Nombre vulgar: “Cardón blanco, “órgano”. (Fig. 1)



Figura 1. Bosque de cactáceas columnares de *Cephalocereus columna-trajani*.

## 1.7 Cambio climático

Debido a la intensiva pérdida de ecosistemas, habitats, y especies de diferentes partes del mundo, se realizan grandes esfuerzos que influyen en el estudio y selección de áreas de conservación e investigación. En México, la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), ha declarado 151 áreas de conservación prioritarias basándose en la tasa de biodiversidad y endemismo (CONABIO 2003). En este contexto, CONABIO y otras agencias tienen estudios fundamentados e investigaciones en estas áreas para la obtención de inventarios sobre flora, fauna, ecología, etnobotánica y otros datos biológicos relevantes que podrían ayudar a obtener información para futuros manejos y protección de estas áreas (Téllez y Dávila 2003). Uno de los factores que ocasionan la pérdida de las especies son los cambios ocurridos en el planeta, debido al aumento de la concentración de CO<sub>2</sub> (Caziani y Díaz1998). Giorgi *et al.* (1998), Karl (1998) y Neilson (1998), revisaron la concentración CO<sub>2</sub>, la precipitación y la variación climática durante el siglo pasado; con ésta información, hicieron algunas predicciones de los cambios climáticos para los siguientes 50 a 100 años. En particular Karl (1998), revisó la variación regional de los cambios de temperatura y precipitación en las latitudes de la Reserva de la Biosfera del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, pronosticando un cambio de casi 2°C dentro de los próximos 50 a 100 años. Entre tanto la precipitación disminuiría en cerca del 15%, en el mismo rango de tiempo ocasionando que la humedad relativa del suelo también se reduzca afectando principalmente el establecimiento de las plántulas y así afectando directamente el numero de organismos jóvenes (Téllez y Dávila 2003). Como ya se mencionó, este cambio en la temperatura ocasionaría que varias de las

especies endémicas (principalmente cactáceas) como *C. columna-trajani* desaparezcan o se reduzca el área de distribución al no poder adaptarse a estos cambios (Fig. 2A y 2B).

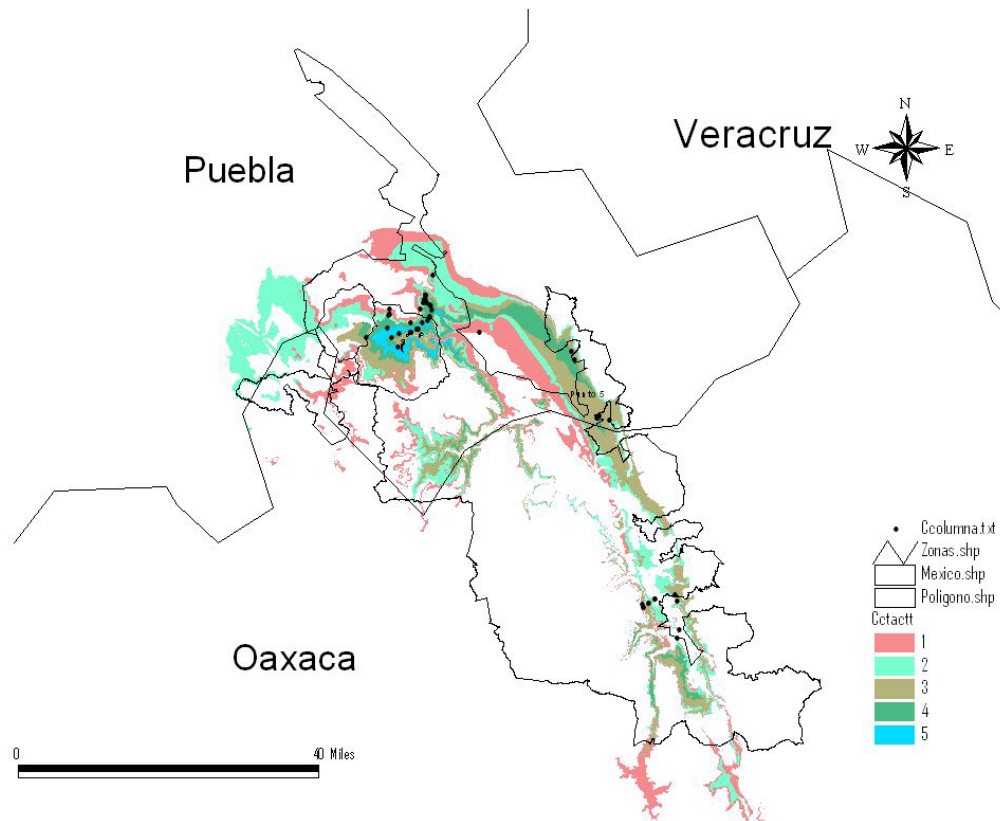


Figura 2A. Zona de distribución y el potencial actual de *C. columna-trajani*. 1- 0-100%, 2- 2.5-97.5%, 3- 3-95%, 4- 4-10-90%, 5- 25-75%, de probabilidad de encontrarse en esa región.



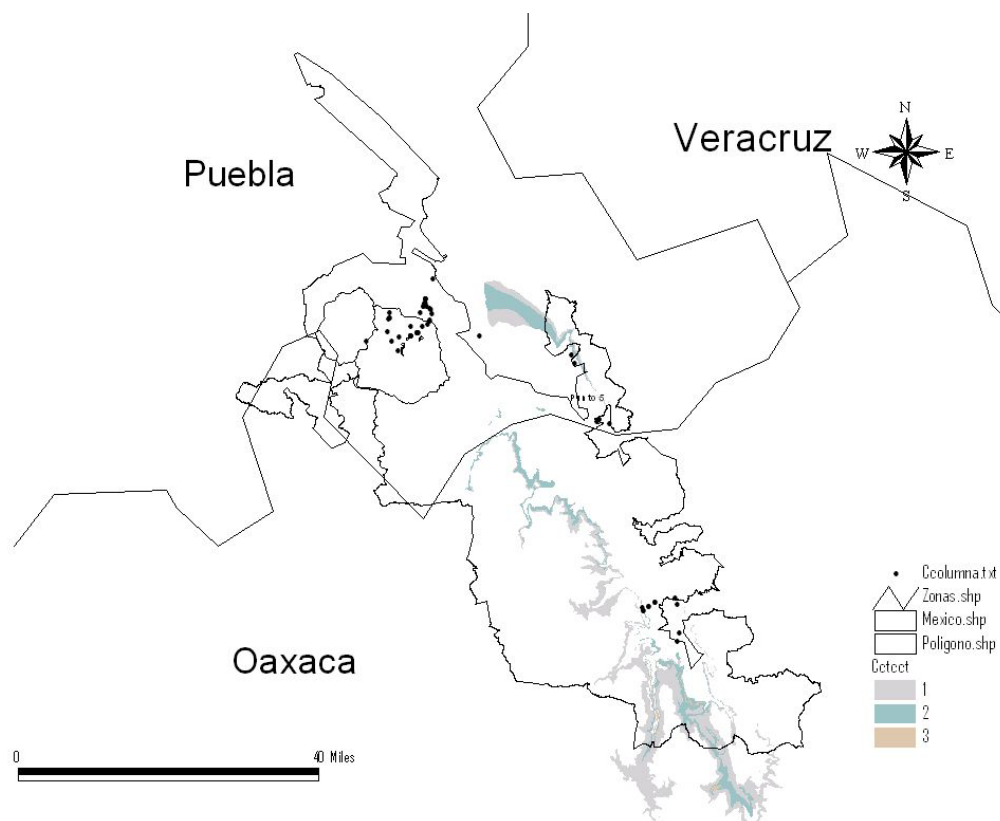


Figura 2B. Zona de distribución de *C. columna-trajani* simulada, después de 100 años y un cambio de 2°C (Téllez y Dávila, 2003).

Una estrategia que les permite a los organismos responder a los factores bióticos y abióticos es su variabilidad genética. Por lo tanto, es importante saber la variabilidad genética de las especies como información fundamental en el diseño de estrategias de conservación (Alejos-2002).

## 1.8 Variación Genética

Se entiende por variación genética a las diferencias en la constitución genética de los individuos de una población. La extinción y la variación genética, en una población, es el resultado de una interacción entre las denominadas “fuerzas evolutivas”: mutación, migración, selección y deriva génica. La mutación y migración (flujo génico) tienden a incrementar la variación genética, mientras que la selección y la deriva génica la disminuyen (Navarro, 1999; Eguiarte y Piñero, 1990).

Cuando en una población ocurren cambios sistemáticos en las frecuencias genéticas por efecto de las distintas fuerzas evolutivas, se produce una diferenciación genética entre varias poblaciones o en una población, por lo tanto se dice que se altera la estructura genética poblacional y una población estructurada puede evolucionar de manera distinta respecto a una no estructurada. En la mayoría de las poblaciones estructuradas no existe el apareamiento al azar, es decir, se produce endogamia, porque algunas subpoblaciones se aparean con las más cercanas, por lo tanto la población se subdivide en grupos genéticamente más parecidos entre sí. La estructura genética poblacional se ve afectada por el tamaño, el número y la edad de los individuos efectivos que contiene cada población (Navarro *et al.*, 1999).

## **1.9 Detección de variación genética**

La aplicación y el análisis de marcadores moleculares en el estudio de la diversidad genética proporcionan información de la cantidad y distribución de variación genética en las poblaciones (Ayad,1997; Jauhar, 1996). Desde hace dos décadas, los marcadores moleculares han sido herramienta fundamental, ya que se han utilizado para establecer filogenias, identidad de genes (introgresión a nuevas variedades), determinación de similitud entre individuos consanguíneos y mapeo genómico de plantas (Vekemans y Jacquemart, 1997). También proporcionan una visión de los patrones de reproducción en las poblaciones vegetales y de los mecanismos de pre y post polinización que contribuyen en estos patrones (Cruzan, 1998). Por lo tanto, el grado y tipo de variación depende de la parte del genoma en estudio con respecto al tipo de marcadores moleculares. Es así, que se han desarrollado varios métodos como el uso de isoenzimas, el uso de enzimas de restricción o los basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las isoenzimas, fueron los primeros marcadores moleculares usados para la estimación de variación, los polimorfismos son el resultado a partir de cambios en la secuencia codificante de la proteína. No obstante, sólo revelan una parte de la variación en secuencias conservadas de DNA. Los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP's) se basan en las diferencias de fragmentos largos obtenidos de la digestión de DNA con endonucleasas denominadas enzimas de restricción, los polimorfismos son debidos a la presencia o ausencia de los sitios de restricción en el genoma de los individuos comparados. Los RFLP's han sido utilizados en la elaboración de mapas genómicos, en le establecimiento de vinculación de características del desarrollo de los árboles filogenéticos, y la tipificación de

cromosomas. Las isoenzimas y RFLP's tienen la ventaja de ser fenotípicamente neutrales y codominantes (Hartl, 1999; Vekemans y Jacquemart, 1997).

Los métodos basados en la PCR, detectan variación codificante y no codificante del genoma de las especies en estudio. Un primer método es el que ha sido utilizado para analizar sitios polimórficos de restricción, eventos de delección e inserción, secuencias de repetidos en tandem y bases por sustitución a partir de secuencias de polimorfismo amplificadas (ASP) (Vekemans y Jacquemart, 1997; Kan Fu Yu *et al.*, 1993). Una segunda técnica se refiere a los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificadas (AFLP's) que combina PCR y análisis de fragmentos de restricción para detectar polimorfismos cerca de sitios de enzimas de restricción. Con esta técnica se detectan múltiples loci polimórficos y que son útiles para generar huellas genéticas o para mapeo, la desventaja es que son de costo elevado (Simpson, 1997). Una tercera técnica se refiere al sistema molecular de Amplificación al Azar del DNA Polimórfico (RAPD) el cual ofrece ventajas en la velocidad y simplicidad en la frecuencia de identificación de polimorfismos (Guadagnuolo *et al.*, 2001; Ayad. 1997; Jauhar 1996; Newbury y Ford-Lloyd, 1992).

## 1.10 Marcadores Moleculares tipo RAPD

Los RAPD's detectan mejor las variaciones genéticas dentro de las poblaciones, por lo que los marcadores RAPD detectan diversidad fenotípica, más que diversidad alélica y enfatizan más las diferencias entre poblaciones (Vekemans y Jacquemart, 1997; Kan Fu Yu *et al.*, 1993).

Los RAPD's son una variación de la PCR, fundamentada en el mecanismo fundamental de la replicación del DNA desarrollado por Williams *et al.* (1990). Se basa en la acción de la enzima DNA polimerasa amplificando segmentos aleatorios del DNA templado a partir de primers con secuencias conocidas cortas de 10 decanucleótidos, un solo primer funciona para la amplificación de ambas cadenas de DNA (Ayad 1997; Jauhar, 1996; Lynch y Milligan, 1994; Kan Fu Yu *et al.*, 1993).

La ausencia de la amplificación de un fragmento de RAPD puede ser debidos a cambios en los sitios de alineación de primer con el DNA templado ocasionados por deleción o inserción de nucleótidos y otro tipo de mutaciones que dan lugar a los polimorfismos (Jauhar, 1996). En la técnica se requiere del DNA que se desee amplificar, una enzima termo estable: la *Taq polimerasa*, originalmente aislada a partir de bacterias que viven en manantiales de agua caliente (*Thermus acuaticus*),  $MgCl_2$  como factor de la enzima, primers y nucleótidos libres (Otero *et al.*, 1997; Kan Fu Yu *et al.*, 1993; Newbury y Ford-Lloyd, 1992).

Cada ciclo de amplificación pasa por tres cambios de temperatura: 1) La doble hélice de DNA se desnaturaliza a 94°C. 2) A 37°C se efectúa la alineación de los primers a uno o varios sitios de la cadena desnaturalizada. 3) Se eleva la temperatura a 72°C donde la polimerasa alarga las nuevas hebras de DNA a partir de los primers, uniendo desoxinucleótidos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP). Se dispone entonces de dos nuevas copias del fragmento. En el ciclo siguiente  $2^n$  fragmentos después de  $n$  ciclos. Por lo tanto el número de moléculas es exponencial (Otero *et al.*, 1997; Jauhar, 1996; Kang Fu Yu *et al.*, 1993; Nembury y Ford-Lloyd, 1992).

Los productos de amplificación son separados por electroforesis en geles de agarosa, revelados con bromuro de etidio. Teóricamente, los productos representan un alelo por locus (Allnutt *et al.*, 1999). Las mutaciones que inhiben el alineamiento del primer o que de alguna forma previenen la amplificación son detectadas por la ausencia de fragmentos amplificados de DNA, la secuencia corta del primer es susceptible de identificar regiones de la cromatina que están presentes en un solo cromosoma de un par homólogo, debido a esto los marcadores RAPD son dominantes porque solamente el alelo + (banda presente) es suficiente para permitir la amplificación por lo tanto no se puede distinguir con el análisis de estos marcadores entre el genotipo homocigoto +/+ del genotipo heterocigoto +/- (Piepho, 2001; Harlt, 1999; Jauhar, 1996). Por la naturaleza de los RAPD's, Lynch y Milligan (1994) señalan que se requieren muestrear más individuos y loci, recientemente Krauss (2000) ha demostrado que el número de individuos no necesariamente debe ser grande si se obtienen muchos loci o bandas.

Las ventajas de los análisis con RAPD's, es que revelan altos niveles de polimorfismo intra e interpoblacionalmente de especies en comparación con RFLP's o isoenzimas, no requiere conocimiento previo de la secuencia de DNA, el número de loci que pueden ser examinados es ilimitado y además no requieren de pruebas radioactivas (Reiter *et al.*, 1992; Van Heusden y Bachmann, 1992).

Se han detectado problemas prácticos como la presencia de bandas erróneas o artefactos, la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados y la comigración de bandas (Raboam *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 1998). Estas desventajas pueden disminuirse, en primer lugar, verificando que el contenido de G + C de los primers no sea mayor del 60%, evitando alineaciones del primer con segmentos que no son 100% homólogos. La reproducibilidad y confiabilidad de los resultados pueden obtenerse si se establecen de manera precisa cada una de las condiciones, tanto de la reacción de amplificación como de la electroforesis (Raboam *at al.*, 1999; Newbury y Ford-Lloyd, 1992).

## **2. HIPÓTESIS**

Las poblaciones que tengan una distribución en el mismo rango climático tendrán similitud genéticamente, que aquellas que estén en un rango climático diferente.



### 3. OBJETIVOS

#### **Objetivo general.**

Determinar los parámetros de diversidad genética de *Cephalocereus columna-trajani* en cuatro diferentes rangos de temperatura en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla.

#### **Objetivos particulares**

1. Determinar la distribución regional de *C. columna-trajani* en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla.
2. Determinar los parámetros de diversidad genética utilizando el sistema de marcadores moleculares de Amplificación Aleatoria del DNA Polimórfico (RAPD).
3. Relacionar los parámetros de diversidad genética de las poblaciones con los patrones climatológicos donde se establecen.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 ÁREA DE ESTUDIO

Se localiza en la Reserva de la Biosfera del Valle de Tehuacán-Cuicatlán entre la parte sureste del estado de Puebla y noreste del estado de Oaxaca, entre los 17° 39' y 18° 53' de latitud norte y los 96° 55' y 97° 44' de longitud oeste (Villaseñor *et al.*, 1990)(Fig. 3). Presenta un clima semiárido con una precipitación media anual de 400 mm y una temperatura media anual de 21°C. Se encuentra delimitado al este por la Sierra Madre Oriental, conocida localmente como Sierra de Zongolica y por la Sierra de Juárez al sur. Los suelos son someros y pedregosos y pueden corresponder a cambisoles cálcicos, xerosoles cálcicos o litosoles (Zavala-Hurtado, 1982). La flora de este lugar esta compuesta por entre 2700 y 3000 especies de plantas vasculares, de las cuales aproximadamente el 30% son endémicas de la región (Dávila *et al.*, 1993; [www.tehuacan.com](http://www.tehuacan.com),2003).

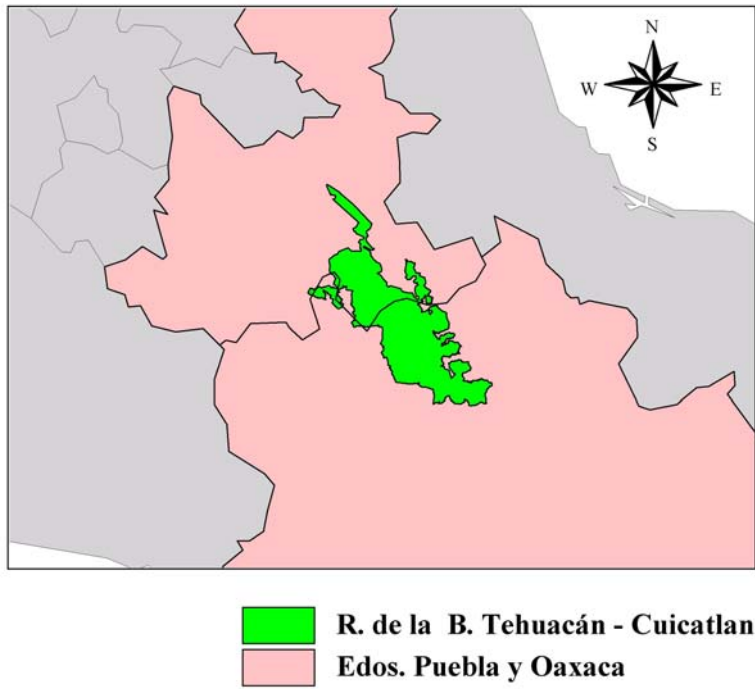


Figura 3. Mapa de localización del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

## 4.2 Trabajo de campo.

Se seleccionaron cinco sitios de la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán. A partir de los lugares de distribución de *C. columna-trajani* y las diferencias en cuanto a las temperaturas promedio de estas (Fig. 4 y Cuadro1).

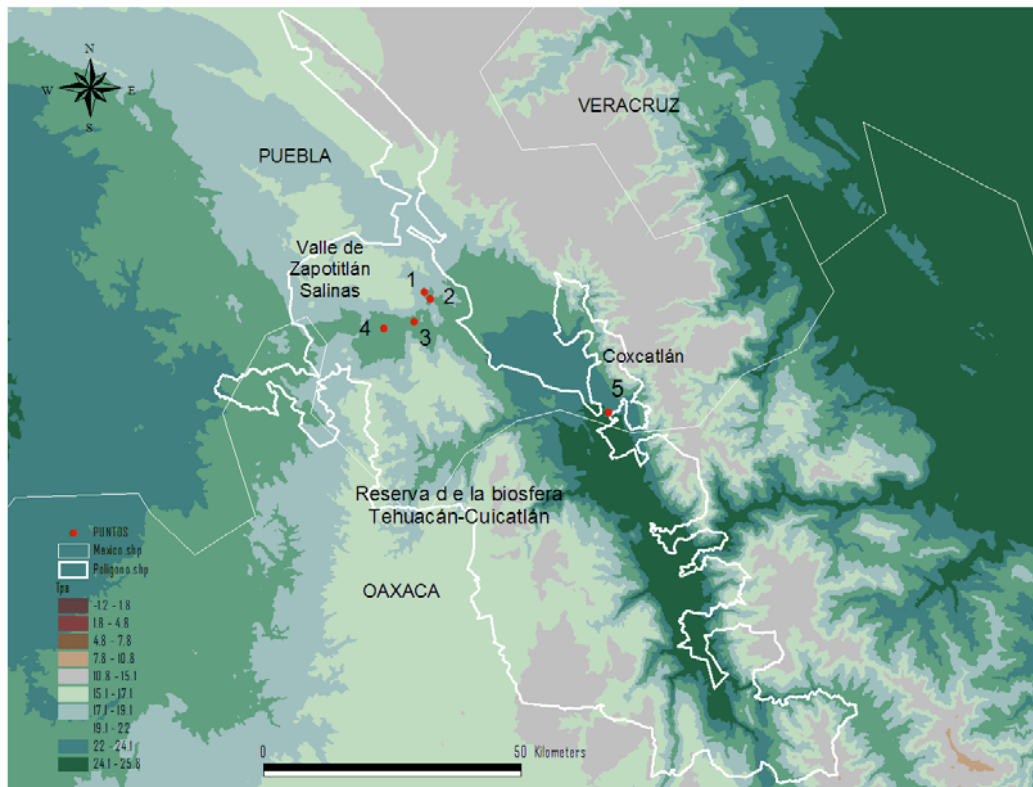


Figura 4. Mapa de climas con los sitios de colecta.

En las zonas ubicadas, se colectaron 25 individuos, a su vez de cada organismo se colectaron aproximadamente 15 cm de costilla a una altura de 1.50 m de la base. Estas muestras fueron almacenadas y transportadas en bolsas de papel. Este material colectado se almacenó al llegar al laboratorio a 4°C hasta el momento de ser procesado. También se colectaron los materiales

que respaldan la especie trabajada, mismo que fue prensado y secado. Posteriormente, esta muestra fue montada y depositada como ejemplar de referencia en el Herbario de IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

### **4.3 Trabajo de laboratorio.**

#### **4.3.1 Extracción de DNA.**

De cada muestra, se tomó una fracción de tejido parenquimático (10-15 g) que se cortó en fracciones delgadas congelándose con nitrógeno líquido y almacenándose a  $-70^{\circ}\text{C}$ , hasta ser procesadas. La extracción de DNA se fundamenta en el método desarrollado por Dellaporta (1983) con las siguientes modificaciones: El tejido congelado de cada muestra se pulverizó utilizando nitrógeno líquido en un mortero frío. Posteriormente, se colocó 1 gr de tejido pulverizado en un tubo que contiene 2 ml de buffer de lisis, (Tris 100 mM, EDTA 50mM, NaCl 500mM y Mercaptoetanol 10mM, se agregaron 136 $\mu\text{l}$  de SDS al 20%), se homogenizó la mezcla y se colocó 10 min en baño de inmersión a  $65^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se le agregó 680 $\mu\text{l}$  de acetato de potasio 5M, se homogenizó y se mantiene a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 20 min. Pasado este tiempo, se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 15 min, el sobrenadante se desechó y la pastilla seca se resuspendió en 600 $\mu\text{l}$  de agua desionizada estéril. A continuación se le agregaron 500 $\mu\text{l}$  de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico

(25:24:1) y se homogenizó por inversión, dejándose reposar de 2 a 3 min, se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 20 min y posteriormente se recuperó la fase superior, sin traer la fase fenólica. A la fase acuosa se le agregó 50  $\mu$ l e Acetato de Sodio 3M, nuevamente se agita y se le añadió 1 ml de etanol absoluto frío colocándose durante 60 min a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido este tiempo se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 30 min El sobrenadante se desecha y la pastilla se lava con etanol frío al 70%. El ADN así purificado se almacenó en agua desionizada estéril a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Para observar el DNA genómico, en las extracciones se uso una electroforesis en un gel de agarosa 0.8% a 100V 40 min, revelando con bromuro de etidio, visualizado en un digitalizador de imágenes Alpha Multimage con luz U.V.

La cuantificación de DNA se realizó en un espectofotómetro Bio wane S2100 Diode Array, a una absorbancia de 260nm,. Para obtener la concentración de DNA, 2  $\mu$ l de la solución se diluyeron en 1 ml de agua desionizada, se midió su absorbancia y se utilizó la siguiente formula para calcular su concentración:

$$DNA \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} = (A_{260} - A_{320}) \cdot \epsilon \cdot \frac{1000 \mu\text{l}}{2 \mu\text{l}}$$

Donde  $A_{260}$  y  $A_{320}$  representan las lecturas a estas absorbancia y  $\epsilon = 50$  es el coeficiente de extinción molar del DNA.

#### **4.3.2 Amplificación.**

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador GeneAMP PCR System 9700 programado con ciclo inicial a 94°C para la desnaturalización de DNA durante 2 min seguido de 40 ciclos de 1 min a 94°C par desnaturalizar, 1 min a 37°C para la alineación de los oligonucleótidos y 1 min a 72°C para la polimerización. Por último se da un ciclo final de 15 min a 72°C de polimerización complementaria. En cada reacción se emplearon de 100 a 200 ng de DNA genómico, H<sub>2</sub>O desionizada buffer para PCR, MgCl<sub>2</sub> (50 mM), Taq polimerasa (5U/μl) y una mezcla de dNTP's (200 μM de cada uno) todos de Invitrogen. Los oligonucleotidos utilizados fueron de la serie OPERON™ (cuadro 2) A02, A04, B10, C07, C08, E14 y J13 y se agregaron por separado a la reacción en una concentración de 5 picomoles/μl.

#### **4.4 Análisis estadístico.**

Las bandas fueron codificadas como datos binarios y se construyeron matrices de presencia/ausencia, en donde la presencia de la banda en los individuos es (1) y la ausencia (0) (Crisci y López, 1983).

##### **4.4.1 Distancia Genética.**

A partir de la matriz de presencia/ausencia se estimó la similitud genética mediante el índice de Jaccard, uno de los más recomendados cuando se trabajan con este tipo de datos (Vierling y Nguyen, 1992). Las semejanzas

entre individuos fueron establecidas por el método de ligamiento promedio aritmético no ponderado (UPGMA) y visualizadas a través de un dendrograma.

Para corroborar que el dendrograma es una buena representación de las relaciones genéticas observadas entre las poblaciones o individuos se calculó el coeficiente de correlación cofenética. Para ello, a partir de la matriz que da origen al dendrograma se construyó una matriz cofenética, la cual es comparada con la matriz de similitud de Jaccard. Para esto se realizó una permutación al azar de posiciones de ambas matrices, repitiendo el proceso de comparar la matriz 1 con la matriz 2 de 1000 veces obteniendo un coeficiente de correlación. Una correlación alta ( $r > 0.8$ ) indica escasa distorsión y viceversa.

#### **4.4.2 Relaciones Espaciales.**

Un análisis complementario que permite resumir las relaciones entre los individuos es el de coordenadas principales (PCO), que representa en forma gráfica las relaciones entre los organismos en un espacio multidimensional. El PCO junto con el análisis de tendido mínimo (MST) sobrepuesto, definen las conexiones entre poblaciones cercanas genéticamente. Ambos métodos fueron utilizados en el análisis de datos de *C. columna-trajani*. Todos los análisis anteriormente mencionados se realizaron con el programa Ntsys V. 2.0.

#### **4.4.3 Estructura Genética.**



Una forma de estimar la diversidad genética sin la suposición de Hardy-Weinberg es considerar la diversidad fenotípica de las bandas de cada individuo como un genotipo distinto y estimar las similitudes y diferencias con base en las mismas (Huff y Smouse, 1993; Whitkus *et al.*, 1998). Bajo este supuesto a partir de la matriz de datos de presencia ausencia se estimó la estructura genética de *C. columna-trajani* mediante un AMOVA, de acuerdo al modelo propuesto por Crow y Aoki (1984) donde el equivalente multialélico de  $\phi_{ST}$  es análogo a la  $F_{ST}$  de Wright, un equivalente al índice de diversidad, que es definido por la formula :

$$\phi_{ST} = \frac{1}{4N_e m \cdot a + 1}$$

Donde  $a = [n/(n-1)^2]$  y  $n$  es el número de poblaciones. Una  $\phi_{ST}$  igual a 1 indica la igualdad genética entre las poblaciones.

De esta fórmula puede estimarse el flujo génico ( $N_e m$ ) a través de la fórmula:

$$N_e m = \left( \frac{1}{4a} \right) \cdot \left( \frac{1}{\phi_{ST}} - 1 \right)$$

Donde  $N_e$  es el número efectivo de la población y  $m$  el número de inmigrantes por generación, el producto de ambos representa el flujo génico. Este valor es inversamente proporcional a la de  $\phi_{ST}$  y si  $N_e m$  es mayor a 1 existe flujo génico en la especie.

Para ver la significancia de la  $\phi_{ST}$  se aplicó el estadístico de Bartlett, que es una prueba no paramétrica de varianza molecular que indica la homogeneidad de la varianza entre los pares de poblaciones comparadas para *C. columna-trajani* es estadísticamente significativa o resultado al azar.

#### 4.4.4 Diversidad Genética.

La diversidad genética para cada población también se estimó con el índice de Shannon para cada locus RAPD, a partir de la relación

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

Donde  $P_i$  es la frecuencia del  $i$ ésimo locus generada por todos los marcadores RAPD en la población. El promedio de la diversidad para todas las poblaciones fue calculado para cada locus:

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

La diversidad de la especie fue calculada para cada locus como:

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

Donde  $P_s$  es la frecuencia del marcador RAPD en la muestra total. De esta forma, para cada locus los componentes de diversidad dentro de las poblaciones es:

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

y la diversidad entre poblaciones es:

$$(H'_{sp} - H'_{POP}) / H'_{sp}$$

Que es equivalente a la  $G_{st}$ ; un índice de diversidad que provee una estimación relativa del grado de variación entre cada localidad (Hartl *et al.*, 1994; Bussell, 1999). Una  $G_{ST}$  igual a 1 equivalente a la igualdad genética entre poblaciones.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Trabajo de Campo.

Se recolectaron 102 individuos en cinco regiones diferentes, al menos, cuatro de ellas con un rango climático distinto (Cuadro 1).

Cuadro 1. Regiones, localización, rango climático y número de individuos analizados de *C. columna-trajani*.

Región	Zona	Localización	No. de Individuos	Rango Climático
1	Texcala	18° 22' 55.9" N 97° 26' 30.1" W	20	17.1 – 19°C
2	Salinas	18° 22' 13.3" N 97° 25' 57.4" W	20	15.1- 17°C
3	Jardín Botánico	18° 19' 49" N 97° 27' 38.4" W	19	19.1- 21°C
4	Río Zapotitlán	18° 19' 6.3" N 97° 30' 47.3" W	21	19.1-21°C
5	San Rafael Coxcatlán	18° 10' 23" N 97° 7' 13.8" W	22	22- 24.1°C

## 5.2 Trabajo de Laboratorio.

### 5.2.1 Extracción de DNA.

Se extrajo el DNA de los 102 individuos. Una de las características principales que presentan las cactáceas columnares es el hecho de presentar gran cantidad de mucílago, que de forma natural les sirve para almacenar agua, el cual contiene una gran cantidad de carbohidratos (Bravo-Hollis, 1978) lo que ocasiona serios problemas al momento de realizar la extracción, esto es porque al colocar el primer buffer de extracción se forma una masa viscosa y difícil de manejar, para solucionar este problema, se lava dos veces la pastilla para quitar el exceso de carbohidratos, con esto se sacrifica cantidad de DNA, pero se obtiene una mayor calidad de en el mismo. La cantidad de DNA extraído fue de 150 ng a 2420 ng/ $\mu$ l, que es suficiente para la técnica de RAPD, la cual se estandarizó entre 100 a 200 ng/ $\mu$ l. (Fig. 5)

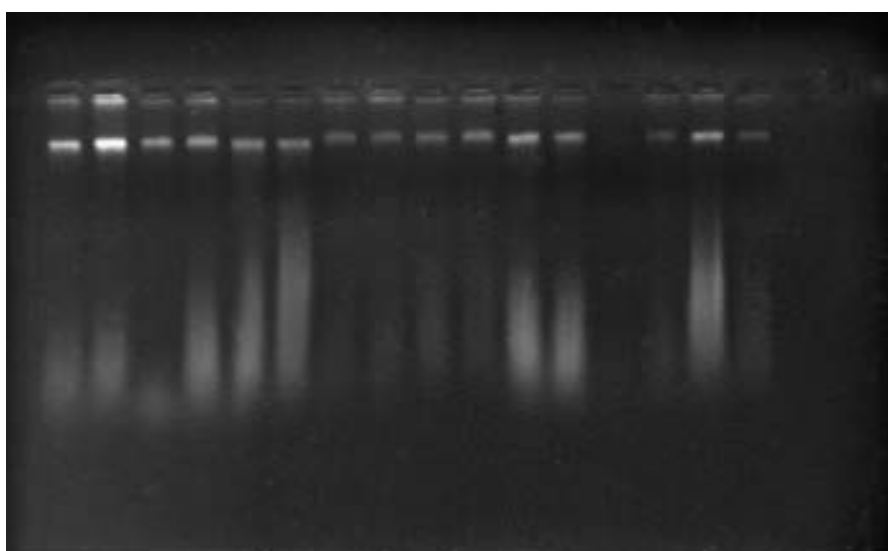


Figura 5. Visualización del DNA de *C. columna-trajani* en un gel de agarosa al 0.8 %.

### 5.2.2 Amplificación.

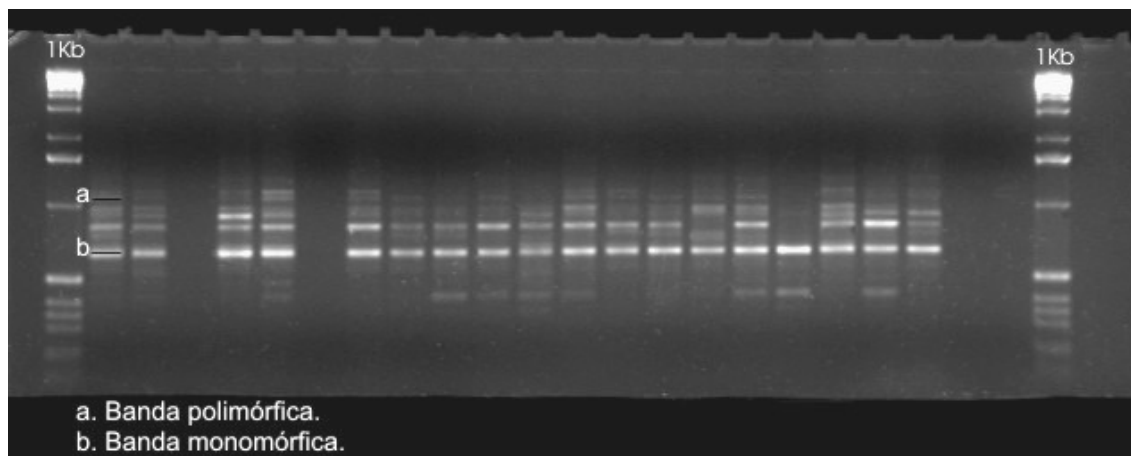
Se probaron 18 oligonucleótidos en cuatro individuos, de los cuales se seleccionaron nueve basándose en el grado de polimorfismo presentado y en función de la reproducibilidad cualitativa del patrón de bandas entre los individuos. Los 9 oligonucleótidos seleccionados se probaron en los 102 individuos de *C. columna-trjani*. Se obtuvieron un total de 142 marcadores (bandas) polimórficas (Fig. 6)

Para cada primer se obtuvo un número diferente de polimorfismos los cuales variaron de 15 a 19 marcadores polimórficos (cuadro 2).

Cuadro 2. Secuencia de los decanucleótidos utilizados y número de bandas polimórficas amplificadas.

Primer	Secuencia	No. de bandas
A02	5'TGCCGAGCTG <sup>3</sup>	15
A04	5'AATCGGGCTG <sup>3</sup>	19
B10	5'CTGCTGGGAC <sup>3</sup>	16
C07	5'GTCCCGACGA <sup>3</sup>	18
C08	5'TGGACCGGTG <sup>3</sup>	18
E14	5'TGCGGCTGAG <sup>3</sup>	17
J13	5'CCACACTACC <sup>3</sup>	15
A10	5'GTGATCGCAG <sup>3</sup>	15
B05	5'TGCGCCCTTC <sup>3</sup>	13
Total		142

Figura 6. Polimorfismos obtenidos con el oligonucleótido E14 en individuos de  
C. *columna-trajani*.



Para el estudio, el número de loci detectados por primer es adecuado, puesto que se detectaron 142 marcadores y cinco poblaciones, de acuerdo con Nybom y Bartish (2000), quienes reportan que de 150 estudios revisados, el número promedio de individuos analizados es de 12-17 muestras por población; el número promedio de marcadores varió de 57-71 en promedio, siendo un buen indicador de polimorfismo aquellos primers que den un número mayor de 13 loci, por lo que valores por encima de estos logran afinar aún más este tipo de análisis y de igual manera, el número de marcadores obtenidos en este análisis es de 142, siendo A-02 el primer con el mayor número de bandas observadas, mientras que el B-05 es el que menor número de bandas observadas tuvo, con lo cual la confiabilidad de nuestros resultados es buena; el porcentaje de polimorfismo por cada sitio de colecta fluctúa entre 51 y 68 % siendo la población de Texcala la de mayor variación, con respecto a las otras cuatro poblaciones.

### 5.3 Análisis Estadístico.

La matriz binaria en la que se codificaron las bandas fue realizada con 102 OTUs (Unidades Taxonómicas Operativas), por 142 marcadores. Los 9 primers utilizados arrojaron porcentajes de polimorfismo promedio de 49 al 68 %, mientras que el polimorfismo promedio para todos los marcadores fue de 40 % (Figura 6, cuadro 3)

Cuadro 3. Número de marcadores y porcentaje de polimorfismo promedio por primer y por población.

Primer polimorfismo	No. de bandas Visualizadas	Poblaciones					% de SR
		T	S	JB	RZ		
OPC-07	18	71	61	49	65	77	65
OPJ-13	15	66	57	43	53	46	53
OPE-14	17	82	49	48	63	45	57
OPA-04	19	71	55	47	72	82	65
OPA-02	15	69	55	55	61	68	62
OPB-10	16	73	50	62	78	71	67
OPC-08	18	78	54	68	59	81	68
OPA-10	15	53	70	38	37	63	52
OPB-05	13	50	51	45	45	53	49
% polimorfismo Promedio		68	56	51	59	65	60

$T^a$      $S^{b,c}$      $JB^{b,c}$      $RZ^{b,d}$      $SR^{a,d}$     con una  
 $p < 0.05$



### **5.3.1 Porcentaje de polimorfismo.**

El porcentaje de polimorfismo corresponde al promedio de los porcentajes de polimorfismo de cada población.

A Partir de los promedios de polimorfismo se realizó un cuadro de agrupaciones de acuerdo a la semejanza de polimorfismo.

### **5.3.2 Distancia Genética.**

En el dendrograma (Fig.7) se visualiza la similitud genética entre los individuos y en forma general se observa agrupación por sitio de colecta, donde los individuos de la zona de Texcala (T1-T25) están agrupados y perteneciendo al mismo rango climático, seguido de los individuos de la zona de las Salinas (S3-S27) también agrupados todos ellos juntos y perteneciendo al mismo rango climático, el siguiente grupo es el del Jardín Botánico (J1-J23) también agrupando a sus individuos todos juntos, la siguiente agrupación es la de San Rafael (SR1-SR22) es agrupado con todos sus individuos juntos, por último los individuos de Río de Zapotitlán (R1-R22) son agrupados de igual manera que los demás, es decir de acuerdo al mismo rango climático.

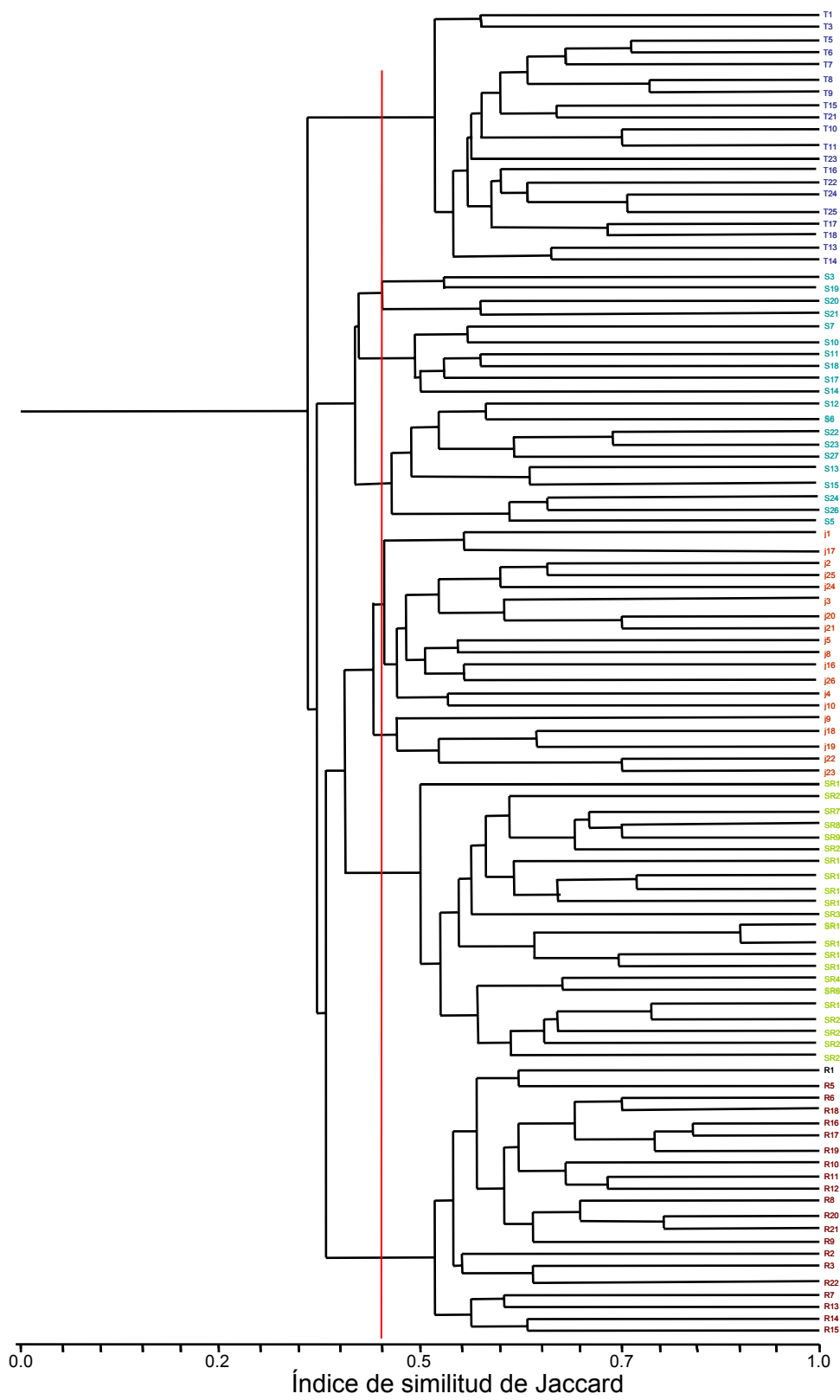


Figura 7. Dendrograma de *Cephalocereus columna-trajani*. Texcala (T), Las Salinas (S), Jardín Botánico(J), Río de Zapotitlán (R), San Rafael (SR). Valor de la prueba de mejor corte de  $t = 0.451$ , visualizado con una línea roja. Coeficiente de correlación de  $r = 0.774$  y la probabilidad de  $p = 1.000$

### **5.3.3 Relaciones espaciales.**

El valor obtenido con la prueba del mejor corte fue de  $t = 0.451$ . Este valor se visualiza en el dendrograma (Fig. 7) como una línea roja y prácticamente todas las agrupaciones son significativas. La robustez del árbol fue estimada con la prueba de Mantel y esta dada por el coeficiente  $r = 0.77441$  que indica escasa distorsión, con una probabilidad de  $p = 1.000$

En el dendrograma obtenido (fig. 7) se observó que existe una agrupación entre los individuos de acuerdo a cada población o sitio de colecta.

En el análisis de PCO (Análisis de Coordenadas Principales), se observó una tendencia similar al dendrograma de la (Fig. 7), ya que los agrupamientos de los individuos están dados por sitio de colecta, es decir que no existe un agrupamiento entre individuos (Fig. 8).

En la (Fig. 8) se observa el análisis de ordenación con red de tendido mínimo (MST) en donde todos los individuos se agrupan de acuerdo a su zona de colecta. En el PCO con MST sobrepuesto se aprecian las agrupaciones más claramente, siendo al parecer la población del Jardín Botánico un centro de dispersión, debido a que todas las poblaciones convergen de ahí, observándose también que las poblaciones de Jardín Botánico y San Rafael, son las más cercanas.

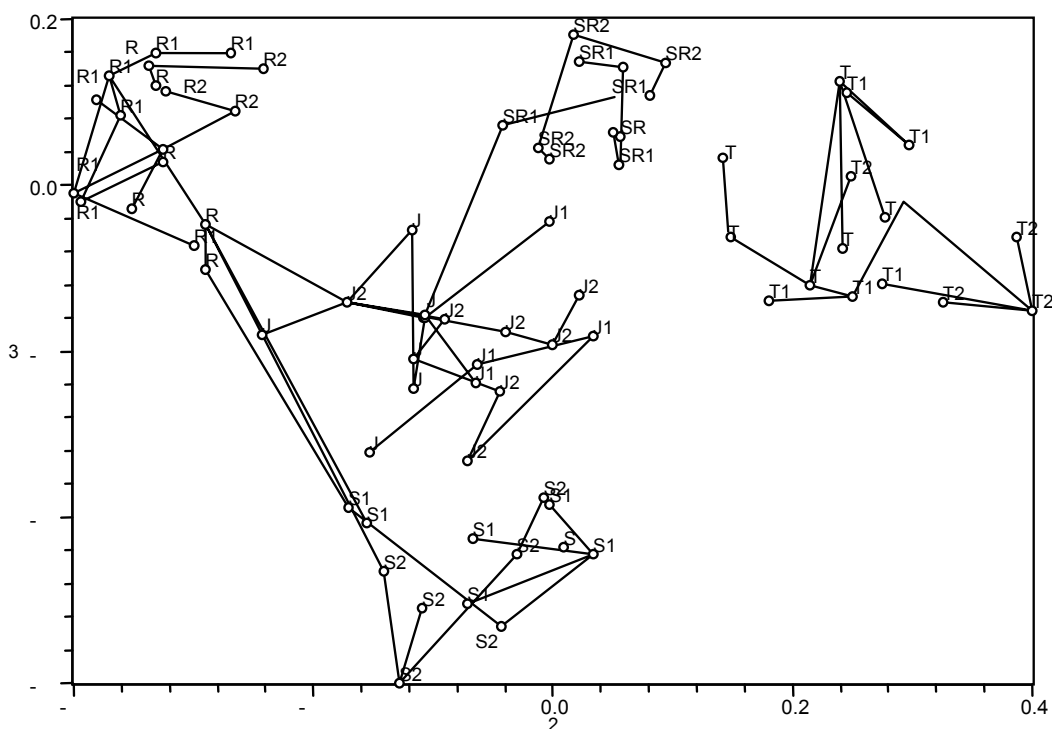


Figura 8. PCO con MST sobrepuesto en los individuos de *C. columna-trajani*, donde existe un agrupamiento de acuerdo a los sitios de colecta.

### 5.3.4 Estructura Genética.

El AMOVA (Análisis de Varianza Molecular) realizado a los individuos de *C. columna-trajani* tomando en cuenta las cinco poblaciones, indica que 28.77% de la variación esta dada entre los individuos, es decir dentro de las poblaciones y el 71.23% esta dada entre las poblaciones. Estos resultados indican que las poblaciones podrían estar en un proceso de fragmentación en los sitios donde se hizo el muestreo, con una  $\phi_{ST} = 0.288$  y una  $N_e m = 0.3479$  que nos indica que no existe flujo génico entre las poblaciones analizadas.

Cuadro 4. Diversidad genética de *C. columna trajani* con el análisis de varianza molecular (AMOVA) en dos niveles.

Componentes de variación	gl	Varianza total	% de varianza total	$\phi_{ST}$
V(A)	4	7.962	(28.77%)	
V(B)	97	19.71	(71.23%)	
Total	101			0.288
				P < 0.001

gl: grados de libertad; V(A): varianza entre las poblaciones; V(B): varianza dentro de las poblaciones; P probabilidad de que sean productos al azar después de 1000 permutaciones.

Para estimar la variabilidad genética por sitio se utilizó el índice de Shannon obteniendo la variabilidad genética por sitios y por oligonucleótidos (Cuadro 5), con este análisis se obtiene que muy poca variabilidad esta contenida entre las poblaciones ( $G'_{ST} = 0.288$ ), estos resultados siguen una tendencia similar a la obtenida con el AMOVA. Con este análisis las zonas más variables son las Salinas y Jardín Botánico, mientras que las poblaciones menos variables son San Rafael y Texcala.

Cuadro 5. Valores de diversidad genética, obtenidos con el índice de Shannon, para cada oligonucleótido y población analizados.

	T	S	JB	RZ	SR	H <sub>pop</sub>	H <sub>sp</sub>	H <sub>pop</sub> /H <sub>sp</sub>	G' <sub>st</sub>
C07	4.507	4.468	5.171	3.054	2.939	4.028	7.447	0.541	0.459
J13	3.090	3.826	5.085	5.193	4.602	4.359	6.379	0.683	0.317
E14	3.263	6.041	5.967	5.403	6.621	5.459	6.872	0.794	0.206
A04	3.832	6.467	7.329	3.324	2.698	4.730	7.199	0.657	0.343
A02	4.326	5.445	4.874	5.431	3.895	4.794	6.004	0.799	0.201
B10	4.178	5.727	6.000	2.801	3.729	4.487	6.496	0.691	0.309
C08	3.363	6.539	4.924	5.986	2.763	4.715	7.084	0.666	0.334
A10	5.369	3.822	6.105	5.621	4.348	5.053	6.310	0.801	0.199
B05	4.967	4.448	5.205	4.880	5.025	4.905	6.039	0.812	0.188
x	4.099	5.198	5.629	4.632	4.069	4.726	6.648	0.716	<b>0.284</b>

A partir del AMOVA, la  $\phi_{ST}$  fue de 0.288, este resultado y el obtenido con el índice de Shannon caen dentro de los valores observados en especies de fecundación cruzada, las cuales presentan una mayor diversidad dentro de sus poblaciones y poca diferenciación genética entre las poblaciones (Hamrik y God, 1996).

Para observar las relaciones entre las poblaciones se graficaron las  $\phi_{ST}$  pareadas de las cinco poblaciones obtenidas con el AMOVA (Cuadro 4) utilizando PCO de dos dimensiones con MST sobrepuesto (Figura 8). En esta gráfica se aprecia un centro de unión de las relaciones en el Jardín Botánico, el hecho de que jardín botánico sea el centro de unión podría decir que esta

población contiene mucho más información genética que comparte con las poblaciones, así como la lejanía genética de la población de Texcala.

Cuadro 6 Matriz de  $\phi_{ST}$  pareadas de las poblaciones de *C. columna-trajani*.

	Texcala	Salinas	Jardín botánico	Río Zapotitlán	San Rafael
Texcala	0				
Salinas	0.3075	0			
Jardín Botánico	0.2802	0.1906	0		
Río Zapotitlán	0.3484	0.2882	0.241	0	
San Rafael	0.3573	0.2611	0.227	0.3494	0

Para observar las relaciones entre los sitios de colecta se realizó un dendrograma a partir de una matriz de similitud (Fig. 9) con las  $\phi_{ST}$  pareadas, observándose mas claramente la tendencia de relacionarse con la población del jardín botánico y siendo la población mas alejada Texcala.

Uniéndose las poblaciones de Salinas y jardín botánico a una distancia 0.15, seguido de la población de San Rafael a una distancia de casi 0.25, posteriormente a una altura cercana a 0.33 se une la población de Río de Zapotitlán y por ultimo la menos parecida o la mas separada es la población de Texcala la cual se une a poco mas de 0.35. Cabe señalar que las poblaciones de Jardín botánico y la del Río de Zapotitlán se encuentran dentro del mismo rango climático y por lo que se puede observar en el dendrograma de las  $\phi_{ST}$  pareadas y en el PCO estas dos poblaciones no son las mas cercanas, por lo

que se deduce que no existe una relación en cuanto al rango climático y una cercanía genética.

Por otro lado, se observa una estructuración clara entre las poblaciones.

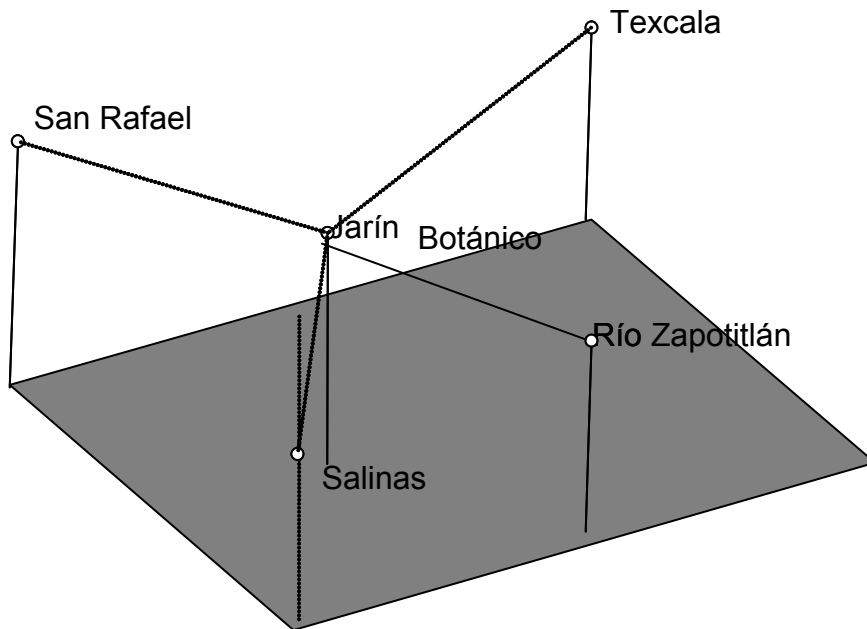


Figura 9. PCO en tres dimensiones con MST de las cinco poblaciones de *C. columna-trajani*.



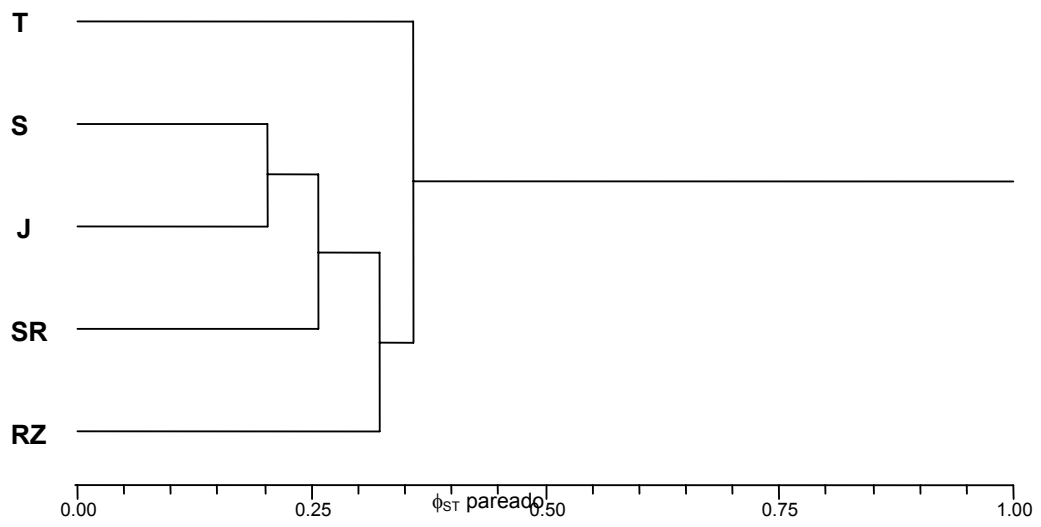


Figura 10. Dendrograma de todas las poblaciones obtenido a partir de las  $\phi_{ST}$  parteadas entre las poblaciones.

## 6. Discusión

La biología de la conservación ha ganado importancia a través de los últimos años debido al aumento en las tasas de extinción. Para lograr una eficiente conservación de las especies, es necesario entender la historia natural de las especies a preservar, de modo que este conocimiento sirva de base a otras acciones encaminadas a la conservación, que permitan a las especies continuar sus procesos de especiación y adaptación, para comprender su funcionamiento a través de las generaciones (Eguiarte y Piñero, 1990).

La evaluación de las respuestas, particularmente del comportamiento de la diversidad genética, de especies en sitios en diferentes estados de conservación aporta datos, tanto al conocimiento de la especie en si misma como al de la dinámica del ecosistema que habita (López, 2004).

*Cephalocereus columna-trajani* es una cactácea columnar, la cual tiene gran importancia por ser la especie dominante en varias zonas, se distribuye en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, en sitios con estado de conservación contrastante y con un rango climático variado; se trata de una especie endémica, oriunda de esta región (Valiente-Banuet *et al.*, 1995).

Un aspecto de relevancia observado durante el muestreo, fue el relacionado con las presiones ejercidas por el hombre sobre las diferentes poblaciones de esta especie. En el caso de la población de Texcala, la gran

mayoría encontraba alteraciones, debido a que se encuentra a los lados de la carretera y por lo tanto casi no hay interacción directa con el hombre. Sin embargo esta población es la más alejada genéticamente que las demás. En el caso de la población que se encuentra en la zona de las Salinas que, es la que se localiza en una zona más fría y alta, podría ser la población con menos interacción que las demás por su lejanía con los poblados. La siguiente población es la del Jardín botánico Helia Bravo Bollis, en esta localidad se colectaron individuos, no sólo del jardín botánico sino también aquellos individuos que se encuentran dentro del pueblo o en jardines de las casas de la localidad. En el caso de la población del Río de Zapotitlán, esta está en una zona de cultivos, por lo que la alteración a su medio ambiente es alto. Por ultimo la población de San Rafael está en una situación más crítica aún, debido a que se encuentra en un zona que se usa como tiradero de basura, no hay que perder de vista que esta última población es la que en teoría tendría oportunidad de sobreponerse al cambio climático, según el modelo propuesto por Tellez y Dávila (2003).

Por otra parte, la principal afectación del incremento de 2° C de temperatura en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, es la pérdida de 15% de la humedad relativa del suelo; si se toma en cuenta que *C. columna-trajani* presenta un crecimiento muy lento, siendo el periodo más crítico de su ciclo de vida el establecimiento de las plántulas y el tiempo que tarda en tener su primera floración (reproducción) es de  $70 \pm 2$  años (Zavala-Hurtado y Díaz-Solis, 1995), por lo que son muy susceptibles a cualquier alteración de humedad, temperatura y cambios en el pH del suelo (Valiente-Banuet, 1991; Godínez-Álvarez, 2000), y sería un grave problema para las futuras generaciones, sin embargo no hay

que perder de vista las alteraciones que podrían sufrir las nodrizas de *C. columna trajani* con respecto al cambio climático podrían agravar o disminuir los efectos.

Esto concuerda con los datos reportados por Godínez-Álvarez (2000) y Vilchis (2000), que mencionan que el establecimiento de nuevos individuos de cactáceas columnares ha decrecido últimamente. De igual forma, Zavala-Hurtado y Díaz-Solis (1995) reportan que hace más de 100 años hubo condiciones favorables que permitieron el establecimiento de las cactáceas como *Neobuxmama macrocephala* y *C. columna-trajani*, esto favoreció el establecimiento de nuevos individuos pero al parecer actualmente las condiciones ambientales ya no son favorables. En estas condiciones, las estrategias reproductivas favorecen la autofecundación o presentan proporciones inusuales de apareamiento que generalmente presentan una variabilidad genética baja, y en condiciones particulares hace muy vulnerable a las poblaciones y en casos extremos llegar incluso a la extinción (Zavala-Hurtado y Díaz-Solis, 1995).

El valor de flujo génico de la especie es  $N_e m = 0.3479$ , que al ser comparado con otros estudios de cactáceas columnares como *Neobuxbaumia macrocephala* (Alejos, 2002) con una  $N_e m = 1.79$ , es menor, lo que indica que no hay flujo génico entre las poblaciones, este resultado confirma que la población total de *C. columna-trajani* está sufriendo un proceso de estructuración entre los sitios muestreados. El valor de variabilidad de *C. columna trajani* es comparable con los valores que se reportan para especies

de polinización cruzada (15-38%), que en general presentan mayor variabilidad que las especies con autofecundación. Por lo que el hecho de tener una adecuada variabilidad genética  $G'_{ST} = 0.28$  sugiere la probabilidad de que la especie se logre adaptar al cambio climático. De acuerdo a estos resultados, tampoco se encontró correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética así como tampoco entre la distancia genética y los rangos de temperatura.

El valor de la  $\phi_{ST}$  para la especie, fue de 0.288 (y una  $N_{em} = 0.347$  esto indica que existe flujo génico ( $N_{em} < 1$ ) entre ellas), explicando la alta variabilidad genética observada, este valor es parecido al reportado para *N. mezcalaensis* y flujo génico menor a 1 ( $N_{em} = 0.47$ ). Aunque cabe señalar que existe intercambio genético entre algunas poblaciones de *N. mezcalaensis*, estas no se encuentran en un estado de estructuración (Rivera, 2003).

En cuanto a la posible estructuración de las poblaciones, podría deberse a que el dispersor, un quiróptero del género *Leptonycteris* el cual al llegar a alimentarse de los frutos de *C. columna-trajani* se percha en algún lugar cercano a comerse el fruto, lo que ocasiona que casi no haya flujo génico entre las poblaciones (Valiente-Banuet, comunicación personal); sobre todo si consideramos que estos murciélagos pueden volar más de 30 Km por noche y abarcar 200 Km<sup>2</sup> en tan solo una semana (Rojas, 1996). Esto ha llevado actualmente, a estudios de las rutas de forrajeo de los murciélagos, que permitirán esclarecer como es que la información genética de las poblaciones es transportada por este grupo biológico. Con esta información se podría

esclarecer el hecho de que la población del Jardín botánico y la población de San Rafael sean las más cercanas genéticamente, aun cuando estas no sean las mas cercanas geográficamente. Estas diferencias en cuanto a la asociación genética y geográfica se pueden asociar con diferencias en el relieve del Valle, el cual, presenta un corredor biológico a lo largo de los sitios de distribución por donde los murciélagos pueden desplazarse en una sola dirección, prefiriendo ciertas rutas de alimentación visitando algunos sitios hasta que el alimento es escaso (Rivera, 2003).

Algo de lo que vale la pena hablar es el hecho de que las cinco poblaciones confluyan con la población del Jardín Botánico. Esto habla de que esta población comparte mayor información genética con las de mas poblaciones. Dentro de este estudio los sitios de colecta con mayor cercanía genética entre si, de acuerdo con el análisis de agrupamiento, reforzado con la prueba del mejor corte, son la Salinas y Jardín botánico, mientras que la mas alejada genéticamente es la población de Texcala.

## 7. CONCLUSIONES

- *Cephalocereus columna-trajani* presenta poblaciones estructuradas genéticamente.
- Las poblaciones no presentan diferencias en su diversidad genética con respecto a su rango climático.
- No existe relación entre la distancia genética y la distancia geográfica.
- La diversidad genética resultó superior a la reportada para especies endémicas.
- De darse el aumento de 2°C , la población perdería las condiciones ambientales favorables y de extinguirse, se perdería el 84.73% de la diversidad genética.

## ABREVIATURAS.

AMOVA	Análisis de varianza molecular.
CONABIO	Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
H <sub>o</sub>	Diversidad por locus.
H <sub>pop</sub>	Diversidad para todas las poblaciones.
H <sub>sp</sub>	Diversidad de las especie.
Jb	Jardín botánico.
MEXU	Herbario Nacional de México.
MST	Red de tendido mínimo
N <sub>e</sub>	Número efectivo de la población.
P	Probabilidad.
PCO	Análisis de Componentes Principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
Primers	Decanucleotidos, cebadores.
r	Coefficiente de correlación.
RAPD	Amplificación aleatoria del DNA polimórfico.
RZ	Río de Zapotitlán.
S	Salinas.
SR	San Rafael.
T	Texcala.
UPGMA	Agrupamiento por promedio aritmético no ponderado.



## 8. Bibliografía

- Alejos L. 2002. Estudio de la estructura poblacional de *N. macrocephala* en Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, mediante el uso de marcadores moleculares. UNAM. 1-18 p.p.
- Allnut, T. R; A. C. Newton; A. Lara; Premoli; J. J. Armesto; R. Vergara y M. Gardner. 1999. Genetic variation in *Fitzroya cupressoides* (Alerce) a Threatened Sout American conifer. *Molecular Ecology*, 8 (6): 975-987.
- Arias, M. S. 1993. Cactáceas. Conservación y diversidad en México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. 44: 109-115.
- Arias, M. S. Gama, L. S. y Guzmán- Cruz, L. U. 1997. Cactaceae. *En: P. Dávila Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. Fascículo 14. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F. 147 pp.
- Ayad, W. G. 1997. Molecular genetics techniques for plant genetics resources.
- Becerra, R. 2000. Las cactáceas, plantas amenazadas por su belleza. *Biodiversitas*. Año 6, núm.18.
- Bussell, J. D. 1999, The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst population of *Isotmam petraea* (Lobeliaceae). *Molecular Ecology*. 8: 775- 789.

- Bravo-Hollis, H. 1978. Las cactáceas de México. 2ª. Ed. Vol. 1. UNAM. México D.F. 743 pp.
- Caziani, O.F. and S. Díaz 1998. Latin America. In : R.T. Watson, M.C. Zinyowera, R.H. Moss and D.J. Donkken. The regional Impacts of Climate Chang: An assessment of vulnerability. A special report of IPCC Working group II. Cambridge University Press.
- Casas, A., A. Valiente-Banuet., J. L. Viveros, J. Caballero, L. Cortés, P. Dávila A., R. Lira and I. Rodríguez 2000. Plant Resources of the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. Economic Botany 55(1): 129-166.
- CONABIO, 2003. [www.conabio.gob.mx](http://www.conabio.gob.mx)
- Cornejo, O. D. and Simpson, B. B. 1997. Analysis fom and function in North American columnar cacti (Tribe Pachycereae). American Journal of Botany. 84 (11): 1482-1501.
- Crisci, J. 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, Argentina. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, D. C. 132 pp.

- Crow, J. F. and Aoki k. 1984. Group selection for a polygenic behavioral trait: Estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 81: 6073-6077.
  
- Cruzan, B. M. 1998. Genetic markers in plant evolutionary ecology. *Ecology*, 79(2): 400-412.
  
- García-Lahera, J. P., G. Hernández-Martínez, D. A. Navarrete-Gutierrez, F. Reyes-Zepeda e I. Ruán-Tejeda. 2000. Variación morfométrica de *Cephalocereus columna-trajani* (Karwinski ex Pfeiffer) relacionada a condiciones climáticas en dos laderas del cerro “volcancillo” en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México. *Unidad de Posgrado UNAM*.1-10 pp.
  
- Dávila, A. P. D., J. L. Villaseñor R., R. Medina L., A. Salinas T., J. Sánchez K. y P. Tenorio 1993. *Listado Florístico de México: Flora del Valle de Tehuacan-Cuicatlán, México*. Instituto de Biología UNAM.
  
- Dellaporta, S. L., Word, J. and Hicks, J. B. 1983. A plant and minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21 pp.
  
- *Diario Oficial de la Federación*. 16 Octubre del 1998. Segunda sección. pp. 1-84.
  
- Eguiarte, E. L y D. Piñero 1990. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. *Ciencias* . 4: 34-47.

- Giorgi, F., G. A. Maahl, A. Kattenberg, H. Grassl, J. F. B. Mitchell, R.J. Stouffer, T. Tokioka, A.J. Weaver and T.M.L. Wigley 1998. Simuleet changes in Vegetation Distribution Under global warming. In: R. T. Watson, M. C. Zinyowera, R. H. Moss and D. J. Dokken (eds.) The regional Impacts of Climate Changes: An assessment of vulnerability. A special report of IPPCC working group II. Cambridge University Press.
- Godínez-Álvarez, H. and Valiente-Banuet, A. 1998. Germination and early seedling growth of Tehucán Valley cacti species: the roles of soils and seed ingestion by dispersers on seedling growth. *Journal of Arid Environments*. 39: 21-31.
- Godínez-Álvarez, H. O. 2000. Dispersión biótica de semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* (Coulter) Beckeberg en el Valle de Tehucán, Puebla. Tesis de Doctorado. Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del C.C.H. Instituto de Ecología. 200 pp.
- Guandagnuolo, R; D. S. Banchi y F. Felber. 2001. Specific genetic markers for wheat, spelt, and four wild relatives: comparison of isozymes, RAPDs, and wheat microsatellites. *Genome*, 44 (4): 610-621.
- Hamrick, J. L. and Godt, M. J. W. 1990. Allozyme diversity in plant species. *En: Plant population Genetics, Breeding and Genetic Resources* (eds Brown ADH, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS). Sinauer Associates. Sunderland. M. A. 43-63.

- Hartl, D. 1999. A primer of population genetics. 3<sup>a</sup> Ed. ISBN.
- Huff, D. R., and Smouse, P. E. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss *Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm. Theoretical and Applied Genetics. 87: 416-422.
- Hunt, D. 1992. Cites Cactaceae. Chek List. Edit. Royal Botanic Gardens KEW. U. K. 190 pp.
- Jauhar, P. P. 1996. Methods of genome analysis in plant. CRC. Press. New York, London.
- Kang Fu Yu; A. Van Deynze y K. P. Pauls, 1993 Random amplified polymorphic DNA (RAPD) análisis. Method in plant molecular biology and biotechnology. CRC. Press. London. 287-300p.
- Karron, J. D. 1987, A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners. Evolutionary Ecology 1:47-58.
- Karl, T.A. 1998 Regional trends and variation of temperature and precipitation. In : R. T. Watson, M. C. Zinyowera, R. H. Moss and D. J. Dokken (eds.). The regional Impacts of Climate Changes: An Assessment of vulnerability. A special report of IPCC working grup II. Cambridge University Press.

- Krauss, S. L. 2000. Accurate gene diversity estimates from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Molecular Ecology*, 9: 1241-125.
- López U. R. E. 2004. Diversidad Genética de la población de *Agave karwinskii* Zucc. En el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. 54 pp.
- Lynch, M y B. G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD marker. *Molecular Ecology*, 3: 91-99.
- Moreno C. P, y Sánchez, R. G. 1990. La enseñanza de la ecología en México. *Ciencias edición especial* 4: 96-111.
- Navarro, Q. A. R. 1999. Estructura genética y procesos de especiación de *Agave cerulata* y *Agave sunsimplex* en el desierto sonorense a partir de RAPDs. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencia. UNAM.
- Neilson, R. P. 1998. Simulation of regional climate change with global coupled climate models and regional modeling techniques. In: R. T. Watson, M. C. Zinyowera, R. H. Moss and D. J. Dokken (eds.). *The regional Impacts of Climate Changes: An Assessment of vulnerability*. A special report of IPCC working group II. Cambridge University Press.
- Newbury, H. J y B. V. Ford-Lloyd. 1992 The use of RAPD for assessing variation in plants. *Plant Growth Regulation*. 36: 1-9.

- Otero, A. A., Cruz, M. y Oyama K. 1997. El uso de los RAPDS como marcadores moleculares en plantas. Boletín de la Sociedad Botánica. México. 60:85-117.
- Pérez, T; J. Albornoz y A. Duguez. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. Conservation biology, 12 (4): 844-855.
- Piepho, H. P. 2001. Exploiting quantitative information in the analysis of dominant markers. Theoretical Applied Genetic, 103: 462-468.
- Raboam,C; A. M. Comes; V. Bretagnolle; F. J. Humbert ; G. Periquets y Y. Bigots. 1999. Features on DNA fragments obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays. Molecular Ecology, 8: 493-503.
- Ranker; T. A. 1994. Evolution of high genetic variability in the rare Hawaiian fern *Adenosporus parins* and implications for conservation management. Biological conservation 70:19-94.
- Reiter R. S; J. G. K. Feldmann; J. A. Rafalski; S. V. Tingey y P. A. Scolinik. 1992. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. Preceedings of the National Academy of Science. USA. 89 : 1477-1481.

- Rivera M. I. 2003, Estudio de la variabilidad genética de la Cactácea columnar *Neobuxbaumia mezcalaensis*, Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. 84 pp.
- Rojas, M. A. 1996. Estudio poblacional de tres especies de murciélagos nectívoros considerados como migratorios y su relación con la presencia estacional de recursos florales en el Valle de Tehucán. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de ciencias. UNAM. 88 pp.
- Rzedowski, J. 1991. Vegetación de México. Limusa México. México, D.F. 432 pp.
- Sánchez-Mejorada, H. 1982. Mexico's problems and programmes monitoring trade in common and endangered Cacti. The Cactacea Succulet Journal (GB). 42 (2): 36-38.
- Simpson, J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms. Bol. Soc. Bot. México. 60: 119-122.
- Smith, J. F., y Vuong P. T. 1996. Genetic Diversity of the narrow endemic *Allium aaseae* ( Alliaceae). American Journal of Botany. 83 (6): 717-726.
- Téllez V. y Dávila A., 2003, The Present rol of the protected areas on the basis of the present and future climatic change: A study case of the Cactaceae in the Tehucán-Cuicatlán Biosphere Reserve, México.
- Tehuacán, 2003. [www.tehuacan.com](http://www.tehuacan.com)



- Toledo, V. M. 1994. La Diversidad biológica de México. Nuevos retos para la investigación en los noventas. *Ciencia y Desarrollo*. 30:43-59.
- Valiente-Banuet, A. 1991. Dinámica del establecimiento de Cactáceas: patrones generales y consecuencias de los procesos de facilitación por Plantas Nodrizas en Desiertos. Tesis Doctoral, UACPYP-CCH. Centro de Ecología. UNAM. México.
- Valiente-Banuet, A., Dávila, P., Arizmendi, M. C., Rojas, y Casas, A. 1995. Bases Ecológicas del desarrollo sustentable en zonas áridas: El caso de los bosques de cactáceas columnares en el Valle de Tehuacán y Baja California Sur, México. En: G.M. Anaya y C. Díaz Editores. *Memorias del IV curso sobre desertificación y desarrollo sustentable*. PNUMA, FAO. Colegio de posgraduados, Chapingo, México. 20-36.
- Van Heusden, A. W y K. Bachmann. 1992. Genotype relationships in *Micraserien elegans* ( Asteraceae, Lactuceae) revealed by DNA amplification from arbitrary primers (RAPDs). *Plant Sistematic and Evolution*, 179: 221-233.
- Vekemas, X. y A. L. Jacquemart. 1997. Perspectives on the use of molecular markes in plant population biology. *Belgian. Journal Botany* 129 (2): 91-100.
- 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.

- Vilchis, A. B. E. 2000. Estudio poblacional por edades de *Neobuxbaumia macrocephala* (Cactaceae) en Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de ciencias. 63 pp.
- Villaseñor, J. L., Dávila, P. y Chiang, F. 1990. Fitogeografía del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Boletín de la Sociedad Botánica. México. 50: 135-149.
- Williams, J. G. W; A. R. Kubelik; K. J; J. Rafalski y S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18: 6531-6535.
- Whitkus, R., de la Cruz, M., Mota-Bravo, L. and Gómez-Pompa, A. 1998. Genetic diversity of tropical crops maintained by ancient cultures: an example in Cacao. Theoretical and Applied Genetics. 96(5): 621-627.
- Zavala-Hurtado. J. A. 1982. Estudios ecológicos en el Valle de Zapotitlán, Puebla. I. Clasificación numérica de la vegetación basada en atributos binarios de presencia de las especies. Biotica 7: 99-120
- Zavala-Hurtado J. A. y Díaz-Solís A. 1995, Repair, growth, age and reproduction in the giant columnar cactus *Cephalocereus columna-trajani* (Karwinski ex. Pfeiffer) Schumann ( Cactaceae), Journal of Environments 31: 21-31 pp.