



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

**DIVERSIDAD CLONAL Y CRUZAS ÓPTIMAS
EN *Opuntia rastrera* WEBER (CACTACEAE)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

P R E S E N T A

LUCIA MARIA TERESA PLASENCIA LÓPEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA DEL CARMEN MANDUJANO SÁNCHEZ

MÉXICO, D. F.

FEBRERO 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas.

A los apoyos financieros recibidos:

1. Proyecto SEMARNAT-CONACyT No. 0350 de la Dra. M. C. Mandujano Sánchez.
2. Proyecto PAPIIT No. IN231203 de la Dra. M. C. Mandujano Sánchez.
3. Proyecto PAPIIT No. IN205007 de la Dra. M. C. Mandujano Sánchez.
4. Beca de Maestría otorgada por el CONACYT a la Biól. Lucía Plasencia López No. Becario 181948.

A los miembros del comité tutorial:

Dra. María del Carmen Mandujano Sánchez (Asesora de tesis)

Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns (Miembro del comité tutorial)

Dr. Raúl Cueva del Castillo (Miembro del comité tutorial)

Agradecimientos personales

En primer lugar quiero agradecer a los miembros de mi comité tutorial por su apoyo a lo largo de la realización de este trabajo. A la Dra. María del Carmen Mandujano (Meli), por todo su cariño y apoyo, para las salidas de campo y en el trabajo de laboratorio, fue un trabajo arduo, largo y costoso, técnicamente casi imposible, pero lo logramos. Al Dr. Luis Eguiarte Fruns por sus exhaustivas y cuidadosas revisiones, así como por sus interesantes puntos de vista con los que ha crecido esta tesis, gracias Luis. Al Dr. Raúl Cueva del Castillo por sus comentarios al trabajo y por ayudarme a plantearme las cosas de manera mas metódica y ordenada.

A los miembros de mi jurado el Dr. Francisco Molina Fraener por la minuciosa y veloz revisión que hizo a la presente, así como por sus siempre amables comentarios y atinadísimas sugerencias, finalmente y no por eso menos importante a la Dra. Judith Márquez Guzmán, por aventurarse a evaluar esta tesis desde un punto de vista diferente, mil gracias a ambos.

A mis padres José Octavio y María Teresa por apoyarme siempre en todo lo que hago, siempre positivos y con las mejores propuestas en los momentos cruciales, gracias por su cariño, los amo por siempre. A mi hermano Octavio por ser una guía para mí en la vida, por saber salir siempre avante y no flaquear en los momentos difíciles. A toda mi familia en general por estar siempre al pendiente.

A Daniel le agradezco todo su amor, ayuda, comprensión y paciencia, pero sobre todo su alegría y compañía.

Le agradezco a mis compañeros del laboratorio que han estado colaborando conmigo en el campo y en el laboratorio. A Mariana por resolverme la vida con la tramitología dentro y fuera del instituto más de una vez, además por ser una gran persona y amiga. A Erick, Sonora, y Daniel por su apoyo en el trabajo de campo, por soportar con entusiasmo los días de duro trabajo bajo el sol del Chihuahuense. Gracias también a Erick y a Isra por hacer la vida en el laboratorio tan dinámica, además por las pláticas y apoyo a este trabajo. A Miriam, Cynthia, Belinda y Hugo por su amistad, ayuda y compañía en el laboratorio de genética. A Viole por su amistad y compañía en la compraterapia de cactáceas. A Rebe y Sussete por unirse al laboratorio y ser tan alegres siempre. En general a todos los compañeros de laboratorio de Dinámica de Poblaciones (de antes y de ahora; Cony, Yup, Habacúc, todos.) por los momentos, las experiencias y el tiempo agradable que compartimos.

6.1.4	Análisis de diversidad clonal y patrón de distribución espacial de ramets estimados demográficamente	41
6.2	Distancia de crucea óptima	44
6.2.1	Cruzas controladas	44
6.2.2	Índice de similitud genética y distancias geográficas	48
7.	Discusión	51
7.1	Diversidad y distribución clonal	51
7.1.1	Determinación de identidades genéticas.	51
7.1.2	Análisis de diversidad clonal	51
7.1.3	Patrón de distribución espacial de ramets	53
7.2	Distancia de crucea óptima	54
7.2.1	Cruzas controladas, índice de similitud genética y distancias geográficas.	54
8.	Conclusiones	57
9.	Literatura citada.	58
10.	Apéndice 1	64

Resumen

Las especies del género *Opuntia* presentan sistemas de cruce mixtos con depresión endogámica elevada, además de ser plantas que se propagan clonalmente. Como consecuencia de la clonalidad, la distribución espacial de los individuos de nopal puede generar parches de plantas emparentadas genéticamente, atributo que puede influir fuertemente en el sistema de cruce de las poblaciones. Los objetivos de este trabajo fueron: 1) determinar la diversidad clonal así como la distribución clonal de dos poblaciones de *Opuntia rastrera* con reclutamiento contrastante (sexual y clonal). 2) Así como hacer esta misma evaluación considerando los ramets identificados demográficamente en estudios previos, para conocer qué impacto tiene lo que sucede a escalas de espacio pequeñas (aprox. 6m² de radio). 3) Evaluar en la población clonal (nopalera) si existe una distancia de cruce óptima, midiendo experimentalmente el efecto que la distancia geográfica y la similitud genética tienen sobre el éxito reproductivo de *Opuntia rastrera*. Mediante la amplificación de secuencias simples repetidas en intrones (ISSR) se estimó: la diversidad clonal en ambas poblaciones, así como la similitud genética entre pares de individuos progenitores en el experimento de cruces a distancia. Con las identidades conocidas se armaron los mapas de distribución clonal para cada población. Para el experimento de cruce óptima se realizaron cruces a distancia con suplementación de polen, se utilizaron tres distancias de separación entre plantas receptoras y donadoras de polen (<10m, >50m y >1000m). Se colectaron los frutos y semillas de cada cruce. Los siguientes estimadores de diversidad clonal fueron evaluados: 1) La proporción de genotipos distinguibles (G/N) fue de 1 en el pastizal (población sexual) y de 0.95 en la nopalera. Tomando en cuenta los ramets identificados demográficamente, la proporción de genotipos distinguibles en la nopalera disminuyó a 0.57. 2) El índice de diversidad de Simpson (D) y la heterocigosis (H) fueron igualmente altos en ambas poblaciones ($D_{\text{pastizal}} = 0.99$ y $D_{\text{nopalera}} = 0.95$; $H_{\text{pastizal}} = 0.35$ y $H_{\text{nopalera}} = 0.325$; respectivamente). 3) La equitatividad genotípica (E) fue de 1 en ambos sitios. Considerando los clones demográficos la equitatividad de la nopalera se reduce a 0.82 en escalas de 6m². Respecto al experimento de cruce óptima, las cruces realizadas entre pares de plantas separadas a distancias mayores de 50m entre progenitores, mostraron una mayor producción de frutos ($\bar{X} = 0.98$, e.e. = 0.016) y de semillas ($\bar{X} = 318$, e.e. = 18) que las que se encontraban a <10m ($\bar{X} = 0.65$, e.e. = 0.076; $\bar{X} = 229$, e.e. = 26, respectivamente). La similitud genética disminuye conforme aumenta la distancia entre plantas ($r = -0.109$, $P = 0.001$) y la producción de frutos y semillas aumenta conforme disminuye la similitud genética entre pares de plantas progenitoras ($r^2 = 0.99$, $F = 14560.33$ $P = 0.0053$; $r^2 = 0.12$, $F = 16.21$ $P = 0.0001$; respectivamente).

Abstract

Species of genus *Opuntia* show mixed crossing systems with high inbreeding depression and also present clonal reproduction. As a consequence of clonality, local spatial distribution of the plants can produce genetic related patches, an attribute that can have a strong influence over the population mating system. The objectives of this work were: 1) to determine the clonal diversity and distribution of two populations of *Opuntia rastrera* with contrasting recruitment (sexual and clonal). 2) to make the same last analysis with demographic information about the identified ramets, and check for the influence of the known clones over clonal diversity estimations. 3) to determine the optimum cross distance in high clonal conditions, measuring the effect that genetic similitude has over the reproductive fitness of the clonal cactus *Opuntia rastrera*. With the Inter Simple Sequence Repeated amplification (ISSR's), we estimated: 1) the clonal diversity in both populations and, 2) the genetic similitude between pairs of parents in optimum cross distance experiment. With the know identities we built distribution clonal maps for both populations. Field experiments consisted in crossing experiments with pollen addition using three distances between pollen receptive plants and pollen donator plants (<10m, >50m and >1000m). We collected the fruits and seeds obtained from each crossing. The following estimators of clonal diversity were evaluated: 1) The proportion of distinguishable genotypes (G/N) was 1 in the grassland and 0.95 in the "nopalera". With the consideration of demographic information of the site G/N in nopalera is reduced to 0.57. 2) Values obtained from Simpson's index (D) and from heterocigosis (H) were high in both populations ($D_{pastizal} = 0.99$ y $D_{nopalera} = 0.95$; $H_{pastizal} = 0.35$ y $H_{nopalera} = 0.325$; respectively). 3) Genotypic equitativity (E) was 1 in both populations. Taking a count demographic information E is reduced to 0.82 in the "nopalera". In the optimum crossing distance experiment, plants separated by >50m of distance showed a higher production of fruits and seeds ($\bar{X} = 0.98$, e.e. = 0.016, $\bar{X} = 318$, e.e. = 18 respectively) than at <10m ($\bar{X} = 0.65$, e.e.= 0.076; $\bar{X} = 229$, e.e. = 26, respectively). Genetic similarity decreased with increasing distance between plants ($r = -0.109$, $P = 0.001$). Fruit and seed production increased as genetic similarity between pairs of parent plants decreases ($r^2 = 0.99$, $F = 14560.33$ $P = 0.0053$; $r^2 = 0.12$, $F = 16.21$ $P = 0.0001$; respectively).

1. INTRODUCCIÓN

La reproducción es una de las funciones más importantes para los seres vivos ya que les permite dejar descendencia que pueda sobrevivir en condiciones futuras. En general se reconocen tres tipos de reproducción; (1) Reproducción sexual, la cual se lleva a cabo por medio de la unión de gametos de distintos individuos; (2) Reproducción asexual, donde un individuo produce descendientes sin recombinarse con otros genotipos, sin fecundación, y en donde se repiten los procesos ontogenéticos desde el desarrollo embrionario y (3) Reproducción clonal, que implica la producción de nuevos individuos (ramets), pero con el mismo genotipo de la planta madre (y forman un genet o clon en su conjunto); estos nuevos individuos vegetativos se forman mediante la fragmentación de la planta progenitora por diversos mecanismos: esquejes, bulbos, tallos, extensiones, rizomas, raíces o simplemente partes de la planta que se separan (Harper, 1985; Harda et al., 1997). Dentro de la reproducción sexual los sistemas de cruce determinan el modo de la transmisión de genes a la próxima generación, lo cual finalmente será importante para la sobrevivencia de las poblaciones en ambientes estables o cambiantes.

En las angiospermas se puede presentar el sistema de cruce de 3 formas: entrecruza, autocruza o ambos (mixto) y cada población de una misma especie puede tener alguno en particular (Neal y Anderson, 2005). El sistema de cruce en una población además de la capacidad propia de las plantas para generar y desplazar sus gametos (morfología, desempeño etc.), depende fundamentalmente de otros dos factores; el primero son los polinizadores, que son quienes realizan las cruces, son fundamentales ya que dispersan el polen entre las flores y mediante patrones de movimiento, dependientes de los despliegues florales, determinan las oportunidades de cruce (auto o entrecruza); y el segundo factor es el vecindario genético

(Barrett y Harder, 1996). El vecindario genético puede afectar frecuentemente los sistemas de cruce en plantas clonales. Este a su vez depende de la manera en que las plantas se reproducen vegetativamente.

Diversas investigaciones han intentado determinar si entre los sistemas de cruce existe un orden en el tiempo, es decir, si uno dio origen a otro, si hay una evolución en estos sistemas, y hacia dónde se dirige (Wyatt, 1983). Para entender esta secuencia se pone especial atención en las ventajas y desventajas a corto y a largo plazo de cada uno, principalmente en los efectos que pueda tener la depresión endogámica, la diversidad genética que cada sistema genera (Charlesworth y Charlesworth, 1987; Jain, 1976) y los mecanismos que existen de manera natural para evitar o facilitar a uno u a otro (Wyatt, 1983). Hay autores que predicen que una población puede permanecer estable si se reproduce predominantemente por autocruce o por entrecruce (Lande y Schemske, 1985), aunque esto sólo se ha probado con algunas especies y no se puede tomar como una generalización (Barrett y Harder, 1996).

Es común en plantas que al crecer se fragmenten o se rompan los lazos que unen a todo el organismo (genet), produciendo así diferentes ramets o partes del genet (reproducción vegetativa), dejando finalmente una “familia” de unidades completamente independientes y desconectadas, donde el riesgo de mortalidad del genet por la estocasticidad ambiental disminuye, debido a que puede suceder que algunas unidades del organismo (ramets) mueran, pero otras sobrevivan y dejen descendencia, contribuyendo así al futuro de la población (Harper, 1985, Eriksson, 1993). Al reproducirse vegetativamente en la mayoría de los casos, las plantas producen parches de ramets con genotipos idénticos (clonación tipo falange) y por ende una disminución en la diversidad genética de la población, con lo que con el tiempo aumenta la probabilidad de que sucedan cruces geitonogámicas en o entre los ramets de un mismo genet y en el caso extremo cada parche pierda la capacidad de producir descendencia

por reproducción sexual (Harper, 1985; Snow et al., 1996; Charpentier, 2002; Honnay y Bossuyt, 2005). Con este tipo de reproducción puede suceder también que los ramets sean exportados a mayor distancia y así generar una distribución entremezclada de ramets de distintos genets (clonación tipo guerrilla) y evitar entonces la disminución de diversidad genética, las cruzas geitonogámicas y la depresión endogámica (Harper, 1985; Charpentier, 2002).

Como cruce geitonogámico nos referimos a cuando ocurre la polinización de flores con polen de otra flor de la misma planta, es un tipo de autocruza, pero ésta difícilmente es prevenida por la hercogamia o la dicogamia, como en el caso de la autocruza en una misma flor, además de que este tipo de cruce dependiendo de la distribución clonal, incrementa el costo reproductivo del genet conforme aumenta el número de flores presentes en sus ramets (Charlesworth y Charlesworth, 1987; de Jong et al., 1993; Harder y Barrett, 1995; de Jong et al., 1999). Este fenómeno normalmente obedece al comportamiento particular de los polinizadores de visitar parches grandes de flores agregadas y disminuir la energía que invierten en el forrajeo (Richards, 1997).

En plantas autocompatibles con sistemas de cruce mixtos, las cruzas geitonogámicas producen un fuerte efecto de depresión endogámica en las poblaciones, es decir, que producen un decremento en la generación de frutos y semillas viables, disminuyendo así la cantidad y calidad de la progenie, con efecto en cualquier etapa del ciclo de vida del organismo, incluso en la fecundidad de la próxima generación de vástagos (Waser y Price, 1989; Mandujano et al., 1996; Muirhead y Lande, 1997). Aunque una ventaja de la autocruza (cruzas geitonogámicas), es que a largo plazo, como efecto secundario, se puede reducir el impacto de la depresión endogámica, ya que en la medida de que se presentan más autocruzas en la

población, se eliminan con más facilidad los alelos deletéreos que causan tal depresión (Charlesworth y Charlesworth, 1987).

Es común en las especies del género *Opuntia* encontrar que la depresión endogámica es elevada, lo que está muy relacionado con que la mayoría de ellas son plantas autocompatibles, que tienen sistema de cruce mixto y sistema de apareamiento xenógamo facultativo (Grant et al., 1979; Grant y Grant, 1979; Del Castillo y González-Espinosa, 1988; McFarland et al., 1989; Mandujano et al., 1996; Plasencia, 2003).

La reproducción vegetativa y en especial la de tipo falange tiende a incrementar las cruces geitonogámicas (Carrillo, 2006; Clark, 2006), proceso que en sistemas xenógamos obligados tiene mayor riesgo de producir extinción de la reproducción sexual (Honnay y Bossuyt, 2005), esto es, una pérdida en la capacidad de producir descendencia vía sexual, debido a un prolongado crecimiento clonal y a la formación de parches monoclonales se imposibilita la entrecruza. La extinción de la reproducción sexual también puede suceder de forma más lenta en especies clonales autocompatibles que presenten algún ligero grado de auto incompatibilidad o depresión endogámica (Honnay y Bossuyt, 2005). Por ello, para estimar a detalle el efecto de este tipo de reproducción sobre el sistema de cruce se debe considerar la arquitectura clonal o la distribución de genotipos presentes en la población, ya que el impacto que las cruces geitonogámicas tengan sobre el éxito reproductivo depende de ello, es decir, que el tipo de cruce que los polinizadores realicen (autocruza o entrecruza) depende de qué tanto se desplacen en su forrajeo y de si existe una distribución agregada de ramets o una distribución intercalada de ramets de distintos genets, así como de cuáles de ellos estén floreciendo en un momento determinado (Charpentier, 2002; Carrillo, 2006; Fig. 1a,b).

El tamaño y arreglo espacial de las plantas y la cantidad de flores producidas por ellas, en algún momento determinado también es un factor importante para una reproducción exitosa.

Las plantas grandes con distribución de ramets agregados pueden ser menos eficientes para exportar polen, debido a que los polinizadores son atraídos por los grandes parches de flores agregadas que producen estos ramets y así se promueve la autocruza (Richards, 1997; Wilcock y Neiland, 2002).

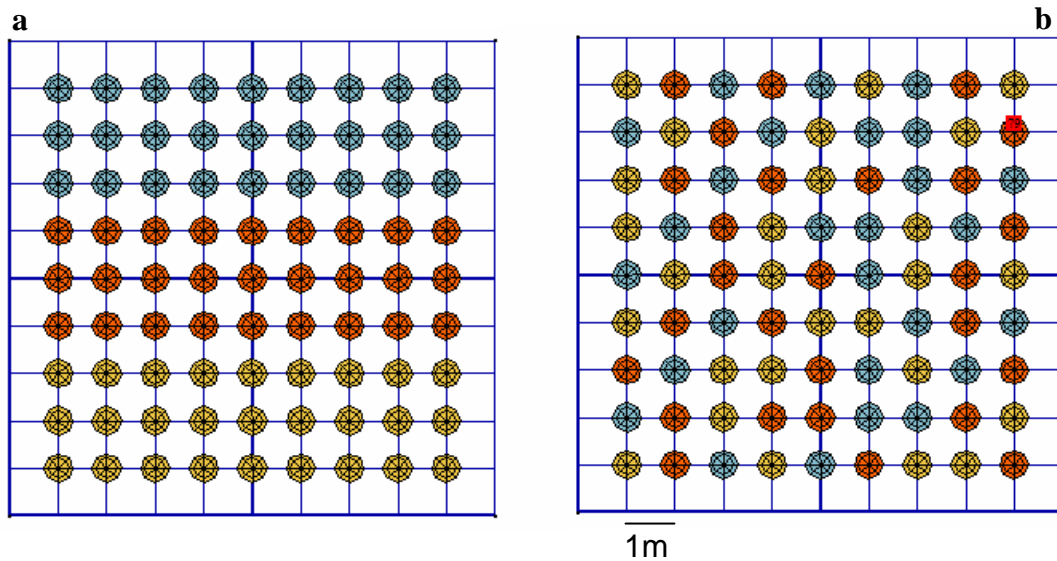


Fig. 1 a) Distribución agregada de ramets de 3 genets distintos. b) Distribución intercalada de ramets de 3 genets distintos. En ambos casos existe el mismo número de ramets por genet, pero las probabilidades de cruza geitonogámica con un polinizador que se desplaza unos pocos metros en sus visitas es mayor en la distribución mostrada en la Fig. 1a.

En estas plantas se incrementa el número de flores visitadas por ramet y entonces las últimas flores tienen cruza geitonogámicas, i.e., en el proceso hay una pérdida o “descuento” de polen, esta pérdida, como se puede apreciar es doble, ya que en cada cruza geitonogámica consecutiva que el polinizador hace en cada flor del mismo ramet, menos polen es exportado a otro genet (Zimmerman, 1988; De Jong et al., 1993; Harder y Barrett, 1995; Wilcock y Neiland, 2002). En las especies autocompatibles las autocruzas se incrementan por cruza geitonogámicas y la función femenina reduce sus pérdidas al asegurar la producción de semillas, pero decrece el éxito masculino reduciéndose la cantidad de polen disponible para exportar en la entrecruza con otros genets (Charpentier, 2002), además las plantas al

autocruzarse, en muchos casos producen mucho menos frutos y semillas vigorosas debido a el efecto de depresión endogámica (Mandujano et al., 1996; Plasencia, 2003). Entonces las flores pueden presentar tanto descuento de polen, como limitación por polen para la función femenina (carga de polen) o interferencia sexual. Esta última sucede cuando el polen de flores de la misma planta o ramet ocupa espacio en el estigma de sus propias flores e impide la entrada de polen de otro genet (i.e., interferencia; de Jong et al., 1993; Barrett, 2002).

Existen algunos mecanismos para evitar la geitonogamia, la pérdida de polen y la interferencia sexual, entre ellos está el extender el periodo de floración y producir pocas flores cada día para maximizar la entrecruza y la fertilidad masculina (Zimmerman, 1988; De Jong et al., 1993; Harder y Barrett, 1995). Otro mecanismo que es más complejo y que funciona incluso en las arquitecturas agregadas de genets, es la asincronía floral, donde se presentan floraciones asincrónicas de los diferentes ramets de un mismo genet (Charpentier, 2002).

Aparentemente la clonalidad genera un compromiso entre el crecimiento vegetativo y la reproducción sexual, i.e., si la planta clona en exceso y produce distribuciones de ramets agregados promueve la geitonogamia, entonces la población tiende hacia un sistema de autocruza (Snow et al., 1996). La clonalidad otorga la ventaja de que los genets se expanden, se mueven a otros ambientes, capturan más recursos, presentan menos mortalidad, desplazan a otros competidores y no invierten en funciones sexuales (Silvertown y Lovett-Doust, 1993). Contrariamente otorga desventajas como que no se generan nuevas combinaciones genéticas, no se incorporan nuevas mutaciones favorables en la meiosis y mitosis, no se eliminan mutaciones desfavorables, no se genera variación (Eguiarte et al., 1992) y a largo plazo se dificulta la entrecruza y se puede eliminar la capacidad de reproducirse sexualmente (Honnay y Bossuyt, 2005).

El arreglo espacial de los ramets es fundamental ya que dependiendo de éste y de los despliegues florales en momentos determinados puede existir o no una disyuntiva entre la expansión del genet y el sistema de cruce en la población (Charpentier, 2002; Carrillo, 2006). Estos arreglos pueden ser ventajosos o desventajosos. Si existen arreglos agregados de genets y se promueve la geitonogamia con depresión endogámica elevada, como puede ser el caso en las *Opuntia*, la producción de semillas en algún momento se reducirá, probablemente se purguen los alelos deletéreos y disminuya la depresión endogámica, mientras eso sucede casi no se generan nuevos hijos (genotipos), sólo crecerán y sobrevivirán los genotipos existentes y se mantendrán combinaciones genéticas exitosas hasta que las presiones de selección natural repentinamente cambien o hasta que por la longevidad que presentan acumulen mutaciones letales y se pierdan lentamente. Por otra parte, si existen arreglos intercalados de genets o se presentan floraciones asincrónicas dentro de los ramets y no se promueve la geitonogamia, se puede mantener un sistema de cruce eficiente, donde se realicen suficientes entrecruzas para mantener la diversidad genética y asegurar la producción de semillas vigorosas y con nuevo material genético para que en alguna oportunidad en el futuro ingresen a la población como nuevos individuos.

En general las *Opuntia* tienen características florales bien adaptadas para atraer polinizadores y procurar entrecruzas, de tal forma que cuando se autocruzan presentan depresión endogámica en alguna etapa de su desarrollo (Del Castillo y González-Espinosa, 1988; Mandujano et al., 1996; Plasencia, 2003). Los polinizadores más constantes y eficaces en las *Opuntia*, además considerados oligoléticos del género, son abejas de tamaño mediano de los géneros *Diadasia*, *Melissodes* y *Lithurge* (Grant et al., 1979; Grant y Grant 1979; Del Castillo y González Espinosa 1988; McFarland et al., 1989; Mandujano et al., 1996; Del Castillo 1999; Plasencia, 2003; Reyes-Agüero et al., 2006; Mandujano com. pers.). Los polinizadores

se desplazan aparentemente siguiendo un patrón de forrajeo eficiente (Jiménez, 2000), esto es dependiendo de la cantidad y distribución de las flores en un parche de plantas. En *Opuntia streptacantha* y *Opuntia leucotricha* la distancia que se desplaza *Diadasia* sp. varía desde <1m hasta >10m según el número de flores disponibles, aunque estas abejas tienen la capacidad de viajar distancias mayores de entre 50m y 200m (Linsley, 1958; García, 1984).

Todas las *Opuntia* son esencialmente clonales, debido a su constitución modular y a que cada módulo contiene areolas con tejido meristemático, i.e. con células totipotenciales, capaces de producir nuevos tallos y raíces (Anderson, 2001; Mandujano, 2007). En el caso de las especies del género *Opuntia*, son plantas que se fragmentan fácilmente, así que en general tienen una gran facilidad para propagarse clonalmente a cortas y largas distancias (Mandujano et al., 1996; Reyes-Agüero, 2006). Esto provoca en las especies de este grupo una mezcla en sus sistemas de cruce y apareamiento, lo que puede ocasionar una adecuación y un éxito diferencial a nivel individual y poblacional (Mandujano et al., 1996).

Una teoría que se basa en los efectos que la clonalidad y la similitud genética tienen sobre los sistemas de cruce y el éxito reproductivo, es la teoría de cruce óptima. Esta teoría sugiere una distancia de cruce óptima lo suficientemente lejana como para evitar las cruces geitonogámicas o con plantas muy emparentadas, evitando así el efecto de depresión endogámica; y lo suficientemente cercana como para evitar las cruces con individuos muy lejanos y genéticamente muy diferentes, evitando así el efecto de depresión exogámica (Fig. 2). La distancia de cruce óptima de una población está muy relacionada con la conducta de los polinizadores y la distribución de las flores (Waser y Price, 1989). Esta distancia de cruce óptima se ha estudiado mediante experimentos de suplementación de polen en poblaciones de varias especies, entre ellas están *Ipomopsis aggregata*, *Agave schottii*, *Delphinium nelsonii*, *Stenocereus eruca* y *Opuntia microdasys* (Waser y Price, 1983; Trame et al., 1985; Waser y

Price, 1991; Clark, 2006; Piña, 2007). En la mayoría de los casos sólo se localiza la distancia en que se produce la depresión endogámica y la distancia de cruce óptima, sin encontrar claramente la distancia donde sucede la depresión exogámica. Para evaluar esta distancia de cruce óptima es necesario conocer la similitud genética de las plantas que se cruzan a las diferentes distancias y para esto los investigadores se han ayudado de la ecología molecular.

La Ecología Molecular es una rama de la Ecología que emplea herramientas y datos moleculares para resolver problemas ecológicos como delimitar especies, delimitar poblaciones, conocer orígenes ontogenéticos, determinar identidades genéticas, estimar índices de diversidad, etc. (Eguiarte y Souza, 2007) y en muchos estudios algunos de los datos moleculares encontrados se analizan a la luz de la genética de poblaciones.

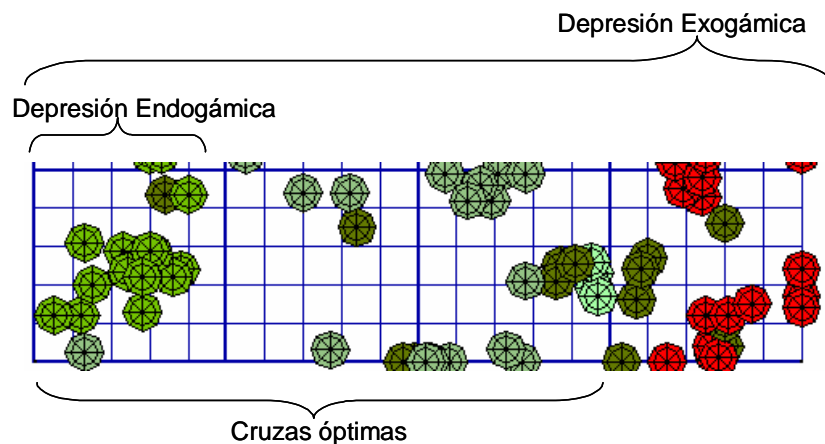


Fig. 2 Diagrama de distancia de cruce óptima. Los círculos representan plantas, cada color corresponde a un genotipo distinto. En la zona donde sucede depresión endogámica las plantas están muy emparentadas, si se presentan polinizaciones entre plantas a esa distancia no habrá descendencia viable. En la zona donde sucede depresión exogámica las plantas están muy alejadas y los genotipos son muy diferentes a las plantas del extremo izquierdo, si se presentan polinizaciones entre plantas que se encuentran separada a esta distancia no habrá descendencia viable. Si las polinizaciones se presentan entre plantas que se encuentran separadas entre si por distancias geográficas y genéticas moderadas (zona de cruce óptima) la descendencia tendrá mejor desempeño.

La Genética de Poblaciones es la disciplina que mediante datos moleculares nos ayuda a evaluar de manera cuantitativa los cambios en la composición genética de las poblaciones, así identifica procesos adaptativos y procesos evolutivos como migración, endogamia, mutación,

deriva génica, selección natural, etc. que ocurren en las poblaciones (Eguiarte y Souza, 2007).

La genética de poblaciones se basa en el cambio en la frecuencias alélicas (p y q) en las poblaciones y bajo el supuesto de las modificaciones a la ley de Hardy-Weinberg ($D=p^2$, $H=2pq$ y $R=q^2$; Hedrick, 2005) estima si ocurre alguno de los procesos adaptativos y evolutivos mencionados.

En la actualidad hay escasos trabajos relacionados con el efecto que la reproducción vegetativa tiene sobre el sistema de cruce y el éxito reproductivo en las plantas y en particular en poblaciones de cactáceas. En especial las especies del género *Opuntia* presentan sistemas clonales con ciclos de vida complejos (Mandujano et al., 2001) y sistemas de cruce mixtos (Del Castillo y González-Espinosa 1988; Mandujano, 1996; Plasencia, 2003), condiciones interesantes para poder abordar esta problemática.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GENERALES

- Determinar la diversidad clonal así como la distribución clonal de dos poblaciones de *Opuntia rastrera* Weber con diferente reclutamiento (sexual y clonal).
- Determinar la distancia de cruce óptima en condiciones de clonalidad, midiendo el efecto de la distancia geográfica y la similitud genética sobre el éxito reproductivo de *Opuntia rastrera* Weber.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la identidad genética de las plantas que se utilizarán para evaluar la diversidad y distribución clonal de los sitios con reclutamiento sexual y clonal, así como de aquellas plantas donadoras y receptoras de polen con las que se estimará la distancia de cruce óptima.
- Estimar la diversidad clonal en las 2 poblaciones con reclutamiento contrastante, mediante la estimación de: 1) La proporción de genotipos distinguibles. 2) La equitatividad genotípica y 3) El índice de diversidad de Simpson. Conjuntamente evaluar la heterocigosis y el porcentaje de loci polimórficos.
- Generar mapas con el patrón de distribución espacial de genets y ramets de plantas identificadas.
- Estimar la diversidad clonal y el patrón de distribución espacial de genets y ramets en la zona con reclutamiento clonal considerando antecedentes demográficos de los individuos muestreados.
- Estimar en condiciones de clonalidad y mediante cruces controladas, la distancia de cruce óptima donde el éxito reproductivo medido como la producción de frutos maduros y número de semillas por fruto sea mayor.
- Estimar el índice de similitud genética y distancia geográfica entre plantas progenitoras del experimento de cruces óptimas para determinar si existe una correlación con el éxito reproductivo de estas plantas.

3. HIPÓTESIS

3.1 DIVERSIDAD Y DISTRIBUCIÓN CLONAL

- 3.1.1 Debido a las diferencias reportadas por Mandujano et al., 2001 en cuanto al reclutamiento sexual y clonal en diferentes poblaciones de *O. rastrera*, se esperan diferencias en los índices de diversidad. En la nopalera donde el reclutamiento en su mayoría es por fragmentación de plantas adultas (clonal), se espera menor diversidad clonal, con un índice de proporción de genotipos distinguibles (G/N) cercano a cero (muchos individuos y pocos genotipos; muchos clones), una equitatividad genotípica (E) tendiente a cero (existen unos genotipos mas representados; varios individuos con el mismo genotipo), una diversidad de Simpson cercana a cero (diversidad baja), y una heterocigosis y porcentaje de loci polimórficos bajos. En el pastizal (sexual) donde el reclutamiento en su mayoría es por vía sexual, se espera un índice G/N de uno (cada individuo con un genotipo distinto), una equitatividad genotípica cercana a 1 (todos los genotipos están igualmente representados; un individuo por genotipo), una diversidad de Simpson cercana a 1 en el pastizal (diversidad alta), y una heterocigosis y porcentaje de loci polimórficos elevados.
- 3.1.2 Debido al carácter clonal de la especie en la nopalera, esperamos encontrar ahí un patrón de distribución de ramets en forma de parches agregados. En el pastizal esperamos encontrar todos los genets representados por un sólo ramet.
- 3.1.3 Considerando los antecedentes demográficos de la zona clonal, esperamos que la diversidad clonal y la distribución de ramets sea similar a lo esperado en el punto 3.1.1, es decir, se espera una alta diversidad clonal, con un índice de proporción de genotipos distinguibles (G/N) cercano a cero, una equitatividad genotípica (E) tendiente también a cero, una diversidad de Simpson cercana a cero, y una heterocigosis y porcentaje de loci polimórficos bajos.

3.2 DISTANCIA DE CRUZAS ÓPTIMAS

- 3.2.1 Suponiendo que en la nopalera (condiciones de clonalidad) los ramets de un genet se encuentran distribuidos en parches agregados, esperamos que el éxito reproductivo aumente en medida de que aumente la distancia geográfica entre plantas progenitoras.
- 3.2.2 De la misma forma esperamos que la similitud genética disminuya conforme aumenta la distancia geográfica entre las mismas plantas progenitoras. La similitud genética entre plantas cercanas debe afectar el éxito reproductivo de plantas receptoras de polen. Esto se explicaría por un efecto de depresión endogámica resultado de cruzas geitonogámicas.

4. MATERIALES Y MÉTODO

El presente trabajo se realizó en dos ambientes distintos, nopalera y pastizal, sitios donde *Opuntia rastrera* Weber presentan diferentes estrategias de historia de vida (Mandujano, 1995). En la zona de la nopalera la mayor contribución a la tasa finita de crecimiento poblacional (λ) es la propagación vegetativa, hay mayor reclutamiento de cladodios que se desprenden (“nuevos individuos”), mientras que en el pastizal es la reproducción sexual, sólo hay reclutamiento de semillas, no hay propagación vegetativa (Mandujano et al., 2001). A largo plazo las plántulas de *O. rastrera* generadas por reproducción sexual sobreviven más en el pastizal que en la nopalera, esto es debido a que en el pastizal las plantas nodriza (principalmente *Hilaria mutica*) que se asocian con *O. rastrera* tienen mayor cobertura, proporcionan más sombra y protegen más a las plántulas de la herbivoría que en la nopalera, donde la principal nodriza es *Jatropha dioica*. En cambio las pencas que se desprenden de plantas adultas sobreviven en mayor porcentaje en la nopalera, esto es porque en la nopalera no existe la gran competencia por recursos y las inundaciones que experimentan las pencas en el pastizal (Mandujano et al., 1998).

ESPECIE Y ÁREA DE ESTUDIO

Descripción de la especie

Opuntia rastrera Weber es una cactácea clonal que pertenece a la Tribu *Opuntieae*, Subfamilia *Opuntioideae*, familia *Cactaceae* (Bravo-Hollis, 1978; Anderson, 2001). Son plantas con artículos desde circulares hasta obovados, los más grandes de unos 20 cm de diámetro. Forma cadenas de cladodios rastreros que se mueven en varias direcciones y no presenta lignificación de sus tejidos, tienen espinas blancas con base oscura, sus flores son amarillas de 4 a 6 cm de diámetro y sus frutos son carnosos de color púrpura con una gran cantidad de semillas (Fig. 3a,

b, c; Bravo-Hollis, 1978; Cornet, 1985). Estas plantas se fragmentan y por la gran cantidad de areolas (meristemos) que tienen en el tallo, enraízan con facilidad.

Distribución de la especie

O. rastrera se distribuye en el desierto Chihuahuense en los estados de Durango, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Zacatecas y San Luis Potosí (Bravo-Hollis, 1978; Cornet, 1985; Guzmán et al., 2003). Actualmente las poblaciones de los Estados de San Luis Potosí y Zacatecas se encuentran deterioradas y muy reducidas (Muños, 2004; com. pers. Jerónimo Reyes), por el contrario las poblaciones más norteñas en la Reserva de la Biosfera de Mapimí se encuentran en un estado más conservado (L. Plasencia obs. pers.).

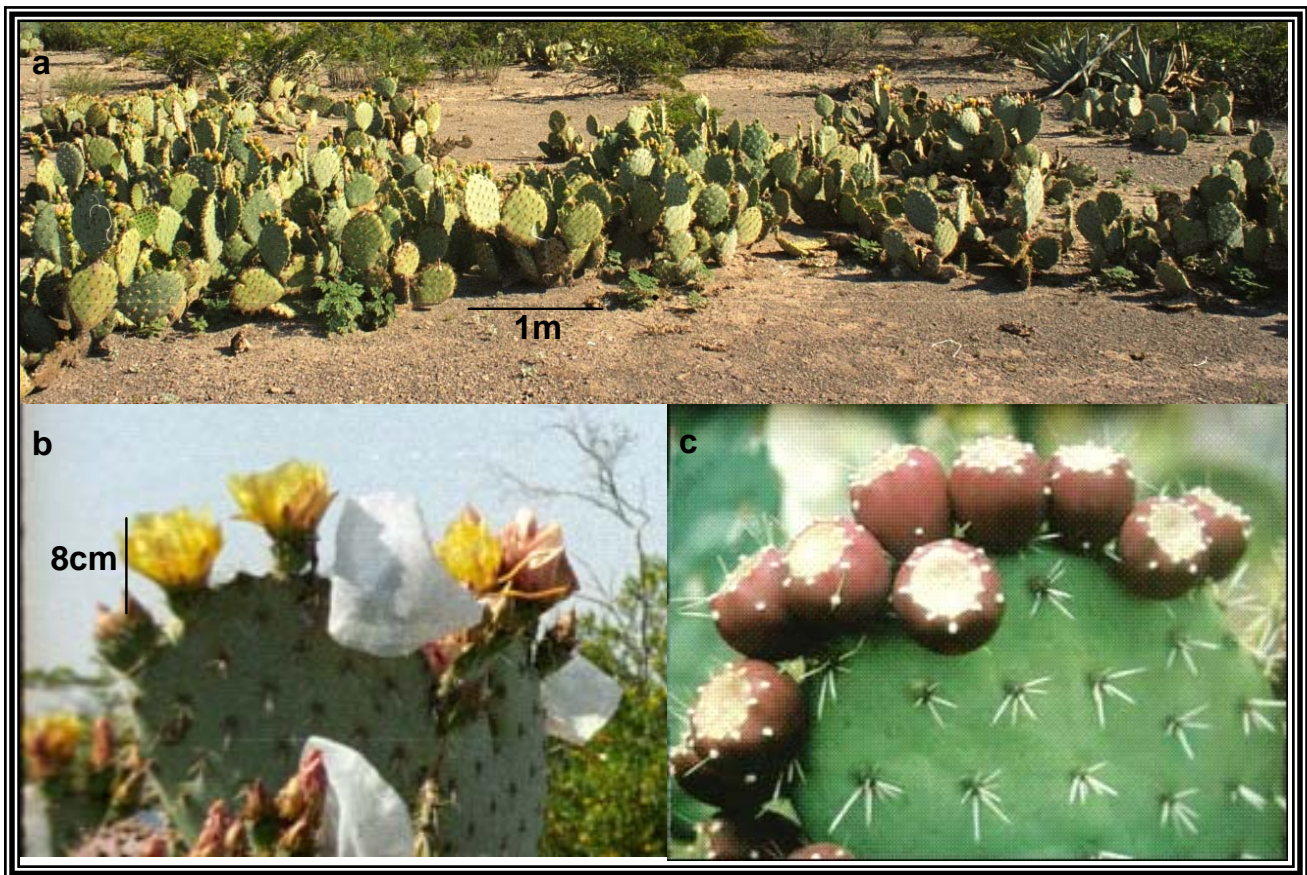


Fig. 3 a) *Opuntia rastrera* Weber en la reserva de la biosfera del bolsón de Mapimí, planta postrada de hábito rastrero; b) Flores de color amarillo naranja con 8 cm de altura y 6 cm de apertura en la corola y c) Frutos carnosos de color llamativo (Fotos a y b tomada por L. Plasencia y foto c tomada por M. C. Mandujano).

La Reserva de la Biosfera de Mapimí está ubicada entre los paralelos 26°29' y 26°52' latitud norte y los meridianos 103°32' y 103°58' longitud oeste, incluye porciones de los estados de Durango, Coahuila y Chihuahua (Google Earth, 2007; Fig. 4a). Dentro de la Reserva *O. rastrera* habita predominantemente en la geoforma de bajada superior, donde forma extensas nopaleras en la formación vegetal denominada como matorral crasicaule. También se encuentra de una manera mas dispersa en la bajada inferior, en la formación vegetal de pastizal donde domina la especie *Hilaria mutica* (Cornet, 1985; Montaña, 1988). El sitio donde se llevó a cabo este estudio se localiza en las coordenadas 26°40' N, 103°45 O, en la bajada oeste del cerro San Ignacio, a una elevación de 1165 msm (Fig. 4b) y comprende tanto el área de nopalera como el área de pastizal. En el sitio de estudio *O. rastrera* comparte el hábitat con *Larrea tridentata* (DC.) Cov, *Castela texana* (T. et G) Rose, *Prosopis glandulosa* Torr. var. *torreyana* (L. Benson) M. C. Johns., *Fouquieria splendens* Engelm., *Euphorbia antisyphilitica* Zucc., *Jatropha dioica* Cerv., *Cylindropuntia imbricata* (Harworth), *Cylindropuntia leptocaulis* (DC.) Watson, *Opuntia microdasys* (Lehmann) Pfeiffer, *Opuntia macrocentra* (Engelmann), además de una gran variedad de pastos y herbáceas (Cornet, 1985; Ruíz de Esperanza, 1988; Guzmán et al., 2003).

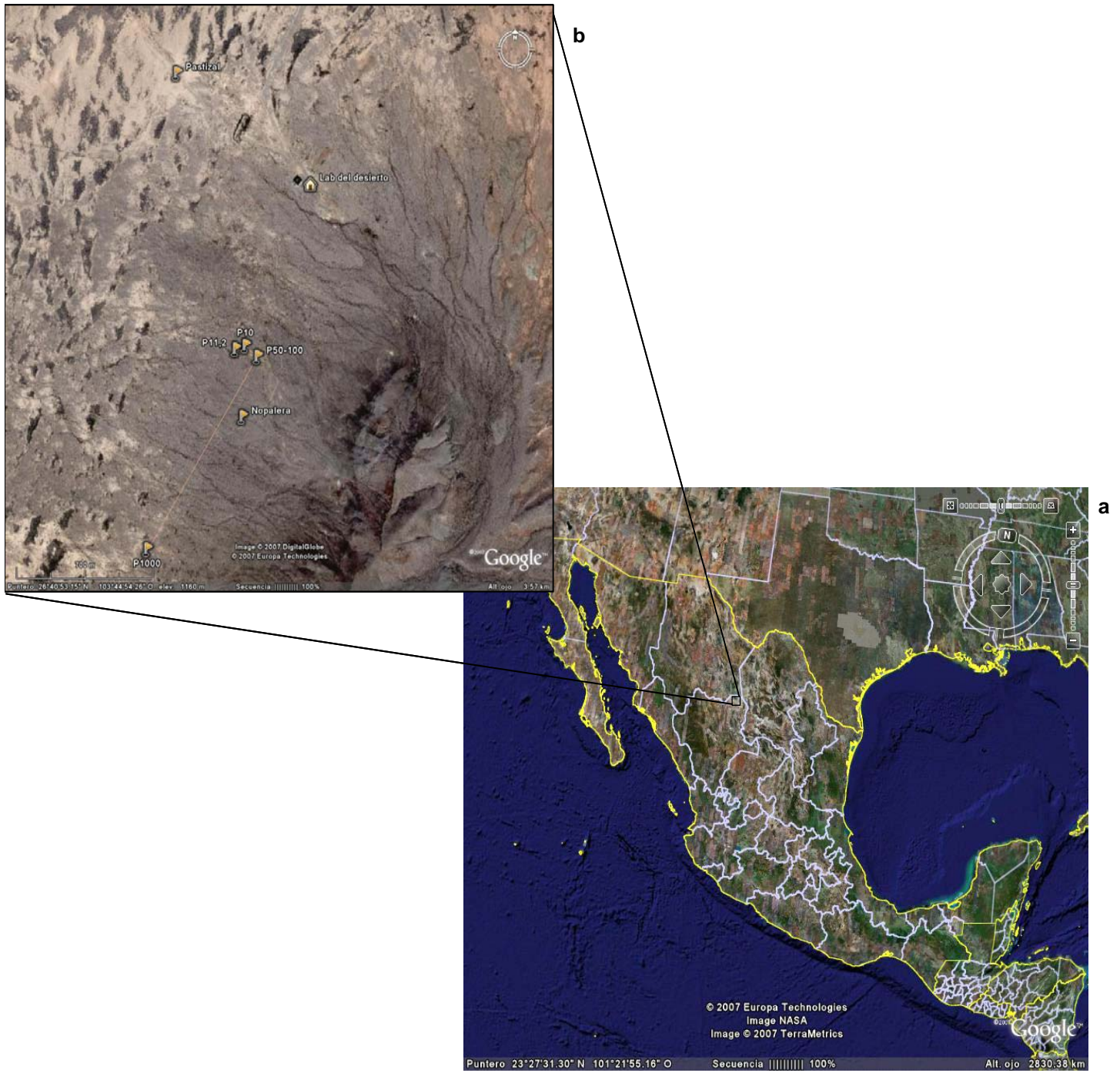


Fig.4 a) Ubicación de la reserva de la Biosfera de Mapimí en el país, b) Sitio de estudio, se muestra la ubicación de las poblaciones de la nopalera en la ladera Oeste del cerro San Ignacio y del pastizal a 800 m al Este del laboratorio de desierto (Imagen digital de Google Earth, 2007).

4.1 DIVERSIDAD Y DISTRIBUCIÓN CLONAL

4.1.1 DETERMINACIÓN DE IDENTIDADES GENÉTICAS

Para determinar la identidad genética de las plantas que se utilizaron para evaluar la diversidad y distribución clonal de los sitios con reclutamiento sexual y clonal, así como de aquellas plantas donadoras y receptoras de polen con las que se estimó la distancia de cruce óptima, se montaron las siguientes técnicas moleculares.

Extracción de ADN en *Opuntia rastrera*

Se recolectó el tejido (aprox. 4 cm²) de un cladodio (i.e., tallos en forma de raqueta) joven de todos los individuos en ambas poblaciones y se enfrió a -196° C en un tanque con nitrógeno líquido. El tejido posteriormente se almacenó a -20° C.

La extracción de ADN se realizó con el método modificado de extracción del kit comercial AquaPure Genomic DNA, protocolo 3.2, Bio-Rad (Apéndice 1). Se probaron 4 métodos de extracción de ADN : 1) Kit QUIAGEN; 2) Kit Bio-Rad; 3) Kit Fast-Prep; y 4) El método CTAB++, que es una combinación de los métodos de Mini-prep y CTAB estandarizados para Agaves y Cactus en el Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología, UNAM. Finalmente se optó por el protocolo de Bio-Rad, ya que las *Opuntia* contienen grandes cantidades de compuestos secundarios y mucílagos ricos en polisacáridos hidrofílicos. Este método resulta eficiente generando una mayor concentración final de ADN (>20 ng/μl) y con menos mucílago. El mucílago está reportado como abundante en células mucilaginosas alrededor de los haces vasculares y en células vesiculares del parénquima (Bravo-Hollis, 1978; Sudzuki 1995; Zlotnik 2001), de tal manera que la mayor cantidad de ADN limpio se extrajo del tejido de la epidermis y del clorénquima.

Amplificación y visualización de ISSR's

Los primers para amplificar secuencias simples repetidas dentro de los intrones de los microsatélites (ISSR's) son diseñados sin la necesidad de conocer una secuencia genómica específica, son hipervariables, muy repetibles y producen gran cantidad de información (Zietkiewicz et al., 1994; Nagaoka y Ogihara, 1997; Bornet y Branchard, 2001). Los ISSR's se utilizan para estudiar la variación genética intra e interespecifica, la taxonomía molecular, el mapeo genómico, para detectar híbridos entre especies, así como para visualizar mutaciones somáticas, además tienen potencial en la genética de poblaciones (Zietkiewicz et al., 1994; Manttoni et al., 2002). Los ISSR's están constituidos de di, tri, tetra y penta nucleótidos repetidos (Nagaoka y Ogihara, 1997). Para el trigo se ha reportado que las repeticiones de di-nucleótidos producen más bandas polimórficas que otros arreglos (Nagaoka y Ogihara, 1997). Estos primers están diseñados para amplificar segmentos del genoma flanqueados por dos elementos de igual secuencia repetida en orientación inversa en el microsatélite (Fig. 5; Zietkiewicz et al., 1994). Al igual que los "Random amplified polymorphic DNA" (RAPD's) los ISSR's son baratos de construir, son menos laboriosos de trabajar que los "Amplified fragment length polymorphism" (AFLPs) e igualmente reproducibles que los microsatélites (Zietkiewicz et al., 1994; Bornet y Branchard, 2001).

Particularmente los primers utilizados en este estudio y en otros realizados con especies de *Nothofagus* y de *Triticum* (Nagaoka y Ogihara, 1997; Manttoni et al., 2002) fueron diseñados por la unidad de servicio de proteínas y ácidos nucleicos (NAPS Unit) del laboratorio del Dr. Michael Smith, en la Universidad de Columbia Británica en Vancouver, Canadá. Por lo general la temperatura de alineamiento reportada para estos primers es de 52°C aunque puede variar, las concentraciones finales del MgCl₂ y del primer varían según la optimización de los mismos con cada especie.

Tabla 1. Primers probados de la serie # 9 de primers de la UBC en *O. rastrera*, se muestra los primers que se encontraron con polimorfismo y los que no funcionaron para esta especie.

Primer #	Amplificación
808	Monomórfico
809	No
810	No
811	No
817	Polimórfico
827	Polimórfico
840	No
841	Monomórfico
842	Polimórfico
847	No
850	No
851	No
856	No
857	No
857	No
858	No

Tabla 2. Concentración y cantidad de reactivos utilizados por reacción para la amplificación de ISSR's.

Reactivo y concentración inicial	Concentración final	Cantidad por reacción (µl)
Buffer (10X)	1X	1.5
MgCl ₂ (30mM)	Ver tabla 4	ver Tabla 4
dNTPmix (10mM)	0.2Mm	0.3
Primer (10µM)	Ver tabla 3	ver Tabla 4
DNA (15ng/µl)	2.7 ng/µl	2.0
Taq (Amplificasa-BIOGENICA, 5U/µl)	1 U/µl	0.2
H ₂ O (destilada)	0	Variable
Volumen total por reacción		15

Tabla 3. Primers de utilizados de ISSR's del set # 9 producidos por la Universidad de Columbia Británica en Vancouver, Canadá.

Nombre	Secuencia	[] final MgCl ₂	[] final primers	Temp. Alineación
817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	2.5mM	0.8µM	50°C
827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	2.5mM	0.6µM	52°C
842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	2mM	0.8µM	54 a 56°C

Y = C, T

Tabla 4. Programa de amplificación para el PCR.

Programa del PCR	Temperatura	Tiempo
1. Desnaturalización inicial	94°C	4min
2. Desnaturalización	94°C	30sec
3. Alineación	52°C	45sec
4. Extensión	72°C	2min
5. Ir al paso 2 por 36 veces		
6. Extensión final	72°C	7min
7. Término	4°C	10min

Las bandas amplificadas mediante la reacción de PCR fueron desde 200 hasta 1500 pb (Fig. 6) y en varias ocasiones fue necesario diluir la concentración de ADN lo más posible (<10ng/µl) para que éstas se amplificaran. Las bandas fueron separadas en geles de agarosa al 1.4%, mediante una diferencia de voltaje de 120 Volts durante 4h y 30min Los geles incluían un par de escaleras de 100pb marca Invitrogen para estimar claramente el peso de las bandas de cada individuo. Las bandas de ADN separadas fueron teñidas con bromuro de etidio al 10% y se visualizaron con una cámara de luz UV. Finalmente se capturó una foto digital de cada gel. En cada foto se asignó el peso molecular de cada una de las bandas de los individuos presentes, se tomaron como referencia las escaleras de 100pb y se colocaron manualmente con la ayuda del programa comercial VisionWorks y Doc-itLs de la compañía UVP, los pesos moleculares de cada una de las banda para todos los individuos (Fig.6). Con los pesos se construyeron matrices

de pesos moleculares, donde las filas eran cada sitio (Loci) y las columnas los diferentes individuos (programa VisionWorks y Doc-itLs). Por último se transformaron las matrices de pesos moleculares en matrices de presencia ausencia, asignando el valor de 1 para presencia de banda en ese sitio (Loci) y 0 para la ausencia de banda (Las matrices que arroja este programa necesitan transponerse para hacer algunos de los análisis de diversidad clonal, sección 4.1.2).

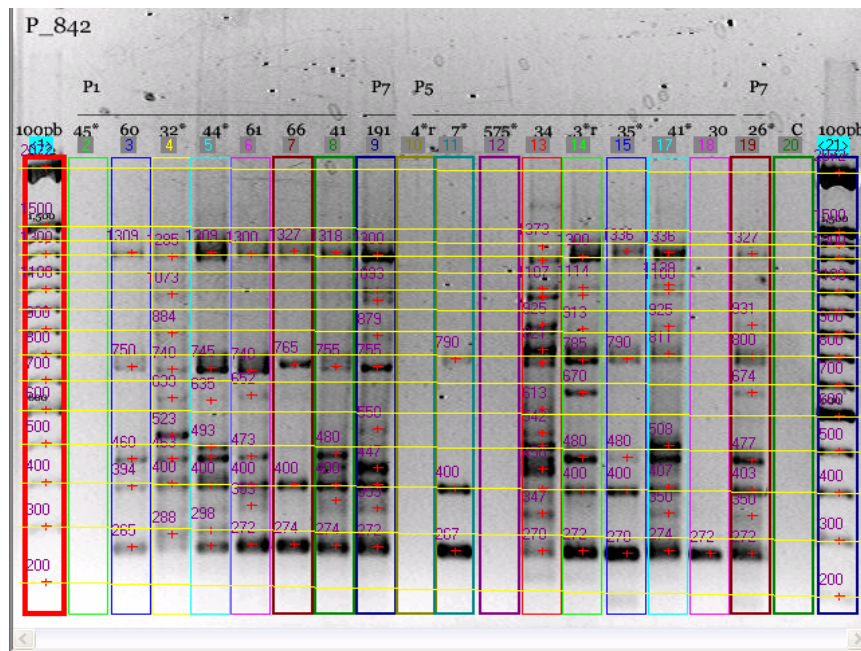


Fig. 6 Foto de el patrón de bandeo en individuos del pastizal, las muestras se encuentran en el gel de agarosa 1.4%, en el primer y último carril está cargada la escalera de 100pb y los individuos presentan bandas desde 270 hasta 1370pb. Se muestra una de las lecturas de pesos de bandas con el programa Vision Works.

4.1.2 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD CLONAL

La diversidad y distribución clonal de *O. rastrera* en la nopalera y en el pastizal se estimó usando una muestra de 80 individuos seleccionados aleatoriamente, 40 en cada una de las poblaciones. Los individuos de la nopalera se encuentran localizados en 4 parcelas permanentes de 20X20 m y los individuos del pastizal se localizan en 5 parcelas de 20X50 m. Se determinó la identidad genética de estos 80 individuos (ver sección 5.1.1.), y se generó una matriz de presencia ausencia para cada loci de todos los individuos. A partir de estas matrices se estimó la

diversidad clonal en ambas poblaciones (con reclutamiento clonal y sexual) mediante el cálculo de 3 parámetros: 1) La proporción de genotipos distinguibles (Ellstrand y Roose, 1987) calculada como:

$$G/N$$

donde G es el número de genotipos distintos y N es el número de individuos muestreados (ramets). El valor de G/N es de 1 cuando el número de genotipos es igual al número de individuos muestreados y se aproxima a 0 cuando todos los individuos comparten el mismo genotipo. Para este análisis se utilizó el programa GenoType/GenoDive versión 1.1. 2) El complemento del índice de Diversidad de Simpson (Clark, 2006; Carrillo, 2006), el cual se calcula como:

$$D = 1 - \sum \{ [r_i (r_i - 1)] / [R (R - 1)] \}$$

donde r_i es el número de ramets del genotipo i y R es el número de ramets muestreados. Este índice adquiere valores de 0 y 1, siendo 1 el valor máximo de diversidad. 3) La equitatividad genotípica (Fager, 1972) calculada como:

$$E = (D_{\text{obs}} - D_{\text{min}}) / (D_{\text{max}} - D_{\text{min}})$$

donde $D_{\text{obs}} = \text{Diversidad de Simpson observada}$, $D_{\text{min}} = \{(G-1)(2N-G)\}/\{(N)(N-1)\}$, $D_{\text{max}} = \{(G-1)(N)\}/\{(G)(N-1)\}$. Aquí G es el número de clones y N es el tamaño de la muestra. Este índice adquiere valores entre 0 y 1, con 0 para poblaciones dominadas por un sólo genotipo y 1 para poblaciones en las que el número de genotipos es igual al número de individuos muestreados.

Con la ayuda del paquete GenAlEx de Excel se estimó la heterocigosis y el porcentaje de loci polimórficos. En el caso de los ISSR's, que son marcadores dominantes, la heterocigosis se estima calculando la frecuencia genotípica (D), $D = q^2$, donde $q^2 = R$ está representada por la

proporción de bandas ausentes para cada loci, a partir de la raíz cuadrada de q se estima la frecuencia alélica de p que es $p = 1-q$, y finalmente se estima la heterocigosis $H=2pq$, es importante tener en cuenta que esta estimación de H implica que las poblaciones se encuentren en equilibrio de Hardy-Weingber (Hedrick, 2005), supuesto que es difícil cumplir en poblaciones clonales. El porcentaje de loci polimórficos se estimó con el mismo paquete de Excel y se calcula contando cuántos del total de loci presentes son polimórficos y cuántos son monomórficos.

4.1.3 PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE RAMETS

Para generar los mapas de distribución espacial se tomaron las coordenadas (x, y) de todas las plantas presentes en cada parcela de ambas poblaciones (4 en la nopalera y 5 en el pastizal), después con ayuda del programa TreeDraw versión 1.2. se generaron los mapas de cada parcela. Donde en una cuadrícula que representa el área total de cada parcela se ubican en círculos las plantas presentes en cada sitio. Los círculos pueden tener diferentes colores que representen por ejemplo distintos genets, de tal forma que, conociendo la identidad genética de cada individuo se marcaron los ramets correspondientes a cada genet (cada círculo) con un color diferente correspondientes a su color de genet. En los casos donde todos los individuos identificados fueron de diferente genotipo se utilizó un solo color, los detalles se especifican de manera particular para cada caso en su respectiva sección.

4.1.4. ANÁLISIS DE DIVERSIDAD CLONAL Y PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE RAMETS ESTIMADOS DEMOGRÁFICAMENTE

En el presente trabajo se exploró la diversidad y distribución clonal de la cactácea *Opuntia rastrera* en la nopalera, sitio que por sus antecedentes demográficos consideramos altamente

clonal (Mandujano et al., 2001). Fue importante considerar los ramets identificados demográficamente (reconocidos a lo largo de los últimos 15 años; Mandujano et al., 1995), pertenecientes a los 40 individuos que se eligieron en nuestro muestreo aleatorio (ver sección 5.1.2), de tal forma que pudimos evaluar a una escala espacial de dispersión clonal más reducida la diversidad y distribución clonal.

Las estimaciones realizadas en la sección 5.1.2 y 5.1.3 en la muestra de 40 individuos seleccionados al azar de la nopalera, se realizaron también en 24 ramets extras identificados demográficamente. Para los análisis mencionados en la nopalera se incremento la muestra inicial (sección 5.1.2) a 64 individuos.

4.2 DISTANCIA DE CRUZAS ÓPTIMAS

4.2.1 CRUZAS CONTROLADAS

En el sitio de nopalera donde existe reproducción vegetativa y donde pensamos puede haber un efecto de depresión endogámica por cruzas geitonogámicas se evaluó la distancia de cruza óptima. Para determinar cuál es la distancia de cruza óptima y el efecto que tiene la geitonogamia sobre el éxito reproductivo de *O. rastrera*, se realizó un experimento de cruzas a distancia con suplementación de polen. El experimento fue realizado en el mes de abril de 2004 cuando la población presenta su pico máximo de floración (Mandujano et al., 1996). Se seleccionaron al azar 40 individuos reproductivos focales (receptores de polen) repartidos en 3 bloques que corresponden a 3 parcelas (para evaluar un posible efecto del sitio) y en 7 bloques que corresponden a categorías de tamaño de planta (para evaluar un posible efecto materno). Se polinizaron manualmente tres flores de cada una de las 40 plantas focales con polen de plantas localizadas a tres distancias (<10m, >50m, >1000 m). El tratamiento control consiste en flores

sin embolsar que son polinizadas de manera natural por sus polinizadores. Cada uno de los 40 individuos focales recibió polen de tres distancias y el tratamiento control, es decir que se completaron 40 flores por tratamiento. El polen recolectado se obtuvo de 11, 3 y 1 plantas donadoras respectivamente a las tres distancias anteriores (Fig. 7 a-d). El polen propio de cada flor se excluyó mediante un corte en la base de los estambres (emasculación) y la adición de alcohol al 70% a las anteras, esto se realizó sólo con las flores que recibieron tratamiento de suplementación de polen a las tres diferentes distancias.



Fig. 7a Mapa del sitio donde se ubican las parcelas utilizadas para el experimento de cruzas óptimas con suplementación de polen para la especie *Opuntia rastrera*. Las banderas corresponden a las diferentes distancias a las que se realizaron las cruzas controladas. P11, P2 y P10 corresponden a las parcelas donde se realizaron las cruzas para el tratamiento de <10m. La bandera de P50-100 corresponde al sitio en donde se encuentran las plantas para el tratamiento >50m. La bandera P1000 corresponde al sitio donde se ubican las plantas con las que se realizaron las cruzas de >1000m. Al Este de los puntos se encuentra el camino que lleva al Laboratorio de Desierto del Instituto de Ecología A. C. y el cerro San Ignacio.

Parcela 11

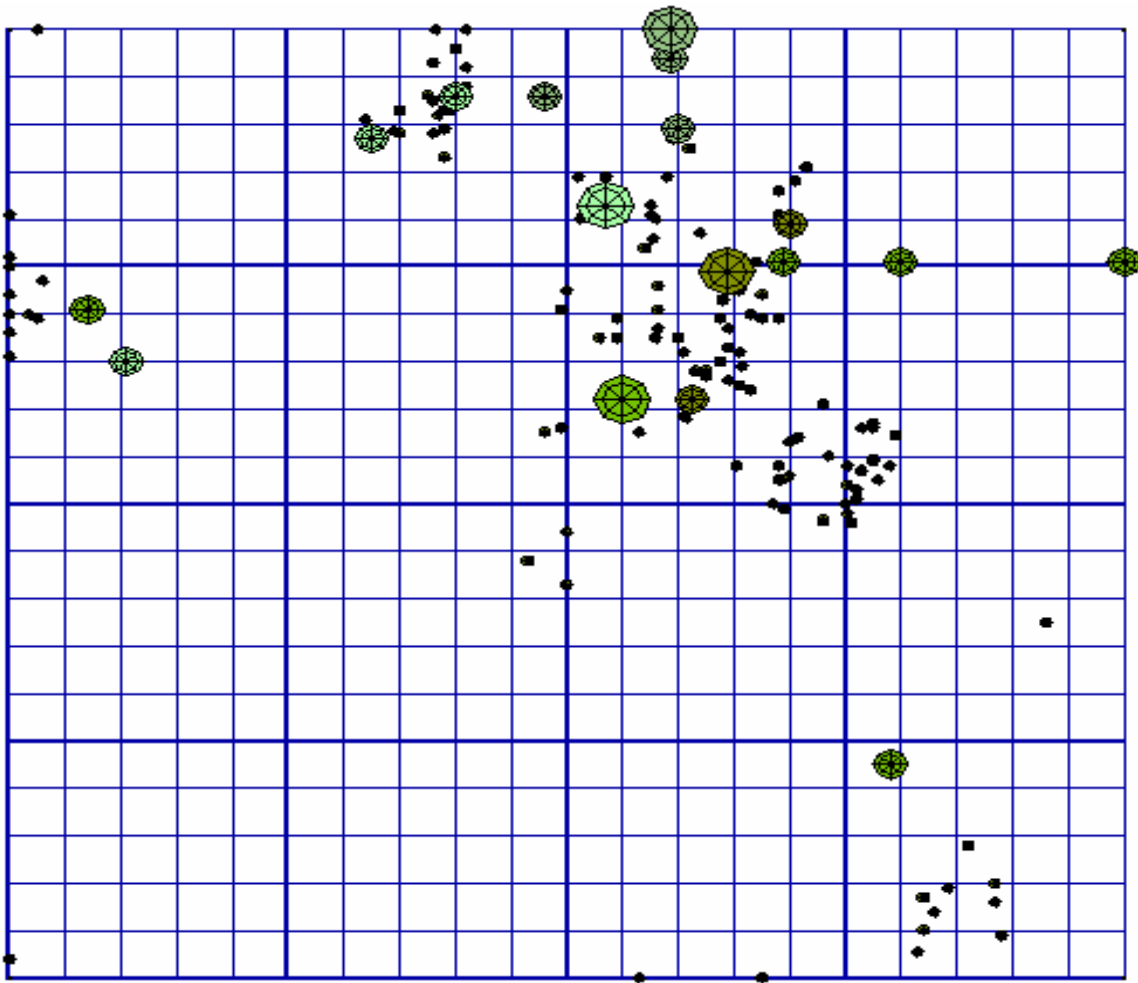


Fig. 7b Se muestra la distribución de plantas donadoras y receptoras de polen utilizadas en el experimento de suplementación de polen a la distancia de >10m. Los puntos de colores son plantas receptoras agrupadas en su bloque (Parcela 11; $n = 17$ plantas focales receptoras de polen) correspondiente. Se muestran con detalle la parcela 11, donde se localizan en círculos de mayor diámetro los individuos donadores, estos puntos están correlacionados con las plantas receptoras de polen por el color que comparten entre círculos y también reciben polen de otra de las mismas plantas de color.

Parcela 2

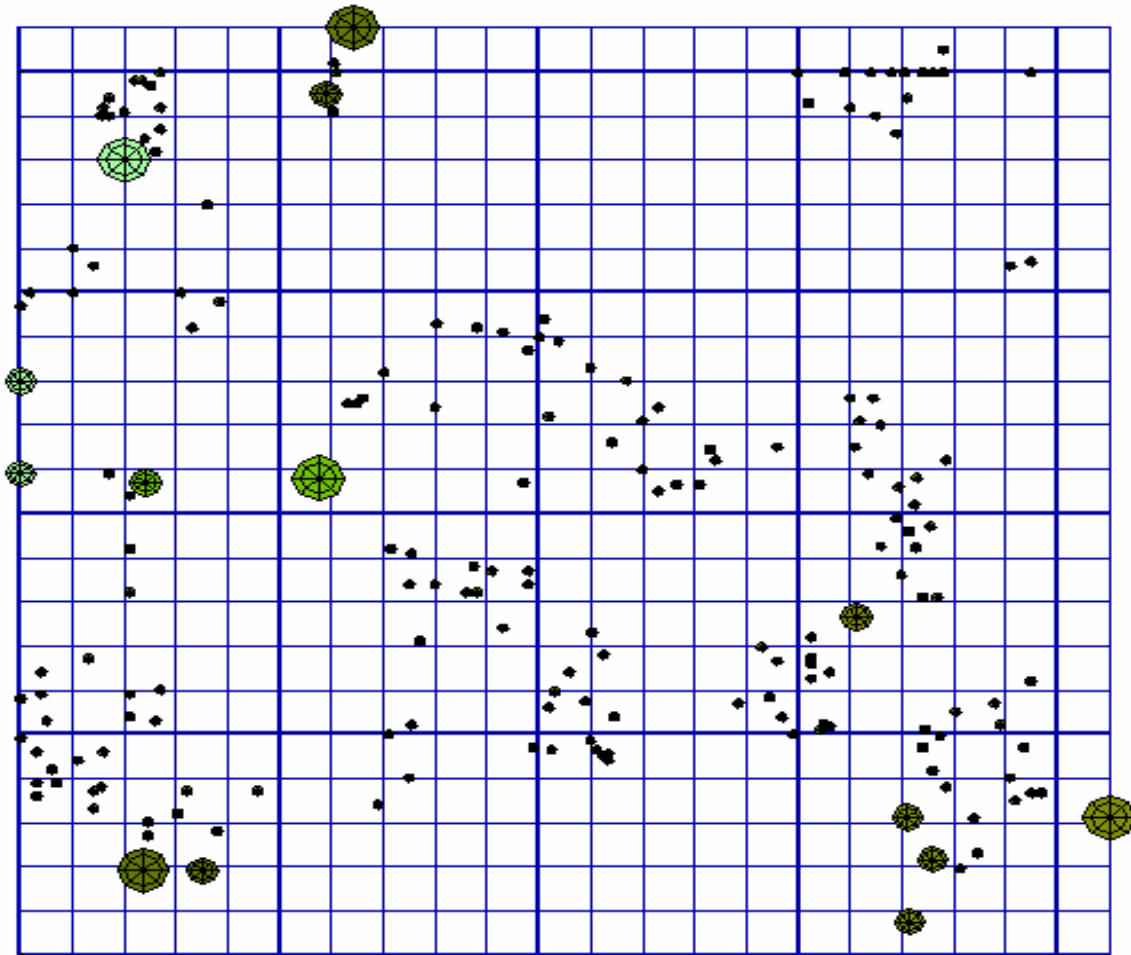


Fig. 7c Se muestra la distribución de plantas donadoras y receptoras de polen utilizadas en el experimento de suplementación de polen a la distancia de >10m. Los puntos de colores son plantas receptoras agrupadas en su bloque (Parcela 2; n = 11 plantas focales receptoras de polen) correspondiente. Se muestran con detalle la parcela 2, donde se localizan en círculos de mayor diámetro los individuos donadores, estos puntos están correlacionados con las plantas receptoras de polen por el color que comparten entre círculos y también una de las plantas donadoras fue utilizada como receptora de polen de otra de las mismas plantas de color.

Parcela 10

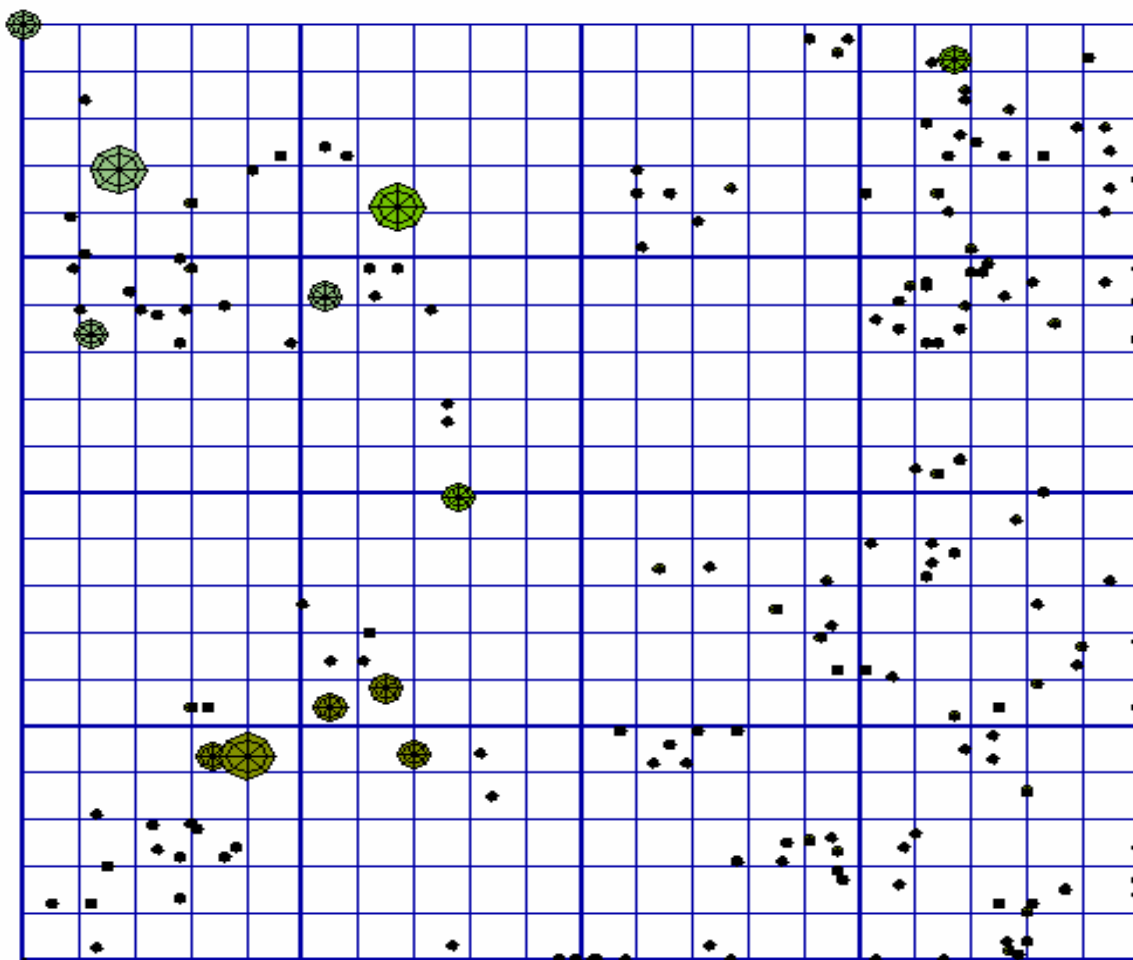


Fig. 7d Se muestra la distribución de plantas donadoras y receptoras de polen utilizadas en el experimento de suplementación de polen a la distancia de $>10\text{m}$. Los puntos de colores son plantas receptoras agrupadas en su bloque (Parcela 10; $n = 12$ plantas focales receptoras de polen) correspondiente. Se muestran con detalle la parcela 10, donde se localizan en círculos de mayor diámetro los individuos donadores, estos puntos están correlacionados con las plantas receptoras de polen por el color que comparten entre círculos y también reciben polen de otra de las mismas plantas de color.

Para controlar la procedencia del polen utilizado, todas las flores de este experimento se embolsaron antes de la antesis y fueron emasculadas antes de aplicar los tratamientos (Fig. 8 y 9). Las flores después de haber sido polinizadas se embolsaron, se rociaron con insecticida *Raid Casa y Jardín* (Tetrametrina 3.5g/kg, Permetrina 1g/kg, Aletrina 1g/kg, emulsificante, solventes, perfume y propelente 994.5g/kg; para evitar pérdidas por parásitos) y se sujetaron a la planta para asegurar que los frutos permanecieran hasta su maduración. Los frutos formados se recolectaron a principios del mes de julio del 2004 para el conteo y almacenamiento de semillas.



Fig. 8 Flores embolsadas antes de la aplicación de tratamientos.



Fig. 9 Flor emasculada antes de la aplicación de los tratamientos.

4.2.2 ÍNDICE DE SIMILITUD GENÉTICA Y DISTANCIAS GEOGRÁFICAS

Para estimar el índice de similitud genética de Nei y Li (1979) se utilizó la matriz de presencia-ausencia obtenida en la sección 5.1.1. Con la ayuda del paquete Matlab se calculó el índice de similitud genética, calculado como: $2m_{xy}/(m_x+m_y)$, donde m_{xy} es el número total de bandas compartidas entre pares de individuos, m_x y m_y son el número total de bandas presentes en una muestra. Finalmente se construyó una matriz de similitud genética entre pares de progenitores. Mediante este índice podemos conocer el grado de parentesco entre los individuos donadores y los receptores (Nei y Li, 1979; Clark, 2006).

La distancia que separaba a cada una de las plantas donadoras y las receptoras de polen se calculó utilizando la fórmula de distancia Euclídeana = $\sqrt{[(x_1-x_2)^2+(y_1-y_2)^2]}$, donde x_1 y y_1 son las coordenadas correspondientes al punto 1 y x_2 y y_2 son las coordenadas correspondientes al punto 2. Finalmente se construyó una matriz de distancias geográficas entre pares de progenitores. Mediante este cálculo podemos conocer la distancia que separa a los individuos donadores de los receptores (Gotelli y Ellison, 2004).

5. ANALISIS ESTADÍSTICOS

5.1. ANÁLISIS DE DIVERSIDAD CLONAL

Los análisis estadísticos realizados en la sección de diversidad clonal fueron de estadística descriptiva (media y error estándar).

5.2.1 ANÁLISIS DE DISTANCIA DE CRUZAS ÓPTIMAS

Para determinar el éxito de la producción de frutos por tratamiento en el experimento de cruza a distancia con suplementación de polen, se ajustó un modelo log-lineal para proporciones con distribución del error tipo binomial. Las diferencias entre tratamientos se analizaron con modelos de máxima verosimilitud de ajuste con ji-cuadrada. El éxito en la producción de semillas por tratamiento se analizó ajustando un modelo log-lineal con una distribución del error de tipo Poisson. Para encontrar diferencias entre tratamientos se realizaron modelos de máxima verosimilitud de ajuste con ji-cuadrada. Todos los análisis se realizaron con los paquetes estadístico JMP versión 7.0 y GLIM (Crawley, 1993; SAS Institute, 1995).

El índice de similitud genética de Nei y Li arroja como resultado una matriz de similitud genética entre pares de individuos, lo que corresponde a una matriz de proporciones de $[N,N]$, dependiendo del número total de individuos muestreados. La similitud genética va

de 0 a 1, siendo 1 el grado máximo de similitud, pero si restamos 1 a la proporción tenemos un índice de distancias genéticas, siendo 0 la menor distancia entre individuos. Para determinar la existencia de una correlación entre la matriz de distancia genética y la de distancia geográfica se realizó una prueba regresión lineal y una prueba de Mantel (Shannon et al., 2002; Clark, 2006).

Para realizar la prueba de Mantel se deben utilizar 2 matrices de igual dimensión (de distancias geográficas y la de distancias genéticas). El programa XLSTAT (Microsoft Excel) después de hacer esta prueba arroja un coeficiente de correlación de Pearson (usando 10,000 permutaciones de las matrices) con su respectivo valor de r y P de significancia. En el caso de la relación existente entre la similitud genética de Nei y Li respecto a la producción de semillas y frutos, así como de la distancia geográfica y la producción de semillas se realizaron regresiones lineales simples en el paquete estadístico JMP versión 7.0.

6. RESULTADOS

6.1 DIVERSIDAD Y DISTRIBUCIÓN CLONAL

6.1.1 DETERMINACIÓN DE IDENTIDADES GENÉTICAS

Extracción y Amplificación de ADN en *Opuntia rastrera*

Como ya se mencionó en las *Opuntia* el mucílago se encuentra de manera abundante y es difícil removerlo, para lo cual es necesario realizar los procesos de extracción y amplificación muy cuidadosamente. El resumen de los resultados de la Amplificación de ISSR's se muestra en la Tabla 5. Para ver más detalles de las técnicas de extracción y amplificación de ISSR's revisar la secciones 5.1.1 y los Apéndice 1.

Tabla 5. Número de Loci totales, monomórficos y polimórficos para los tres primers utilizados. Se estima la probabilidad de exclusión para los loci utilizados, cuando $1 - P_G = 1$ es que nuestro número de Loci es suficiente y confiable para identificar clones.

	Primer 842		Primer 827		Primer 817	
	Pastizal	Nopalera	Pastizal	Nopalera	Pastizal	Nopalera
Número de Loci	16	16	16	16	16	16
Loci monomórficos	1	1	2	4	2	3
Loci polimórficos	15	15	14	12	14	13
P _G (Probabilidad de exclusión para los Loci utilizados)	Pastizal		5.76158E-20	1- P _G		1
	Nopalera		1.54439E-16	1- P _G		1

6.1.2 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD CLONAL

Los análisis de diversidad clonal que se estimaron fueron para ambas poblaciones (pastizal y nopalera). Las dos poblaciones mostraron altos porcentajes de loci polimórficos ($\bar{x} = 86\%$), así como una elevada Heterocigosis media ($\bar{x} = 0.342$). La diversidad de Simpson también fue alta en ambas poblaciones ($\bar{x} = 0.97$). Los valores de la proporción de genotipos distinguibles (G/N) y la equitatividad (E) no contrastan al comparar los dos ambientes con la muestra de 80

individuos elegidos al azar (Tabla 6). En el pastizal hay tantos genotipos como individuos en la muestra ($G/N = 40$) y todos los genotipos presentes están representados por un individuo de la muestra ($E = 1$). En la nopalera sólo hay dos individuos que comparten el mismo genotipo ($G/N = 0.95$), lo que indica que casi todos los individuos están representados por un genotipo diferente. La equitatividad nos muestra al igual que en el pastizal que no existen genotipos que estén mayormente representados por mas individuos, solo uno ($E = 1$, Fig. 10).

Tabla 6. Diversidad clonal estimada en las dos poblaciones de *O. rastrera* con reclutamiento contrastante pastizal y nopalera (sexual y clonal). N es el número total de individuos muestreados, G es el número de genotipos estimados, G/N es la proporción de genotipos distinguibles, $\%LP$ es el porcentaje de loci polimórficos encontrados, H es la heterocigosis media para cada población y su error estándar, D es la diversidad estimada de Simpson, E es la equitatividad genotípica y e.e. es el error estándar.

	N	G	G/N	$\%LP$	H (e.e.)	D	E
Pastizal	40	40	1	89	0.359 (0.024)	0.99	1
Nopalera	40	38	0.95	83	0.325 (0.026)	0.95	1

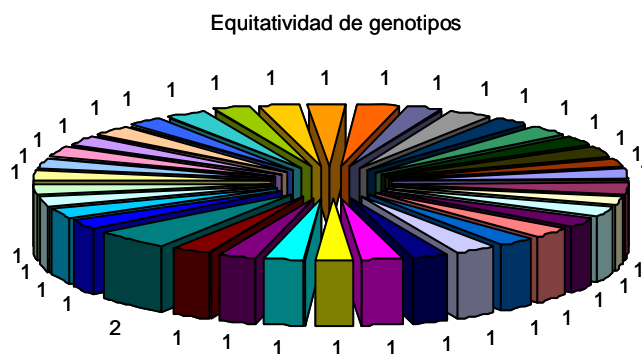


Fig. 10 La gráfica muestra la distribución de individuos muestreados ($n = 40$) en cada uno de los 38 genotipos estimados para la población clonal de la nopalera.

6.1.3 PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE RAMETS

La distribución espacial de los genets y ramets de la población del pastizal y la nopalera se muestran en las Figuras 11 y 12. Debido a que se tomó una muestra de 40 plantas al azar en cada población para evaluar distribución clonal, no conocemos el total de genotipos en las poblaciones (aprox. 800 plantas en 1600m² la nopalera y 150 en 5000m² el pastizal) para estimar de una manera exacta la distribución de genotipos. A esta escala, a nivel de parcela (400m²), con una muestra elegida al azar de 10 individuos por parcela, casi no se localizan ramets que compartan el mismo genotipo, la mayoría de los genets al parecer no cuentan con copias que se muevan en áreas de ese tamaño. De los genets que encontramos en la nopalera con esta escala sólo uno presenta una copia y esta se encuentra a un metro de distancia.

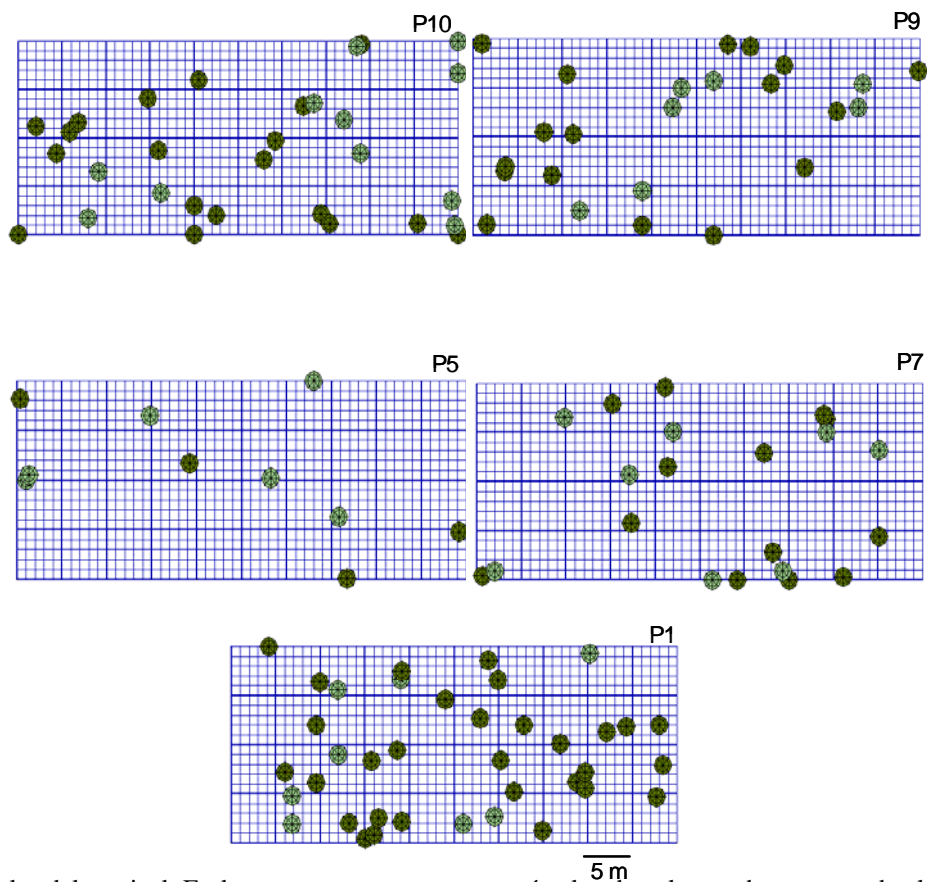


Fig. 11 Parcelas del pastizal. En los mapas se muestran con círculos de color verde oscuro todos los individuos de las parcelas, en verde claro está la muestra de 40 individuos seleccionados al azar de los cuales conocemos su identidad genética. Ninguna de las plantas muestreadas presentó ramets. Cada pequeño cuadro representa 1 m. P10 = parcela 10, P9 = parcela 9, P7 = parcela 7, P5 = parcela 5, P1 = parcela 1.

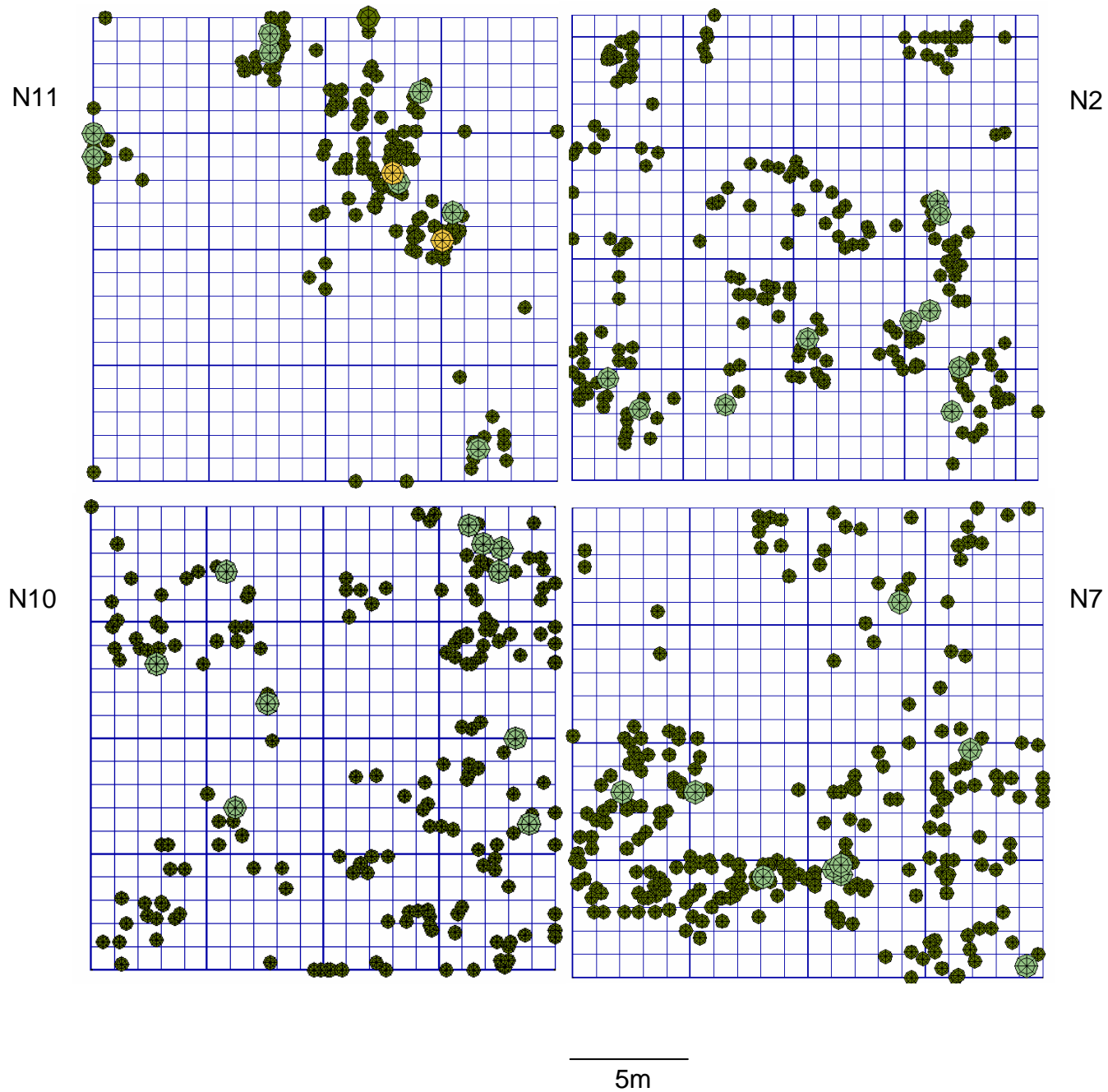


Fig. 12 Parcelas de la nopalera donde se representan los 40 individuos muestreados al azar y de los que se conoce su identidad genética. Se muestran en círculos todas las plantas en las parcelas. En los círculos de color verde oscuro se representan todas las plantas de las parcelas que no fueron consideradas. En los círculos de color verde claro (pistache) se muestran las plantas que fueron muestreadas que no presentaron otros ramets. En círculos de colores amarillos, se muestran los ramets encontrados con un mismo genotipo en la parcela N2.

6.1.4 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD CLONAL Y PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE RAMETS ESTIMADOS DEMOGRÁFICAMENTE

Los análisis de diversidad clonal que se estimaron fueron realizados considerando la muestra al azar de 40 plantas de la nopalera (repartidas en 3 parcelas de 20 x 20m) más los 24 ramets identificados demográficamente (Mandujano et al., 1995), pertenecientes a los mismos individuos elegidos al azar en este hábitat. En esta sección resaltan los resultados obtenidos para la nopalera a escala de espacios mas cercanos (0 a 5m, áreas de 6m²) a diferencia del muestreo aleatorio donde se hicieron las estimaciones en áreas de 400m² por parcela.

La población de la nopalera considerando los clones conocidos (ramets demográficos; Mandujano, 1995) mostró altos porcentajes de loci polimórficos (%LP = 82), así como una elevada Heterocigosis media ($H = 0.310$). La diversidad de Simpson también fue alta en la población ($D = 0.95$). Los valores de la proporción de genotipos distinguibles (G/N) y la equitatividad (E) contrastan al comparar la población de 64 individuos (más clones) con la población de 40 individuos elegidos al azar (Tabla 6 y 7). En el nopalera a gran escala hay tantos genotipos como individuos en la muestra ($G/N = 40$) y casi todos los genotipos presentes están representados por un individuo de la muestra, excepto dos individuos que comparten el mismo genotipo en N2 (Fig. 12; $E = 1$). En contraste en la nopalera considerando los clones sólo hay la mitad de genotipos que de individuos ($G/N = 0.57$), lo que indica que hay varios individuos con genotipos repetidos. La equitatividad nos muestra que unos pocos genotipos (2 ó 3) están representados por varios individuos ($E = 0.082$, Tabla 6 y 7, Fig. 13 y 14).

Tabla 7. Diversidad clonal de *O. rastrera* estimada en la población de la nopalera con escalas de medición en áreas de 6m² con ramets estimados demográficamente. *N* es el número total de individuos muestreados, *G* es el número de genotipos estimados, *G/N* es la proporción de genotipos distinguibles, %*LP* es el porcentaje de loci polimórficos encontrados, *H* es la heterocigosis media para la población y su error estándar, *D* es la diversidad estimada de Simpson, *E* es la equitatividad genotípica y e.e. es el error estándar.

	<i>N</i>	<i>G</i>	<i>G/N</i>	% <i>LP</i>	<i>H</i> (e.e.)	<i>D</i>	<i>E</i>
Nopalera con ramets (estimación demográfica)	64	38	0.57	83	0.310 (0.026)	0.95	0.82

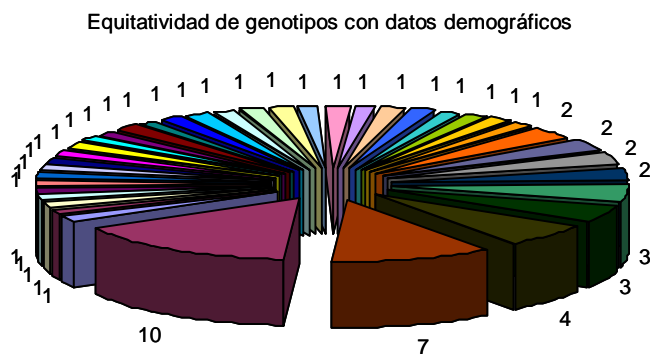


Fig.13 La gráfica muestra la distribución de individuos muestreados (*n* = 64) en cada uno de los 38 genotipos estimados para la población con estimación demográfica de ramets, zona clonal de la nopalera.

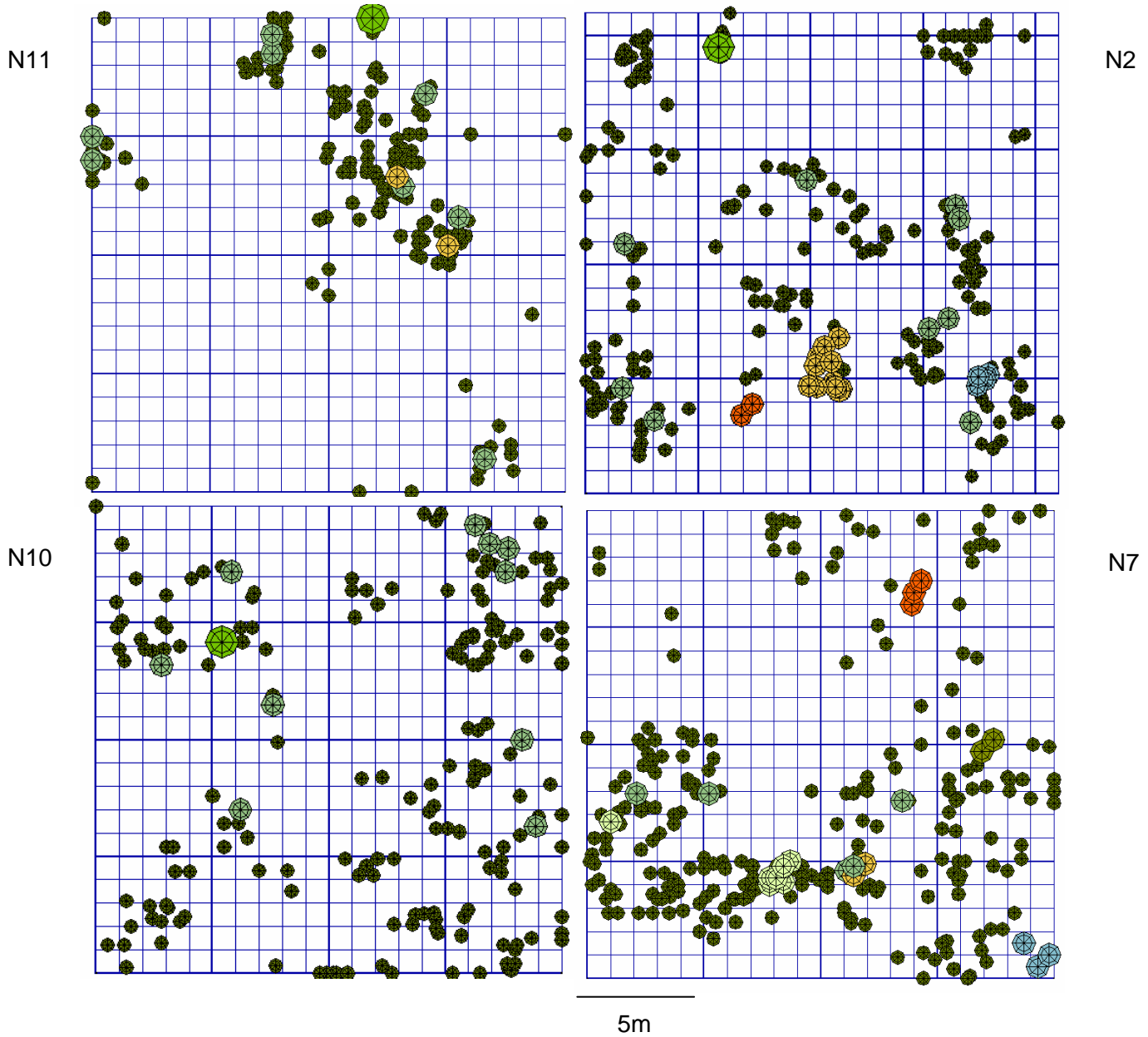


Fig. 14 Parcelas de la nopalera (20mx20m) donde se representan los individuos con identidad genética conocida. Están los 40 individuos utilizados en el análisis de diversidad clonal, más sus 24 ramets identificados demográficamente ($N = 64$, $G = 38$ genotipos diferentes). En los círculos pequeños de color verde oscuro se representan todas las plantas de las parcelas que no fueron consideradas. En los círculos grandes de color verde claro (pistache) las plantas que fueron muestreadas que no presentaron otros ramets. En círculos grandes de diferentes colores se muestran los ramets encontrados, las plantas que comparten colores “dentro de cada parcela” son ramets de un sólo genotipo. Los tres círculos grandes de color verde brillante (uno en cada parcela, N11, N2 y N7) representan individuos con el mismo genotipo “en diferentes parcelas”.

Conocemos la historia clonal de cada planta a partir de 1992, es decir, conocemos en todos los casos qué plantas se fragmentaron de cuáles plantas progenitoras en los últimos 15 años (Mandujano, 1995; Mandujano, 2001; Mandujano, datos no publicados), así que al agregar a nuestros individuos elegidos al azar los ramets que le corresponden encontramos una mejor representación de qué sucede a distancias con la distribución de ramets.

Estimamos que los grandes parches de clones no parecen ser abundantes y encontramos genets desde 2 hasta 10 ramets, que se encuentran en áreas pequeña $<6\text{m}^2$ (e. j. N2 en Fig. 14). Hay algunos casos en que existen ramets del mismo genotipo dispersos en áreas más grandes $<6\text{m}^2$ (e. j. Fig. 14, N12 círculos en amarillo), de tal manera que se puede sugerir una distribución irregular de ramets, donde hay zonas con parches de ramets agregados y zonas con ramets dispersos e intercalados.

6.2 DISTANCIA DE CRUZAS ÓPTIMAS

6.2.1 CRUZAS CONTROLADAS

Los resultados demuestran que *Opuntia rastrera* es afectada por depresión endogámica cuando se cruza con plantas que se encuentran a 10 m de distancia o menos. El experimento de cruza a distancia mostró diferencias significativas entre tratamientos en la producción de frutos formados por tratamiento, como en las semillas formadas por fruto en cada tratamiento (frutos $X^2 = 33.52$, g. l. 3, 156, $P < 0.0001$, Fig. 15; semillas $X^2 = 916.33$, g. l. 3, 156, $P < 0.0001$, Fig. 16; medias y e.e. en Tabla 8). Se agruparon los tratamientos >50 , $>1000\text{m}$ y control que no presentaban diferencias entre ellos y se compararon como un sólo grupo contra el tratamiento $<10\text{m}$, se encontraron diferencia significativas en la producción de frutos y semillas (frutos $X^2 = 33.33$, g. l. 1, $P = 7.7 \times 10^{-9}$; semillas $X^2 = 856.89$, g. l. 1, $P < 0.00001$; Figs. 15, 16; Tabla 9). En

la producción de semillas el tratamiento control no difiere significativamente del tratamiento de >50 (distancia intermedia), ambos muestran en promedio menor producción de semillas que el tratamiento >1000m (Fig. 16, Tabla 9).

Tabla 8. Medias y errores estándar de los valores de proporción de frutos formados y número de semillas por fruto formado en *Opuntia rastrera* para las tres diferentes distancias de suplementación de polen. El tratamiento control es donde las flores son polinizadas por abejas de manera natural. $N = 40$ flores usadas en cada tratamiento.

Tratamiento	Producción de frutos	Producción de semillas	Adecuación total ω (frutos x semillas)
<10 m	0.65 (0.076)	229 (26.49)	284,301
>50 m	0.975 (0.025)	312 (20.99)	487,148
>1000 m	0.975 (0.025)	336 (20.55)	503,724
Control	1 (0.00)	307 (15.25)	492,040

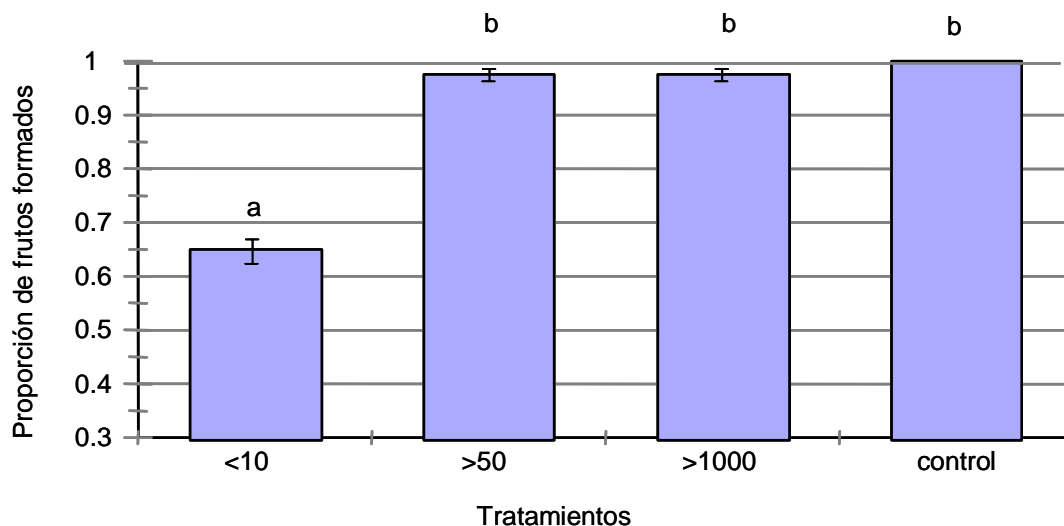


Fig. 15 Experimento de cruza óptimas en *Opuntia rastrera*. Proporción de frutos formados por tratamiento, media $\pm e.e.$ Se agruparon los tratamientos b, c y d y se compararon contra a , se encontraron sólo diferencias significativas entre estos dos grupos, $X^2 = 33.33$, g.l. 1, $P < 0.00001$. Las iniciales que se comparten muestran donde no hay diferencias significativas. $N = 40$ flores usadas para cada tratamiento.

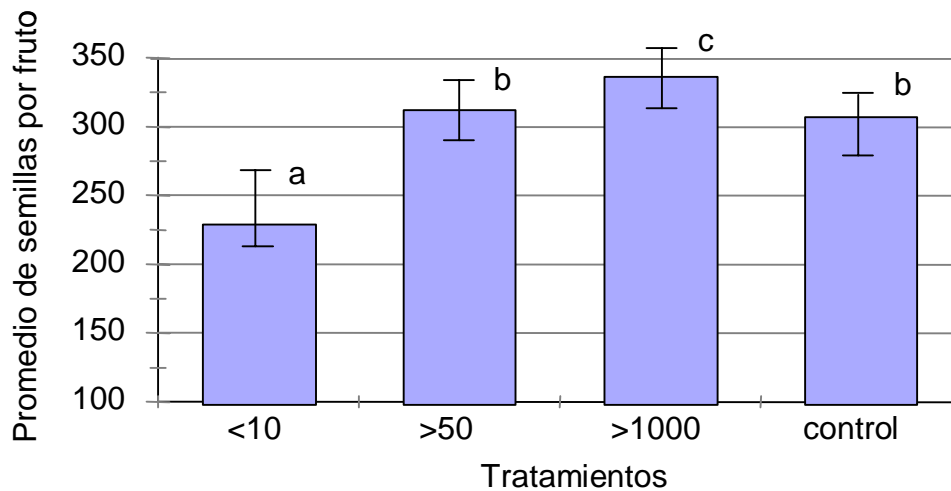


Fig. 16 Producción de semillas por tratamiento de cruce óptima. $N = 40$ flores por tratamiento, $\chi^2 = 916.33$, g. l. 3,156, $P < 0.00001$. Las iniciales que se comparten muestran donde no hay diferencias significativas.

Tabla 9. Valores de las pruebas de ji-cuadrada entre los tratamientos de cruces a distancia en *Opuntia rastrera* $N = 160$ (40 flores por tratamiento). La iniciales corresponden a: 1 = tratamiento <10, 2 = tratamiento >50, 3 = tratamiento >1000 y 4 = tratamiento control.

Tratamiento	χ^2		g. l.		P	
	Frutos	Semillas	Frutos	Semillas	Frutos	Semillas
1-2	16.04	511.13	1	1	0.00006	<0.00001
1-3	16.06	815.70	1	1	0.00006	<0.00001
1-4	22.40	457.89	1	1	0.000002	<0.00001
2-3	0	35.67	1	1	1	2.3×10^{-9}
2-4	1.39	1.471	1	1	0.2368	0.2251
3-4	1.39	51.63	1	1	0.2368	6.6×10^{-13}
1-2,3,4	33.33	916.33	1	1	7.7×10^{-9}	<0.00001

En la evaluación de los efectos del sitio y el número de pencas de las plantas madre sobre la producción de semillas encontramos que se producen menos semillas en la parcela 10 que además es donde se encuentran las plantas con más pencas ($F = 6.81$, g.l. 2, 157, $P = 0.001$; $F = 7.71$, g.l. 2, 157, $P < 0.000$; Fig. 17 a, b). No se encontró relación significativa entre la producción de semillas y el número de pencas en esa parcela ($F = 1.34$, g.l. 1, 42, $P = 0.253$). En general no se encontraron diferencias significativas en la producción de semillas

relacionadas con el número de pencas de las plantas madre ($r^2 = 0.001$, $F = 0.309$, g.l. 1, 158, $P = 0.57$; Fig. 18), ni con el número de pencas más el efecto del sitio ($F = 1.407$, g.l. 3, 154, $P = 0.242$).

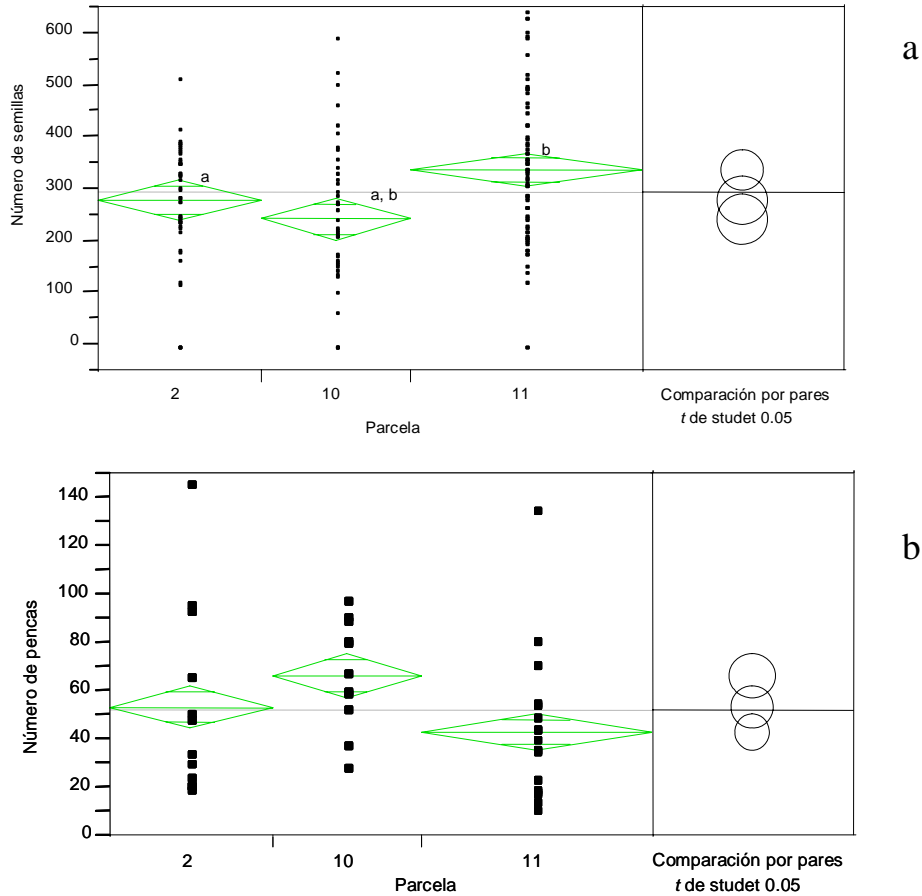


Fig.17 a) En la parcela 10 del experimento de cruza a distancia *Opuntia rastrera* presenta menor producción de semillas que las otras dos parcelas. Se realizó la transformación de los conteos de semillas para normalizar los datos (raíz de semillas + 0.5); b) En la misma parcela 10 se encuentran las plantas mas grandes de las tres parcelas. Se transformaron los conteos de pencas para normalizar los datos (raíz de pencas).

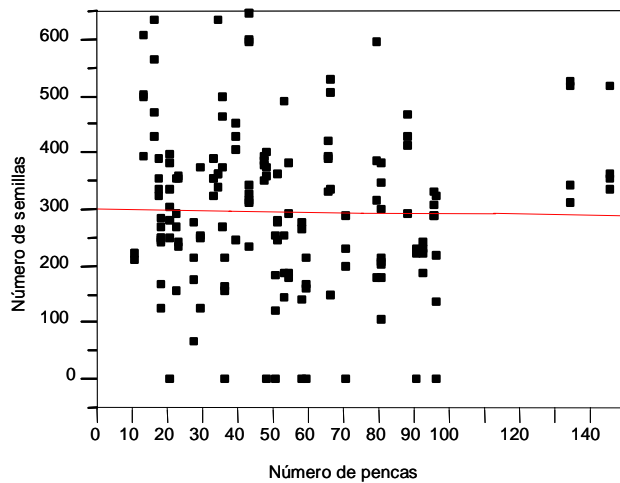


Fig. 18 No se encuentran relación significativas entre la raíz cuadrada de pencas por planta y la raíz cuadrada del número de semillas producidas por planta en todas las parcelas ($r^2 = 0.001$ $F = 0.39$, g.l. 1, 158, $P = 0.5$).

6.2.2 ÍNDICE DE SIMILITUD GENÉTICA Y DISTANCIAS GEOGRÁFICAS

La similitud genética de Nei y Li (1979) es mayor en el sitio con reclutamiento clonal que en el sitio con reclutamiento sexual (\bar{X} nopalera = 0.79, e.e. = 0.002, \bar{X} pastizal = 0.74, e.e. = 0.003).

La regresión lineal mostró que existe una correlación leve y negativa entre distancias geográficas lejanas y la similitud genética (Fig. 19). Con la prueba de Mantel encontramos que existe una correlación significativa y negativa entre la distancia geográfica y la similitud genética (Fig. 20). Nuestros resultados indican que a menor distancia entre individuos la similitud genética es mayor, ya que las plantas de <10 m presentaron mayor similitud genética entre ellas que con las que se encontraban a >50 y >1000 metros ($r = -0.109$, $P = 0.001$; Fig. 20).

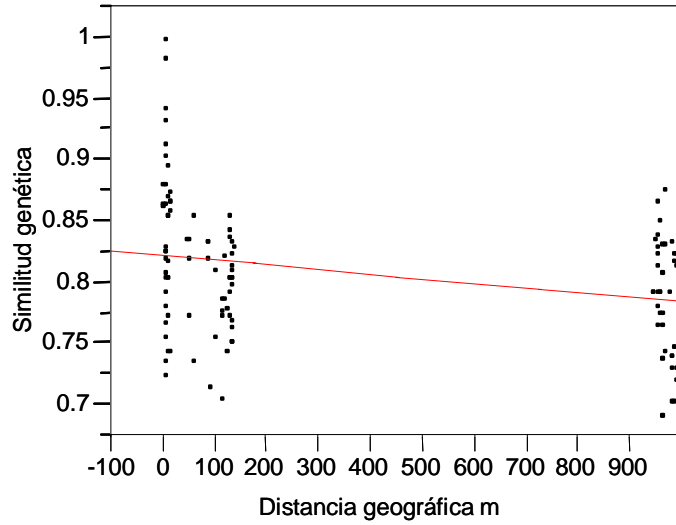


Fig. 19 Regresión lineal entre la distancia geográfica (de 0 a >1000m) y la similitud genética (0.7 a 1) de *Opuntia rastrera* en el hábitat de la nopalera. $r^2 = 0.083$, $P = 0.0014$.

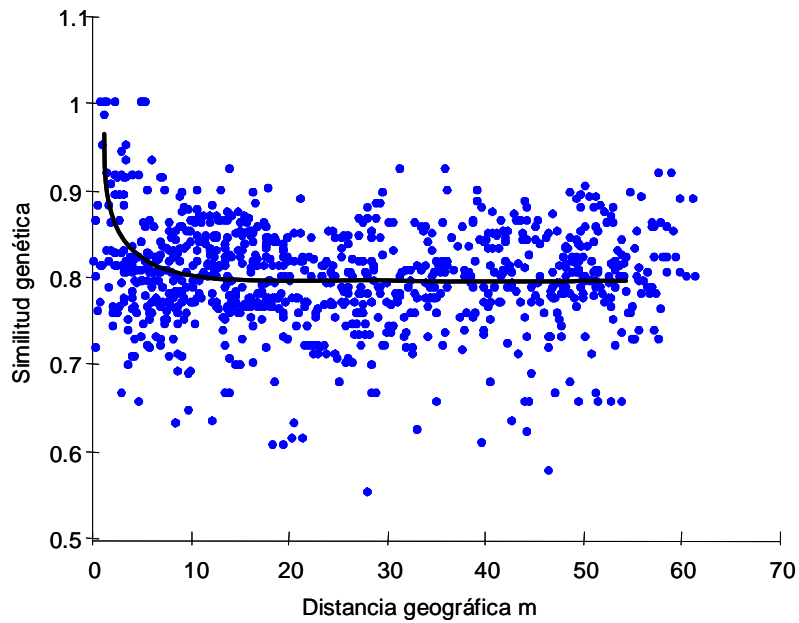


Fig. 20 Prueba de Mantel con todos los individuos utilizados para el experimento de cruzas óptimas, donde se correlaciona la matriz de distancias geográficas (de 0 a 70m) y la de similitud genética (0.55 a 1). Prueba realizada en el hábitat de la nopalera en la reserva de la biosfera del Bolsón de Mapimí. $r = -0.109$, $P = 0.001$.

La similitud genética mostró tener efecto sobre la producción de frutos y semillas. Las proporciones de frutos formados y el promedio de las proporciones de similitud genética por cada tratamiento mostraron una relación lineal significativa ($r^2 = 0.99$, g. l. 1, 1, $F = 14560.33$, $P = 0.0053$). También encontramos que a mayor similitud genética se produce menor cantidad de semillas (Fig. 21). Aunque en este estudio no se realizaron pruebas de autocruza, está reportado que *O. rastrera* es autocompatible, siendo el promedio de semillas por fruto = 129 e.e.= 0.55 (Mandujano, 1996). Tomando en cuenta estos antecedentes, suponemos que la relación entre similitud genética y producción de semillas sería mas significativa, ya que justo los datos de autocruza que harían falta en la regresión entrarían en los valores de similitud genética = 1 con una producción de entre 117 y 140 semillas por fruto. También encontramos que hay plantas que no generaron semillas aún cuando la similitud entre los progenitores fuera de las más bajas de la muestra, posiblemente estas plantas necesiten cruzarse con genotipos menos emparentados, con una similitud genética < 0.55 .

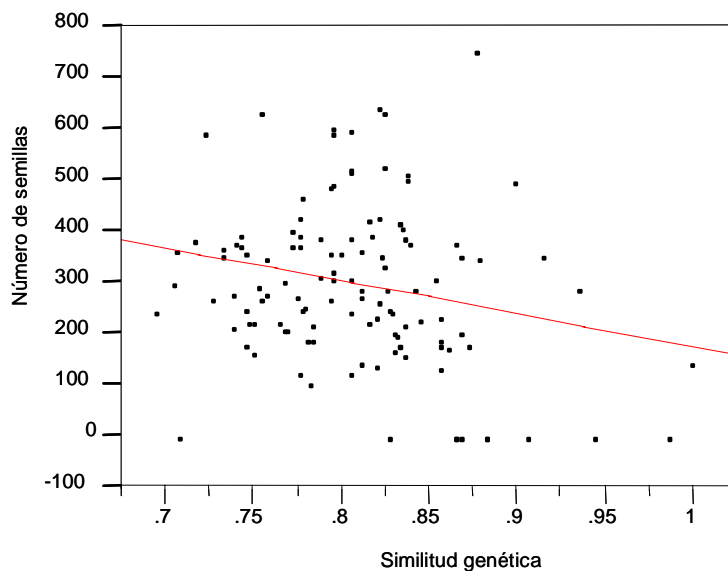


Fig. 21 Análisis de regresión entre la transformación de la similitud genética y la transformación de la raíz cuadrada del número de semillas por fruto formado. $r^2 = 0.12$, $F = 16.21$ g.l. 1, 118, $P = 0.0001$.

7. DISCUSIÓN

7.1 DIVERSIDAD Y DISTRIBUCIÓN CLONAL

7.1.1 DETERMINACIÓN DE IDENTIDADES GENÉTICAS

De los métodos utilizados recomendamos ampliamente el método modificado de AquaPure Genomic DNA (protocolo 3.2 marca Bio-Rad; Apéndice 1). La serie # 9 de primers producidos en el laboratorio del Dr. M. Smith, en la unidad NAPS, de la Universidad de Columbia Británica en Vancouver B. C., Canadá, fue muy útil para identificar genotipos en *Opuntia*, ya que los primers que resultaron polimórficos, fueron estables, consistentes y variables.

7.1.2 ANÁLISIS DE DIVERSIDAD CLONAL

Los individuos de la nopalera son genéticamente más similares entre ellos que los del pastizal. Esto puede deberse a endogamia, poca dispersión o a la clonalidad. Sin embargo encontramos valores de heterocigosis, porcentaje de loci polimórficos y diversidad genética igualmente elevados en ambas poblaciones, lo cual no parece ser compatible con los modelos que predicen baja diversidad clonal en poblaciones sin reclutamiento sexual (Harper, 1985; Snow et al., 1996; Honnay y Bossuyt, 2005). Altos niveles de diversidad y de equitatividad han sido reportados para varias especies de plantas clonales, de tal forma que esta condición parece ser común (Ellstrand y Roose, 1987). En *Cylindropuntia bigelovii* y *Cylindropuntia fulgida* Cactáceas cilíndricas de fácil fragmentación, se han reportado valores elevados de diversidad clonal y equitatividad ($G/N = 0.947$, $E = 0.96$ y $D = 0.997$; $G/N = 0.973$, $E = 0.98$ y $D = 0.999$; respectivamente; Hernández, 2006). En la cactácea clonal *Stenocereus eruca* que a diferencia de *O. rastrera* es autoincompatible, está reportada una alta heterocigosis y una elevada diversidad genética ($G/N = 0.833$, $E = 0.785$ y $D = 0.987$; Clark, 2004). La alta diversidad encontrada en

Opuntia rastrera como en otros grupos sugiere que el reclutamiento sexual, ha tenido contribuciones importantes a lo largo de su historia (Eriksson, 1993; Clark, 2004). Las contribuciones de nuevos genotipos pueden haberse dado de manera repetida en varios momentos de la historia de las poblaciones o bien hubo una cohorte de semillas sexuales inicial con alta variabilidad genética y que precisamente mediante la propagación vegetativa se lograron establecer varios genotipos y se han mantenido desde el surgimiento de la población (Eriksson, 1993). En el caso de poblaciones que no presentan reclutamiento sexual frecuente, como la población de la nopalera, donde está reportado que actualmente el establecimiento de plántulas es muy limitado debido a la extrema herbivoría (Mandujano et al., 1998), quizá se han presentado ambas estrategias; el mantenimiento de genotipos establecidos que originó a la población y el reclutamiento de semillas sexuales repetidas en ventanas de oportunidad a lo largo de la vida de las poblaciones (Jelinski y Cheliak, 1992; Eriksson, 1993).

La proporción de genotipos distinguibles considerando escalas de distancia cortas ($6m^2$) muestra que la clonalidad ha tenido un efecto importante sobre el número de genotipos en la nopalera, ya que existe casi la mitad de genotipos de los que debería de haber si no hubiera clonalidad y podemos resaltar que aunque se presenten más clones en la población no se ven afectadas la heterocigosis y la diversidad genética. Esto puede deberse a que no hay un genotipo dominante, sólo 2 de 38 genotipos tienen más ramets (7 y 10) que los otros 36. Podemos sugerir entonces que la mayoría de genets en la nopalera tiene de uno a cuatro ramets y que sólo algunos dominan con un poco más ramets.

7.1.3 PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN ESPACIAL DE RAMETS

La distribución de los ramets en la nopalera parece ser agregada para algunos genotipos, presentándose acumulaciones de ramets del mismo genet a un radio de aprox. 6m^2 . En la mayoría de los casos muestreados se encuentran genets junto con uno o dos de sus ramets y/o junto a individuos con diferentes genotipos (Fig.12). Esto es similar a lo reportado en la cactácea clonal *Stenocereus eruca* (Clark, 2004), donde parece que los individuos que comparten genotipo se encuentran localizados de forma agregada y a distancias cortas, encontrando sólo algunos a distancias mayores. En la Cactácea clonal *Ferocactus robustus* que se distribuye principalmente de forma agregada se ha reportado que en radios de 6 a 10 m se presentan casos donde sólo hay un sólo genotipo ($G/N = 0.11$) y casos donde hay varios genotipos ($G/N = 1$), pero la mayoría de casos son intermedios con G/N entre 0.4 y 0.6 (Carrillo, 2006), parecido a lo que hemos encontrado en *O. rastrera* cuando evaluamos escalas pequeñas con nuestros antecedentes demográficos ($G/N = 0.57$). En *O. rastrera* los ramets de un mismo genet también pueden encontrarse a distancias mayores de entre 20m y 100m, al igual que en cactáceas como *Stenocereus eruca* y *Ferocactus robustus* (Clark, 2004; Carrillo, 2006). Hay que tener en cuenta que no contamos con la información completa del total de identidades genéticas en las parcelas de la nopalera y no podemos señalar exactamente la distribución de ramets de un mismo genet.

La ramificación natural de la plantas de *O. rastrera* le permite un crecimiento donde las ramas de plantas cercanas pueden entrelazarse y entonces posiblemente generar agregados de ramets de distintos genets, lo cual podría ser sumamente efectivo para atraer polinizadores y evitar cruza geitonogámicas o entre clones (Charpentier, 2002). Es importante considerar que para *O. streptacantha* y *O. leucotricha* está reportado que las abejas del género *Diadasia* sp., principal polinizador de *O. rastrera*, se puede mover distancias que van desde 1 hasta 10m dependiendo

de los despliegues florales. En el caso de la nopalera cabe resaltar que la distancia que pueden desplazarse los polinizadores y la oportunidad de visitar incluso a plantas aisladas aumenta por la gran densidad de plantas en el sitio (Wilcock y Neiland, 2002).

7.2 DISTANCIA DE CRUZA ÓPTIMA

7.2.1 CRUZAS CONTROLADAS, ÍNDICE DE SIMILITUD GENÉTICA Y DISTANCIAS GEOGRÁFICAS

Al evaluar el efecto que la distancia geográfica tiene sobre el éxito reproductivo de *Opuntia rastrera* encontramos que esta especie presenta una reducción significativa en la producción de frutos y semillas cuando la polinización ocurre a distancias cortas, al igual que otras especies como *Delphinium neksonii*, *Ipomopsis aggregata*, *Agave schottii*, *Stenocereus eruca*, y *Opuntia microdasys* (Waser y Price, 1985; Waser y Price, 1989; Trame, et al., 1995; Clark, 2004, Piña, 2007). Lo anterior muy probablemente está relacionado con la similitud genética entre donadores y receptores de polen, es decir que la cercanía entre ramets del mismo genet o de genets muy emparentados puede promover cruzas geitonogámicas y un elevado efecto de depresión endogámica, fuertemente marcada en la producción de frutos cuando se realizan autocruzas (Mandujano et al., 1996). Encontramos al igual que *A. schottii* (Trame et al., 1995), que los individuos más cercanos (<10m) presentan más similitud genética (comparten más bandas) que con los individuos separados a mayor distancia. En *O. rastrera* la depresión endogámica al parecer empieza a afectar la producción de frutos y semillas cuando las cruzas se realizan entre parientes que tienen una similitud de 0.83 y > 0.87, respectivamente. Aunque en la nopalera la similitud genética entre genets sea alta (de 0.7 a 0.9 en su mayoría) y existan algunos parches de ramets (aprox. 6m² de radio) con el mismo genotipo, el grado de cruzas

geitonogámicas que se presenten depende de la floración y de los patrones de movimiento de los polinizadores (Clark, 2004; Carrillo, 2006).

Los resultados si nos permitieron distinguir la distancia donde ocurre depresión endogámica pero no nos permitieron distinguir la distancia donde sucede la depresión exogámica, esto ha pasado en otros trabajos (Trame et al., 1995; Clark, 2004), y lo que se ha sugerido es aumentar el número de polinizaciones controladas a 1000 plantas para cada tratamiento y repetirlo en varios años (Waser y Price, 1983, 1989). Nuestros resultados de producción de semillas muestran que el tratamiento control, donde los polinizadores son los que realizan las cruzas, no difieren significativamente del tratamiento intermedio (>50m), lo que sugiere que o los polinizadores están trayendo polen de distancias mayores 50m o polen de ramets no emparentados o emparentados en menos del 0.83 de sus genotipos, posible resultado de un arreglo intercalado de ramets de distintos genets. Cabe señalar que se encontró diferencia significativa entre las cruzas que se realizan a mayor distancia (>1000m) los demás tratamientos. En el tratamiento >1000m si se producen en promedio más progenie que las cruzas control, lo que sugiere que los polinizadores pueden estar realizando cruzas geitonogámicas en alguna proporción. El éxito reproductivo de la población de la nopalera depende entonces de la disposición de ramets que predomine en el sitio (ramets agregados del mismo genets o ramets intercalados de diferente genet) y del patrón de floración de estos ramets, así como de la presencia y actividad de los polinizadores, estos dos últimos aspectos quedan por explorar.

La diversidad genética en el sitio clonal (nopalera) es elevada, muy similar al sitio que no presenta crecimiento clonal (pastizal). Hasta no conocer el total de los genotipos del sitio, con la muestra aleatoria que tenemos estimamos que la mayoría de los genets tienen cantidades similares de ramets y sólo hay algunos genets que dominan en un porcentaje bajo, presentando

mas ramets que la mayoría. Por la alta producción de frutos y semillas generada por los polinizadores del sitio suponemos que el arreglo de genets en el sitio no está facilitando las cruas geitonogámicas, aunque la similitud genética en la nopalera es mayor que en el pastizal, lo que probablemente incremente el riesgo de que la proporción de cruas geitonogámicas se eleve en algún momento en la nopalera. Además que esta reportado que entre mas xenógamo sea el sistema de apareamiento en las poblaciones, (*O. rastrera* es xenógama facultativa) estas son más sensibles a la extinción de la reproducción sexual, debido a largos periodos de clonación y a la formación de parches monoclonales (Honnay et al., 2005). No hay que perder de vista que *O. rastrera* tiene la capacidad de formar año con año grandes bancos de semillas, que se mantienen vivas por largos periodos de tiempo y que entre mas longevas mas capacidad germinativa tienen (Aguilar, 2005), con lo que asegura reintroducir, en reclutamientos repetidos y de manera ocasional en una escala de tiempo excepcionalmente larga en términos humanos, genotipos nuevos a la población, en lo que se ha llamado las ventanas de oportunidad (Jelinski y Cheliak, 1992; Eriksson, 1993).

8. CONCLUSIONES

Estimamos que actualmente para la especie *Opuntia rastrera* no existe un riesgo alto de reducción de la diversidad genética, ni una disminución importante en la producción de frutos y semillas en el sitio con reclutamiento clonal de Mapimí (la nopalera). Al parecer los polinizadores están realizando las cruzas de manera exitosa. Las cruzas en la población se están realizando entre individuos con la suficiente separación genética como para no afectar el éxito reproductivo de esta población por efecto de la depresión endogámica. Conocer la identidad y la distribución de todos los ramets de la nopalera, así como su demografía particular, cuáles de ellos son reproductivos y en qué momento, al igual que la distancia de forrajeo de los polinizadores en este sitio y el estado de sus poblaciones, nos aclararía muchos de los procesos reproductivos que han mantenido a lo largo de cientos de años poblaciones clonales tan exitosas como la de la nopalera en Mapimí. También ayudaría a detectar si el tener estrategias mixtas de reclutamiento funciona a los largos plazos de los ciclos de vida de estas cactáceas milenarias.

9. LITERATURA CITADA

- Aguilar, M. G. 2005. *Dinámica del banco de semillas de Opuntia rastrera Weber. Un banco artificial originado a partir de dos poblaciones contiguas e la Reserva de la Biosfera de Mapimí, Durango, México*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Anderson, E. F. 2001. *The Cactus Family*. Timber Press. Portland, Oregon. E.U.A.
- Barrett S. C. H. 2002. Sexual interference of the floral kind. *Heredity* **88**: 154-159.
- Barrett, S. C. H. y L. D. Harder. 1996. Ecology and evolution of plant mating. *Trends in Ecology and Evolution* **11**: 73-79.
- Bornet, B. y M. Branchard. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* **19**: 209-215.
- Bravo-Hollis H. 1978. *Las Cactáceas de México*. Vol. 1. Universidad Nacional Autónoma de México. D. F., México.
- Carrillo A. I. 2006. *Efecto de la clonalidad en el éxito reproductivo sexual de Ferocactus robustus*. Tesis de Maestría, Instituto de Ecología, Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, México.
- Charlesworth, D. y B: Charlesworth. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematic* **18**: 237-268.
- Charpentier A. 2002. Consequences of clonal growth for plant mating. *Evolutionary Ecology* **15**: 521-530.
- Clark T. R. 2004. *Estructura clonal, demografía y biología reproductiva de Stenocereus eruca (Cactaceae) en las planicies de Magdalena, B.C.S.* Tesis de Doctorado. Instituto de Ecología, UNAM. México.
- Clark, T. R., C. A. Corrado, M. C. Mandujano y F. F. Molina. 2006. Reproductive consequences of clonal growth in *Stenocereus eruca*, a rare clonal cactus of the Sonoran desert. *Evolutionary Ecology* **20**: 131-142.
- Cornet A. 1985. *Las cactáceas de la Reserva de la Biosfera de Mapimí*. Instituto de Ecología, A. C. México.
- Crawley, M. J. 1993. *GLIM for ecologists*. Blackwell, Oxford.
- De Jong T. J., N.M. Waser y P.G.L. Klinkhamer. 1993. Geitonogamy: The neglected side of selfing. *Trends in Ecology and Evolution* **8**: 321-325.

- De Jong T. J., P. G. L. Klinkhamer y M. C. J. Rademaker. 1999. How geitonogamous selfing affects sex allocation in hermaphrodite plants. *Journal of Evolutionary Biology* **12**: 166-176.
- Del Castillo R. F. 1999. *Memoria VIII Congreso Nacional y VI Internacional Sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal*. Editado por Juan Rogelio Aguirre Rivera y Juan Antonio Reyes Agüero. S.L.P., México.
- Del Castillo R. F. y M. Gonzáles-Espinosa. 1988. Una interpretación evolutiva del polimorfismo sexual de *Opuntia robusta* (Cactaceae). *Agrociencia* **71**: 185-196.
- Eguiarte L. E., F. J. Nuñez, C. A. Domínguez y C. Cordero. 1992. Biología evolutiva de la reproducción de las plantas. *Revista Ciencias núm. especial* **6**: 87-97.
- Eguiarte L. E. y V. Souza. 2007. *Introducción a la ecología molecular*. En: Ecología Molecular. Editado por L. E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre. SEMARNAT, INE, UNAM, CONABIO, México.
- Ellstrand N. y M. L. Rose. 1987. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *American Journal of Botany* **74**:123-131.
- Eriksson O. 1993. Dynamics of genets in clonal plants. *Trends in Ecology and Evolution* **8**: 313-317.
- Fager, E. W. 1972. Diversity: a sampling study. *American Naturalist* **106**: 293-310.
- García, S. R. 1984. *Patrones de polinización y fenología floral en poblaciones de Opuntia spp. en San Luis Potosí y Zacatecas*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Gotelli, N. J. y A. M. Ellison. 2004. *A primer of ecological statistics*. Sinauer Associates Inc. Massachusetts U.S.A.
- Grant, V., K. A. Grant., y P. D. Hurd, Jr. 1979. Pollination of *Opuntia lindheimeri* and related species. *Plant Systematics and Evolution* **132**: 313-320.
- Grant, V., y K. A. Grant. 1979. Pollination of *Opuntia basilaris* and *O. littoralis*. *Plant Systematics and Evolution* **132**: 321-325.
- Guzmán U., S. Arias y P. Dávila. 2003. *Catálogo de cactáceas mexicanas*. UNAM. CONABIO. México.
- Harda Y., S. Kawano y Y. Iwasa. 1997. Probability of clonal identity: inferring the relative success of sexual versus clonal reproduction from spatial genetic patterns. *Journal of Ecology* **85**: 591-600.

- Harder, L.D. y S.C.H. Barrett. 1995. Mating costo of large floral displays in hermaphrodite plants. *Nature* **373**: 512-515.
- Harper, J. L. 1985. *Modules, branches and the capture of resource*. En: Population biology and evolution of clonal organisms. Editado por J. B. C. Jackson, L. W. Buss y R. E. Cook. Yale University Press, London.
- Hedrick, P. W. 2005. *Genetics of population*. Jones y Bartlett Publicaciones. Londres, Reino Unido.
- Hernández., R. L. 2006. *Variación genética y producción de semillas en poblaciones de Cylindropuntia bigelovii con diferente ploidía*. Tesis de Maestría. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Honnay, O. y B. Bossuyt. 2005. Prolonged clonal growth: escape route or route to extinction?. *Oikos* **108**: 427-432.
- Jain. S. K. 1976. The evolution of inbreeding in plants. *Annual Review of Ecology and Systematic* **7**: 469-495.
- Jelinski D. E. Y W. M: Cheliak. 1992. Genetic diversity and spatial subdivisión of *Populus tremuloides* (Salicaceae) in a heterogeneous landscape. *American Journal of Botany* **79**: 728-736.
- Jiménez A. G. 2000. *Biología reproductiva de una especie polinizada por engaño*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. División de Estudios de Posgrado. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Lande, R. y D. R. Schemske. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic model. *Evolution* **39**: 24-40.
- Linsley, E. G. 1958. The ecology of solitary bees. *Hilgardia* **27**: 543-599.
- Mandujano M. C. 1995. *Establecimiento por semillas y propagación vegetativa de Opuntia rastrera en dos ambientes contrastantes en la Reserva de la Biosfera de Mapimí, Durango*. Tesis de Doctorado. Instituto de Ecología, UNAM.
- Mandujano M. C., C. Montaña, I. Méndez y J. Golubov. 1998. The relative contributions of sexual reproduction and clonal propagation in *Opuntia rastrera* from two habitats in the Chihuahuan desert. *Journal of Ecology* **86**: 911-921.
- Mandujano M. C., C. Montaña, L. E. Eguiarte. 1996. Reproductive ecology and inbreeding depression in *Opuntia rastrera* (Cactaceae) in Chihuahuan Desert: Why are sexually derived recruitments so rare?. *American Journal of Botany* **83**: 63-70.

- Mandujano M. C., C. Montaña, M. Franco, J. Golubov y A. M. Flores. 2001. Integration of demographic annual variability in a clonal desert cactus. *Ecology* **82**: 344-359.
- Mandujano M. C. 2007. *La clonalidad y sus efectos en la biología de poblaciones*. En: Ecología Molecular. Editado por L. SEMARNAT, INE, UNAM, CONABIO, México. E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre. SEMARNAT, INE, UNAM, CONABIO, México.
- Manttoni C., M Casasoli, M. González y R. Ipinza. 2002. Comparison of ISSR and RAPD markers to characterize three Chilean *Nothofagus* species. *Theoretical and Applied Genetics* **104**: 1064-1070.
- McFarland, J. D., P. G. Kevan y M. A. Lane. 1989. Pollination biology of *Opuntia imbricata* (Cactaceae) in southern Colorado. *Canadian Journal of Botany* **67**: 24-28.
- Montaña, C. 1988. *Las formaciones vegetales*. En: Estudio integrado de los recursos vegetación, suelo y agua en la Reserva de la Biosfera de Mapimí I. Ambiente natural y humano. Editado por C. Montaña. Instituto de Ecología A. C. México.
- Muirhead, C. A. y R. Lande. 1997. Inbreeding depression under joint selfing, outcrossing, and asexuality. *Evolution* **51**: 1409-1415.
- Muños, U. A. 2004. *Variación fenotípica, aislamiento reproductivo y ecofisiología de poblaciones silvestres de especies de Opuntia en la porción sur del desierto chihuahuense*. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Nagaoka T., y Y. Ogihara. 1997. Applicability of Inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* **94**:597-602.
- Neal P. R. y G. J. Anderson. 2005. Are 'mating systems' 'breeding systems' of inconsistent and confusing terminology in plant reproductive biology? or is it other way around?. *Plant Systematics and Evolution* **250**: 173-185.
- Nei, M. y W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 5269-5273.
- Piña H. H. 2007. *Biología reproductiva de Opuntia microdasys (Lehm.) Pfeiffer en el Desierto Chihuahuense*. Tesis de Doctorado. Instituto de Ecología A. C. Xalapa, Veracruz, México.
- Plasencia L. M. 2003. *Biología reproductiva de Opuntia bradtiana (Cactaceae) en Cuatro Ciénegas, Coahuila*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM, México.
- Reyes-Agüero J. A., J. R. Aguirre y A. Valiente-Banuet. 2006. Reproductive biology of *Opuntia*: A review. *Journal of Arid Environments* **64**: 549-585.

- Ruíz de Esperanza. 1988. *Lista de las especies vasculares*. En: *Estudio integrado de los recursos vegetación, suelo y agua en la Reserva de la Biosfera de Mapimí. I. Ambiente natural y humano*. Editado por Montaña C. Instituto de Ecología, A C. México.
- SAS Institute. 1995. *JMP statistics and graphics guide*. SAS Institute, Cary, North Carolina, E.U.A.
- Shannon, W. D., M. A. Watson, A. Perry y K. Rich. 2002. Mantel statistics to correlate gene expression level from microarrays with clinical covariates. *Genetic Epidemiology* **23**: 87-96.
- Silvertown, B. B. y D. Lovett. 1993. *Introduction to plant population biology*. Blackwell Scientific Publication. Cambridge. E.U.A.
- Snow, A. A., T. P. Spira, R. Simpson y R. A. Klips, 1996. The ecology of geitonogamous pollination. En: *Floral biology. Studies on floral evolution in animal – pollinated plants*. Editado por Lloyd , D. G. y S.C.H. Barrett. Chapman y Hall. Universidad de Toronto, Canada. pp: 191-216.
- Sudzuki, H. F. 1995. *Anatomy and morphology. En Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear*. Ed. Barbera G., Inglese P., y Pimienta-Barrios E. FAO. Roma, Italia.
- Trame, A. M., A. J. Coddington y K. N. Paige. 1995. Field and genetic studies testing optimal outcrossing in *Agave schottii*, a long-lived clonal plant. *Oecologia* **104**:93:100.
- Waser, N. M. y M. V. Price. 1983. *Optimal and actual outcrossing in plants, and the nature of plant pollinator interaction*. En *Handbook of experimental polination biology*. Editado por Van Nostrand Reinhold, N. Y., E.U.A.
- Waser, N. M. y M. V. Price. 1989. Optimal outcrossing in *Ipomopsis aggregata*: seed set and offspring fitness. *Evolution* **43**: 1097-1109.
- Waser, N. M. y M. V. Price. 1985. Reciprocal transplant experiments with *Delphinium nelsonii*: (Ranunculaceae): evidence for local adaptation. *American Journal of Botany* **72**: 1726-1732.
- Waser, N. M. y M. V. Price. 1991. Outcrossing distance effects in *Delphinium nelsonii*: pollen loads, pollen tubes and seed set. *Ecology* **72**: 171-179.
- Wilcock C. y R. Neiland. 2002. Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. *Trends in Plant Science* **7**: 270-277.
- Wyatt, R. 1983. Pollinator-Plant interactions and the evolution of breeding systems. En: *Pollination Biology*. Editado por Lesly Real. Academic Press. New York. pp. 51-95.

- Zimmerman, M. 1988. *Nectar production, flowering phenology, and strategies for pollination*. En: *Plant reproductive ecology: pattern and strategies*. Editado por Doust J. L. y L. L. Doust. Oxford University Press, New York, E.U.A.
- Zietkiewicz E., A. Rafalski y D. Labuda. 1994. Genome Fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **GENOMICS 20**: 176-183.
- Zlotnik E. A. 2001. *Anatomía vegetal: material de apoyo*. Facultad de Ciencias. UNAM, México.

10. APÉNDICE 1

Protocolo modificado de extracción con kit de Bio-Rad para *Opuntia rastreara*

Las modificaciones que sufrió el protocolo original consistieron en aumentar la cantidad de tejido vegetal, de 10mg a 25mg.

Lisis celular

Se molió el tejido de epidermis de *Opuntia rastrera* en un mortero con nitrógeno líquido hasta quedar reducido a un polvo blanco. En este paso es muy importante que el tejido quede lo más finamente molido posible. El polvo se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5ml al que se le adicionaron 600 μ l y 300 μ l (para individuos con mucho mucílago y sin mucílago respectivamente) de solución de lisis celular del kit, agitándolos para crear una mezcla homogénea e incubándolos a 65°C por 45 minutos en un termobloque.

Tratamiento con RNAasa

Los tubos se sacan del termobloque para adicionarles 3 μ l y 1.5 μ l (con mucílago y sin mucílago respectivamente) de la solución de RNAasa (Rnase A Solution, mg/ml), los cuáles se mezclaron por inversión 25 veces y se incubaron nuevamente a 65°C por 45 minutos en el termobloque.

Precipitación de proteínas

Una vez que termina el tiempo de incubación con la RNAasa, los tubos se sacan del termobloque y se dejan enfriar a temperatura ambiente, posteriormente se añaden 200 μ l y 100 μ l (con mucílago y sin mucílago respectivamente) de solución precipitadora de proteínas, los tubos se colocan en el vórtex durante 20 segundos (hasta formar una espuma abundante) y se centrifuga a 14000rpm durante 3 minutos. El precipitado debe formar un pellet compacto de desechos celulares. En caso de que no este compacto, volver a vortexear e incubar la muestra en

hielo por 5 minutos y posteriormente centrifugar de nuevo, hasta que se forme el pellet (la repetición de este paso es necesaria en la mayoría de los casos).

Precipitación de ADN

Colocar el sobrenadante (que contiene el ADN) en un tubo limpio y agregar 600 μ l y 300 μ l (con mucílago y sin mucílago respectivamente) de isopropanol frío al 100%. Los tubos se mezclan por inversión (50 veces), se deben ver las hebras blancas de ADN sin que las rodee ninguna sustancia viscosa. Se centrifugan a 14000rpm por un minuto. El sobrenadante se desecha con cuidado de no tirar el pellet de ADN y se deja escurrir el tubo boca abajo sobre una toalla absorbente. Posteriormente, se agregan 600 μ l y 300 μ l (con mucílago y sin mucílago respectivamente) de etanol frío al 70 % para lavar el ADN y se mezcla el tubo por inversión varias veces. Centrifugar posteriormente a 14000rpm por un minuto, desechar el sobrenadante con cuidado de no tirar el pellet de ADN. Dejar secar el tubo boca arriba durante 15 minutos.

Hidratación del ADN

Finalmente se añaden 50 o 100 μ l de solución de hidratación, dependiendo del tamaño del pellet y se deja incubar a 65°C por 45 minutos o toda la noche a temperatura ambiente.