



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“ANÁLISIS DE LOS MARCADORES MOLECULARES *matK* Y  
*rbcL* DE CACTÁCEAS COLUMNARES DEL GÉNERO  
*Neobuxbaumia*”

**TESIS**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**BIOLOGA**  
PRESENTA:  
**NALLELY ÁLVAREZ SANTOS**

DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. Elías Piedra Ibarra



EDO. DE MÉXICO

2015



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**

A mi adora UNAM que me permitió tener una carrera universitaria y una mentalidad que solo se obtiene estudiando en esta gran escuela.

Al Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la FES-Iztacala por brindarme las facilidades para realizar este proyecto y a cada uno de los integrantes que forman o han formado parte de este maravilloso laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio: Helena (sensei), Gerardo, Paty, Daniel, Erick y Eduardo, principalmente a Martha Santiago, Amanda Moreno y Anabel Ruiz, que me brindaron su apoyo incondicional y una amistad que hicieron de mi estancia algo maravilloso.

Al Dr. Elias Piedra por su apoyo para el desarrollo de este trabajo, por su paciencia, confianza y hacer posible la realización de esta tesis.

A mis sinodales Dr. Cesar Mateo Flores Ortiz, Dra. Teresa Margarita Terrazas Salgado, Dra. Martha Martínez García y M. en C. Josefina Vázquez Medrano, por su paciencia, apoyo incondicional, por compartir sus conocimientos para mejorar y hacer posible este trabajo.

A la Dra. Martha Martínez García, por su sencillez, sus conocimientos otorgados y simplemente por mostrarme la magia.

Al Dr. Alejandro Monsalvo por la secuenciación y compartir sus conocimientos, mil gracias.

Al Profesor Rafael Quintanar por su apoyo, su sinceridad, comprensión, por convertir cada dificultad en una meta, por las enseñanzas que permitieron ver siempre la vida con sentido del humor y muy especialmente por su amistad mil gracias.

A la M. en C. Josefina Vázquez Medrano por su apoyo a cada uno de mis proyectos, mostrarme a través del ejemplo la ética que conlleva esta carrera, su paciencia infinita, enseñarme que el mundo puede ser un lugar mejor porque aún existen personas como usted: luchadora, incansable, fuerte, emprendedora, tenaz, inteligente y siempre dispuesta ayudar a quien la necesita sin esperar nada a cambio, a su lado aprendí muchas cosas que me llevo para aplicarlas todos los días de mi vida. En pocas palabras agradezco conocer a una mujer ejemplar a la cual admirare y querré siempre GRACIAS.

*“El agradecimiento es la memoria del corazón”*  
Lao-Tsé

## DEDICATORIAS

A mi MAMA, por confiar en mi cuando yo no confiaba ni en mi misma, por estar siempre cuando necesite de ti, por ser mi ejemplo mediante la valentía que has mostrado a lo largo de tu vida siendo una guerrera y una luchadora incansable, por aguantar dolores y años de privaciones para dármelo todo a mí, recuerda que todo lo que soy te lo debo a ti. TE AMO.

A mi hermana Alicia, hemos pasado tantas cosas a veces buenas, a veces malas y tristes, pero siempre conté contigo para sobrevivir a cada una de ellas, doy gracias a la vida de tenerte como mi hermana y por eso te dedico este trabajo, porque si no hubiéramos estado juntas no estaría aquí.

A mi hermano Ángel y mi sobrina Lilit, desde el día que nacieron fueron mi motor que me motiva a ser cada día una mejor persona, porque cada que quisiera rendirme me vienen a la mente sus caritas de niños que no permiten que pare, quiero demostrarles mediante el ejemplo que siempre se puede lograr lo que quieres no importa cuánto tarde y que las cosas más importantes de la vida son aquellas que no tiene precio. Siempre serán mi razón para crecer como persona.

A mi Manuel, por compartir conmigo todo este proceso, por estar siempre a mi lado en las buenas, las malas y las peores, ser un ser humano extraordinario, por tu paciencia, cariño y ejemplo que siempre me motiva a salir adelante. Tú formas parte fundamental de este trabajo y mi vida, te lo agradezco con un TE AMO.

A mis may's Ximena Magallán (mi querida hippie), Karla Ramírez (mi si me lo merezco), Jessica Toledo (mi corazón de pollo) y Berenice Torres (mi antes muerta que sencilla), gracias por el apoyo incondicional, por compartir todas estas aventuras, las risas, las lágrimas, la comida (o no Bere), las prácticas de campo, los proyectos y sobre todo la vida. Las quiero.

A mis amigos de toda la vida (mi segunda familia) que los conocí en sus inicios y ahora así como los ven ya son todos unos profesionistas, Psicóloga Flor Peña Estrada, Actuario Vicente Arturo Román De Los Santos, Diseñadora Brenda Nashelly Rodríguez Palacios y la empresaria Mariana Berenice Gonzales Sarabia, quien diría de esos entonces cuando no teníamos ni un peso, justo de esos momentos de hacer la vaca y de tanto juntarla el Animal aprendió a manejar las matemáticas de tal manera que lo convirtió en su carrera, que aquella Florecilla jovencita con tantos amigos con expediente clínico ahora tiene consultorio y ya los atiende en su diván, que aquella chica de cabellos de colores y vestimenta original (muchas veces copiada jamás igualada) con diferentes seudónimos (Luna por ejemplo) la convertiría en Diseñadora y empresaria, y por último una persona que toda su vida ha trabajado, que nada se le dio gratis, que sobresalía no solo por su belleza, sino también por su inteligencia, ahora es toda una empresaria y por supuesto modelo mi Flaca adorada. *A ustedes les dedico este trabajo ya que me conocen en todos los aspectos, las virtudes y los defectos y aun así siempre han creído en mí.*

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Trasplante de Plántulas de <i>N. polylopha</i>	8
<b>Figura 2</b> Material utilizado para la colecta de tejido.	10
<b>Figura 3</b> Mucilago de un adulto de <i>S. stellatus</i> durante el proceso de extracción de ADN	10
<b>Figura 4</b> Plántulas de 10 meses de edad de <i>N. polylopha</i> , <i>P. weberi</i> y <i>N. mezcalaensis</i>	15
<b>Figura 5</b> ADN extraído con DNAzol® de plántulas de 10 meses de edad	17
<b>Figura 6</b> ADN extraído por el Método CTAB y productos de PCR ( <i>matK</i> y <i>rbcl</i> ) de 2 individuos de la especie <i>N. laui</i> .	18
<b>Figura 7</b> Productos de PCR ( <i>matK</i> ) de <i>N. scoparia</i> y <i>N. euphorbioides</i> del en geles de agarosa.	19
<b>Figura 8</b> ADN, productos PCR ( <i>matK</i> y <i>rbcl</i> ) de <i>N. polylopha</i> en geles de agarosa.	19
<b>Figura 9</b> Electroferograma del amplicón <i>rbcl</i> de <i>N. tetetzo</i> con el primer forward.	20
<b>Figura 10</b> Electroferograma del amplicón <i>matK</i> de <i>N. squamulosa</i> con el primer forward <i>matK</i>	20
<b>Figura 11</b> Electroferograma del amplicón <i>matK</i> de <i>N. tetetzo</i> con el primer reverso	20
<b>Figura 12</b> Árbol filogenético obtenido con la secuencia de nucleótidos de <i>matK</i> y el modelo de máxima parsimonia.	25
<b>Figura 13</b> Árbol filogenético obtenido con la secuencia de nucleótidos de <i>rbcl</i> y el modelo de máxima parsimonia.	26
<b>Figura 14</b> Árbol filogenético obtenido con la secuencia de nucleótidos de <i>rbcl+matK</i> y el modelo de máxima parsimonia.	27

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1</b> Especies de <i>Neobuxbaumia</i> y su distribución en la República Mexicana	3
<b>Cuadro 2</b> Nombre de los oligonucleótidos utilizados y secuencia.	11
<b>Cuadro 3</b> Donadores de material Biológico, especies donadas, características del material, lugar de colecta y el número de individuos.	14
<b>Cuadro 4</b> Lugares de colecta de los híbridos y sus parentales.	16
<b>Cuadro 5</b> Matriz de Distancia Genética (Kimura 2 parámetros) entre los híbridos y sus parentales usando la secuencia de <i>matK</i> .	21
<b>Cuadro 6</b> Matriz de Distancia Genética (Kimura 2 parámetros) entre los híbridos y sus parentales usando la secuencia de <i>rbcl</i> .	22
<b>Cuadro 7</b> Matriz de Distancia Genética (Kimura 2 parámetros) entre los híbridos y sus parentales usando la secuencia <i>rbcl+matK</i> .	22
<b>Cuadro 8</b> Matriz de Distancia Genética (Kimura 2 parámetros) entre los miembros del género <i>Neobuxbaumia</i> con la secuencia <i>matK</i>	
<b>Cuadro 9</b> Matriz de Distancia Genética (Kimura 2 parámetros) entre los miembros del género <i>Neobuxbaumia</i> con la secuencia <i>rbcl</i>	
<b>Cuadro 10</b> Matriz de Distancia Genética (Kimura 2 parámetros) entre los miembros del género <i>Neobuxbaumia</i> con la secuencia <i>matK+rbcl</i>	
<b>Cuadro 11</b> Número de especies analizadas, caracteres totales, variables e informativos de las secuencias <i>matK</i> y <i>rbcl</i> .	23

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	1
<b>RESUMEN</b>	2
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	3
1.1. Género <i>Neobuxbaumia</i>	3
1.2. Estrategias para la elaboración de hipótesis filogenéticas	5
1.3. Determinación taxonómica por Código de Barras	6
<b>2. HIPÓTESIS</b>	8
<b>3. OBJETIVOS</b>	8
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	9
4.1. Material biológico	9
4.2. Extracción de ADN	11
4.3. Marcadores moleculares y PCR	12
4.4. Secuenciación, Edición y Alineamiento	13
4.5. Matriz de Distancia genética	13
<b>5. RESULTADOS</b>	15
5.1. Material biológico	15
5.2. Extracción de ADN	18
5.3. PCR y Secuenciación	19
5.4. Edición y Alineamiento	22
5.5. Matriz de distancia genética entre híbridos y miembros del género <i>Neobuxbaumia</i> .	22
5.6. Análisis Filogenético de los miembros del género <i>Neobuxbaumia</i>	22
<b>6. DISCUSIÓN</b>	24
6.1. Distancia genética en híbridos y parentales	29
6.2. Distancia genética entre miembros del género <i>Neobuxbaumia</i>	30
6.3. Análisis filogenético de miembros del género <i>Neobuxbaumia</i>	31
<b>7. CONCLUSIONES</b>	35
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	36
<b>APENDICES</b>	49

---

## ABREVIATURAS

---

ADN.	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Kb	Kilobase
Bts:	Bootstrap
CBOL	Consortium for the Barcode of life
IOS	Organización Internacional para el estudio de las Suculentas
pb	Pares de bases
RuBisCo	Ribulosa 1,5 Bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa
µL	Microlitro
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MPM	Marcador de peso molecular
rpm	Revoluciones por minuto

---

## RESUMEN

Se han propuesto distintas hipótesis filogenéticas del género *Neobuxbaumia* (Cactaceae) que van desde la integración de especies de otros géneros hasta la inclusión del género completo en otro. Estas hipótesis han sido elaboradas con base en datos morfológicos y moleculares, dentro de este último existe una alternativa reciente y prometedora: los códigos de barras genéticos. Estos permiten la discriminación entre especies incluso crípticas, en plantas se utilizan dos regiones del cloroplasto: *matK* y *rbcL*. Por consiguiente, reconsiderar que el uso de estos permitirían tener una hipótesis filogenética del género e inclusive integrar a organismos en proceso de especiación como los híbridos de *N. mezcalaensis* y *N. macrocephala* del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Para las extracciones se adaptaron dos métodos de extracción dependiendo de las características del material vegetal. Se obtuvo material biológico de la mayoría de las especies excepto de *N. multiareolata*. Se obtuvo ADN y productos de PCR de 70 individuos, sin embargo del total de secuencias obtenidas se tuvieron que eliminar las de *N. squamulosa* ya que la secuencia fue altamente divergente. Por otro lado la matriz de distancia genética de los híbridos y sus parentales los muestra como la misma especie ya que *matK* y *rbcL* no discriminaron entre especies. Igualmente en el género *Neobuxbaumia* no se logró la discriminación total de las especies pero si permitió la discriminación de géneros. Mientras tanto en análisis filogenético de *rbcL* y *matK* definen al género como monofilético si se incluye a *C. columna-trajani*, *matK* indica una relación cercana entre *N. tetetzo* y *C. columna-trajani* y *rbcL* entre *N. polylopha* y *N. euphorbioides*. Los marcadores discriminan entre géneros *Pachycereus*, *Lemaireocereus* y *Carnegia* esto a pesar de la baja tasa evolutiva mostrada por estos marcadores. En conclusión los códigos de barras de *matK* y *rbcL*, no permiten la discriminación entre especies del género *Neobuxbaumia* pero dan información fundamental para la filogenia del género y dentro de la familia Cactaceae.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Género *Neobuxbaumia*

La familia de las cactáceas es originaria de América, debido a su gran diversidad y alto número de endemismo a nivel genérico y específico se le considera de los grupos vegetales más exitosos en México. Los miembros de la familia han sido agrupados en 3 subfamilias: Opuntioideae (K. Shum., 1897), Pereskioideae (K. Shum., 1897) y Cactoideae (Eaton, 1836), la más robusta (Guzmán *et al.*, 2007). En México se han reportado cerca de 689 especies de las 1,500 reconocidas para la familia (Bravo-Hollis, 1978). Actualmente se encuentra dividida en cuatro subfamilias: Opuntioideae, Pereskioideae, Maihuenioideae y Cactoideae, esta última la más grande (Anderson, 2001).

La tribu Pachycereeae (Guzmán *et al.*, 2007) o Echinocereae (Hernández-Hernández *et al.*, 2011; Barba, 2012) es una de las nueve que conforman la subfamilia Cactoideae; incluye a las subtribus Pachycereinae y Stenocereinae de especies columnares, cuyo límite de distribución norte es el suroeste de los Estados Unidos, y se extiende hacia el sur hasta las Antillas y al norte de América del Sur. Los miembros de esta subtribu tienen una distribución amplia, y la mayoría de las especies crecen en México; siete géneros y 47 especies de la tribu (81% del total) son endémicos (Dávila-Aranda *et al.*, 2002). Uno de los géneros de la subtribu es *Neobuxbaumia* Backeb (Cactaceae), el cual comprende plantas columnares monopódicas o con ramificación de escasa a profusa, tallos cilíndricos con pocas o numerosas costillas; flores tubular campanuladas o tubular infundibuliformes, nocturnas; frutos ovoides con espinas, restos de perianto persistentes, dehiscencia vertical en forma de estrella y pulpa blanca y semiseca; semillas largas a muy largas, de color negro o café oscuro, lustrosas, lisas y con quilla (Bravo-Hollis, 1978; Barthlott y Hunt, 1993; Arroyo-Cosultchi *et al.*, 2007). Cuenta con nueve especies endémicas (Cuadro 1) que se distribuyen desde el bosque tropical caducifolio hasta el matorral xerófilo de la Depresión del Balsas, de la vertiente del Pacífico y de la vertiente del Golfo de México y del Valle de

Tehuacán–Cuicatlán (Bravo–Hollis, 1978; Flores, 2004). En éste último, uno de los centros de diversidad más importantes de cactáceas columnares, coexisten tres especies del género: *N. tetetzo* que ocupa ambientes con altitudes no mayores a los 1600 m, *N. macrocephala*, endémica del Valle, con distribución restringida en poblaciones pequeñas y escasa regeneración natural en presencia de su especie hermana *N. mezcalaensis* (Godínez-Álvarez y Valiente-Banuet, 2004), la cual tiene una distribución más amplia en México. Las especies *N. macrocephala* y *mezcalaensis* florecen y fructifican simultáneamente, incluso comparten polinizadores que son murciélagos nectarívoros (Valiente-Banuet *et al.*, 1997). Experimentos de adición manual de polen heteroespecífico demostraron que las flores de *N. macrocephala* pueden ser polinizadas por *N. mezcalaensis* (Ríos, 2009). Así se hipotetizó que en condiciones naturales estas especies llegan a hibridarse. Alejos (2006) evaluó la hibridación entre las tres especies y encontró evidencias de que únicamente había sucedido entre *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis* y que no existe aislamiento genético o estructura entre las dos especies y sus híbridos.

**Cuadro 1. Especies del género *Neobuxbaumia* y su distribución en la República Mexicana (Modificado de Arias *et al.*, 1997)**

GÉNERO	ESPECIE	DISTRIBUCIÓN
<i>Neobuxbaumia</i>	<i>mezcalaensis</i> (Bravo) Backeb., 1941	Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca y Puebla
	<i>tetetzo</i> (F.A.C. Weber) Backeb., 1938	Oaxaca y Puebla
	<i>macrocephala</i> (F.A.C. Weber ex K. Schum) E.Y. Dawson., 1952.	Puebla
	<i>multiareolata</i> (E.Y. Dawson, Scheinvar & Sánchez-Mej., 1972	Guerrero
	<i>polylopha</i> (DC.) Backeb., 1938	Guanajuato, Hidalgo, Querétaro y San Luis Potosí
	<i>loui</i> (P.V. Heath) D.R.Hunt, 1997	Oaxaca
	<i>scoparia</i> (Poselg.) Backeb., 1941	Oaxaca y Veracruz
	<i>squamulosa</i> Sheeinvar & Sanchez-Mej., 1990	Colima, Guerrero y Michoacán
	<i>euphorbiodes</i> (Haw) Bux.ex Bravo., 1978.	San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz y Puebla.

La mayoría de las propuestas filogenéticas para el género *Neobuxbaumia* Backeb son a nivel de la tribu Pachycereeae. Cornejo y Simpson (1997) basados en el diseño mecánico, morfología y ramificación, propusieron al género como monofilético y formando parte de un clado con *C. gigantea*. La Organización Internacional para el estudio de las Suculentas (IOS) propuso la inclusión de las especies del género *Neobuxbaumia* dentro de *Carnegiea* (Terrazas y Loza-Cornejo, 2002). Arias *et al.*, (2003) con datos moleculares (intron *trnL*, espaciador *trnL-F* e intron *rpl16*) y morfológicos (cámara nectarial con diafragma, células epidérmicas con cristales prismáticos, grosor de la pared del fruto menor a 3 mm y células de mucilago abundantes), propuso que las especies *N. euphorbioides*, *N. mezcalaensis*, *N. multiareolata*, *N. polylopha*, *N. scoparia* y *N. tetetzo*, son de origen monofilético y que forman parte de un clado con *Cephalocereus* y *Pseudomitrocereus* (grupo *Cephalocereus*). Por otra parte, Flores (2004) revisó la distribución geográfica, analizó los alcaloides de las nueve especies y caracterizó los patrones de enzimas constitutivas útiles como marcadores taxonómicos del género *Neobuxbaumia*, así, determinó que las especies forman grupos homogéneos bien diferenciados y determinó, mediante análisis cladístico, que el género *Neobuxbaumia* es un grupo monofilético

## **1.2. Estrategias para la elaboración de hipótesis filogenéticas**

Existen al menos dos tendencias para la elaboración de propuestas filogenéticas; una basada en datos morfológicos y otra con base en datos moleculares. Ante la disyuntiva, vale la pena meditar la elección: en los estudios morfológicos los caracteres deben ser descubiertos y delimitados generalmente sin ningún criterio explícito para la selección o la codificación del carácter, por lo que tienen el potencial de ser arbitrarios. Por ejemplo, los morfólogos generalmente no divulgan los criterios para incluir o excluir ciertos caracteres y cuando los manifiestan, varían considerablemente (Hillis, 1987). Por otro lado, el principal argumento en favor de la utilización de caracteres moleculares es que son universales. En muchos casos, principalmente cuando se quiere comparar linajes con divergencia temprana, es imposible establecer hipótesis de homología morfológica; en cambio,

existen genes que pueden proveer información para elaborar reconstrucciones filogenéticas, donde los caracteres morfológicos son inaplicables (Avice, 1994). Las filogenias moleculares también tienen la ventaja de trabajar directamente con la base genética de la variación, mientras que cuando se trabaja con caracteres morfológicos, se asume la base genética. Asimismo, en el acercamiento molecular los caracteres se pueden seleccionar y definir de una manera relativamente objetiva (Hillis y Wiens, 2000). Por su parte, los caracteres morfológicos, permiten un muestreo taxonómico mucho más cuidadoso que el realizado con análisis moleculares, lo que es importante en las revisiones sistemáticas, los estudios de evolución del carácter y la valoración filogenética. Asimismo, los especímenes de museo ofrecen muchos caracteres morfológicos de una gran cantidad de taxa, mientras que un muestreo tan amplio para un estudio molecular puede ser difícil por el alto costo de la secuenciación, la necesidad de material relativamente fresco y la inaccesibilidad de las áreas donde se distribuyen algunos de ellos (Wiens, 2004).

### **1.3. Determinación taxonómica por Código de Barras.**

El uso de marcadores moleculares universales o “código de barras genéticos” es una alternativa relativamente reciente, que consiste en un sistema diseñado para proporcionar de manera rápida, precisa y automatizada la identificación de especies mediante la secuencia de regiones cortas y estandarizadas del ADN (Herbert, 2003). Una ventaja de la identificación utilizando el código de barras es que el ADN se puede obtener de pelos, plumas, huesos y otras partes de los individuos sin tener que sacrificarlos (Biodiversidad, 2012), otra es que no es necesario que las plantas se encuentren en floración para llevar a cabo la identificación (Carrión, 2012). Adicionalmente los códigos de barras genéticos han ayudado a descubrir especies crípticas (Monaghan *et al.*, 2004; Schindel y Miller, 2005) o como complemento en el proceso de delimitar especies (Schindel y Miller, 2005).

La región del genoma utilizada en casi todos los grupos animales es un fragmento de 648 pares de bases del gen que codifica la citocromo oxidasa 1 (CO1) mitocondrial. Sin embargo, CO1 no es una región efectiva en plantas debido a que evoluciona muy lentamente. Alternativamente, fragmentos de dos genes del cloroplasto, *matK* y *rbcL*, han sido aprobadas como las regiones de código de barras para plantas ([www.barcodeoflife.org](http://www.barcodeoflife.org)), la combinación de los dos loci, representan la solución a un complejo equilibrio entre universalidad, calidad de secuencia y costo (CBOL Plant Working Group, 2009).

La región del ADN cloroplástico *matK*, codifica para la proteína maturasa, tiene una longitud aproximada de 1500 pb, está localizada entre los exones 5' y 3' del gen *trnK* en el genoma del cloroplasto, además cuenta con funciones importantes durante el desarrollo de la planta y en procesos como la fotosíntesis y se le ha involucrado en el procesamiento de intrones tipo II de al menos cinco genes del cloroplasto (Barthet y Hilu, 2007) y por su alta tasa evolutiva y que es la región codificadora que evoluciona más rápido en el genoma del cloroplasto se le ha elegido como un marcador genético útil para análisis filogenéticos (Sang *et al.*, 1997).

La región *rbcL* codifica la subunidad larga de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa de 1206 pb (Hasebe *et al.*, 1994), la cual forma parte de la enzima RuBisCo en sus dos tipos de holoenzimas: I (8 *rbcL* y 8 *rbcS*) y II presente en procariontas y dinoflagelados (2 *rbcL*) (Spreitzer y Salvucci, 2002). Esta enzima funciona catalizando dos procesos opuestos, primero la fijación de CO<sub>2</sub> atmosférico a una forma orgánica durante la fotosíntesis y la fotorrespiración en la que actúa como oxigenasa del mismo sustrato (Campbell y Reece, 2007). A nivel de género y rangos taxonómicos más altos, *rbcL* es el gen más utilizado para construir filogenias (Penjor *et al.*, 2010) y por su facilidad de amplificación lo convierten en la opción más apropiada para un código de barras (Kress y Erickson, 2007)

Así, el uso de código de barras del ADN a través de la secuenciación de los marcadores *matK* y *rbcL* de los miembros del género *Neobuxbaumia*, puede servir como herramienta para complementar el conocimiento taxonómico y probablemente permitirá analizar las hipótesis filogenéticas del grupo.

## 2. HIPOTESIS

Las regiones *matK* y *rbcL* fueron elegidas como marcadores únicos para el Código de Barras de la Vida (CBOL) en plantas, ya que cuentan con características que les permiten discriminar entre especies, por lo tanto podrán determinar la identidad taxonómica de las especies del género *Neobuxbaumia* y con esta información construir una propuesta sobre la filogenia del género e indagar su capacidad para discriminar organismos en proceso de especiación como podrían ser los híbridos de *N. mezcalaensis* y *N. macrocephala* del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

## 3. OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

- Analizar los marcadores moleculares *matK* y *rbcL* como código de barras en cactáceas columnares del género *Neobuxbaumia*.

### OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la utilidad de los genes *matK* y *rbcL* para la identificación taxonómica de los miembros del género *Neobuxbaumia*.
- Determinar si los marcadores *matK* y *rbcL* nos permitirán la discriminación taxonómica de los híbridos de *N. mezcalaensis*-*N. macrocephala*.
- Realizar una propuesta filogenética mediante los marcadores *matK* y *rbcL*.

## 4. MATERIALES Y METODOS

### 4.1. Material biológico

Se incluyeron todas las especies del género *Neobuxbaumia* (Cuadro 1) y algunas cuya relación filogenética con este género ha creado confusión: *Carnegia gigantea*, *Cephalocereus columna-trajani*, *Lemaireocereus hollianus* y *Pachycereus weberi* (Terrazas y Loza-Cornejo, 2002; Arias *et al.*, 2003; Flores, 2004; Guzmán *et al.*, 2007), además se incluyeron los híbridos *N. mezcalaensis-N. macrocephala*. El grupo externo (*Stenocereus stellatus*) fue seleccionado con base en el análisis filogenético realizado por Arias *et al.* (2003) y Flores (2004).



Fig. 1. Plántulas de *N. polylopha* germinadas *in vitro* y trasplantadas en tierra, agrolita y tezontle.

Las semillas, fueron desinfectadas con Tween 1% durante 5 min, y enjuagadas con agua estéril, enseguida se colocaron en hipoclorito de sodio al 2% durante un minuto, se enjuagaron con agua estéril, posteriormente fueron colocadas en cajas Petri con agar bacteriano al 1% (esterilizado 15 minutos a 120°C, 15 lb/p<sup>2</sup>). Se mantuvieron en una cámara de germinación a 25°C y fotoperiodo de 12 horas de luz (Flores, 2001; Lozada, 2005). Se colocaron 10 semillas de cada especie (*P. weberi*, *N. polylopha*, *N. mezcalaensis*, *N. macrocephala*, *S. stellatus*, *N. tetetzo*, *N. squamulosa* y *N. scoparia*). Después de la germinación se trasplantaron en

agrolita, tierra y tezontle relación 1:1:1 (Loza-Cornejo y Terrazas, 2012). La extracción de ADN se realizó cuando la plántula tuvo 10 meses de edad.

El tejido de las especies cuyas semillas no germinaron y no se contaba con material biológico fue colectado de organismos silvestres como se describe a continuación. Los híbridos fueron ubicados mediante las coordenadas geográficas (Apéndice 1) y los caracteres reportados por Alejos (2006) (Apéndice 2) en el Valle de Tehuacán Cuicatlán. Se colectó tejido de cuatro individuos de cada fenotipo híbrido. Adicionalmente, se colectó tejido de organismos de las especies *N. macrocephala*, *N. tetetzo*, *N. mezcalaensis* y *C. columna-trajani*, los individuos (cuatro de cada especie) fueron seleccionadas al azar. En el estado de Veracruz, se seleccionaron poblaciones conocidas de *N. scoparia* en Actopan y *N. euphorbioides* en Trapiche del Rosario descritas por Flores (2004), ahí se seleccionaron cinco individuos de cada especie y el tejido fue colectado tal como se describe a continuación.

Se tomó el material vegetal con una navaja previamente sumergida en alcohol al 96%, se realizaron cortes de aproximadamente 10 cm, el tejido fue etiquetados, y congelado inmediatamente con nitrógeno líquido. Antes de congelar el tejido, se tomó un fragmento se depositó en solución Allprotect Tissue Reagent (Qiagen, Cat. No. 76405) la muestra se conservó a temperatura ambiente hasta el momento de su uso (Figura 2). Posteriormente con un pincel se colocó Azufre en la herida ocasionada a los organismos al tomar las muestras, para evitar las infecciones por microorganismos (Flores, 2003).



Fig. 2. Material utilizado para la colecta de tejido.

#### 4.2. EXTRACCIÓN DE ADN

El método de extracción se adaptó a las características del material vegetal, ya que en organismos adultos hay presencia abundante de mucilagos, polisacáridos (Figura 3), metabolitos secundarios y aceites esenciales (Suman *et al.*, 1999; Rivera, 2003).

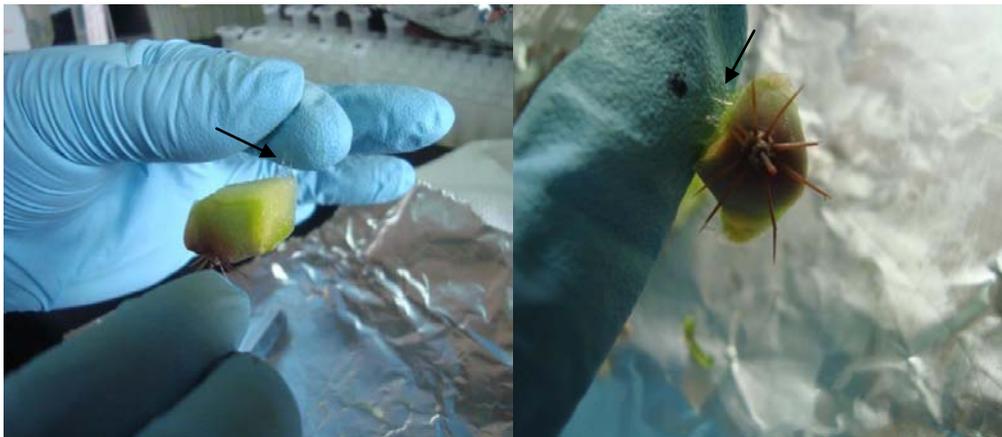


Fig. 3. Mucilago en el tejido de un organismo adulto de *S. stellatus*.

El ADN genómico de tejido de individuos jóvenes (obtenidos a partir de semillas e individuos donados de invernadero), fue obtenido con el sistema ADNzol® de

Invitrogen™ (No. 10503-027 Lot. No. 50563301) (Apéndice 3) siguiendo las instrucciones del proveedor.

Alternativamente, el ADN de tejido de los individuos colectados de campo y de muestras deshidratadas con silica gel fue obtenido mediante el Buffer de extracción de Carlson (Carlson *et al.* 1991). Independientemente del método de extracción se utilizaron 0.5 g de tejido vegetal.

Para verificar la cantidad y calidad del ADN extraído, se tomó una alícuota de 5 µL de cada muestra y fueron separadas por electroforesis en geles de agarosa al 1%, con 0.15 µL/mL de Bromuro de etidio y 3 µL de Buffer de carga (glicerol 30%, azul de bromofenol 0.25% y xileno cianol 0.25%) a 80 Volts por 45 min en buffer TBE 1X y temperatura ambiente. Una vez concluida la separación los geles fueron observados y fotografiados con un transiluminador de luz UV y sistema de digitalización de imágenes Kodak Logic Analyzer 100.

### 4.3. MARCADORES MOLECULARES Y PCR

La secuencia de los oligonucleótidos que se utilizaron se presenta en el cuadro siguiente:

**Cuadro 2. Nombre y secuencia de los Oligonucleótidos utilizados.**

Nombre del primer	Secuencia 5' a 3'	Tamaño del fragmento esperado (pb)
matK Kim 3F	CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG	800
matK Kim 1R	ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC	800
rbcL R	TCGCATGTACCTGCAGTAGC	700
rbcL F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	700

La reacción de amplificación (PCR) se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL, que contenía 22.5 de Buffer Master mix red 1.1X (1.5 mM MgCl<sub>2</sub>) Marca: Amplicon III con No. Cat. 160303; 1 µL (10 mM) de oligonucleótido 5' y 1 µL (10 mM) del oligonucleótido 3' y 3.0 µL del ADN genómico extraído. Las reacciones de PCR se

llevaron a cabo en un termociclador (Modelo: Multigene™ Gradient Thermal Cycler de la marca Labnet). El programa para la amplificación de *matK* y *rbcL* fue el siguiente: un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 40s; 35 ciclos de amplificación integrados por alineamiento a 55°C durante 50s; extensión 72°C durante 1min 15 s y un ciclo de extensión final a 72°C durante 5 min. Los productos de la amplificación fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1% con de Bromuro de etidio (3 µL por cada 20 µL) y buffer de carga a 80 Volts durante 45 min a temperatura ambiente. Al finalizar la separación, los geles fueron observados y fotografiados con un transiluminador de luz UV y digitalizador de imágenes Kodak Logic Analyzer 100.

#### **4.5. Secuenciación, edición y alineamiento**

La secuenciación se realizó en el secuenciador automatizado ABIPrism, 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Foster, California, USA) de la FES Iztacala usando ambos oligonucleótidos.

Los electroferogramas obtenidos con cada oligonucleótido fueron revisados y corregidos manualmente con el programa Chromas 1.45 (Mc Carthy, 1996). Mediante el alineamiento de las secuencias “forward” y “reverse” se obtuvo una secuencia consenso de cada individuo con el programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). Posteriormente, las secuencias *matK* y *rbcL*, fueron comparadas con las disponibles en las bases de datos mediante un alineamiento local (BLAST) en el portal del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Finalmente los alineamientos fueron editados con el programa SEAVIEW (Gouy *et al.*, 2010) para que todas las secuencias tuvieran el mismo número de caracteres. Cada alineamiento fue evaluado por suma de pares con el programa GeneDoc (Nicholas y Nicholas, 1997).

#### **4.6. Cálculo de Distancias Genéticas entre híbridos y sus parentales**

El análisis de distancia genética en híbridos se realizó con las secuencias ya editadas y alineadas de cada individuo. Mediante el programa MEGA5 (Tamura *et*

*al.*, 2011) se realizó un alineamiento mediante ClustalW (Thompson, 1994), dicho alineamiento fue revisado para evitar cualquier error cometido por el programa y si era el caso se arreglaba de forma manual, posteriormente se realizó el análisis de estimación de distancia genética mediante el modelo de Kimura 2-parametros (Kimura, 1980) y finalmente la matriz obtenida fue analizada.

#### **4.7. Cálculo de Distancias Genéticas del género *Neobuxbaumia***

El análisis de distancia genética del género se realizó con las secuencias ya editadas y alineadas de cada individuo. Mediante el programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) se realizó un alineamiento mediante ClustalW (Thompson, 1994), dicho alineamiento fue revisado para evitar cualquier error cometido por el programa y si era el caso se arreglaba de forma manual, posteriormente se realizó el análisis de estimación de distancia genética mediante el modelo de Kimura 2-parametros (Kimura, 1980) y finalmente la matriz obtenida fue analizada.

#### **4.8. Análisis Filogenético del género *Neobuxbaumia***

Los alineamientos fueron editados con el programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) y evaluados mediante el modelo de suma de pares con el programa Genedoc (Nicholas y Nicholas, 1997). El análisis filogenético se realizó con el programa PAUP4.0 (Swofford, 2000), por el método de Máxima parsimonia para lo cual se realizó una búsqueda heurística con 1000 réplicas, la adición de secuencias fue al azar y el método TBR para intercambiar ramas. Se realizó un análisis de robustez bootstrap con 10000 interacciones, en ese árbol las relaciones con soporte menor a 50% fueron colapsadas. El grupo externo utilizado fue *S. stellatus* (Arias *et al.*, 2003).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Material biológico

Material biológico de trece especies fue obtenido de las fuentes enlistadas en el cuadro 3, semillas de siete especies, tejido deshidratado en silica gel de tres, organismos juveniles de tres y material congelado de una especie. De las especies *N. polylopha*, *N. squamulosa* y *N. mezcalaensis* se obtuvo tanto tejido deshidratado como semillas, y del grupo externo se consiguió semillas y organismos juveniles. De la especie *N. multiareolata* no se obtuvo material biológico de ningún tipo.

**Cuadro 3. Donadores de material biológico, especies facilitadas, características del material, lugar de colecta y número de individuos.**

DONADOR	ESPECIES	CARACTERISTICAS	LUGAR DE COLECTA	No. DE INDIVIDUOS
Dra. Teresa Terrazas UNAM	<i>N. squamulosa</i>	Tejido deshidratado en silica gel.	El aguacate, Gro.	2
	<i>N. mezcalaensis</i>	Tejido deshidratado en silica gel.	Ixtapa, Gro.	2
	<i>N. polylopha</i>	Tejido deshidratado en silica gel.	Petlalingo, Gro.	2
Biól. Marcial García FESI	<i>N. polylopha</i>	Semillas	Jardín Botánico FES-Iztacala 2011	1 fruto
Lab. Fisiología Vegetal UBIPRO FESI	<i>N. macrocephala</i>	Semillas	km4 Los Reyes Mezontla 2004	10
	<i>N. scoparia</i>	Semillas	Veracruz 2001	30
	<i>N. squamulosa</i>	Semillas	Carretera a Manzanillo 2002	30
	<i>N. mezcalaensis</i>	Semillas	San Martin 2005	10
	<i>N. tetetzo</i>	Semillas	Zapotitlan 2005	10

<i>P. hollianus</i>	Organismos juveniles invernadero	Invernadero UBIPRO	5
<i>P. weberi</i>	Semillas	San Martin 2011	10
<i>C. gigantea</i>	Organismos juveniles invernadero	Invernadero UBIPRO	5
<i>S. stellatus</i>	Organismos juveniles invernadero	Invernadero UBIPRO	5
<i>N. laui</i>	Material congelado	Laboratorio de Fisiología	1
	Individuo juvenil invernadero	Vegetal Invernadero UBIPRO	1

La germinación de las semillas de *N. polylopha* y *P. weberi* fue del 90%, *N. mezcalaensis* 70%, *N. macrocephala* y *S. stellatus* fue del 30%, para *N. tetetzo*, *N. scoparia*, y *N. squamulosa* fue nula. Para lograr la germinación de las semillas de las dos últimas especies se realizaron diversas modificaciones al ensayo: se cambió el método de limpieza para eliminar la probable contaminación, se agregó ácido giberélico 1000 ppm al agar para eliminar la latencia como factor que inhibiera la germinación, logrando la germinación de una semilla de *N. squamulosa* que sin embargo no sobrevivió para permitir la extracción.

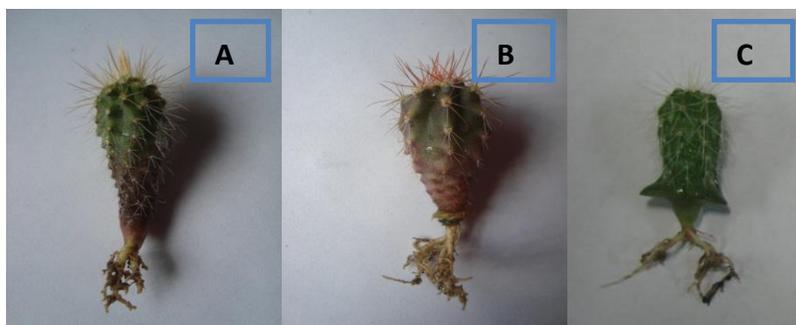


Fig. 4. Plántulas de 10 meses de edad de *N. polylopha* (A), *P. weberi* (B) y *N. mezcalaensis* (C)

Se realizaron dos salidas al campo para obtener tejido de especies cuyo tejido no fue posible obtener de los donadores: la primera en mayo del 2011 al Valle de Tehuacán Cuicatlán (Oaxaca y Puebla) y la segunda en octubre del 2012 a

Trapiche del Rosario (Veracruz). En estas salidas se obtuvo tejido de 5 especies de *Neobuxbaumia*, 1 especie de *Cephalocereus* y 2 de organismos con fenotipo híbridos (*N. macrocephala*-*N. mezcalaensis*). Las especies, localidades de cada colecta y el número de individuos muestreados se presentan en el cuadro 4.

**Cuadro 4. Especies, lugares de colecta de tejido tanto de los híbridos como sus parentales.**

ESPECIE	LUGAR DE COLECTA	No. DE INDIVIDUOS
<i>N. macrocephala</i>	Tehuacán-Cuicatlán	4
<i>N. mezcalaensis</i>	Tehuacán-Cuicatlán	4
<i>N. tetetzo</i>	Jardín Botánico Helia Bravo N 18° 19' 40" W 97° 27' 35"	4
<i>C. columna-trajani</i>	Tehuacán-Cuicatlán	4
Hibrido Fenotipo 1	Tehuacán-Cuicatlán N 18° 15' 165" W 97° 32' 885"	1
	N 18° 14' 297" W 97° 33' 338"	1
	N 18° 14' 463" W 97° 33' 036"	1
	N 18° 14' 455" W 97° 32' 964"	1
Hibrido Fenotipo 2	Tehuacán-Cuicatlán N 18° 15' 165" W 97° 32' 885"	1
	N 18° 14' 297" W 97° 33' 338"	1
	N 18° 14' 418" W 97° 33' 055"	1
	N 18° 14' 463" W 97° 33' 036"	1
<i>N. scoparia</i>	Actopan, Ver. N 19° 0.49' 924" 096° 0.58' 613"	5
<i>N. euphorbioides</i>	Trapiche del Rosario, Ver. N 19° 32' 0.770' W 96° 44' 0.265'	5

## 5.2. Extracción de ADN

Se extrajo ADN de 78 individuos: 46 del género *Neobuxbaumia*, ocho de los dos fenotipos híbridos, cinco del género *Pachycereus*, cinco del género de *Lemaireocereus*, cinco del género *Carnegiea*, cuatro de *C. columna-trajani* y cinco de *S. stellatus*. Los individuos del género *Neobuxbaumia* pertenecían a distintas poblaciones: cuatro individuos de *N. mezcalaensis* provenían de Tehuacán-Cuicatlán, 2 individuos Teplatcingo, Guerrero (donados por la Dra. Terrazas) y dos individuos de San Martín reserva de Tehuacán-Cuicatlán (germinado). Los individuos de *N. macrocephala* de los cuales se extrajo material genético cuatro fueron colectados en Tehuacán-Cuicatlán y dos fueron germinados de semillas germinadas de los Reyes Mezontla. Finalmente, las fuentes de ADN de la especie *N. polylopha* fueron cinco individuos obtenidos de semillas del Jardín Botánico de la FESI y 2 donados por la Dr. Terrazas (Cuadro 3).

La extracción con el método ADNzol® fue eficiente con tejido de plántulas y organismos juveniles debido al bajo contenido de mucilago y polisacáridos. El rendimiento aproximado de ADN fue de 20 ng/μL partiendo de 0.5 gramos de tejido (Figuras 5). El protocolo de extracción fue el más rápido y sencillo.

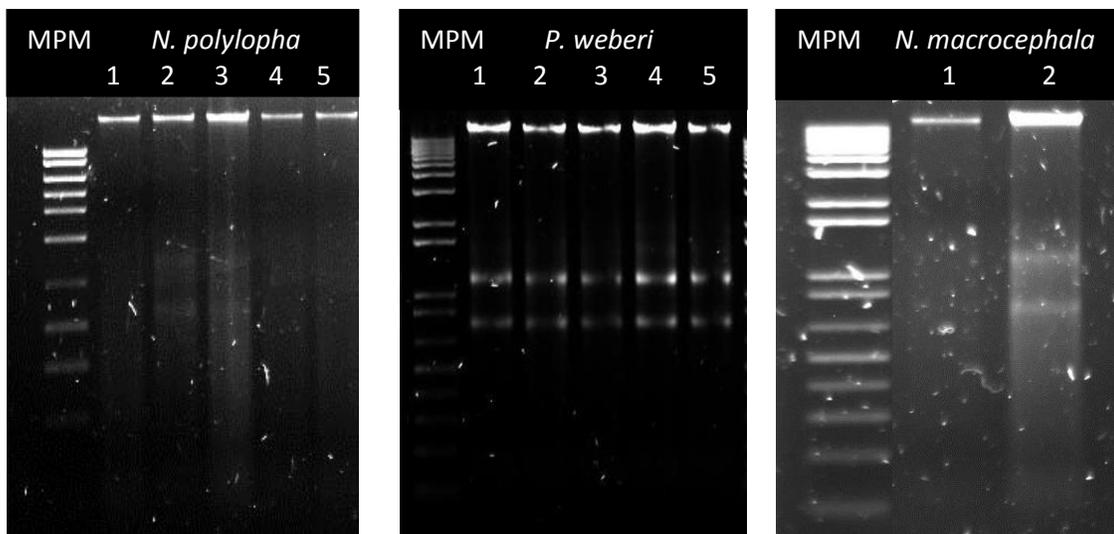


Fig. 5. ADN extraído con el sistema ADNzol® a partir de plántulas de 10 meses de edad, en A) 5 individuos de *N. polylopha*; B) cinco individuos de la especie *P. weberi*, C) 2 individuos de *N. macrocephala*. En cada gel se incluyó un Marcador de peso molecular (MPM).

El método CTAB (Apéndice 4) permitió la extracción del ADN de individuos adultos la cual no se logró con el sistema ADNzol® debido a la gran cantidad de mucilago. Sin embargo el método fue más prolongado y el rendimiento de ADN fue menor respecto al método ADNzol®. La cantidad de tejido utilizado fue 0.5 g aproximadamente.

El material conservado en All protect o en silica gel, permitieron la extracción ADN más fácil y rápido con el método CTAB. (Apéndice 5) (Figura 6).

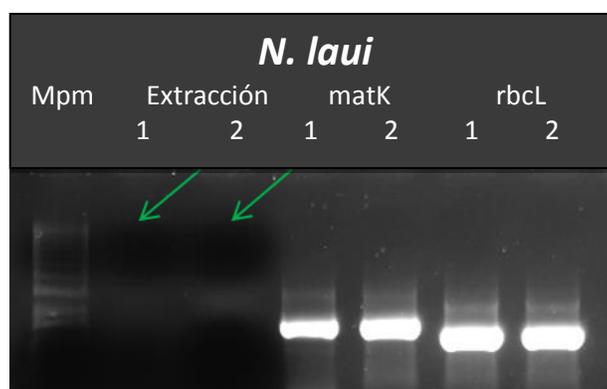


Fig. 6. Producto de extracción con CTAB (carril 2 y 3) de *matK* y *rbcL* (carriles 4 a 7) de 2 individuos de la especie *N. laui*.

### 5.3. PCR y SECUENCIACION

Se amplificaron por PCR los fragmentos *matK* de 70 individuos y mientras que se logró el amplicon *rbcL* de 73 individuos. No se logró la amplificación de *matK* con el ADN de dos individuos de *N. scoparia* ni con uno de *N. euphorbioides* (Figura 7).

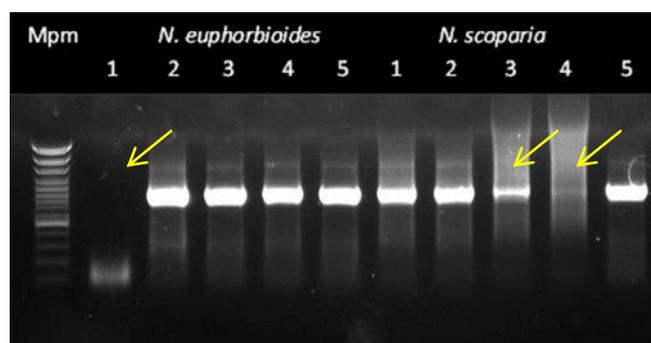


Fig. 7. Producto de PCR (*matK*) de *N. euphorbioides* (carril 1 a 5) y *N. scoparia* (carril 6 al 11).

En la figura 8 se presentan algunos de los productos *matK* y *rbcl* obtenidos con el resto de las especies

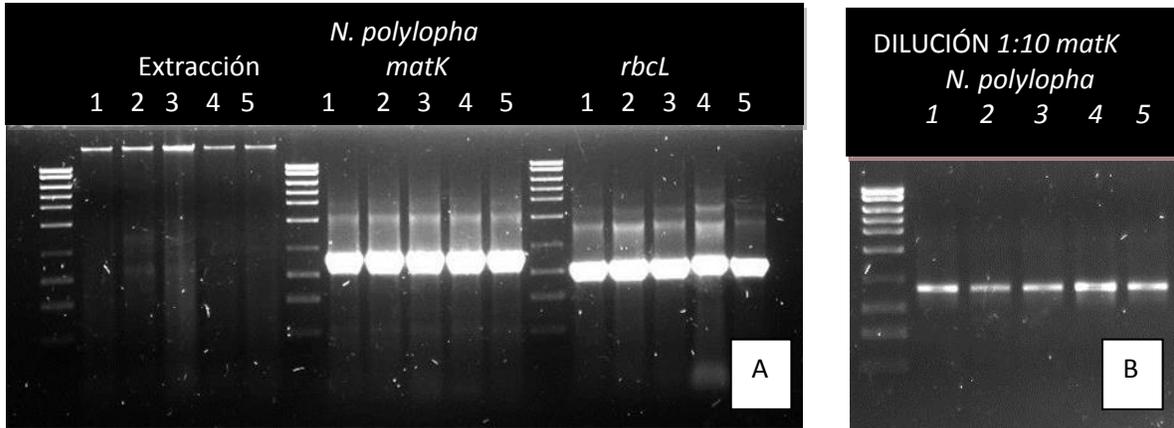


Fig. 8. A) Productos de la extracción y amplificación por PCR de *matK* y *rbcl* de *N. polylopha* y B) Dilución 1/10 del producto de PCR de *matK*. En ambos geles se incluye el marcador de peso molecular 1 Kb plus

Las reacciones de secuenciación del fragmento *rbcl* arrojaron secuencias con longitud entre 655 y 717pb (Figura 9).

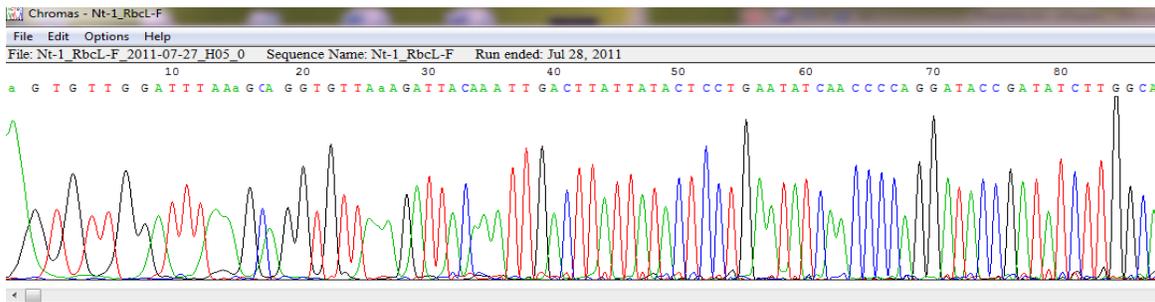


Fig. 9 Parte de un electroferograma obtenido con el oligonucleótido forward *rbcl* y ADN de un individuo de *N. tetetzo*.

Mientras que los fragmentos *matK* secuenciados tuvieron longitud entre 790 y 843 pb. Los amplicones *matK* y *rbcl* de *N. squamulosa* produjeron secuencias de poca calidad que no permitieron su edición y por tanto no se tomaron en cuenta en los análisis posteriores (Figura 10). En el resto de las especies se obtuvieron secuencias de buena calidad y fácil edición (Figura 11).

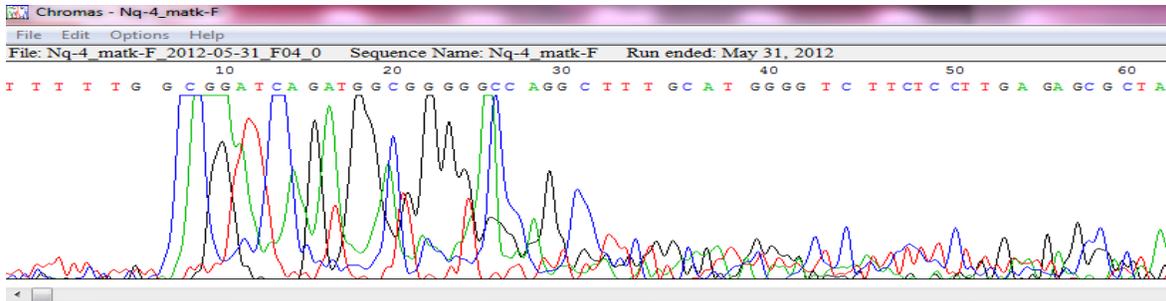


Fig. 10 Parte de un electroferograma obtenido con el oligonucleotido forward *matK* y ADN de un individuo de la especie *N. squamulosa*.

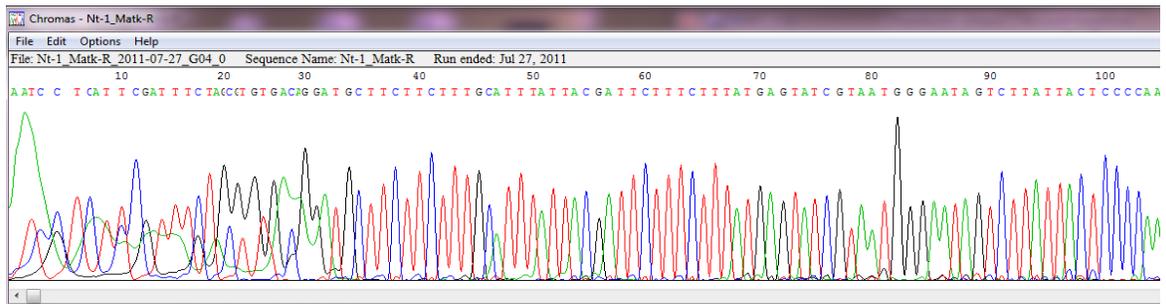


Fig. 11 Parte de un electroferograma obtenido con el oligonucleotido reverse *matK* y ADN de un individuo de la especie *N. tetetzo*.

#### 5.4. Edición y Alineamiento

El alineamiento de las secuencias *matK* y *rbcL* permitió identificar que las secuencias atribuidas a *N. squamulosa* presentaban divergencia elevada con las otras especies incluso entre las atribuidas a otros individuos de la misma especie, inclusive la comparación con BLAST indicó elevada identidad con el género *Lantana*, por lo que fueron excluidas del análisis posterior. Finalmente se obtuvieron secuencias *matK* y *rbcL* de 14 especies con porcentaje elevados de identidad con las cuales se procedió a calcular la Distancia Genética.

#### 5.5. Matriz de distancia genética entre híbridos y sus parentales

Se obtuvo una matriz de Distancia Genética utilizando el modelo de Kimura 2 Parámetros y las secuencias *matK* y *rbcL* de los híbridos, sus parentales y *S. stellatus* como grupo externo.

La matriz de distancia con *matK* muestra (Cuadro 5) que las secuencias entre parentales e híbridos son idénticas (independientemente del fenotipo 1 o 2) y que por tanto la distancia del grupo externo (*S. stellatus*) respecto a las especies parentales e híbridos es idéntica (0.8%).

**Cuadro 5. Matriz de Distancia Genética (Kimura 2 parámetros) entre secuencias *matK* de híbridos y sus parentales.**

	1	2	3	4	5	6
1. Fenotipo Híbrido 1						
2. Fenotipo Híbrido 2	0.000					
3. <i>N. macrocephala</i>	0.000	0.000				
4. <i>N. mezcalaensis</i>	0.000	0.000	0.000			
5. <i>N. tetetzo</i>	0.001	0.001	0.001	0.001		
6. <i>S. stellatus</i>	0.008	0.008	0.008	0.008	0.009	

La matriz obtenida con la secuencia *rbcL* muestra que las secuencias de híbridos y parentales son idénticas (independientemente del fenotipo 1 o 2) (Cuadro 6) y que la secuencia de *N. tetetzo* muestra una divergencia de 0.5% respecto a

híbridos y sus parentales, mientras que el grupo externo difiere 1.7% respecto al grupo parentales híbridos y 2.2% con relación a *N tetetzo*.

**Cuadro 6. Matriz de Distancia Genética (Kimura 2 parámetros) entre las secuencias *rbcL* de híbridos y sus parentales.**

	1	2	3	4	5	6
1. Fenotipo Híbrido 1						
2. Fenotipo Híbrido 2	0.000					
3. <i>N. macrocephala</i>	0.000	0.000				
4. <i>N. mezcalaensis</i>	0.000	0.000	0.000			
5. <i>N. tetetzo</i>	0.005	0.005	0.005	0.005		
6. <i>S. stellatus</i>	0.017	0.017	0.017	0.017	0.022	

El Cuadro 7 muestra las distancias genéticas entre los individuos incluyendo las secuencias de ambos marcadores *matK* y *rbcL*, como es de esperarse, la distancia entre el grupo parental e híbridos es cero y la de *N. tetetzo* con el grupo anterior sólo alcanza 0.3%, mientras que la del grupo externo (*S. stellatus*) y el grupo parental e híbrido solo asciende a 1.2% y a 1.5% con *N. tetetzo*.

**Cuadro 7. Matriz de Distancia Genética Kimura 2 parámetros entre secuencias *rbcL+matK* de híbridos y sus parentales.**

	1	2	3	4	5	6
1. Fenotipo Híbrido 1						
2. Fenotipo Híbrido 2	0.000					
3. <i>N. macrocephala</i>	0.000	0.000				
4. <i>N. mezcalaensis</i>	0.000	0.000	0.000			
5. <i>N. tetetzo</i>	0.003	0.003	0.003	0.003		
6. <i>S. stellatus</i>	0.012	0.012	0.012	0.012	0.015	

## 5.6. Matriz de distancia genética de los miembros del género *Neobuxbaumia*

Se obtuvo una matriz de Distancia Genética utilizando el modelo de Kimura 2 Parámetros con el programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011). Se utilizaron las secuencias *matK* y *rbcL* por separado y en conjunto, de los miembros del género *Neobuxbaumia*, junto con los miembros de otros género que han causado controversia: *C. columna-trajani*, *L. hollianus*, *P. weberi*, *C. gigantea* y como grupo externo *S. stellatus*. Los análisis incluyeron a 12 secuencias finales, una por especie ya que las secuencias a pesar de venir de distintos individuos y poblaciones son iguales.

**Cuadro 8. Matriz de Distancia Genética (Kimura 2 parámetros) entre secuencias *matK* de los miembros del género *Neobuxbaumia* y algunos de sus posibles parentales.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1. <i>N. euphorbioides</i>											
2. <i>N. scoparia</i>	0.006										
3. <i>N. polylopha</i>	0.005	0.001									
4. <i>N. laui</i>	0.009	0.005	0.004								
5. <i>N. macrocephala</i>	0.006	0.003	0.001	0.004							
6. <i>N. mezcalaensis</i>	0.006	0.003	0.001	0.004	0.000						
7. <i>N. tetetzo</i>	0.008	0.004	0.003	0.005	0.001	0.001					
8. <i>C. columna-trajani</i>	0.008	0.004	0.003	0.005	0.001	0.001	0.000				
9. <i>L. hollianus</i>	0.012	0.008	0.006	0.010	0.008	0.008	0.009	0.009			
10. <i>P. weberi</i>	0.008	0.004	0.003	0.006	0.004	0.004	0.005	0.005	0.004		
11. <i>C. gigantea</i>	0.012	0.008	0.006	0.010	0.008	0.008	0.009	0.009	0.005	0.004	
12. <i>S. stellatus</i>	0.012	0.008	0.006	0.010	0.008	0.008	0.009	0.009	0.005	0.004	00

El número de caracteres utilizados para la matriz de distancia de las secuencias *matK* fue de 780. La matriz muestra (Cuadro 8) bajo poder resolutivo entre los individuos del género *Neobuxbaumia* ya que tienen porcentajes menores al 1%, incluso indica con secuencias homólogas a las especies *N. tetetzo* y *C. columna-trajani*, *N. mezcalaensis* y *N. macrocephala* e incluso *C. gigantea* y *S. stellatus*, debido al bajo poder discriminante de este gen, a pesar de que son especies distintas e incluso en el caso de *C. gigantea* y *S. tellatus* son de distintas subtribus.

El número de caracteres utilizados para la matriz de distancia de las secuencias de *rbcL* fue un total de 641 caracteres de las secuencias. Dicha matriz, nos indica que el gen *rbcL* (Cuadro 9) también tiene un bajo poder resolutivo entre los individuos del género *Neobuxbaumia* ya que tienen porcentajes menores al 1%, indica como secuencias homólogas las especies *N. mezcalaensis* y *N. macrocephala*. Pero, muestra un mayor poder discriminante entre géneros ya que tuvieron valores mayores al 1%, incluso del 2.2% en el caso de *P. weberi* - *S. stellatus* y del 2.1% entre *P. weberi* - *C. gigantea*, el único género que muestra valores menores al 1% es la especie *C. columna-trajani* del género *Cephalocereus*.

**Cuadro 9. Matriz de Distancia Genética (Kimura 2 parámetros) entre secuencias *rbcL* de los miembros del género *Neobuxbaumia*.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>1. <i>N. euphorbioides</i></b>											
<b>2. <i>N. scoparia</i></b>	0.004										
<b>3. <i>N. polylopha</i></b>	0.003	0.001									
<b>4. <i>N. laui</i></b>	0.006	0.003	0.003								
<b>5. <i>N. macrocephala</i></b>	0.004	0.001	0.001	0.001							
<b>6. <i>N. mezcalaensis</i></b>	0.004	0.001	0.001	0.001	0.000						
<b>7. <i>N. tetetzo</i></b>	0.007	0.004	0.004	0.004	0.003	0.003					
<b>8. <i>C. columna-trajani</i></b>	0.005	0.002	0.002	0.002	0.001	0.001	0.002				
<b>9. <i>C. gigantea</i></b>	0.014	0.011	0.011	0.013	0.011	0.011	0.014	0.012			
<b>10. <i>P. weberi</i></b>	0.019	0.016	0.016	0.018	0.016	0.016	0.019	0.017	0.021		
<b>11. <i>L. hollianus</i></b>	0.013	0.010	0.010	0.011	0.010	0.010	0.013	0.011	0.011	0.019	
<b>12. <i>S. stellatus</i></b>	0.015	0.012	0.012	0.014	0.012	0.012	0.015	0.013	0.001	0.022	0.011

El Cuadro 10 muestra las distancias genéticas entre los individuos incluyendo las secuencias de ambos marcadores *matK* y *rbcL*, en la que nuevamente se observa que entre las especies del género *Neobuxbaumia* se obtienen porcentajes mejores al 1% y se siguen considerando secuencias homólogas *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis*. Se mantiene la discriminación entre géneros ya que tuvieron valores mayores al 1%, incluso del 2.2% en el caso de *P. weberi* - *S. stellatus* y del 2.1% entre *P. weberi* - *C. gigantea*, el único género que muestra valores menores al 1% es la especie *C. columna-trajani* del género *Cephalocereus*.

**Cuadro 10. Matriz de Distancia Genética (Kimura 2 parámetros) entre secuencias *rbcL+matK* de los miembros del género *Neobuxbaumia*.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>1. <i>N. euphorbioides</i></b>											
<b>2. <i>N. scoparia</i></b>	0.004										
<b>3. <i>N. polylopha</i></b>	0.003	0.001									
<b>4. <i>N. laui</i></b>	0.006	0.003	0.003								
<b>5. <i>N. macrocephala</i></b>	0.004	0.001	0.001	0.002							
<b>6. <i>N. mezcalaensis</i></b>	0.004	0.001	0.001	0.001	0.000						
<b>7. <i>N. tetetzo</i></b>	0.007	0.004	0.004	0.005	0.003	0.003					
<b>8. <i>C. columna-trajani</i></b>	0.005	0.002	0.002	0.003	0.001	0.001	0.002				
<b>9. <i>L. hollianus</i></b>	0.013	0.010	0.010	0.011	0.010	0.010	0.013	0.011			
<b>10. <i>P. weberi</i></b>	0.019	0.016	0.016	0.018	0.016	0.016	0.019	0.017	0.019		
<b>11. <i>C. gigantea</i></b>	0.014	0.011	0.011	0.013	0.011	0.011	0.014	0.012	0.011	0.021	
<b>12. <i>S. stellaus</i></b>	0.015	0.012	0.012	0.014	0.012	0.012	0.015	0.013	0.011	0.022	0.001

## 5.7. Análisis Filogenético entre miembros del género *Neobuxbaumia*

El número de caracteres útiles de las secuencias *matK* fue de 780 y los de *rbcL* de 641. El alineamiento de las secuencias *rbcL* mostraron 86 (13.3%) caracteres variables de los cuales 36 fueron parsimoniosos informativos. Por su parte el alineamiento con las secuencias *matK* mostró 16 (2%) caracteres variables de los cuales todos fueron informativos (Cuadro 8). En conjunto las secuencias *matK* y *rbcL* muestran 102 (7.1%) caracteres variables de los cuales 52 son parsimoniosos.

Cuadro 11. Información de las secuencias *matK*, *rbcL* obtenidas y utilizadas en este trabajo.

	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>	<i>matK+rbcL</i>
No. de especies	14	14	14
No. de caracteres totales	780	646	1421
No. de caracteres variables	16 (2%)	86(13.3%)	102 (7.1%)
No. De caracteres informativos	16 (2%)	36(5.5%)	52 (3.6%)

La Figura 12 nos muestra el árbol consenso construido a partir de 130 árboles igualmente parsimoniosos con una longitud de 17 pasos (CI: 0.986, RI: 0.942) con base en 780 caracteres de la secuencia *matK*. El cladograma muestra al grupo *Neobuxbaumia* apoyado con un valor de 91% bts, en este clado (denominado grupo *Neobuxbaumia*), se encuentra la especie *C. columna-trajani* relacionada con *N. tetetzo* (con soporte de 69% bts. Las otras especies cuya relación filogenética con este género ha creado confusión, quedaron fuera del género *Neobuxbaumia*.

La Figura 13 nos muestra el árbol consenso construido a partir de 122 árboles igualmente parsimoniosos con longitud de 98 pasos (CI: 0.948, RI: 0.8936), con base en 641 caracteres de la secuencia *rbcL*. El cladograma muestra al grupo *Neobuxbaumia* como un género de origen monofilético con apoyo de 86% de

bootstrap, en el que se incluye la especie *C. columna-trajani*. A diferencia del árbol construido con *matK*, *C. comuna-trajani* no mantiene una relación estrecha con *N. tetetzo*. Pero en cambio, se puede observar en el mismo grupo que *N. polylopha* y *N. euphorbioides* comparten un ancestro común (soportado por 65% bootstrap). Se puede observar que es consistente la separación entre los géneros.

El árbol filogenético construido con las secuencias *matK* y *rbcL* presentado en la Figura 14, consensua las relaciones establecidas en 110 árboles igualmente parsimoniosos con longitud de 56 pasos (CI= 0.953, RI= 0.914). Se muestra al grupo *Neobuxbaumia* (soporte de 99% bts), Dentro de este grupo, la combinación de ambos marcadores aun con soportes bajos, sugiere una relación entre *C. columna-trajani* y *N. tetetzo* (66% bts), así como entre las especies *N. polylopha* y *N. euphorbioides* (71% de bts). Las relaciones de los otros géneros como era de esperarse, se mantienen idénticas a los árboles anteriores.

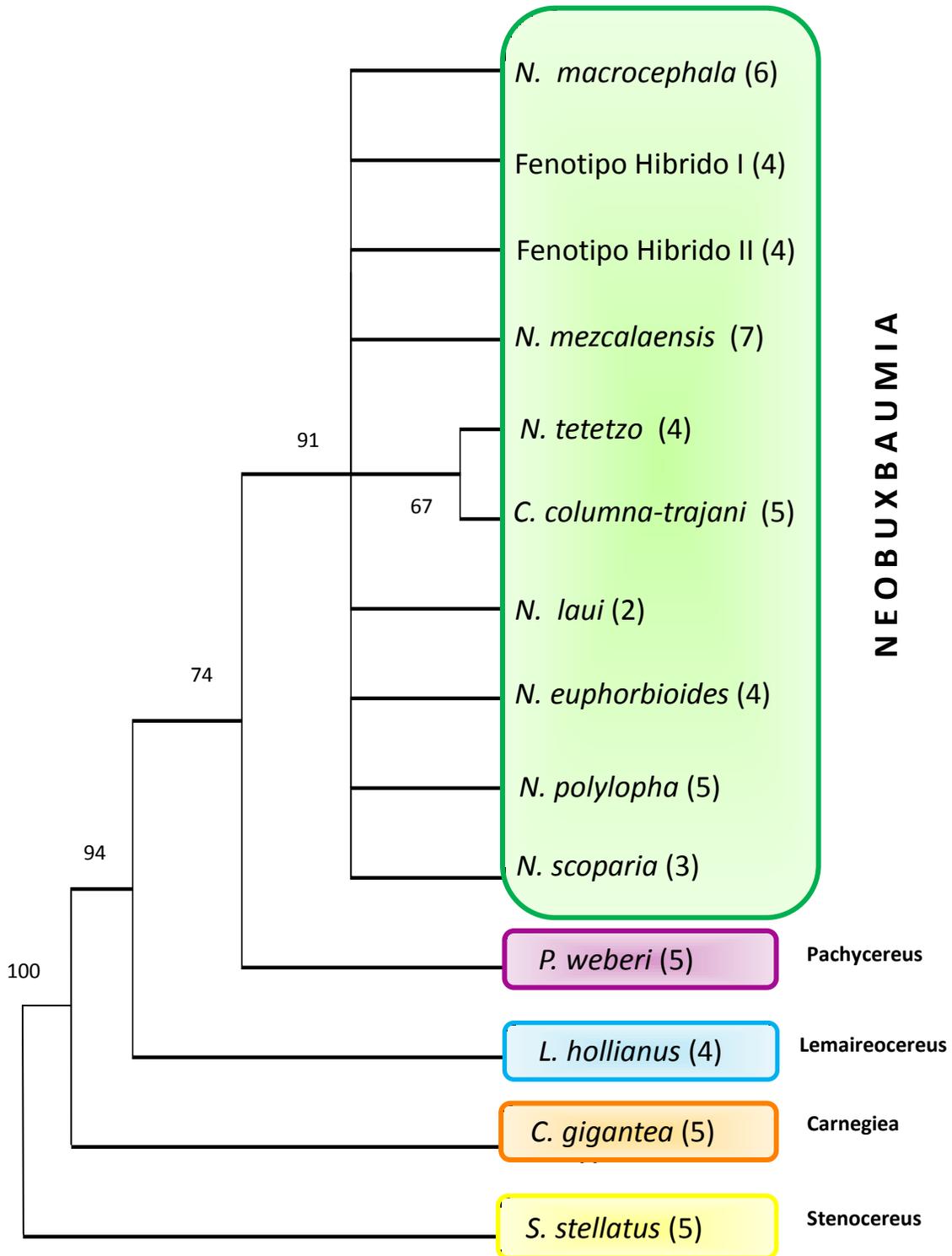


Fig. 12. Árbol filogenético construido mediante el criterio de máxima parsimonia y la secuencia *matK*. El árbol consenso fue obtenido a partir de una prueba bootstrap de 1000 repeticiones. Los valores de confianza bootstrap se muestran con números a lado de los clados. Los números entre paréntesis al final de las ramas terminales indican el número de individuos analizados por especie.

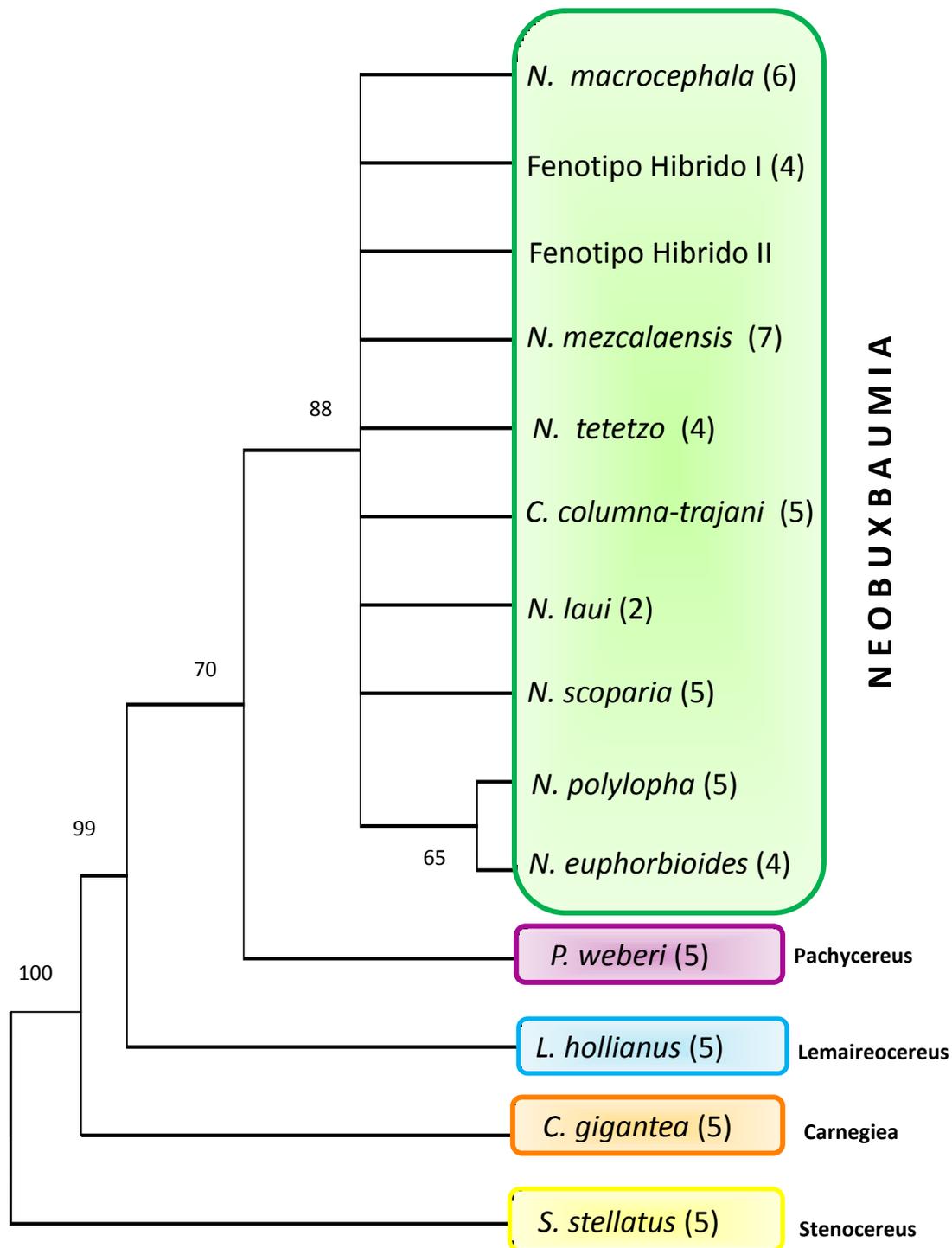


Fig. 13. Árbol filogenético construido mediante el criterio de Máxima Parsimonia con la secuencia *rbcL*. El árbol consenso fue obtenido a partir de una prueba bootstrap de 1000 repeticiones. Los valores de confianza bootstrap se muestran con números a lado de los clados. Los clados apoyados con valores menores a 50% fueron colapsados. Los números entre paréntesis al final de las ramas terminales indican el número de individuos analizados por especie.

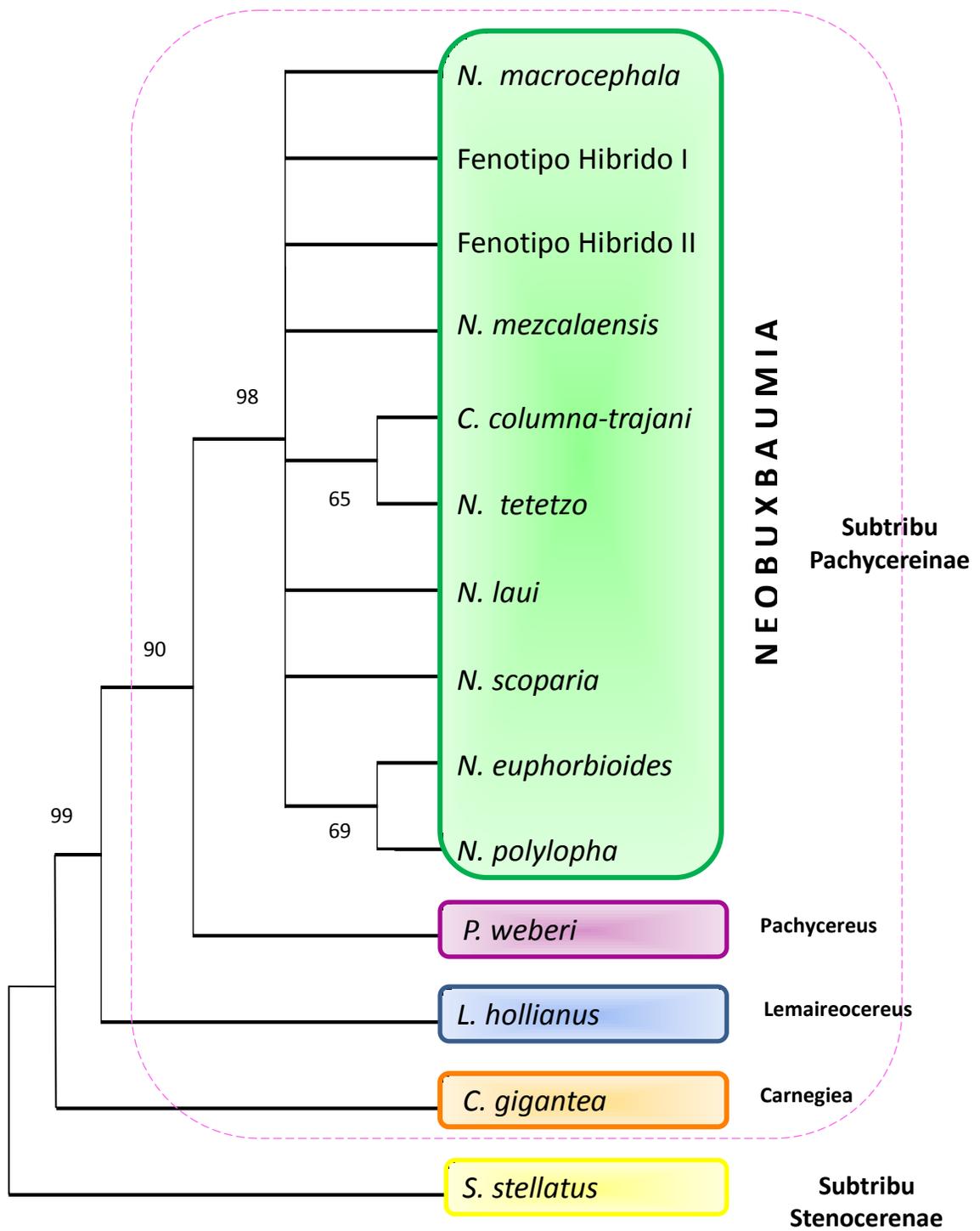


Fig. 15. Árbol filogenético construido mediante el criterio de Máxima Parsimonia con la secuencia *rbcl* y *matK*. El árbol consenso fue obtenido a partir de una prueba bootstrap de 1000 repeticiones. Los valores de confianza bootstrap se muestran con números a lado de los clados. Los clados apoyados con valores menores a 50% fueron colapsados. Los números entre paréntesis al final de las ramas terminales indican el número de individuos analizados por especie. .

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. Matriz de distancia genética entre híbrido y sus parentales

Las matrices de distancia genética entre los híbridos y sus parentales, consideran las secuencias homólogas, es decir como la misma especie (Tablas 5, 6 y 7) por lo que *matK* y *rbcL* mostraron que en conjunto y por separado carecen de capacidad para su discriminación a pesar de sus diferencias morfológicas (Alejos, 2006). Sin embargo, en otras familias como Orchidaceae el código de barras genético *matK* permitió revelar especies crípticas y resultó útil en la determinación de especies (Lahaye *et al.*, 2007; Cuellar, 2010). A su vez, códigos de barras universales como COI (animales), han permitido la discriminación de especies crípticas e incluso híbridos (Herbert *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2006; Herbert y Gregory 2005). No obstante, la tarea más difícil para los códigos de barras de ADN en plantas es resolver especies hermanas o especies muy relacionadas (Newmaster y Subramanyam 2009), como nuestros híbridos y sus parentales, esto probablemente se deba a que la divergencia absoluta de la secuencia entre especies hermanas es muy variable, ya que se ve afectado por el tiempo transcurrido desde la especiación, tasa de mutación, etc. (Ford *et al.*, 2009). La subtribu Pachycereinae es considerada como la de origen más reciente (Dávila-Aranda *et al.*, 2002), se ha calculado que tiene una edad de entre 9.07 a 6.68 m.a, en tanto para el género *Cephalocereus* 1.62 a 2.02 millones de años, para el género *Stenocereus* 2.39 a 3.68 m.a, género *Pachycereus* 4.26 a 5.22 m.a. y para el género *Neobuxbaumia* de 1.7 a 2.8 m.a. (Barba 2009; Barba 2012; Hernández-Hernández *et al.*, 2011). Tal vez el origen reciente de este grupo podría explicar porque estas secuencias no han divergido lo suficiente y a su vez, que siendo especies relativamente recientes permitan procesos de hibridación, como el caso que aquí se aborda e incluso el reportado entre *N. tetetzo* y *C. columna-trajani* quienes cuentan con un descendiente híbrido en el mismo Valle de Tehuacán Cuicatlán (Vite *et al.*, 1994). Así, probablemente la cercanía filogenética dificulta la discriminación misma de las especies y sus descendientes híbridos utilizando estos marcadores moleculares.

## 6.2. Matriz de distancia genética del género *Neobuxbaumia*

El principio básico de los códigos de barras de la vida, es que permitan la discriminación entre especies, sin embargo las matrices de distancia (Tablas 8, 9 y 10) aplicadas al género no han permitido la discriminación de especies, incluso algunas presentaron secuencias homólogas. La región *matK* utilizada no pudo discriminar entre especies y géneros, ya que los valores en su mayoría fueron distancias menores a 1% (Cuadro 8), estando por debajo del umbral de 2% propuesto por Herbert *et al.* (2004) y por lo tanto no serían reconocidas como especies a pesar de las diferencias biológicas. Del mismo modo, con una muestra de 528 especies de cactáceas, determinaron que *matK* permitió ubicarlas de manera correcta a nivel genérico, pero que a nivel de especie solo ubicó a 34 especies (6%) (Yesson *et al.*, 2011), por lo que se cuestiona la universalidad de esta región como marcador, se considera que esto es debido a que no existen marcadores universales para esta región (Ran *et al.*, 2010), el uso en su totalidad del gen *matK* no resulta tan informativo porque algunas secciones del gen son más informativas e incluso algunas regiones proporcionan problemas al realizar filogenias (Hilu y Liang, 1997). Sin embargo, en otros trabajos, utilizando *matK* más el intron *trnK* ha sido posible resolver dudas filogenéticas en el nivel de subfamilia y género (Hernández-Hernández *et al.*, 2011; Bárcenas y Hawkins 2011). Incluso, en otras familias como Orchidaceae se logró el 100% de la identificación de orquídeas en peligro de extinción en Veracruz, con el marcador *matK* y mientras que *rbcL* permitió la asignación del 80% (Cuéllar,; 2011).

En el caso del marcador *rbcL* (Cuadro 9) dentro de las especies del género *Neobuxbaumia* no se logró discriminar especies, no obstante hay valores mayores al 1% en cuanto a la discriminación de distintos géneros (*Lemainocereus*, *Carnegiea*, *Pachycereus* y el grupo externo *Stenocereus*) excepto la especie del género *Cephalocereus*. Dentro de las angiospermas el gen *rbcL* ha sido ampliamente secuenciado y utilizado para inferir filogenias de plantas en los niveles taxonómicos superiores (Wikstrom, 2001, Wallace, 2002; Anderson *et al.*

2005; Hernández-Hernández *et al.*, 2011). Desafortunadamente *rbcL* no suele contener suficiente información para resolver las relaciones entre géneros estrechamente relacionados (Gyelly y Taberlet 1994), también se ha observado que el nivel de variación interespecífico es bajo (Renner, 1999; Salazar *et al.*, 2003; Kress *et al.*, 2005). Se evaluaron 10,000 secuencias de *rbcL* del Gen Bank, como código de barras en diferentes grupos, teniendo un 88% de eficacia, teniendo los mejores resultados en musgos, sin embargo, en otros grupos se encuentra altamente conservada, como en el género *Pinus* que tuvieron muchas secuencias idénticas y en general se consideró que en gimnospermas fue un fracaso (Newmaster *et al.*, 2006). En un análisis a 99 especies de 80 géneros de 53 familias *rbcL* fue por mucho, la que presentó menor divergencia 0.38% en comparación con otros marcadores (Kress *et al.*, 2005). En otros grupos como en el género *Compsoeura* (Myristicaceae) hay baja variabilidad interespecífica y *rbcL* no fue lo suficientemente variable para poder discriminar entre especies y ser considerado código de barras para este género (Newmaster *et al.*, 2007) y en helechos inclusive obtuvieron secuencias homólogas entre distintas especies, sin embargo utilizando en conjunto *rbcL* y *trnL.F*, se logró la identificación a nivel de género y especie del 100% (Groot *et al.* 2011).

Ahora bien, en la matriz con los datos en conjunto de *rbcL* y *matK* no muestra cambios significativos ya que permanecen la distancia interespecífica con valores menores al 1% y con valores más altos a nivel de género con valores de entre 1% al 2% (Cuadro 10). En otros trabajos, el conjunto de marcadores *matK* y *rbcL* han mostrado diversos resultados, en un análisis de 48 especies (48 géneros de 43 familias y 39 órdenes), el gen *rbcL* logró discriminar sólo el 69% de éstas; sin embargo al trabajar en conjunto con *matK* logró identificar el 95% (Kress y Erickson 2007). Por otro lado, en la evaluación a plantas medicinales (8557 ejemplares de 5905 especies) con distintos marcadores moleculares, entre los cuales fueron evaluados en conjunto *rbcL* y *matK* mediante matrices de Kimura 2 parámetros, obtuvieron los valores más bajos en la distancia interespecífica e intraespecífica (Chen *et al.*, 2010). Aunado a esto, Korotkova y colaboradores

(2011) trabajaron con Rhipsalideae (Cactaceae) utilizando siete marcadores entre los cuales se encontraban *matK* y *rbcL*, indican que para la identificación de especies fueron los que menos permitieron discriminar entre especie. Por otra parte, García y colaboradores (2013) analizando estos dos marcadores en 3 especies de *Hylocereus* y 2 de *Selenicereus* reportan que *matK* no presentó variación entre las especies de *Hylocereus*, mientras que *rbcL* les permitió discriminar a nivel inter genérico, siendo esto similar a lo obtenido en nuestro trabajo. Sin embargo, en un análisis de la tribu Cacteeae, (Vázquez-Sánchez *et al.*, 2013), *rbcL* y *matK* fueron considerados como fundamentales para determinar las relaciones entre los principales clados (nodos basales) a pesar del bajo número de caracteres informativos. De igual manera, en un análisis de cinco grupos críticos de la flora de México (Agaváceas, Cactáceas, Orquidáceas, Coníferas y Crasuláceas), se encontró que aunque la resolución a nivel de familia fue excelente, el código de barras estándar *rbcL* y *matK* tuvo un desempeño variable en la discriminación entre taxa a nivel genérico y específico (Gernandt *et al.*, 2011).

Se ha considerado que la baja capacidad de discriminación entre especies de las regiones *matK* y *rbcL* (evolución lenta) puede estar asociada a las presiones de selección purificadora asociada con su función. *matK* codifica la proteína madurasa, con funciones importantes durante el desarrollo de la planta y en procesos como la fotosíntesis y se le ha involucrado en el procesamiento de intrones tipo II de al menos cinco genes del cloroplasto (Barthet y Hilu, 2007). Sin embargo, se había descrito que *matK* tiene la tasa de sustitución global más elevada respecto a otros genes del cloroplasto comúnmente utilizados en la filogenética molecular (Olmstead y Palmer, 1994; Johnson y Soltis, 1994; Müller *et al.*, 2006; Barthet y Hilu, 2007). Incluso se ha determinado que la tasa de sustitución de nucleótidos es tres veces mayor y la sustitución de aminoácidos es seis veces mayor que la de *rbcL* (Johnson y Soltis, 1994; Olmstead y Palmer, 1994), pero resulta evidente que las tasas de sustitución no son homogéneas y en algunos linajes cambian más rápido que en otros (Eyre-Walker y Gaut, 1997),

actualmente se reconoce que las sustituciones nucleotídicas o de aminoácidos no se acumulan de manera constante y universal, inclusive entre linajes cercanamente emparentados (Wertheim *et al.*, 2010; Gaut *et al.*, 2011).

Algo similar pasa con *rbcL* cuya función es fundamental ya que esta enzima funciona catalizando dos procesos opuestos, primero la fijación de CO<sub>2</sub> atmosférico a una forma orgánica durante la fotosíntesis y la fotorrespiración en la que actúa como oxigenasa del mismo sustrato (Campbell y Reece, 2007) y a su vez se ha demostrado que cuenta con tasas de sustitución muy diferentes entre familias, Gaut y colaboradores (1996) analizaron la tasa de sustitución en este gen entre palmas y pastos determinando que es 5 veces más rápida en pastos lo que atribuyen al efecto del tiempo generacional, dentro de las angiospermas es decir, las formas anuales evolucionan, en promedio, más rápidamente, que las perennes (Wilson, *et al.*, 1990; Gaut *et al.*, 2011),

## **6.2. Análisis Filogenético del género *Neobuxbaumia***

Los cladogramas con las regiones analizadas por separado y en conjunto (Figura 12, 13 y 14) muestran al género *Neobuxbaumia* como un grupo monofilético si se incluye a *C. columna trajani*, lo cual concuerda con lo descrito por Arias *et al.*, (2003) y Flores (2004). En el género se incluye a *C. columna-trajani*, lo cual Arias *et al.*, (2003) ya había considerado (formando el grupo *Cephalocereus*), con base en información molecular y morfológica. A su vez, Hernández-Hernández *et al.* (2011), describen a estos dos géneros (incluyeron cuatro especies de *Cephalocereus* y dos de *Neobuxbaumia*) como de origen monofilético mediante un análisis con cinco marcadores, así mismo, Bárcenas *et al.*, (2011) indican que ambos géneros son de origen monofilético (incluyeron cinco especies de *Neobuxbaumia* y tres de *Cephalocereus*), sin embargo, excluyen a *N. tetetzo* y lo integran al clado de *Pachycereus*. Igualmente, en un análisis sobre la diversificación de Pachycereeae, mediante los marcadores de cloroplasto trnL-trnF y rpl16, muestra a los miembros del género *Neobuxbaumia* y el género *Cephalocereus* (se incluyeron las 9 especies de *Neobuxbaumia* y cuatro especies

de *Cephalocereus*) forman un grupo monofilético (Barba 2012). Por consiguiente, con base en los reportes y los datos obtenidos en este trabajo, debe considerarse un análisis más detallado para poder determinar si se unen o no en un solo género.

El cladograma obtenido con la región *matK* (Figura 12) nos indica que *C. columna-trajani* y *N. tetetzo* cuentan con un ancestro en común (divergencia reciente), tal como lo estableció Flores (2004) mediante caracteres morfológicos, así se podría explicar la hibridación de estas especies en la comunidad de Zapotitlán de las Salinas (Vite *et al.*, 1994). Es importante resaltar que esta relación no se había definido en análisis morfológicos (Gibson y Horak 1978) y/o moleculares previos (Arias *et al.*, 2002; Hernández-Hernández *et al.*, 2011; Bárcenas *et al.*, 2011; Barba, 2012).

El cladograma obtenido con la región *rbcL* (Figura 13) muestra una relación cercana entre *N. euphorbiodes* y *N. polylopha*, las cuales son consideradas como taxones de reciente formación por Flores (2004), quien mediante el análisis de caracteres morfológicos, alcaloides e isoenzimas les propone como especies hermanas, esta relación ya había sido indicada por Cornejo y Simpson (1997), mediante datos anatómicos morfológicos y químicos. Así mismo, se han obtenido los mismos resultados con distintos marcadores moleculares, mediante el intron *trnL* y espaciador *trnL-F* (Arias *et al.*, 2003), con la región *matK-trnK* (Bárcenas *et al.*, 2011), *trnL-trnF* y *rpl16* (Barba, 2012). En el cladograma obtenido con *matK* esa relación fue apoyada con bootstrap menor a 50 por lo cual se colapsó, de manera que se debe de considerar que *trnK* puede mejorar la capacidad de *matK* para resolver divergencias a nivel de especie (Hilu *et al.*, 2008).

En los cladogramas, la otras especies cuya relación filogenética con este género ha creado confusión, quedaron fuera del género *Neobuxbaumia* creando clados: claros y definidos.

*C. gigantea* en todos los cladogramas forma un clado independiente, sin embargo se le había integrado al género *Neobuxbaumia*, (Cornejo y Simpson, 1997), en otras ocasiones se agrupa a *C. gigantea* con el género *Pachycereus*, formando un grupo monofilético (Cota y Wallace, 1997) y estudios más recientes con datos moleculares (Hernández-Hernández *et al.*, 2011; Barba 2012) lo agrupa con el género *Pachycereus* formando un grupo monofilético. Arias *et al.*, (2003) con datos tanto morfológicos como genéticos lo recupera como taxón hermano de *Pachycereus*.

Finalmente este trabajo muestra que *matK* y *rbcL* a pesar de no permitir la discriminación de los híbridos y sus parentales, y a su bajo poder discriminante interespecífico del género *Neobuxbaumia*, nos brinda información congruente e indispensable para la determinación de la filogenia del grupo y sus taxones hermanos.

## 7. CONCLUSIONES

- ✓ Los marcadores moleculares *matK* y *rbcL* no permiten la discriminación interespecífica del género *Neobuxbaumia*, lo que dificulta su uso como Códigos de Barras de la Vida para el Género *Neobuxbaumia*.
- ✓ Los marcadores *matK* y *rbcL*, no permitieron la discriminación taxonómica de las especies *N. macrocephala*, *N. mezcalaensis* y sus híbridos.
- ✓ El género *Neobuxbaumia* mediante el análisis en conjunto y por separado se define como de origen monofilético, solo sí *C. columna-trajani* es incluido en él.
- ✓ *N. euphorbiodes* y *N. polylopha* son especies que probablemente cuentan con un ancestro en común
- ✓ Los géneros que han creado confusión, quedaron fuera del clado del género *Neobuxbaumia*, creando clados independientes, claros y definidos
- ✓ *C. columna-trajani* podría estar relacionada con *N. tetetzo*.
- ✓ Con base en los análisis y la información recabada el género *Cephalocereus* y el género *Neobuxbaumia* podrían formar un solo taxón.

## BIBLIOGRAFIA

**Alejos, V. L. P. 2006.** Caracterización a nivel genético de un posible híbrido entre dos especies de cactáceas columnares del género *Neobuxbaumia*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. FES- Iztacala. México.

**Anderson, E.F. 2001.** The Cactus Family. Timber Press, Portland.

**Anderson, C. L., Bremer, K., y Friis, E. M. 2005.** Dating phylogenetically basal eudicots using *rbcL* sequences and multiple fossil reference points. *American Journal of Botany*. 92:1737-1748.

**Arias, S., Terrazas, T. y Cameron, K. 2003.** Phylogenetic Analysis of *Pachycereus* (Cactaceae, Pachycereeae) based on Chloroplast and Nuclear ADN Sequences. *Systematic Botany*. 28(3):547-557.

**Arias, S. y T. Terrazas. 2006.** Análisis filogenético con base en caracteres morfológicos en *Pachycereus* (Cactaceae). *Brittonia* 58:197-216.

**Arroyo–Cosultchi G., Terrazas T., Arias S. y López–Mata L. 2007.** Morfología de la semilla de *Neobuxbaumia* (Cactaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 81:17–25.

**Barba, M. J. A. 2009.** Origen y Diversificación de la tribu Pachycereeae (Cactaceae). Tesis de licenciatura. UNAM. 84pp.

**Barba, M. J. A. 2012.** Diversificación de Pachycereeae (Cactaceae, Caryophyllales, Eudicotylodoneae) en relación al síndrome de polinización. Tesis de Maestría. UNAM. 93pp.

**Barcenas, R. T., Yesson, C. y Hawkins. 2011.** Molecular systematics of the Cactaceae. *Cladistics*. 27: 470-489.

**Barthet, M. M. y Hilu, K. W., 2007.** Expression of *matK*: Functional and evolutionary implications. *Am. J. Bot.* 94, 1402–1412.

**Barthlott, W. y Hunt, D. R. 1993.** Cactaceae. En K. Kubitzki (ed.) The families and genera of vascular plants. Springer-Verlag. Berlin. 161-197 p.

**Bravo-Hollis, 1978.** Las cactáceas de México. Edit. UNAM. Segunda Edición. México. 743pp.

**Carlson J. E, Tulsieram L. K, Glaubitz J. C, Luk V. M. K, Kauffeldt C, y Rutledge R. 1991.** Segregation of random amplified ADN markers in F1 progeny of conifers. *Theor. Appl. Genet.* 83:194-200.

**Carrión 2012.** disponible en: <http://cepra.utpl.edu.ec/handle/123456789/1851>

**CBOL Plant Working Group 2009.** A ADN barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 106: 12794-12797.

**Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., Zhu, Y., Ma, X., Gao, T., Pang, X., Luo, K., Li, Y., Li, X., Jia, X., Lin, Y. y Leon, C. 2010.** Validation of the ITS2 Region as a Novel ADN Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *PLoS ONE.* 5(1): e8613. doi:10.1371/journal.pone.0008613

**Cornejo, D., y Simpson, B. 1997.** Analysis of forma and function in North American columnar cacti (Tribe Pachycereeae). *Am. J. of Bot.* 84: 1482-1501.

**Cota, J. H. y Wallace, R. S. 1997.** Chloroplast ADN Evidence for divergence in *Ferocactus* and its Relationships to North American Columnar Cacti (Cactaceae: Cactoideae). *Systematic Botany.* 22(3):529-542.

**Cuellar, M. M. A. 2011.** Código de barras genético de algunas orquídeas veracruzanas bajo riesgo de extinción. Tesis de licenciatura de Biología. Facultad de Biología. Universidad Veracruzana. México. 70pp.

**Dávila–Aranda, P., S. Arias–Montes, R. Lira–Saade, J. L. Villaseñor y A. Valiente–Banuet. 2002.** Phytogeography of the columnar cacti (tribe Pachycereeae) in México: a cladistic approach. En Columnar cacti and their mutualists: evolution, ecology and conservation, T. H. Fleming y A. Valiente–Banuet (eds.). University of Arizona Press, Tucson. 25–41.

**Edwards, E. J., Nyffeler, R. y Donoghe, M. J. 2005.** Basal cactus phylogeny: implications of *Pereskia* (Cactaceae) paraphyly from the transition to the cactus life form. *American Journal of Botany*. 92 (7): 1177-1188.

**Eyre-Walker, A. y Gaut, B. S. 1997.** Correlated rates of synonymous site evolution across plant genomes. *Molecular Biology and Evolution*. 14(3): 455-460.

**Flores, O. C. M. 2004.** Quimiotaxonomía del género *Neobuxbaumia*. Tesis de Doctorado. FES-Iztacala. UNAM. 112pp.

**Ford, C. S., Ayres K. L., Toomey, N., Haider, N., Stahl, J. V. A., Kelly, L. J., Wikstrom, N., Hollingsworth, P. M., Duff, R. J., Hoot, S. B., Cowan, R. S., Chase, M. W., Wilkinson, M. J., 2009.** Selection of candidate coding ADN barcoding regions for use on land plants. *Bot. J. Linn. Soc.* 159: 1–11

**García, M. A., Terrazas, T., Segura, L. O., Arias, S., Vibrans, H. y López-Mata. 2013.** Caracterización molecular de tres especies de *Hylocereus* (Cactaceae) presentes en México. *Rev. Fitotec. Mex.* 36 (1): 13-22.

**Gaut, B., Morton, B. R., McCaig, B. C. y Clegg, M. T. 1996.** Substitution rate comparisons between grasses and palms: Synonymous rate differences at the

nuclear gene *Adh* parallel rate differences at the plastid gene *rbcL*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 10274-10279.

**Gaut, B., Yang, L., Takuno, S. y Eguiarte, L. E. 2011.** The patterns and causes of variation in plant nucleotide substitution rates. *Annual Review of Ecology, and Systematics*. 42: 245-266.

**Gernandt, D., Salazar, G., Vergara, F., Arias, S., Sosa V., García, A., Reyes, J. Cabrera, L. y P. Rosas. 2011.** Código de barras genético de cinco grupos críticos de la flora de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología. Instituto de Ecología, A.C., Informe final SNIB-CONABIO, proyecto No. GE021, México D. F.

**Gibson, A. C. y Horak, K. E. 1978.** Systematic anatomy and phylogeny of Mexican columnar cacti. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 65:999-1057.

**Gielly, L. y Taberlet, P. 1994.** The use of chloroplast ADN to Resolve Plant Phylogenies: noncoding versus *rbcL* sequences. *Molecular Biology and Evolution*. 11(5):769-777.

**Godínez-Álvarez, H. y Valiente-Banuet, A. 2004.** Demography of the columnar cactus *Neobuxbaumia macrocephala*: a comparative approach using population projection matrices. *Plant Ecology* 174: 109-118.

**Gouy, M., Guindon, S. y Gascuel, O. 2010.** SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27 (2):221-224.

**Groot, G. A., During, H. J., Maas, J. W., Schneider, H., Vogel, J. C. y Erkens, R. H. J. 2011.** Use of *rbcL* and *trnL-F* as a Two-Locus ADN Barcode for

Identification of NW-European Ferns: An Ecological Perspective. *PLoS ONE*. 6(1): e16371. doi:10.1371/journal.pone.0016371

**Guzmán, U., Arias, S. y Dávila, P. 2007.** Catálogo de autoridades taxonómicas de las cactáceas (Cactaceae: Magnoliopsida) de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Base de datos SNIB-CONABIO, proyectos Q045 y AS021. México.

**Hasebe, M., Omori, T., Nakazawa, M., Sano, T., Kato, M. y Iwatsuki, K. 1994.** *rbcL* gene sequences provide evidence for the evolutionary lineages of leptosporangiate ferns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:5730-5734.

**Herbert, P. D. N., Cywinska A., Ball, S. L. y de Waard, JR. 2003.** Biological identifications through ADN barcodes. *Proc. R. Soc. Lond B. Biolo. Sci.* 270: 313-321.

**Herbert, P. D. N., Penton, E. F., Burns, J. M., Janzen, D. H. y Hallwachs, W. 2004.** Ten species in one: ADN barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101: 14812-14817.

**Hernández-Hernández, T., Hernández, H. M., De-Nova, J. A., Puente, R., Eguiarte, L. E. y Magallón, S. 2011.** Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). *American Journal of Botany*. 98(1): 44-61.

**Herbert, P. D. N. Soeckle, M. Y. Zemlak, T. S. y Francis, C. M. 2004.** Identification of birds through ADN barcodes. *PLOS Biol.* 2:1657-1665.

**Herbert, P. D. N. y Gregory, T. R. 2005.** The promise of ADN barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*. 54(5):852–859.

**Hillis, M. D. 1987.** Molecular versus morphological approaches to systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. (18):23-42.

**Hillis, D. M. y Wiens, J. J. 2000.** Molecules versus morphology in systematics. En: J.J.Wiens (ed.). *Phylogenetic analysis of morphological data*. Smithsonian Institution Press. Washington. pp. 1-19.

**Hilu, K. W. y Liang, H. 1997.** The matK gene: sequence variation and application in plant systematics. *American Journal of Botany*. 84(6):830-839.

**Hilu, K. W., Black, C., Diouf, D. y Burleigh, J. G. 2008.** Phylogenetic signal in *matK* vs. *trnK*: A case study in early diverging eudicots (angiosperms). *Molecular phylogenetics and Evolution*. 48: 1120-1130.

**Johnson, L. A., y Soltis. D. E. 1994.** *matK* ADN sequences and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae s. str. *Systematic Botany*. 19: 143–156.

**Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. 2005.** A: y Janzen, D. H. Use of ADN barcodes to identify flowering plants. *PNAS*. 102(23):8369-8374.

**Kress, W. J. y Erickson, D. L. 2007.** Two-Locus Global ADN Barcode for Land Plants: The Coding *rbcL* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region. *PLOS*.

**Korotkova, Nadja., Borsch, T., Quandt, D. Taylor, N. P., Müller, K. F. y Barthlott, W. 2011.** What does it take to resolve relationships and to identify species with molecular markers? An example from the epiphytic Rhipsalideae (cactaceae). *American Journal of Botany*. 98 (9): 1549-1572.

**Lahaye, R., Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupullin, F., Gigot, G., Maurin, O., Duthoit, S., Barraclough, T. G. y Savolainen.** ADN barcoding the floras of

biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105 (8): 2923-2928.

**Lozada, V. Y. 2005.** Peroxidación de ácidos grasos de semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* *Neobuxbaumia mezcalaensis* en condiciones de almacenamiento a largo plazo. Tesis para obtener el título de Biólogo. FES-Iztacala. UNAM. 51 pp.

**Loza-Cornejo, y Terrazas, T. 2012.** Morfo-anatomía de plántulas en especies de Pycnaceae: ¿Hasta cuándo son plántulas? *Bol. Soc. Bot. Méx.* 88:1-13.

**McCarthy, C. Chromas 1996** version 1.45. School of Health science, Griffith University, Gold Coast Campus, Queensland, Australia.

**Monaghan, M. T., Balke, M., Gregory, T. R. y Vogler, A. P. 2005.** ADN-based species delineation in tropical beetles using mitochondrial and nuclear marker. *Philosophical Transactions of Royal Society B*. 360: 1925-1933.

**Müller, K. F., Borsch, T., Hilu, K. W., 2006.** Phylogenetic utility of rapidly evolving ADN at high taxonomical levels: contrasting *matK*, *trnT-F*, and *rbcL* in basal angiosperms. *Mol. Phylogenet. Evol.* 41:99–117.

**Campbell, N. A; y Reece, J. B. 2007.** Biología. Editorial. Médica Panamericana, 7 Edición. 1532 pp.

**Newmaster, S. G., Fazekas, A.J. y Ragupathy, S. 2006.** ADN barcoding in land plants: evaluation of *rbcL* in a multigene tiered approach. *Can. J. Bot.* 84: 335–341.

**Newmaster, G.S. y Subramanyam R. 2009.** Testing plant barcoding in a sister species complex of pantropical *Acacia* (Mimosoideae, Fabaceae). *Mol. Ecol. Resour.* 9 (Suppl. 1), 172–180.

**Nicholas, K. B. and Nicholas H. B. Jr. 1997.** GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignment. Distributed by the author.

**Olmstead, R. G. y Palmer. J. D. 1994.** Chloroplast ADN systematics: a review of methods and data analysis. *American Journal of Botany*. 81:1205–1224.

**Penjor, T., Anai, T., Nogano, Y., Matsumoto, R. y Yamamoto, M. 2010.** Phylogenetic relationship of Citrus and its relatives base don *rbcL* gene sequences. *Tree genetics & Genomes*. 6:931-939.

**Spreitzer, R. J. y Salvucci, M, E. 2002.** Rubisco: structure, regulatory interactions y possibilities for a better enzyme. *Rev. Plant. Biol.* 53:449-475.

**Ran J. H, Wang P. P, Zhao H. J. y Wang X. Q. 2010.** A test of seven candidate barcode regions from the plastome in *Picea* (Pinaceae). *J. Integr. Plant Biol.* 52(12), 1109–1126.

**Renner, S. S. 1999.** Circumscription and phylogeny of the Laurales: evidence from molecular and morphological data. *American Journal Botanic*. 86: 1301–1315.

**Rios, R. M. M. 2009.** Limitaciones en el reclutamiento de *Neobuxbaumia macrocephala*: un análisis de las interacciones a través de su ciclo reproductivo. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias Biológicas (Biología Ambiental). Instituto de Ecología. UNAM. 110 pp.

**Salazar, G. A, Chase, M. W, Arenas, M. A. S, y Ingrouille, M. 2003.** Phylogenetics of Cranichideae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): evidence from plastid and nuclear ADN sequences. *American Journal Botanic*. 90: 777–795.

**Sang, T., Crawford, D. J. y Stuessy, T. F. 1997.** Chloroplast ADN phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*. 84(9): 1120-1136.

**Shindel D. E. y Miller, S. E. 2005.** ADN barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature*. 435:17.

**Smith, M. A., Woodley, N. E., Janzen, D. H., Hallwachs, W. y Herbert, P. D. N. 2006.** ADN barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103, 3657-3662.

**Swofford D. L. 2000.** PAUP\* 4.0b4a Laboratory and molecular Systematic. Museum Support Center. Smithsonian Institution. Washington D. C. 20560-0534 USA.

**Tamura, K., Peterson D., Stecher G, Nei M, y Kumar S. 2011.** MEGA5 Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular biology and Evolution*. <http://mbe.oxfordjournals.org/content/28/10/2731.short>

**Terrazas, T. y Loza-Cornejo, S. 2002.** Phylogenetic relationships of Pachycereae: a cladistics analysis based on anatomical and morphological data. En: Fleming, T. H. y Valiente-Banuet, A. (eds). *Columnar Cacti and Their Mutualists: Evolution, Ecology and Conservation*. Edit. University of Arizona Press. Tucson, A. Z. 25-41.

**Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. 1994.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22(22):4673-4680.

**Valiente-Baunet, A., Roas-Martínez, A., Arizmendi, M. C. y Dávila, P. 1997.** Pollination biology of two columnar cacti (*Neobuxbaumia mezcalaensis* and *Neobuxbaumia macrocephala*) in the Tehuacán Valley, Central México. *American Journal of Botany*. 84 (4): 452-455.

**Valverde, V. M. T., 2001.** Dinámica poblacional de *Mammillaria crucigera* y *Neobuxbaumia macrocephala* en la región de Tehuacán-Cuicatlán. Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias, Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. R129. México D.F.

**Vázquez-Sánchez, M., Terrazas, T., Arias, S. y Ochoterena, H. 2013.** Molecular phylogeny, origin and taxonomic implications of the tribe Cacteeae (Cactaceae). *Systematics and Biodiversity*. 11(1):103-116.

**Vite, F., Portilla, E., Zavala-Hurtado, J. A., Valverde, P. L. y Díaz-Solís, A., 1994.** A natural hybrid population between *Neobuxbaumia tetetzo* and *Cephalocereus columna-trajani* (Cactaceae). *Journal of Arid Environments*. 32: 395–405.

**Wallace, R. S. 2002.** The phylogeny and Systematics of columnar cacti: an overview. En: Fleming, T. H. y Valiente-Banuet, A. (eds). *Columnar Cacti and Their Mutualists: Evolution, Ecology and Conservation*. Edit. University of Arizona Press. Tucson, A. Z. 42-63.

**Wertheim, J. O., Sanderson, M. J., Worobey, M. y Bjork, A. 2010.** Relaxed molecular clocks, the bias-variance trade-off, and the quality of phylogenetic inference. *Syst. Biol.* 59(1):1-8.

**Wilson, M. A., Gaut, B., y Clegg, M. T. 1990.** Chloroplast ADN evolves slowly in the palm Family (Arecaceae). *Mol. Biol. Evol.* 7 (4): 303-314.

**Wiens, J. J. 2004.** The role of Morphological data in Phylogeny Reconstruction. *Systematic Biology*. 53(4): 653-661

**Yesson, C., Bárcenas, R. T., Hernández, H. M., Ruiz-Maqueda, M. L., Prado, A., Rodríguez, V. M. y Hawkins, J. A. 2011.** ADN barcodes for Mexican Cactaceae, plants under pressure from wild collecting. *Molecular Ecology Resources*. 11:775-783.

[www.barcodeoflife.org](http://www.barcodeoflife.org)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

## **APENDICE 1**

### **Extracción ADN ADNzol® plántulas y juveniles.**

Macerar muestra fresca con nitrógeno líquido hasta pulverizar.

1. Agregar 700  $\mu$ L ADNzol
2. Incubar 5 min a temperatura ambiente
3. Centrifugar 10 min a 12,000 rpm
4. Tomar sobrenadante
5. Agregar 0.5 ml de EtOH por cada 1ml ADNzol.
6. Mezclar por inversión 8 veces.
7. Incubar 5 min a  $-20^{\circ}\text{C}$
8. Centrifugar por 2 min a 12,000 rpm
9. Eliminar sobrenadante por decantación
10. Lavar con EtOH al 70%
11. Centrifugar de 1 a 2 minutos
12. Decantar sobrenadante (Eliminar el EtOH restante por evaporación)
13. Resuspender en 100  $\mu$ L de  $\text{H}_2\text{O}$  bi-destilada estéril.

## **APENDICE 2**

### **Extracción ADN Buffer Carlson Muestra Fresca**

**(Dra. Martha Martínez)**

Macerar muestra con nitrógeno líquido hasta pulverizar.

1. Agregar 750  $\mu$ L Buffer Carlson a  $65^{\circ}\text{C}$
2. 6  $\mu$ L mercaptoetanol
3. Incubar a  $65^{\circ}\text{C}$  x 20 min
4. Enfriar 8 min en Vortex
5. Agregar 750  $\mu$ L cloroformo-octanol (24:1)
6. Centrifugar 10 min a 9,000 rpm
- 7.- Tomar fase acuosa y agregar más buffer Carlson para complementar los 750 $\mu$ L
- 8.- Agregar  $\text{H}_2\text{O}$  bi-destilada esteril V:V
9. Separar en partes
10. Agregar V:V acetato de amonio

11. Agregar V:V isopropanol
12. Centrifugar por 5 min a 14,000 rpm
13. Suspender pastillas en agua bi-destilada y unir las
14. Agregar Acetato de Amonio V:V
15. Agregar V:V Cloroformo-octanol (24:1)
16. Centrifugar 5 min a 14,000 rpm
17. Recuperar fase acuosa
18. Precipitar (1:1.5) con EtOH 96%
19. Centrifugar 1 o 2 min a 14,000 rpm
20. Eliminar sobrenadante
21. Lavar pastilla con EtOH 70%
22. Resuspender pastilla en H<sub>2</sub>O bi-destilada esteril de 80 a 100 µL

### **APENDICE 3**

#### **Extracción ADN Buffer Carlson Muestra seca y All protect**

Macerar muestra seca con nitrógeno líquido hasta pulverizar.

1. Agregar 800 µL de CTAB a 65° C
2. Incubar 20 min a 65° C
3. Agita en Vortex 8 min hasta enfriar.
4. Agregar 800 µL cloroformo-octanol (24:1)
5. Centrifugar 10 min a 12,000 rpm
- 6.-Tomar sobrenadante
7. Precipitar con EtOH al 96%
8. Centrifugar 5 min a 12,000 rpm
9. Si existe una gran cantidad de precipitados se repetirán del paso 1 al 8
10. Lavar con EtOH al 70%
11. Centrifugar 1 o 2 min x 12,000 rpm
- 12.- Resuspender en H<sub>2</sub>O bi-destilada estéril, la cantidad dependerá del tamaño de la pastilla.

## APENDICE 4

### Localización geográfica de los Híbridos analizados por Alejos (2006).

#### LOCALIZACIÓN GEOGRAFICA DE LOS POSIBLES HÍBRIDOS ANALIZADOS.

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

## APENDICE 5

Características generales de las especies de *Neobuxbaumia* y sus híbridos, presentes en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Alejos 2006).

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

\* n. e. no estimado

## APENDICE 6

Número de acceso en GenBank de las secuencias de las regiones del cloroplasto *matK* y *rbcl* utilizadas en las matrices de distancia genética.

Secuencias <i>matK</i>	
No. de acceso	Especie
KF437833	<i>Carnegieia gigantea</i>
KF437838	<i>Cephalocereus columna-trajani</i>
KF437848	<i>N. mezcalaensis</i> x <i>N. macrocephala</i> (F1)
KF437857	<i>N. mezcalaensis</i> x <i>N. macrocephala</i> (F2)
KF437866	<i>N. euphorbioides</i>
KF437875	<i>N. laui</i>
KJ568422	<i>N. macrocephala</i>
KJ568423	<i>N. mezcalensis</i>
KJ568424	<i>N. polylopha</i>
KJ568425	<i>N. scoparia</i>
KJ568426	<i>N. tetetzo</i>
KJ568427	<i>P. hollianus</i>
KJ568428	<i>P. weberi</i>
KJ568429	<i>S. stellatus</i>

Secuencias <i>rbcl</i>	
No. de acceso	Especie
KF279509	<i>Carnegieia gigantea</i>
KF437843	<i>Cephalocereus columna-trajani</i>
KF437853	<i>N. mezcalaensis</i> x <i>N. macrocephala</i> (F1)
KF437861	<i>N. mezcalaensis</i> x <i>N. macrocephala</i> (F2)
KF437868	<i>N. euphorbioides</i>
KF437873	<i>N. laui</i>
KJ568430	<i>N. macrocephala</i>
KJ568431	<i>N. mezcalaensis</i>
KJ568432	<i>N. polylopha</i>

KJ568433	<i>N. scoparia</i>
KJ568434	<i>N. tetetzo</i>
KJ568435	<i>P. hollianus</i>
KJ568436	<i>P. weberi</i>
KJ568437	<i>S. stellatus</i>