

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

**ESTRUCTURA GENÉTICA Y FILOGEOGRAFÍA DE
DOS CACTOS ENDÉMICOS DEL VALLE DE
TEHUACÁN-CUICATLÁN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
P R E S E N T A

AMELIA CORNEJO ROMERO

COMITÉ TUTORAL
CO-DIRECTORA: DRA. BEATRIZ RENDÓN AGUILAR
CO-DIRECTOR: DR. PEDRO LUIS VALVERDE PADILLA
ASESOR: DR. CARLOS FABIÁN VARGAS MENDOZA

JULIO 2013

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

El Jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

Amelia Cornejo Romero

3 de julio de 2013

Jurado

Presidenta: Dra. Beatriz Rendón Aguilar

Secretario: Dr. Pedro Luis Valverde Padilla

Vocal: Carlos Fabián Vargas Mendoza

Vocal: Dra. María del Carmen Mandujano Sánchez

Vocal: Dr. Alejandro Zavala Hurtado



Handwritten signatures of the jury members, corresponding to the names listed on the left. The signatures are written in black ink and are somewhat stylized. The first signature is circled and appears to be 'Beatriz Rendón Aguilar'. The second signature is 'Pedro Luis Valverde Padilla'. The third signature is 'Carlos Fabián Vargas Mendoza'. The fourth signature is 'María del Carmen Mandujano Sánchez'. The fifth signature is 'Alejandro Zavala Hurtado'.

A mi familia

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) me otorgó una beca de Doctorado (No. 158260).

Esta tesis se financió con fondos del proyecto FOSEMARNAT-2004-01-26 “Efecto de los patrones de distribución y la biología reproductiva en los niveles de variación y estructura genética de dos especies de cactus endémicos de la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán, Puebla” y con fondos del “Apoyo Integral para la Formación del CONACyT (No. 34903)”

A mi Comité Tutorial que estuvo integrado por la Dra. Beatriz Rendón, el Dr. Pedro Luis Valverde y el Dr. Fabián Vargas, por su valioso apoyo y orientación académica.

A los miembros del Jurado Dr. Alejandro Zavala Hurtado y María del Carmen Mandujano por sus comentarios que contribuyeron a mejorar este escrito.

A las personas que amablemente proporcionaron sus fotografías de cactáceas para ilustrar el artículo del Capítulo I.

Al Dr. Javier Medina y la Dra. Tania Hernández por su disposición de colaborar en el artículo correspondiente al Capítulo II.

A la Dra. Alejandra Serrato Díaz, responsable del Laboratorio Divisional de Biología Molecular (LDBM) de la UAM-Iztapalapa, por su asesoría en las técnicas moleculares y por brindarnos el espacio para realizar esta investigación.

Al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, a cargo de la Dra. Martha Rocha, y al Laboratorio de Ciencias Avanzadas de la Escuela Nacional Preparatoria Plantel 4 a cargo del M. en C. Eduardo Delgadillo por permitirnos utilizar su infraestructura en la etapa inicial de este proyecto.

Al M. en C. Gilberto Cárdenas y su equipo por haber elaborado los mapas de distribución de las especies.

A la Jefatura del Departamento de Biología por brindar los recursos económicos para la publicación del artículo del Capítulo II.

Al señor Pedro Miranda Pacheco, nuestro guía de campo, por ayudarnos durante la colecta de material vegetal de mi tesis, así como de los datos del proyecto FOSEMARNAT-2004-01-26.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco profundamente a todas las personas que me brindaron su apoyo y amistad a lo largo de este proceso.

A mi Comité Tutorial agradezco su paciencia, confianza y apoyo que fueron fundamentales para concluir con este proyecto personal.

Al Dr. Zavala quiero agradecer su disposición por discutir mis borradores y ayudarme en todo lo que ha estado a su alcance.

A la Dra. Madujano agradezco los comentarios que ayudaron a mejorar la estructura del Capítulo I y en general de la tesis.

A Javier Medina y a Tania Hernández agradezco que hayan dedicado horas y horas de arduo trabajo a mi tesis, y haber impedido que decayera el ánimo.

A la M. en C. Martha Pérez quien me brindó fraternalmente su espacio y recursos en distintos momentos.

A la Dra. Rosaura Grether por su confianza, apoyo y solidaridad que me impulsaron para concluir este proyecto.

A Gilberto Hernández, Alma Toledo, Paola Durante y Osiris Aguilar del Laboratorio de Manejo de Ecosistemas, por su amabilidad, por ayudarme a salir de apuros con los mapas y prestarme su equipo de cómputo.

A mis amigas y compañeras del Laboratorio de Comunidades de Zonas Áridas Sombra Rivas, Monserrat Jiménez por su colaboración en el trabajo de campo, edición de figuras y captura de datos. A Monse y Esperanza Córdova agradezco también su solidaridad, acompañamiento en los momentos críticos, pero sobre todo por los momentos llenos de risas.

A mi queridas amigas Alejandra Serrato y Rocío Fernández por estar en mi camino y por todos los momentos que hemos compartido.

Agradezco especialmente a mi familia por su invaluable ayuda, por estar siempre a mi lado y ser una inspiración en mi vida.

ÍNDICE

RESUMEN	7
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN GENERAL	11
CAPÍTULO I Estructura genética y filogeografía en cactáceas	22
CAPÍTULO II Origen cuaternario y divergencia genética del cacto endémico <i>Mammillaria pectinifera</i> en un paisaje cambiante en el Valle de Tehuacán, México	50
CAPÍTULO III Expansión poblacional reciente de <i>Cephalocereus</i> <i>columna-trajani</i> (Cactaceae), en el Valle de Tehucán-Cuicatlán	76
DISCUSIÓN GENERAL	108
CONCLUSIONES GENERALES	114
LITERATURA CITADA	116

RESUMEN

Los estudios filogeográficos en biomas áridos han demostrado que la divergencia de linajes y su diversificación son resultado de eventos vicariantes y dispersión, los cuales ocurrieron bajo el escenario de los cambios geológicos e incremento en la aridez durante el Neogeno y el Cuaternario. Los pocos estudios sobre estructura genética y filogeografía reportados en la familia Cactaceae sugieren que el aislamiento geográfico, fragmentación poblacional, vicarianza y dispersión, debidos a la actividad tectónica y fluctuaciones climáticas del Pleistoceno, han jugado un papel importante en la divergencia genética de las especies, particularmente en aquellas del norte de Sudamérica y noroeste de México.

Se estudio la estructura filogeográfica de dos cactus endémicos del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, el centro de diversificación de cactáceas más importantes del centro-sur de México, para inferir si la configuración espacial y divergencia de haplotipos ha sido dirigida por la evolución geológica ocurrida durante la transición del Plioceno/Pleistoceno, periodo en el cual la región adquirió su geomorfología y clima actuales.

Mammillaria pectinifera, un cacto globoso, se distribuye exclusivamente al norte del Valle dentro de un rango altitudinal de 1778-2130 m, en montañas planas aisladas con pendiente suave y suelos tipo migajón arenoso. Se puso a prueba si el origen y la divergencia haplotípica de *M. pectinifera* han sido dirigidas por los procesos geomorfológicos acontecidos durante el Pleistoceno. El origen estimado y edades de divergencia entre haplotipos se ubicaron entre 1.237 y 0.019 m.a., y coinciden con eventos tectónicos y de erosión, ocurridos en el Pleistoceno. La alta diferenciación interpoblacional ($F_{ST} = 0.687$, $P < 0.00001$), apoya la hipótesis de un aislamiento geográfico dirigido por eventos geomorfológicos, e indica que el aislamiento y baja capacidad de dispersión restringen severamente el flujo génico e intensifican los efectos de la deriva génica. La estabilidad demográfica en los últimos miles de años, indica que la persistencia en hábitats confinados ha sido la principal respuesta de la especie a la evolución del paisaje.

Aunque el origen *Cephalocereus columna-trajani*, es reciente (0.99m.a.), es una de las catáceas columnares más abundantes en el Valle. La especie se distribuye discontinuamente a lo largo del Valle de Tehuacán-Cuicatlán dentro de un rango altitudinal de 800-1800 m, en laderas accidentadas, sobre afloramientos de rocas calizas con suelos muy pedregosos, someros y una elevada cantidad de materia orgánica, fósforo, sodio y magnesio. Se puso a prueba que conforme se establecían las condiciones ambientales (topográficas y edáficas) de *C. columna-trajani*, la especie experimentó una expansión demográfica posiblemente en el Pleistoceno. La diferenciación poblacional fue baja ($F_{ST} = 0.124$, $P < 0.00001$) pero significativa y puede relacionarse con dispersión local de semillas. La hipótesis de expansión poblacional fue apoyada por la red de haplotipos en forma de estrella y el análisis *mismatch*. Este último indica que las poblaciones han pasado por una expansión demográfica y espacial reciente, en la cual los murciélagos pueden tener un papel clave. Asimismo, el análisis de demografía histórica indica que las poblaciones han crecido en los últimos miles de años.

Nuestros datos sugieren que el origen y aislamiento geográfico de *M. pectinifera*, así como la expansión poblacional reciente de *C. columna-trajani* están relacionados con la evolución geomórfica local del Cuaternario, y apoyan la hipótesis de que la rápida especiación de cactáceas se debe en parte a que la elevación de sistemas montañosos en Norte y Sudamérica originó un accidentado paisaje e intensificó las condiciones regionales de aridez, creando la amplia variedad de hábitats que las cactáceas colonizaron exitosamente durante el Mioceno.

ABSTRACT

Phylogeographic studies in modern arid biomes have shown that the divergence of lineages and diversification are the result of vicariant and dispersal events, which occurred during the Neogene and Quaternary, under the scenario of geological changes and increased aridity. The few studies on genetic structure and phylogeography reported in the family Cactaceae suggest that geographic isolation, population fragmentation, vicariance, and dispersal, due to tectonic activity and Pleistocene climatic fluctuations have played a major role in the genetic divergence of species, particularly those of northern South America and northwestern Mexico.

Phylogeographic structure was studied in two endemic cacti from Tehuacan-Cuicatlan Valley, the major main center of diversification and endemism of family Cactaceae in southern Mexico, to infer whether the spatial configuration and haplotype divergence has been driven by the geological evolution occurred during the transition from the Pliocene/Pleistocene period in which the region acquired its current geomorphology.

Mammillaria pectinifera is distributed exclusively north of the Valley within an altitude range of 1778-2130 m in isolated flat mountains with gentle slopes and sandy loam soil type. It was tested if the origin and haplotype divergence of *M. pectinifera* have been driven by geomorphologic processes that occurred during the Pleistocene. The estimated origin and divergence times among haplotypes were 1.237 and 0.019 Ma, which are consistent with Pleistocene tectonic and erosion events. The high differentiation between populations ($F_{ST} = 0.687$, $P < 0.00001$), supporting a hypothesis of geomorphically-driven geographical isolation, and indicates that isolation and low dispersal ability severely restrict gene flow and intensify the effects of genetic drift. Populations showed long term demographic stability, indicating that the persistence in confined habitats has been the main response of the species to landscape evolution.

Although the origin of *Cephalocereus columna-trajani* is recent (0.99 Ma), it is one of the most abundant columnar cacti within the Valley. Species is distributed discontinuously throughout the Tehuacan-Cuicatlan Valley within an altitudinal range of 800- 1800 m, on mountain slopes with high stoniness and shallow soils with high amount of organic matter, phosphorous, sodium and magnesium. We tested if *C. columna-trajani* experienced a recent demographic expansion, possibly during the Pleistocene when the suitable topographic and edaphic conditions for the species were created.

Population differentiation was low ($F_{ST} = 0.124$, $P < 0.00001$) but significant, and it can be related to local seed dispersal. Our hypothesis of population expansion was supported by star-like haplotype network and mismatch analysis. The latter indicated that populations had undergone a recent demographic and spatial expansion, which could be driven by seed dispersal mediated by bats. Furthermore, analysis of historical demography indicates that populations have grown in the last thousands of years.

Our data suggest that the origin and geographical isolation of *M. pectinifera* and recent population expansion of *C. columna-trajani* are related to local Quaternary

geomorphic evolution, and support the hypothesis that rapid speciation of cacti is related to the tectonic uplifting of orogenic belts that formed intricate landscapes and enhanced regional aridity creating a wide variety of new habitats that were successfully colonized by this group during the Miocene.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La radiación evolutiva de cactáceas representa uno de los eventos evolutivos más llamativos de biomas áridos de América. Diferentes factores biológicos y físicos que acontecieron a lo largo del Cenozoico se han asociado con su rápida diversificación (Hernández-Hernández 2010; Arakaki *et al.*, 2011). Entre ellos se encuentran el surgimiento del síndrome suculento que en cactáceas alcanzó su desarrollo extremo con tallos fotosintéticos y hojas modificadas en espinas; la disminución global en la temperatura que redujo la precipitación (debido a la dilación del ciclo hidrológico) e incrementó la aridez (Arakaki *et al.*, 2011); y la elevación de sistemas montañosos en Norte y Sudamérica, los cuales indujeron cambios en la circulación atmosférica que disminuyeron el transporte de humedad y modificaron los patrones precipitación, como resultado se generó una fuerte aridificación regional (Hewit, 2001; Arakaki *et al.*, 2011; Gregory-Wodzicki, 2010).

Las filogenias moleculares de la familia Cactaceae que incluyen árboles calibrados, muestran evidencia de que la diversificación ocurrió recientemente (en el Mioceno) y arrojan tasas de especiación altas para la familia (Hernández-Hernández, 2010; Arakaki *et al.*, 2011). Sin embargo, existen unos cuantos estudios que analizan la relación entre los procesos microevolutivos y los eventos geológicos y geomorfológicos en los sitios considerados centros de diversificación del grupo, como la región árida de México y suroeste de Estados Unidos y los andes centrales (Boyle y Anderson, 2002).

El análisis filogeográfico puede ayudar a comprender cómo ha ocurrido el proceso de especiación en cactáceas a nivel de especies y sus poblaciones, bajo

el contexto de los cambios geológicos que propiciaron el surgimiento y expansión de hábitats áridos, los cuales fueron colonizados por las cactáceas (Rzedowski, 1962; Hershkovitz y Zimmer, 1997; Ritz *et al.*, 2007). La filogeografía analiza cómo están distribuidos espacialmente los linajes de genes, para deducir la influencia de procesos históricos y ecológicos sobre la evolución de poblaciones y especies (Avice, 2000; 2009). La influencia de estos procesos puede deducirse porque las condiciones ambientales cambiantes conducen a cambios en la distribución de las especies y éstos dejan huellas en la composición genética de las poblaciones y especies (Byrne, 2008).

La dispersión y flujo génico, expansión y colonización, contracción y fragmentación son procesos que producen asociaciones genético-espaciales, cuyas huellas pueden visualizarse mediante las técnicas moleculares modernas (Avice 2000; Byrne, 2008). Por ejemplo, las especies que han experimentado contracción a refugios durante los cambios climáticos del Pleistoceno, muestran poblaciones que retienen una alta diversidad genética y haplotipos ancestrales. El aislamiento geográfico debido las fluctuaciones climáticas y/o eventos biogeográficos lleva a la divergencia genética entre poblaciones y a largo plazo al desarrollo de distintos linajes; entre mayor sea el período de aislamiento mayor será esta divergencia. La expansión rápida, desde el límite de la distribución de la especie hacia hábitats inhóspitos, puede llevar a la pérdida progresiva de la diversidad genética, conforme se expande el rango (Byrne, 2008)

Los estudios filogeográficos han permitido poner a prueba hipótesis biogeográficas; comprender la evolución del aislamiento reproductivo entre poblaciones; determinar la influencia de los cambios históricos en el tamaño

efectivo poblacional sobre los niveles de diversidad genética; e inferir el impacto de las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno sobre la distribución actual de la biota y su estructura genética (Beheregaray, 2008; Byrne, 2008). La mayoría de estos estudios se han enfocado en especies del hemisferio norte, en regiones que han estado afectadas directamente por las glaciaciones del Pleistoceno como las zonas montañosas de Europa (Hewit, 2000, Petit *et al.*, 2002), este y oeste de Norte América (Avice, 2000; Soltis *et al.*, 2006).

En los últimos años se ha comenzado a examinar la influencia de los eventos climáticos y geológicos sobre la distribución y estructura genética en plantas de biomas áridos (Byrne 2008; Rebering *et al.*, 2010). La estructura genética de algunas especies de las familias Cactaceae, Papaveraceae, Euphorbiaceae y Asteraceae de los ambientes áridos del suroeste de Estados Unidos y zonas adyacentes de México muestran huellas tanto de vicarianza como de las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno (Nason *et al.*, 2002; Clarck-Tapia y Molina-Freaner, 2003; Sosa *et al.*, 2009; Garrick *et al.*, 2009; Fehlbert y Ranker, 2009; Rebering *et al.*, 2010). Con base en presencia de distintos grupos de haplotipos, así como una asociación significativa entre haplotipos y localidades, se ha inferido la contracción hacia múltiples refugios (parches de vegetación xerófila con temperaturas cálidas) donde persistieron las especies en los períodos fríos y húmedos (Garrick *et al.*, 2009; Fehlbert y Ranker, 2009). Asimismo, se ha encontrado evidencia de flujo génico restringido, aislamiento por distancia, fragmentación alopátrica y expansión contigua post-glacial hacia los hábitats áridos recién formados, en un fase de aridificación a gran escala en el Holoceno (Rebering *et al.*, 2010).

Estos trabajos representan los primeros estudios filogeográficos realizados en plantas ambientes áridos del norte del país, mientras que las especies de los biomas áridos del centro y centro-sur de México han sido menos estudiadas (Sosa *et al.*, 2009). Se sabe poco sobre la influencia de los eventos históricos en la estructura genética de especies del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (VTC), el cual ha experimentado una compleja evolución geológica a lo largo del Cenozoico (Dávalos-Álvarez *et al.*, 2007), y representa uno de los centros de diversificación de cactáceas más importantes de Norte América (Hernández y Godínez, 1994).

El surgimiento del VTC comenzó al final de Cretáceo, con la orogenia que formó las tierras altas de la Sierra Madre del Sur (Nieto-Samaniego *et al.*, 2006; Cerca *et al.*, 2007) y continuó su evolución durante el Paleogeno hasta el Cuaternario por la acción de eventos regionales como magmatismo extrusivo e intrusivo, fallamiento extensivo y desplazamiento de bloques (Morán-Zenteno *et al.*, 1999; Martiny *et al.*, 2000; en Beraldi-Campesi *et al.*, 2006).

El Valle de Tehuacán es una fosa tectónica que debe su origen al hundimiento del bloque estructural al oeste de la falla de Oaxaca con respecto a la Sierra Mazateca (Nieto-Samaniego *et al.*, 2006; Dávalos-Álvarez *et al.*, 2007). Este medio graben tectónico se constituyó inicialmente como un sistema endorreico, formando un lago que perduró hasta finales del Terciario (Dávalos-Álvarez *et al.*, 2007). El registro estratigráfico de la región indica que la evolución del Valle de Tehuacán durante el Cenozoico se debe a re-activaciones de la falla de Oaxaca, las cuales ampliaron la zona de valle, formaron cuencas menores e interrumpieron la continuidad de algunas cadenas de montañas (Dávalos-Álvarez *et al.*, 2007; Medina-Sánchez, 2010). La presencia de macizos montañosos

alrededor del medio graben de Tehuacán generó el aislamiento del valle que le confirió el ambiente semiárido característico de la región, desde por lo menos el Eoceno tardío (Beraldi-Campesi *et al.*, 2006) y que se incrementó durante el Cuaternario (Valiente-Banuet *et al.*, 2006). Debido a las diferencias altitudinales y de topografía, el interior del Valle ha presentado una variedad de ambientes a través del tiempo geológico (Valiente-Banuet *et al.*, 2000).

Por otra parte, los pocos estudios sobre reconstrucción paleoecológica del sur de México sugieren cambios en la distribución de las comunidades vegetales así como un incremento regional en la aridez posiblemente desde el Oligoceno (Ramírez-Arriaga *et al.*, 2006). Se ha inferido la presencia de linajes adaptados a ambientes secos, como cactáceas, agaváceas, leguminosas, compuestas y gramíneas que actualmente son elementos dominantes de los algunos de los tipos vegetación xerófila en la región (Carranza 2001; Cevallos-Ferriz y Ramírez 2004). Es muy probable que en esta región las comunidades vegetales hayan sido objeto de cambios de altitud, ubicación y extensión debidas eventos geológicos e incremento en la aridez (Beraldi-Campesi *et al.*, 2006; Ramírez-Arriaga *et al.*, 2006).

A esta heterogeneidad ambiental a lo largo del tiempo geológico se ha asociado la diversificación de la flora, incluyendo las cactáceas (Dávila *et al.*, 2002). Actualmente habitan en el VTC 28 géneros con 86 especies de la cuales 21 son endémicas (Arias *et al.*, 2012). Es probable que conforme evolucionara la geomorfología del VTC, y se incrementó la aridez, se desarrollara el mosaico de hábitats que promovió la evolución de linajes independientes y, a largo plazo, la especiación de cactáceas.

A este complejo escenario geológico y geomorfológico, con la configuración de una amplia variedad de paisajes y ambientes, puede estar asociado el aislamiento geográfico, la expansión, fragmentación de poblaciones y cambios en el tamaño poblacional de cactáceas. Así, se evaluó si la estructura filogeográfica de dos especies endémicas con distribución discontinua está asociada a la ampliación de valles, formación de cuencas, la interrupción de la continuidad de cadenas montañosas, que acontecieron en los últimos millones años, y en general, a la amplia heterogeneidad topográfica al interior del VTC.

En el VTC se ha observado una notoria asociación entre la distribución de cactáceas y el paisaje (Peters, 2000; Valiente-Banuet, 2001). Las mammillarias y columnares muestran una fuerte asociación con la altitud, la pendiente y el sustrato. De acuerdo con Peters (2000), las mammillarias se pueden separar en dos grupos: las de altura (2046-2219 m snm) y las de tierra caliente (763-1633 m snm). Las primeras se establecen en zonas planas con pendiente poco pronunciada (6-19°), mientras que las segundas en terrenos con pendientes pronunciadas o acantilados (Peters, 2000). La distribución de la mayoría de las cactáceas de hábito columnar muestra una fuerte asociación con la altitud, la mayor concentración de ellas se ubica dentro del rango entre 1200-1400 m snm, aunque algunas especies se encuentran a una altitud mayor, 1600-1900 m (Serrano-Estrada, 2010), así como a afloramientos litológicos y tipos de suelo (Valiente-Banuet, 2001; Zavala-Hurtado, 1982).

Se emplearon dos cactáceas endémicas con distribución geográfica y características ecológicas contrastantes: un cacto globoso, *Mammillaria pectinifera* F.A.C. Weber, Dict. Hort., y *Cephalocereus columna-trajani* (Karw. Ex

Pfeiff.) K. Schum., Pflanzenr., un cacto columnar, para analizar la relación entre la estructura genética y evolución del paisaje que ha dado lugar al mosaico de hábitats donde ocurrió la radiación de columnares mexicanas y algunas mammillarias a lo largo del Neogeno (23.03 m.a.).

Mammillaria pectinifera se distribuye discontinuamente en el norte el VTC. Las pequeñas poblaciones restringen a montañas planas, dentro de un rango altitudinal de 1778-2130 m (Zavala-Hurtado y Valverde-Padilla, 2003). Es posible que dichas montañas hayan estado aisladas geográficamente por largos periodos de tiempo. Por otra parte, la especie presenta baja capacidad de dispersión la cual puede restringir flujo génico. En contraste, *Cephalocereus columna-trajani* se distribuye ampliamente a lo largo del valle en laderas montañas a una altitud entre 800-1800 m sobre afloramientos de rocas calizas (Valiente-Banuet, 2001), en terrenos muy accidentados (pendiente media = 10.7°), con suelos muy pedregosos, someros y caracterizados por una elevada cantidad de materia orgánica, fósforo, sodio y magnesio (Zavala-Hurtado, 1982). Aunque se ha estimado que este cacto tiene un origen reciente (Pleistoceno), abunda dentro del VTC, debido en parte a que la dispersión de semillas se ve favorecida por la interacción que mantiene con murciélagos. Es probable que las poblaciones de *C. columna-trajani* se expandieran conforme se ampliaba su hábitat a lo largo del VTC.

La hipótesis general que se puso a prueba es que la distribución actual, la estructura genética y divergencia de linajes de *Mammillaria pectinifera* y *Cephalocereus columna-trajani* han sido moldeadas por los eventos geológicos y

geomorfológicos del Valle de Tehuacán-Cuicatlán ocurridos a lo largo del Neogeno.

El objetivo general de esta investigación fue analizar la estructura filogeográfica de dos cactus endémicos con distribución discontinua, mediante secuencias de ADN de cloroplasto, para inferir eventos de aislamiento geográfico, expansión poblacional y cambios en el tamaño poblacional asociados a la evolución geomorfológica reciente y contribuir a explicar los procesos que subyacen al origen, distribución, especiación y mantenimiento de la biodiversidad de cactáceas en el VTC.

Los objetivos específicos consistieron en: a) conocer el estado de conocimiento de los estudios sobre estructura genética que han contribuido a explicar la evolución en cactáceas y sus poblaciones, b) determinar si en el cacto globoso *Mammillaria pectinifera*, el aislamiento geográfico ha sido un factor que promueve la divergencia poblacional, y a largo plazo la especiación y c) inferir si la estructura genética de *C. columna-trajani* es resultado de un proceso de expansión, posiblemente a causa la expansión de su hábitat.

México alberga la mayor riqueza especies de cactáceas a nivel mundial (660) y mayor número de especies endémicas (78%), por lo que es considerado un país altamente prioritario para la conservación de la familia (Ortega-Baez y Godínez-Álvarez, 2006). Sin embargo, 263 especies que representan el 39.83% de las especies se encuentran enlistadas en la NOM -059-ECOL-2001 (SEMARNAT, 2002) bajo alguna categoría de riesgo para su conservación (Arias *et al.*, 2005; Ortega-Baez y Godínez-Álvarez, 2006). De de los cuatro principales centros de diversidad (México y suroeste de Estados Unidos; Andes centrales;

este de Brasil; Oeste y Sur de Brasil, Paraguay, Uruguay y sur y este de Argentina), el mayor número de especies amenazadas se encuentra en México (Hernández y Godínez, 1994; Boyle y Anderson 2002). La colecta ilegal, tráfico internacional y cambio de uso de suelo, son los principales factores que ponen en riesgo su preservación (Boyle y Anderson 2002).

Por otra parte, la combinación de características biológicas y ecológicas que presentan las cactáceas hace que la vulnerabilidad a las perturbaciones se incremente. La mayoría de ellas presentan distribución restringida a hábitats específicos, o presentan algún grado de rareza; ciclos de vida largos, tasas de crecimiento y reclutamiento bajas o negativos, características que dificultan el restablecimiento demográfico después de una perturbación (Hernández y Godínez, 1994).

Aun nos encontramos lejos de comprender el patrón de rápida diversificación del grupo, por lo que es urgente implementar estudios filogeográficos pueden contribuir a explicar los procesos responsables de su origen y diversificación. Esta información será útil para mejorar las acciones para su preservación. Dentro de las regiones áridas mexicanas consideradas prioritarias para la conservación del grupo es urgente contar con información genética de las especies de estas zonas, que expliquen los procesos históricos, ecológicos y evolutivos que mantienen su diversidad. Por otra parte, comprender la diversificación de cactáceas y su relación con evolución geomorfológica ayudará a comprender la diversificación de la flora de ambientes áridos mexicanos, que son reconocidos a nivel mundial como regiones con alta riqueza

biológica y endemismos, y al mismo tiempo a conservar las comunidades vegetales.

Esta tesis se encuentra organizada en tres capítulos, en el Capítulo I se presenta una síntesis de las investigaciones realizadas con especies silvestres, las cuales se basan principalmente en el enfoque de la genética de poblaciones clásica. Se mencionan algunas hipótesis preliminares sobre la importancia relativa de las fuerzas evolutivas y su efecto en la estructura y especiación de cactus. Se discute la urgencia de implementar estudios filogeográficos que permitan poner a prueba hipótesis biogeográficas relacionadas con eventos geológicos y geomorfológicos, particularmente aquellos ocurridos desde el Mioceno, y los cambios climáticos del Pleistoceno.

En el Capítulo II se presenta el análisis de la estructura genética y edades de origen y divergencia de los haplotipos de *Mammillaria pectinifera*. En la hipótesis se planteó que si el aislamiento poblacional, posiblemente durante largos períodos de tiempo, y la baja capacidad de dispersión han restringido fuertemente el flujo génico, entonces es posible encontrar linajes de haplotipos estructurados geográficamente y una alta diferenciación genética. El objetivo en este capítulo fue determinar si el aislamiento geográfico, debido a la evolución del paisaje a lo largo del Plioceno/Pleistoceno, ha sido un factor determinante de la distribución, origen y estructura genética de *M. pectinifera*.

En el Capítulo III se estudio la estructura filogeográfica del cactus columnar *Cephalocereus columna-trajani* En la hipótesis se puso a prueba fue que si las poblaciones de *C. columna-trajani* se han expandido conforme su hábitat lo hizo, la diferenciación genética sería baja y se encontraría uno o varios haplotipos con

distribución amplia. Así, el principal objetivo de este capítulo fue inferir *C. columna-trajani* si la distribución actual y estructura genética reflejan un proceso de expansión, como resultado del surgimiento y expansión de su hábitat.

Capítulo I

Estructura genética y filogeografía en cactáceas

En este capítulo se presenta una síntesis de los estudios sobre genética de poblaciones clásica y filogeografía que brindan información de los principales procesos microevolutivos y factores históricos que han moldeado la estructura genética de cactáceas, los cuales representan el punto de partida para explicar la especiación en algunas especies.

Los estudios están enfocados a especies de la subfamilia Cactoide, en particular a especies de las tribus Cacteeae, Cereeae y Pachycereeae. Dentro de éstas, las columnares y muestran el flujo génico ha jugado un papel importante en su evolución y que en globosas, con distribución restringida y tamaños poblacionales pequeños, la deriva génica puede ser determinantes en su alta diferenciación

poblacional. Por otra parte, es notoria la falta de estudios sobre el papel de la selección natural en la rápida especiación de cactus.

Observamos que en la mayoría de los estudios no se han puesto a prueba hipótesis biogeográficas relacionadas con eventos tectónicos ocurridos a lo largo del Mioceno, particularmente en las regiones áridas del norte de América, centro de México y la región andina las cuales presentan una compleja topografía y alta diversidad de especies.

En la mayoría de las cactáceas estudiadas del norte de Sudamérica, ubicadas en la región pericaribeña, los cambios climáticos del Pleistoceno son considerados un factor importante que ha moldeado la distribución y la estructura genética. Sin embargo, en el suroeste de Norte América se tiene un escaso de la influencia de los cambios climáticos del Pleistoceno en la estructura genética de las especies. Se discute la necesidad de ampliar los estudios filogeográficos, considerando los eventos geo-climáticos a lo largo del Neogeno ocurridos en México, para poner a prueba procesos de especiación por alopatría, eventos de expansión; ponderar la importancia de selección natural y la deriva génica; y comprender el impacto de las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno.

El escrito que se presenta a continuación consiste del artículo de revisión publicado en la revista *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*.

Estructura genética y filogeografía en cactáceas

Cornejo-Romero Amelia^{1,2}, Vargas-Mendoza Carlos Fabián³,
Valverde Pedro² & Rendón-Aguilar Beatriz^{2*}

Resumen

Hay un creciente interés por identificar los procesos de especiación de plantas de biomas áridos mexicanos que originaron su alta diversidad florística, entre ellas destacan las cactáceas. El análisis de la genética de poblaciones y la filogeografía permiten inferir los procesos ecológicos e históricos relacionados con el origen, distribución de la diversidad y la especiación a nivel infraespecífico. Se presenta una revisión de los estudios sobre estructura genética que pueden contribuir a explicar la especiación de cactáceas. Se describió el papel que tienen los procesos microevolutivos (p.e. selección natural, deriva génica) en la diversificación de los cactus y se discute la importancia de poner a prueba, desde el enfoque filogeográfico, hipótesis históricas sobre vicarianza y dispersión, así como determinar el efecto de las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno en la divergencia de linajes, para comprender el impacto de estos eventos históricos en la evolución del grupo.

Palabras clave: Cactaceae, estructura genética, filogeografía, mecanismos evolutivos, especiación, eventos históricos.

Abstract

There is a growing interest in identifying plant speciation processes of Mexican arid biomes that originated its high flora richness, including cacti. Population genetics and phylogeography analysis allow to infer ecological and historical processes related to origin and distribution of diversity and speciation at infra specific level. We provide a review of knowledge of genetic structure that contributes to explain cacti speciation. We described the relative role of the different microevolutionary mechanisms (e.g., natural selection, genetic drift) in the diversification process of cactus and we discuss how future phylogeography studies are likely to shed light on vicariance and dispersal, as well as Pleistocene climatic fluctuations on lineage divergence and speciation.

Key words: Cactaceae, genetic structure, phylogeography, evolutive mechanisms, speciation, historical events.

Introducción

La familia Cactaceae representa una de las radiaciones evolutivas más llamativas de

los taxa de biomas áridos de América. Los estudios basados en filogenias moleculares señalan que este grupo monofilético presenta altas tasas de especiación y la radiación

¹ Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, D.F. México.

² Departamento de Biología, Universidad Autónoma Metropolitana, D.F. México.

³ Departamento de Zoología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, D.F. México.

* Autor de correspondencia: bra@xanum.uam.mx



Alejandro Zavala

FOTO 1. *Carnegiea gigantea*.

ocurrió recientemente durante la expansión de ambientes áridos, probablemente en el Mioceno/Plioceno (Hernández-Hernández 2010; Arakaki *et al.* 2011, Bárcenas *et al.* 2011). La radiación coincide con la reducción global en la precipitación y en la concentración de CO₂ (Arakaki *et al.* 2011), así como eventos geológicos continentales. Éstos incluyen la elevación de sistemas montañosos en norte y Sudamérica que aislaron cuencas, intensificaron las condiciones de aridez y configuraron la amplia variedad de hábitats que las cactáceas colonizaron exitosamente (Rzedowski 1962; Hershkovitz & Zimmer 1997; Ritz *et al.* 2007; Hernández-Hernández 2010; Arakaki *et al.* 2011). Sin embargo, se sabe poco sobre el papel de los procesos microevolutivos (selección natural, flujo génico, endogamia y deriva génica) y su importancia relativa en la especiación de cactáceas a nivel infraespecífico. La genética de poblaciones y la filogeografía ofrecen las herramientas para inferir los procesos microevolutivos, los factores ecológicos e históricos que subyacen al origen y distribución de la diversidad genética y la especiación (Avice 2000; Beheregaray 2008).

Durante mucho tiempo se ha mantenido la idea de que la selección natural es una fuerza determinante en la evolución de cactáceas (Gibson & Nobel 1986; Landrum 2002). Sin embargo, no se han reportado trabajos en los que se mida la selección, se muestre evidencia contundente de su papel en la diversificación y se determine el valor de los caracteres adaptativos más allá de los síndromes de polinización (Gibson & Nobel 1986).

Recientemente, Gorelick (2009) propuso que la deriva génica puede ser una fuerza evolutiva más importante que la selección

natural o reduce su intensidad, pues gran parte de las cactáceas tienen tamaños efectivos poblacionales (N_e) pequeños, son endémicas y se distribuyen de manera restringida. Otra condición que da sustento a esta hipótesis es que probablemente el tamaño poblacional de los cactus se mantenga bajo durante largos periodos de tiempo debido a que el reclutamiento ocurre ocasionalmente (en pulsos sincronizados con eventos de precipitación) y que varias especies muestran tasas de crecimiento poblacional negativo (Godínez-Alvárez *et al.* 2003).

Los N_e reducidos, el endemismo y la distribución restringida propician una alta endogamia local e incrementan la intensidad de la deriva, en particular en especies que presentan autofertilización (Gorelick 2009). Las cactáceas más propensas a la endogamia son aquellas especies con ciclos de vida cortos como las globosas que tienden a presentar sistemas de apareamiento mixto y autogamia, mientras que las menos propensas son las Pachycereeae, especies en las que predomina el entrecruzamiento y presentan ciclos de vida largos (Mandujano *et al.* 2010).

Entre mayor sea la endogamia menor será el N_e y mayor el papel de la deriva (Gorelick 2009). Por lo que puede esperarse que en globosas la deriva y la endogamia actúen con gran intensidad y tengan un efecto importante en su especiación.

Los estudios genéticos realizados en las cactáceas columnares que son polinizadas por murciélagos señalan que el flujo génico tiene un efecto homogeneizador entre poblaciones (Hamrick *et al.* 2002). Por otra parte, en especies polinizadas por animales con baja vagilidad, el flujo génico restringido puede intensificar la divergencia poblacional. Es probable que en cactáceas

con ciclo de vida corto y crecimiento globoso el flujo génico restringido sea un factor que promueva la especiación (Mandujano *et al.* 2010).

Con respecto a los eventos históricos, se conoce poco sobre el efecto de eventos biogeográficos, evolución geomorfológica y fluctuaciones climáticas en la estructura genética de cactáceas y su diversificación (Nason *et al.* 2002). A lo largo del tiempo, los eventos históricos modifican la distribución espacial propiciando el desarrollo de diferencias genéticas entre poblaciones como resultado del aislamiento espacial y reproductivo, así como de la selección local adaptativa, los cuales a largo plazo pueden llevar a la especiación (Fox *et al.* 2001). En Norte América a lo largo del Plioceno y Pleistoceno los eventos biogeográficos y climáticos configuraron la distribución actual de los biomas áridos, de manera que estos eventos pudieron tener un fuerte impacto en la distribución de la variación genética de cactus y su especiación. Dado que en algunas cactáceas cercanamente emparentadas prevalece la distribución segregada, particularmente en aquéllas de las regiones áridas y semiáridas del norte de México, se ha planteado que la especiación alopátrica puede ser el modo dominante de especiación en las cactáceas de Norte América, aunque es necesario poner a prueba esta hipótesis (Gibson & Nobel 1986; Hernández & Gómez-Hinostrosa 2011).

En la presente revisión se analiza la información disponible sobre estructura genética y filogeografía en cactáceas a fin de evaluar los principales patrones y procesos microevolutivos que contribuyen a explicar la especiación. México es un sitio clave en la radiación evolutiva de cactáceas, pues representa el principal centro de diversi-

dad a nivel mundial (Godínez-Álvarez & Ortega-Baez 2007), por lo que es urgente determinar cómo está configurada espacialmente la diversidad genética, analizar el papel de las fuerzas microevolutivas e inferir el impacto de los eventos geoclimáticos en su evolución.

Material y métodos

Se realizó la búsqueda de estudios sobre variación genética y estructura poblacional en cactáceas publicados en bases de datos electrónicas como *ISI WEB of Knowledge* de *Thompson Scientific* y *Biological Abstracts*. La búsqueda de información se realizó empleando términos como *genetic diversity*, *genetic structure*, *genetic differentiation*, *phylogeography* y *Cactaceae* en título, resumen y palabras clave en todos los artículos publicados de 1990 a 2012. Asimismo, se hizo una búsqueda de tesis a nivel nacional en la base de datos *tesiumam*.

La base de datos incluye estudios en los que se reportan estimadores básicos de la diversidad y estructura genética (H_{es} y F_{ST}) los cuales son comparables entre estudios y permiten inferir las fuerzas evolutivas. Los estimadores que reportan los estudios se obtuvieron a partir de isoenzimas, *RAPD*'s y microsátélites. Esta base se ordenó de acuerdo a la subfamilia *Pereskioideae*, *Opuntioideae* y *Cactoideae*. En ésta última los datos se ordenaron por tribus (*Cacteae*, *Pachycereeae* y *Cereae*). Se compararon los estimadores de diversidad y estructura entre especies con base en las características de historia de vida (sistemas de apareamiento, polinización y dispersión) y se describen las principales fuerzas evolutivas y factores históricos que han tenido una influencia importante en la configuración genética de las especies. Se discute la urgencia de implementar métodos y análisis filogeográficos para poner a prueba hipótesis biogeográficas relacionadas con los eventos geoclimáticos que dieron origen

Alejandro Zavala



FOTO 2. *Neobuxbaumia tetetzo*.

a la expansión de biomas áridos mexicanos y puedan explicar la especiación de cactáceas a nivel infraespecífico.

Resultados

Los estudios sobre estructura genética y filogeografía que contribuyen a explicar la evolución a nivel infraespecífico en la

familia Cactaceae se encuentran en su etapa inicial. De las más de 2000 cactáceas descritas, sólo se han analizado alrededor de 28 especies silvestres, las cuales están comprendidas en 14 de los cerca de 100 géneros reconocidos. Los estudios están sesgados hacia la subfamilia Cactoideae, en particular miembros de las tribus Cacteeae, Pachycereeae y Cereeae de los nueve que



David Bravo

FOTO 3. *Stenocereus pruinosus*.

comprende la subfamilia. Los miembros de Pereskioideae y Opuntioideae son los menos estudiados y ninguna especie de Maihueinioideae ha sido analizada (Cuadro 1). Por lo que los resultados descritos aquí deben considerarse exploratorios.

En Norte América se han examinado principalmente especies de la subfamilia Cactoideae, cuatro pertenecen a la tribu Cacteeae y 12 a Pachycereeae. Éstas se distribuyen en los desiertos de Sonora y Baja California y en la región semiárida del Valle de Tehuacán en Puebla, a excepción de la globosa *Astrophytum asterias* del desierto Chihuahuense (Cuadro 1). No se han reportado estudios de la zona árida Queretano-Hidalguense de México.

En Sudamérica se ha estudiado una especie de la subfamilia Pereskioideae y una de Opuntioideae. Dentro de las Cactoideae se incluye a un miembro de Pachycereeae y nueve de Cereae (Cuadro 1). Los estudios se concentran en la región árida pericari-beña de Venezuela, la vegetación brasileña denominada caatinga y las islas Galápagos. No se han reportado trabajos de la región árida andina. Tanto en Norte América como en Sudamérica, la mayoría de las cactáceas estudiadas son endémicas y de distribución restringida (Cuadro 1). En el caso de las especies con distribución amplia sólo se han estudiado algunas poblaciones dentro de un mismo país o región.

En el cuadro 2 se sintetiza la información sobre los estimadores genéticos, características de historia de vida, eventos históricos y fuerzas microevolutivas que han moldeado la estructura genética en cactus. Como se observa en el cuadro 2, las isoenzimas son el principal marcador molecular empleado, con el 72% de los trabajos, mientras que los *RAPD*'s y microsátélites

se han utilizado en menor proporción. Los cactus de hábito columnar y arboreo son los más estudiados, seguidos de los globosos y arbustivos (Cuadro 2). En las especies de Pachycereeae se observa cierta correspondencia entre los atributos genéticos y las características ecológicas, aunque en Cereae no sucede lo mismo (Cuadro 2). Asimismo, se observa que en la mayoría de las especies de Pachycereeae y Cacteeae no se ha profundizado en los aspectos históricos que contribuyen a inferir el papel de las fuerzas evolutivas (Cuadro 2). A continuación se describen en mayor detalle los resultados de las especies reportadas y algunas conclusiones relevantes sobre los procesos microevolutivos.

Pereskioideae y Opuntioideae

El único estudio reportado de la subfamilia Pereskioideae se realizó en *Pereskia guamacho*. La especie presentó alta diversidad genética ($H_e=0.239$), la cual se concentra en poblaciones del noroeste de Venezuela. En poblaciones de la península de Paraguana la variación fue menor, posiblemente como resultado del aislamiento geográfico que impidió la reintroducción de alelos del continente y la reducción del tamaño poblacional (Nassar *et al.* 2002). La diferenciación genética ($\theta=0.112$) se atribuyó a la distribución amplia y continua de las poblaciones que favorecen el flujo de genes, aún cuando la polinización y dispersión sea mediada por insectos.

En la familia Opuntioideae, se evaluó el papel de la especiación alopátrica a fina escala de las tres variedades de *Opuntia echios* (var. *echios*, var. *gigantea* y var. *zacana*), distribuidas alrededor de la Isla Santa Cruz e islas satélite en las Galápagos (Helsen *et al.* 2011). Se detectaron, mediante

CUADRO 1. Cactáceas estudiadas con el enfoque de la genética de poblaciones y filogeografía. Las especies están ordenadas de acuerdo a la subfamilia y tribu dentro de Cactoideae (Bárcenas *et al.* 2011). Se indica distribución regional y continental. Fotos 1-7.

Especie	Subfamilia/Tribu	Distribución
<i>Pereskia guamacho</i>	P	Endémica de Venezuela y Colombia •
<i>Opuntia echios</i>	O	Endémica de las Islas Galápagos, Ecuador •
<i>Astrophytum asterias</i>	C/Cac	Edémica del desierto Chihuahuense ♦
<i>Mammillaria crucigera</i>	C/Cac	Endémica del VTC ♦
<i>Mammillaria napina</i>	C/Cac	Endémica del VTC ♦
<i>Mammillaria sphacelata</i>	C/Cac	Endémica del VTC ♦
<i>Carnegiea gigantea</i>	C/Pac	Endémica del Desierto Sonorense ♦
<i>Cephalocereus columna-trajani</i>	C/Pac	Endémica del VTC ♦
<i>Cephalocereus totolapensis</i>	C/Pac	Endémica de Oaxaca ♦
<i>Lophocereus schottii</i>	C/Pac	Amplia desde Sinaloa, Baja California y Arizona ♦
<i>Neobuxbaumia macrocephala</i>	C/Pac	Endémica del VTC ♦
<i>Neobuxbaumia mezcalaensis</i>	C/Pac	Amplia desde la Cuenca del Río Balsas y el VTC ♦
<i>Neobuxbaumia tetetzo</i>	C/Pac	Endémica del VCT ♦
<i>Pachycereus pringlei</i>	C/Pac	Endémica del Desierto Sonorense ♦
<i>Stenocereus eruca</i>	C/Pac	Endémica, restringida a áreas costeras de las planicies de Magdalena, Baja California Sur ♦
<i>Stenocereus griseus</i>	C/Pac	Amplia, en Venezuela •
<i>Stenocereus gummosus</i>	C/Pac	Endémica del Desierto Sonorense ♦
<i>Stenocereus stellatus</i>	C/Pac	Endémica del Centro de México ♦
<i>Stenocereus thurberi</i>	C/Pac	Endémica del Desierto Sonorense ♦
<i>Cereus repandus</i>	C/Cer	Amplia, Venezuela •
<i>Melocactus concinnus</i>	C/Cer	Amplia, Brasil •
<i>Melocactus curvispinus</i>	C/Cer	Amplia, en Centro América, sur de México y Venezuela •
<i>Melocactus glaucescens</i>	C/Cer	Endémica de Brasil •
<i>Melocactus paucispinus</i>	C/Cer	Endémica de Brasil (Bahia) •
<i>Pilosocereus lanuginosus</i>	C/Cer	Amplia, desde Venezuela, Ecuador, Perú, Colombia, Antillas menores •
<i>Pilosocereus machrisii</i>	C/Cer	Restringida al este de Brasil en poblaciones agregadas •
<i>Pilosocereus tillianus</i>	C/Cer	Endémica de Venezuela •
<i>Praecereus euchlorus</i>	C/Cer	Amplia (sureste de Brasil, Andes y Venezuela), con poblaciones agregadas •

Subfamilia: Pereskioideae, P; Opuntioideae, O; Cactoideae, C. Tribus dentro de Cactoideae: Cacteeae, Cac; Cereae, Cer; Pachyceerae, Pac. Norte América ♦; Sudamérica •; Valle de Tehuacán-Cuicatlán, VTC



David Bravo

FOTO 4. *Sienocereus stellatus*.



Salvador Arias

FOTO 5. *Cephalocereus totolapensis*.

microsatélites, dos grupos genéticos: el primero formado por todas las opuntias de Santa Cruz (var. *echios* y var. *gigantea*) y el segundo por las opuntias de las islas satélite Syemour Norte y Daphne Mayor (var. *echios* y var. *zacana*). La formación de estos dos grupos puede ser resultado del aislamiento de Daphne Mayor del resto de las islas, en el último máximo glacial. Por otra parte, el patrón de aislamiento por distancia observado entre las poblaciones del noroeste y el resto de la Isla Santa Cruz

se explica a partir de la hipótesis sobre la presencia de barreras locales al flujo génico. Dichas barreras consistieron de campos de lava estéril, originadas por la actividad volcánica, que impidieron la colonización de *O. echios* hasta que cambiaron las condiciones ecológicas.

Cactioideae

Cacteae. En Norte América el género más estudiado de esta tribu corresponde a *Mammillaria*. Los atributos genéticos

observados de *Mammillaria crucigera*, *M. napina* y *M. sphacelata*, endémicas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (VTC), consisten en una alta diversidad (H_{es} = 0.591, 0.722 y 0.699, respectivamente) y baja diferenciación genética, a excepción de *M. crucigera* (R_{ST} = 0.591) que mostró la diferenciación más alta de todas las globosas (Cuadro 2). La estructura genética de *M. crucigera*, *M. napina* se asocia con la distribución discontinua y la endogamia local que promueven los insectos (himenópteros, dípteros y coleópteros) que de acuerdo con la morfología floral, probablemente las polinizan. La deriva génica puede ser un factor determinante en la estructura genética pues las poblaciones están formadas por un número reducido de individuos, a excepción de *M. sphacelata* (Ibarra 2009; Tapia 2011). Dado que *M. sphacelata* presenta reproducción mixta, se sugiere que la endogamia puede ser favorecida por la reproducción asexual y dispersión de rametos (Tapia 2011).

Pachyceerae. Independientemente del marcador molecular empleado, la mayor parte de las especies de la tribu Pachyceerae muestran una alta diversidad genética (H_{es} = 0.129–0.402) y un nivel de estructuración bajo (F_{ST} = 0.017–0.281) (Cuadro 2). Estos valores están dentro de los rangos de diversidad y diferenciación genética reportados para especies leñosas de vida larga, polinizadas y dispersadas por animales, así como en los rangos obtenidos para columnares norte americanas (Hamrick *et al.* 2002). Cerca de la mitad de las especies presentan entrecruzamiento obligado, dispersión a larga distancia y polinización por animales, principalmente murciélagos (Cuadro 2). Éstos son considerados los polinizadores efectivos de

columnares y son capaces de desplazarse grandes distancias, hasta 40 km por noche (Rojas-Martínez & Valiente-Banuet 1996, 2002; Nassar *et al.* 1997). Este intenso flujo de genes puede evitar la acumulación de diferencias genéticas que llevan a la divergencia poblacional.

Dentro de los estudios realizados en especies norteamericanas, el de Esparza-Olguín (2005) puede ilustrar sobre la alta diversidad que muestran las cactáceas columnares. Se comparó la diversidad genética y el grado de rareza (en relación al rango de distribución) de *Neobuxbaumia macrocephala*, *N. mezcalaensis* y *N. tetetzo*, siendo la primera la de distribución más restringida dentro del VTC y la última de distribución más amplia. La diversidad genética de las tres columnares es alta (H_{es} = 0.335, 0.402 y 0.307, respectivamente) e independiente del grado de rareza. Dado que la diversidad genética es mayor a la reportada en otras especies raras, se concluyó que en estas especies, la diversidad genética no está relacionada con el nivel de rareza. Debido a que *N. macrocephala* presenta una variación genética mayor a la esperada, se considera que la especie proviene de poblaciones más amplias y diversas; los resultados positivos de un análisis de cuello de botella reciente apoyan esta hipótesis.

En cuatro poblaciones de *Stenocereus stellatus*, establecidas en un abanico aluvial de posible origen holocénico, se estudió si la estructura genética estaba influenciada por el grado de evolución edáfica de las cuatro terrazas que forman dicho abanico (Cornejo-Romero 2004). Se encontró una alta diferenciación local (F_{ST} = 0.106) que se relacionó con el reclutamiento diferencial en las terrazas, el cual a su vez está condicionado por el desarrollo edáfico.

Éste originó un gradiente de aridez, en el cual las terrazas antiguas tienen suelos más áridos y en ellos predomina el reclutamiento clonal. Mientras que el resto de los suelos, de formación más reciente, ofrece un microambiente más húmedo que favorece el reclutamiento vía semillas. El tipo de reclutamiento predominante entre los pisos del abanico pudo originar una composición genética distinta y llevar a la alta diferenciación local. Por lo que es probable que la heterogeneidad microambiental sea un factor que contribuya a la divergencia de las poblaciones de *S. stellatus* y limite el flujo génico dentro de esta geofорма. Otra posible explicación, que requiere ponerse a prueba, está relacionada con la selección natural dirigida por estrés hídrico entre pisos que promovió la diferenciación genotípica.

Los dos estudios con enfoque filogeográfico que ponen a prueba hipótesis biogeográficas pertenecen al Desierto Sonorense y corresponden a *Lophocereus schottii* y *Stenocereus gummosus*. Las poblaciones de estas especies muestran linajes genéticos, estructurados geográficamente a causa de la vicarianza y dispersión, así como a los cambios climáticos del Pleistoceno. En *L. schottii* se encontró evidencia de vicarianza y dispersión. La división de los filogrupos de Baja California y Sonora se explican por dos eventos de vicarianza, uno asociado con la separación de la península del continente y el segundo por la invasión del mar a la península (Nason *et al.* 2002). Asimismo, se infirió que las poblaciones se expandieron hacia el norte de Baja California a partir de un único refugio ubicado al sur, durante los ciclos de contracción y expansión del Pleistoceno. Lo anterior se basó en el hecho de que los parámetros de diversidad genética disminuyen conforme aumenta la latitud;

y que las poblaciones del norte (derivadas) se anidan dentro del filogrupo formado por las poblaciones del sur (ancestrales).

En *S. gummosus* el origen disyunto de las poblaciones de la península y las islas de Baja California, así como las de Sonora, se atribuye, en parte, a la dispersión histórica. En las poblaciones peninsulares de *S. gummosus* también se observó una correlación entre diversidad genética y latitud, la diversidad genética disminuye conforme aumenta la latitud aunque esta correlación es más débil que la reportada en *L. schottii*. Lo anterior sugiere que ambas especies presentan una estructura genética concordante, derivada de una historia ambiental común (Clark-Tapia & Molina-Freaner 2003).

Hasta la fecha sólo se ha publicado un trabajo donde se encuentra evidencia de especiación (Molina-Freaner & Clark-Tapia 2005). Dado que la composición alélica de *S. eruca* es un subgrupo de la de *S. gummosus* y que el porcentaje de loci polimórficos, número de alelos promedio por locus y heterocigosis son menores en *S. eruca* que en *S. gummosus* ($H_{es} = 0.154$ y 0.261 , respectivamente), se determinó que *S. eruca* derivó recientemente de *S. gummosus*.

La moderada variación genética y baja diferenciación de la especie venezolana *Stenocereus griseus* ($H_{es} = 0.182$ y $G_{ST} = 0.092$ respectivamente) se relacionó con el síndrome quireptófilo y se considera que las barreras geográficas que actualmente separan a las poblaciones son insuficientes para promover la especiación.

Cereae. Las especies estudiadas de la tribu Cereae pertenecen a los géneros *Cereus*, *Pilosocereus*, *Praecereus* y *Melocactus*, los cuales mostraron una diversidad de moderada a alta ($H_{es} = 0.145$ – 0.443), y una divergencia

FOTO 6. *Astrophytum asterias*.

poblacional con la misma tendencia (0.126–0.484), si se excluyen las tres especies de melocactos brasileños sujetos a un fuerte impacto antropogénico (*M. glaucescens*, *M. paucispinus* y *M. concisus*) (Cuadro 2).

El patrón de diversidad en *Melocactus* se asoció a características como sistema reproductivo mixto, auto-compatibilidad; polinización y dispersión restringidas, mediadas por colibríes territoriales e insectos. Se planteó que la diferenciación genética se debe a que las poblaciones se encuentran aisladas como resultado de las contracciones y expansiones de las zonas áridas, hace aproximadamente 18000 años, y han impedido el contacto genético (Nassar *et al.* 2001; Moraes *et al.* 2005; Mota-Lambert *et al.* 2006a, b). En general, la diferenciación interpoblacional se relacionó con la acción de deriva génica, escaso flujo de genes y endogamia (Nassar *et al.* 2001; Moraes *et al.* 2005; Mota-Lambert *et al.* 2006a, b). La deriva génica puede ser resultado de la reducción del tamaño poblacional asociado a la fragmentación y el aislamiento poblacional. El flujo génico local se favorece por la conducta territorial del colibrí polinizador, *Chlorostilbon aureoventris*. Es muy probable que ocurra endogamia biparental pues la

dispersión de semillas la realizan lagartijas y hormigas, cuya capacidad de dispersión es limitada.

La diversidad del melocacto venezolano, *M. curvispinus*, es moderada ($H_e=0.145$) y sus poblaciones mostraron niveles de heterocigosidad variables. Es probable que aquellas poblaciones con alta heterocigosidad formaran parte de una vegetación árida más amplia que mantenía poblaciones grandes durante el último glacial máximo. En cambio, en las poblaciones menos diversas, aisladas geográficamente, es posible que la deriva génica haya reducido la variación (Nassar *et al.* 2001).

La alta diversidad y baja diferenciación genética de la columnar venezolana *Pilosocereus lanuginosus* ($H_{es}=0.274$ y $G_{ST}=0.043$, respectivamente) pueden deberse al alto flujo génico que promueve el murciélago nectarívoro *Leptonycteris curasoae* (Cuadro 2). La alta diversidad encontrada en el noroeste de Venezuela y su mantenimiento se asoció con la disponibilidad de hábitats grandes y estables que se distribuyen de manera continua, posiblemente desde el Terciario Tardío (Nassar *et al.* 2003).

Al este de Brasil, las poblaciones de *Pilosocereus machrisii* presentan una alta diversidad genética ($H_{es}=0.38$) y un gran número de alelos raros (Cuadro 2, Moraes *et al.* 2005). Es posible que las poblaciones aisladas se diferenciaron genéticamente como resultado de los eventos de expansión-contracción de ambientes áridos y, al re-establecer el contacto, incrementaran su variación. La pronunciada diferenciación genética de *P. machrisii* ($\theta=0.281$) puede atribuirse a que sus poblaciones son pequeñas y aisladas, así como a la endogamia biparental, la selección contra heterocigotos y al flujo génico restringido



Alejandro Zavala

FOTO 7. *Neobuxbaumia macrocephala*.

CUADRO 2. Valores promedio de diversidad y diferenciación genética en cactáceas, columnares y en las especies de tres subfamilias de cactáceas. Datos basados en isoenzimas (*), microsatélites (**) y RAPD (•). Se indica Forma de vida/Sistema de Cruzamiento/Compatibilidad/Síndrome de polinización (FV/SC/C/SP), datos obtenidos de Mandujano *et al.* 2010. Fuerzas evolutivas y procesos históricos que explican la estructura observada.

Grupo o especie	No. pobs.	N	H_{as}	$G_{ST}^a, F_{ST}^b, R_{ST}^c, \theta^d$	FV/SC/C/SP	Fuerza evolutiva	Proceso histórico	Referencia
Todas las plantas**			0.15 ¹ , 0.214 ²	0.288 ^{1,a} , 0.350 ²				¹ Hamrick <i>et al.</i> 2002; ² Nybohm & Bartish 2000
Leñosas de vida larga••			0.242 ²	0.084 ^{1,a} , 0.250 ²				
Leñosas con entrecruzamiento, polinizadas por animales••			0.211 ¹ , 0.228- 0.260 ²	0.099 ^{1,a} , 0.280 ²				
Plantas con entrecruzamiento, semillas dispersadas por granividad•			0.152	0.189 ^a				Hamrick & Godt 1996
Plantas polinizadas por abejas•			0.305	0.202 ^a				Loveless & Hamrick 1984
Cactáceas ¹ •			0.211 ¹	0.120 ^{1,a}		Alto flujo génico		
PERESKIOIDEAE								
<i>Pereskia guamacho</i> •	17	816	0.239	0.112 ^b	A/E/Al/Me	Alto flujo de genes	Distribución amplia y continua en Venezuela	Nassar <i>et al.</i> 2002

OPUNTIOIDEAE									
<i>Opuntia echinos*</i>	22	444	0.65-0.77	0.056, 0.058 ^b	Ar/E, A/?/?	Bareras locales al flujo génico	Aislamiento geográfico entre islas durante el Último Máximo Glacial	Helsen <i>et al.</i> 2011	
CACTOIDEAE									
<i>Astrophytum asterias*</i>	5	142	0.63-0.81	0.05 ^a	Glo/M/AC, AI/Me			Terry <i>et al.</i> 2012	
<i>Mammillaria crucigera*</i>	3	64	0.555	0.591 ^c	Glo/?/?/?	Deriva génica, endogamia local		Ibarra 2009	
<i>Mammillaria napina*</i>	4	864	0.722	0.09 ^b	Glo/?/?/?	Deriva génica, endogamia local,		Tapia 2011	
<i>Mammillaria sphaeclata*</i>	5	106	0.699	0.103 ^b	Glo/M/?/?	Endogamia		Tapia 2011	
<i>Carnegia gigantea</i> ^{1, •}	16		0.129	0.075 ^a	A/?/Q/?			Hamrick <i>et al.</i> 2002	
<i>Cephalocereus columna-trajani</i> [•]	5	102	0.310	0.287 ^b	Co/E/Al/Q			Vázquez-Montiel 2005	
<i>Cephalocereus torolapensis</i> [•]	3	120	0.229	0.144 ^d	Co/?/Q/?			Palleiro-Dutrenit 2008	
<i>Lophocereus schottii</i> [•]	8	147	0.145	0.150 ^a	A/E/Al/F			Parker & Hamrick 1992	
<i>Lophocereus schottii</i> [•]	22		0.226	0.302	A/E/Al/F	Flujo génico	Vicarianza y dispersión durante los cambios climáticos del Pleistoceno	Nason <i>et al.</i> 2002	
<i>Neobuxbaumia macrocephala</i> ^{••}	3	100	0.535 ⁵ 0.348 ⁴	0.017 ^{5, d} 0.229 ^{4, b} 0.106 ^{4, d}	Co/E/Al/Q			³ Esparza-Olguín 2005; ⁴ Alejos 2002	

<i>Neobuxbaumia mezcalaensis</i> ••	3	103	0.402 ³ 0.280 ⁵	0.042 ^{3,a} 0.230 ^{5,b} , 0.081 ^{5,d}	A/E/AI/Q		5 Rivera 2005
<i>Neobuxbaumia tetetzo</i> ••	3	103	0.507	0.193 ^a	Co/?/?/?		
<i>Pachycereus pringlei</i> ••	19		0.212	0.076 ^a	Co/?/?/?		
<i>Stenocereus erica</i> •	6	436	0.154		Ci/E/AI/‡		Molina-Freaner & Clarck-Tapia 2005
<i>Stenocereus griseus</i> •	15	717	0.182	0.092 ^a	A/?/?/Q	Alto flujo génico	Nassar <i>et al.</i> 2003 Disponibilidad de hábitats grandes y estables, continuos posiblemente desde el Terciario
<i>Stenocereus gummosus</i> •	10-12	600-659	0.261	0.102 ^a	Ai/?/AI/F		Molina-Freaner & Clarck-Tapia 2005
<i>Stenocereus stellatus</i> •	4	147	0.247	0.106 ^a	Co/E/AI/Q		Cornejo-Romero 2004
<i>Stenocereus thurberi</i> ••	20		0.201	0.128 ^a	Co/?/?/‡		
<i>Cereus repandus</i> •	14	648	0.242	0.126 ^a	Co/E/AI/Q	Alto flujo génico	Nassar <i>et al.</i> 2003 Disponibilidad de hábitats grandes y estables, continuos posiblemente desde el Terciario
<i>Melocactus concinnus</i> •	3	64	0.066	0.349 ^b	Glo/?/?/O	Deriva génica, bajo flujo génico, endogamia	Mota-Lambert <i>et al.</i> 2006a Contracciones y expansiones (~18,000 años)
<i>Melocactus curvispinus</i> •	18	864	0.145	0.193 ^a	Glo/M/AC/O	Deriva génica, bajo flujo génico, endogamia	Nassar <i>et al.</i> 2001 Aislamiento geográfico (en poblaciones menos diversas)

<i>Melobactis glaucescens</i> *	4	98	0.03-0.08	0.045 ^b	Glo/?/?/0	Deriva génica, bajo flujo génico, endogamia	Mota-Lambert <i>et al.</i> 2006b
<i>Melobactis paucispinus</i> *	10	256	0.031	0.504 ^b	G 1 o / M / AC/O	Deriva génica, bajo flujo génico, endogamia	Mota-Lambert <i>et al.</i> 2006a
<i>Præacereus euchlorus</i> *	6	91	0.443	0.484 ^d	E/?/?/Q	Tamaño poblacional pequeño, endogamia biparental y selección natural contra heterócigos y flujo génico restringido	Moraes <i>et al.</i> 2005
<i>Pilosocereus lanuginosus</i> *	10	430	0.274	0.043 ^d	A/E/AI/Q	Alto flujo génico	Nassar <i>et al.</i> 2003
<i>Pilosocereus machrisii</i> *	6	94	0.380	0.281 ^d	Ar/?/?/‡	Tamaño poblacional pequeño, endogamia biparental y selección natural contra heterócigos y flujo génico restringido	Moraes <i>et al.</i> 2005
<i>Pilosocereus trillianus</i> *	2	80	0.552	0.028 ^b	Co/?/AC/Q	Alto flujo génico	Figueredo <i>et al.</i> 2011

N = tamaño poblacional; H_{es} diversidad genética o heterocigosis esperada en equilibrio de Hardy-Weinberg [un valor igual a 0 indica que no existe variación genética en la especie y tiende a 1 si la diversidad es alta]; G_{st} , F_{st} y R_{st} = proporción de la diversidad genética debida a diferencias entre poblaciones; θ = diferenciación interpoblacional (equivalente a la F_{st} de Wright). Estos índices son considerados análogos e indican la pérdida de heterocigidad en función del incremento de los homócigos. Si tienden a 1 señalan que las poblaciones son muy distintas genéticamente y si se acercan a 0 indican que las poblaciones están poco diferenciadas y comparten la mayor parte de la variación.
 Forma de vida: Arbol, A; Arbusto, Ar; Cilíndrica, Ci; Columnar, Co; Expansivo, E; Globosa, Glo. Sistema de Cruza: Entrecruzamiento, E; Mixto M. Compatibilidad: Autoincompatibilidad, AI; Autocompatibilidad, AC. Síndrome de Polinización: Melitofilia, Me; Ornitofilia, Or; Quiropterofilia, Q; Fanelofilia, F; más de un polinizador ‡. Se desconoce (?).

por largos periodos (Moraes *et al.* 2005). Esta diferenciación y el hecho de que no se detectó un patrón de aislamiento por distancia, apoyan la hipótesis de fragmentación de poblaciones grandes, distribuidas ampliamente en el Cuaternario cuando el clima frío y seco favoreció la expansión de hábitats xéricos (Pennington *et al.* 2000; Moraes *et al.* 2005).

La diversidad genética de la columna *Pilosocereus tillanus* ($H_{es}=0.352$) es alta y se explica no solo la poliploidía, por el alto flujo de genes que promueven los murciélagos y aves, sino también porque es posible que las dos poblaciones fragmentadas representan relictos de una distribución más amplia que han mantenido altos niveles de diversidad. Se considera que es probable que las poblaciones se contrajeran durante los cambios cíclicos del Cuaternario y que la diversidad refleje al mismo tiempo una relativa estabilidad demográfica (Figueredo *et al.* 2010).

Dentro de la tribu Cereeae, *Praecereus euchlorus* mostró la diversidad genética más alta y al mismo tiempo la mayor diferenciación ($H_{es}=0.443$ y $G_{ST}=0.484$), estos atributos genéticos se relacionan con fragmentación, tamaño poblacional reducido, endogamia biparental, así como selección natural y flujo génico restringido. En contraste, *Cereus repandus* mostró valores similares a columnares de la tribu Pachycereeae ($H_{es}=0.242$ y $G_{ST}=0.126$), posiblemente debido a la disponibilidad de hábitats grandes, estables y continuos, así como al alto flujo génico que promueven los murciélagos polinizadores (Cuadro 2).

Finalmente, los trabajos en cactáceas sudamericanas coinciden en que las regiones áridas son hábitats remanentes, aislados espacialmente que albergan información genética única y pueden fungir

como reservorios genéticos de la vegetación xerófila de Venezuela y Brasil (Nassar *et al.* 2002; Moraes *et al.* 2005).

Discusión

Los estudios de genética de poblaciones y filogeografía realizados hasta ahora son escasos lo cual dificulta la posibilidad de establecer patrones sobre su evolución a nivel infraespecífico y expliquen la alta diversidad. La mayor parte de los estudios de genética de poblaciones no incluyen el componente histórico, a pesar de que existe evidencia de que dicho componente ha moldeado la estructura genética, ha dirigido la especiación y ha originado un alto endemismo en biomas áridos (Riddle *et al.* 2000; Byrne 2008). Considerando que este trabajo representa un análisis exploratorio, se discuten posibles tendencias de la evolución en cactus, y se proponen los sistemas mexicanos que podrían utilizarse para analizar en detalle los procesos microevolutivos.

La evolución de las cactáceas se ha explicado fundamentalmente como un proceso adaptativo a las condiciones de aridez, mediado por la selección natural. Paradójicamente, no se han reportado estudios que muestren que la selección natural ha sido la principal fuerza promotora de la especiación. Varias especies de cactáceas que muestran distribución restringida a hábitats específicos pueden emplearse con este fin. En la región semiárida del VTC algunas columnares y mammillarias se distribuyen en afloramientos litológicos, tipos de suelo, altitud y pendiente particulares (Peters 2000). Éstas podrían utilizarse para inferir si estos factores ambientales dirigen la selección natural y cuál es su influencia en la evolución de miembros de la tribu

Pachycereae, la cual se originó y diversificó en este lugar (Barba-Montoya 2009).

En las mammillarias con poblaciones aisladas y baja capacidad de dispersión, se puede poner a prueba si estas características junto con la selección natural promueven la divergencia interpoblacional y propician la especiación en la heterógena topografía del VTC.

En las especies de suculentas de los géneros africanos *Lithops* y *Argyroderma* (Aizoaceae) se demostró que la selección de caracteres morfológicos es una respuesta adaptativa a la variación edáfica entre las cuencas que habitan. Al igual que algunas especies de *Mammillaria*, estas especies africanas presentan distribución discontinua, aislamiento poblacional y dispersión limitada. Los estudios revelan que selección en combinación con la heterogeneidad topográfica y edáfica han sido factores importantes en la especiación alopatrica de *Lithops* y *Argyroderma* (Ellis *et al.* 2006; Kellner *et al.* 2011).

Los estudios sobre estructura genética resumidos aquí apoyan la hipótesis de que la deriva génica y la endogamia pueden ser dos fuerzas que tienen un efecto significativo en la divergencia poblacional de cactáceas, como en los géneros *Mammillaria* y *Melocactus*. Estos cactus globosos presentan distribución agregada y tamaños poblacionales pequeños. Asimismo, las especies muestran sistemas de apareamiento mixto y autofecundación (Mandujano *et al.* 2010; Tapia 2011), características que incrementan la probabilidad de apareamientos consanguíneos. Las especies con estas características deben seguir estudiándose, desde el enfoque filogeográfico, para inferir cambios históricos en el N_e y describir ampliamente la importancia de la deriva en la especiación.

De acuerdo con los estudios reportados hasta ahora, el flujo génico puede reducir la divergencia interpoblacional en algunas especies, pero en otras actuar como factor que intensifica la divergencia, lo cual a largo plazo puede llevar a la especiación. Las especies de la tribu Pachycereae tienden a presentar bajas tasas de diferenciación genética (Cuadro 2). Inclusive en especies domesticadas de dicha tribu y que también son polinizadas por murciélagos, los estudios de genética de poblaciones revelan una baja diferenciación y un efecto homogeneizador del flujo génico sobre características morfológicas que están bajo selección artificial (Casas *et al.* 2007). Estos resultados sugieren que en columnares con alto flujo génico, la selección natural y posiblemente la alopatría pueden ser determinantes en la especiación. En cambio, en especies con hábito globoso el flujo génico es restringido porque las especies muestran una marcada distribución en parches y presentan baja capacidad de dispersión de polen y semillas (Moraes *et al.* 2005, Mandujano *et al.* 2010). La combinación de flujo génico restringido, deriva génica y endogamia, así como distribución en parches pueden estar relacionadas la especiación de mammillarias, las cuales presentan una de las tasas de especiación más altas dentro de cactáceas (Hernández-Hernández 2010).

La mayoría de los estudios realizados en cactáceas de Norte América adolecen de las explicaciones históricas, un aspecto fundamental para comprender la evolución del grupo. Los estudios filogeográficos realizados en *Lophocereus schottii*, *Stenocereus gummosus* y *S. eruca* en los desiertos del norte del país, muestran patrones de variación genética y estructura consistentes con cambios en la distribución debido tanto a

eventos biogeográficos como a las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno (Nason *et al.* 2002; Fehlbert & Ranker 2009; Garrick *et al.* 2009; Rebernic *et al.* 2010). Los estudios filogeográficos que pongan a prueba hipótesis de este tipo contribuirán a comprender la respuesta de las cactáceas a los eventos históricos, ocurridos durante el Neogeno como la elevación de las Sierras Madre Oriental y Occidental y el Eje Transmexicano, que han promovido el aislamiento geográfico y restringido el flujo génico en especies o géneros con amplia distribución o endémicas. Asimismo, este tipo de estudios permitirán establecer o confirmar posibles rutas de colonización para poner a prueba hipótesis de migración en los miembros de la tribu *Pachycereeae* y del género *Ferocactus* (Barba-Montoya 2009; Cota-Sánchez 2008).

Recientemente, se han publicado estudios sobre la influencia de los cambios climáticos del Pleistoceno en la estructura filogeográfica de plantas de la familia Asteraceae y Euphorbiaceae de los desiertos del norte de México. Los cambios en distribución de las biotas han provocado contracciones, expansiones, fragmentación poblacional y aislamiento geográfico que a su vez han generado divergencias genéticas entre los linajes que conforman a las especies. Este patrón sugiere que las especies han persistido en múltiples refugios durante los periodos más fríos y húmedos, a partir de los cuales se han expandido, dando lugar a una alta diversidad genética y linajes geográficamente diferenciados por interrupciones del flujo génico y deriva génica (Fehlbert & Ranker 2009; Garrick *et al.* 2009; Rebernic *et al.* 2010). Estas evidencias pueden tomarse como referencia para plantear los posibles escenarios evolutivos para cactus que se distribuyen en dichos desiertos.

El estado de conservación de las cactáceas es crítico debido principalmente a actividades humanas como alteración del hábitat, tráfico internacional y colecta ilegal que amenazan a las poblaciones (Boyle & Anderson 2002). Un gran número de cactáceas están incluidas en listas de especies amenazadas de varias organizaciones internacionales y nacionales (Hunt 1999; SEMARNAT 2002; IUCN 2004). En México se enlistan 239 especies y 16 subespecies en tres de las cuatro categorías de riesgo (en peligro de extinción=27; amenazadas=81 y sujetas a protección especial=157 taxones) que representan el 39.83% de las especies del país (Arias *et al.* 2005; Godínez-Álvarez & Ortega-Baes 2007). Por otra parte, los cactus presentan características ecológicas que los hacen vulnerables a perturbaciones ambientales (distribución restringida, ciclos de vida largos y tasas de crecimiento bajas) y pueden dificultar el mantenimiento de sus poblaciones (Godínez-Alvarez *et al.* 2003; Arias *et al.* 2005; Ortega-Baes & Godínez-Alvarez 2006). Estos hechos resaltan la necesidad de implementar información genética para planear estrategias de conservación que permitan mantener el acervo genético de las especies y los procesos evolutivos que han dirigido la diversificación del grupo. Las cactáceas son especies clave de los sistemas áridos mexicanos, por lo que los estudios sobre genética de poblaciones y particularmente sobre filogeografía, contribuirán a explicar y conservar a dichas especies y a la alta diversidad florística que caracteriza a las regiones áridas mexicanas.

Agradecimientos

Amelia Cornejo-Romero (ACR) recibió apoyo del CONACyT a través de la beca de doctorado

No. 158260. Este artículo es parte del trabajo de investigación de ACR, alumna del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana. La UAM brindó apoyo logístico. ACR agradece los valiosos comentarios de la Dra. Rosaura Grether y dos revisores anónimos que ayudaron a mejorar este escrito.

Literatura citada

- Alejos-Velázquez LP. 2002. Estudio de la estructura poblacional de *Neobuxbaumia macrocephala* en Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, mediante el uso de marcadores moleculares. Tesis profesional. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México.
- Anderson EF. 2001. *The cactus family*. Timber, Portland, OR.
- Arakaki M, Soltis DE, Soltis PS & Speranza PR. 2010. Characterization of polymorphic microsatellite loci in *Haageocereus* (Trichocereae, Cactaceae). *Am J Bot* **97**:17-19.
- Arakaki M, Christin PA, Nyffeler R, Lendel A, Egglic U, Ogburna RM, Spriggs E, Moored MJ & Edwards EJ. 2011. Contemporaneous and recent radiations of the world's major succulent plant lineages. *Pro Nat Acad Sci USA* **108**:8379-8384.
- Arias S, Guzmán U, Mandujano MC, Soto-Galván M & Golubov J. 2005. Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. *Cact Suc Mex* **4**:101-124.
- Avisé JC. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Barba-Montoya JA. 2009. Origen y diversificación de la tribu Pachycereae (Cactaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.
- Bárceñas RT, Yesson C & Hawkins JA. 2011. Molecular systematics of the Cactaceae. *Cladistics* **27**:470-489.
- Beheregaray, LB. 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Mol Ecol* **17**:3754-3774.
- Boyle TH & Anderson E. 2002. Biodiversity and Conservation. En: Nobel P.S. Ed. *Cacti. Biology and uses*. University of California Press, Los Angeles, 125-141.
- Byrne M. 2008. Evidence for multiple refugia at different time scales during Pleistocene climatic oscillations in southern Australia inferred from phylogeography. *Quat Sci Rev* **27**:2576-2585.
- Casas A, Otero-Arnaiz A, Pérez-Negrón E & Valiente-Banuet A. 2007. *In situ* management and domestication of plants in Mesoamerica. *Ann Bot* **100**:1101-1115.
- Clark-Tapia R & Molina-Freaner F. 2003. The genetic structure of a columnar cactus with a disjunct distribution: *Stenocereus sgmusosus* in the Sonoran desert. *Heredity* **90**:443-450.
- Cornejo-Romero A. 2004. Diversidad genética y estructura clonal de *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) en una cronosecuencia edáfica del Valle de Tehuacán. Tesis de Maestría. Instituto de Ecología, UNAM. México, D.F.
- Cota-Sánchez JH. 2008. Evolución de cactáceas en la región del Golfo de California. En: Flores-Campaña, L.M. Ed. *Estudios de las Islas del Golfo de California*. Universidad Autónoma de Sinaloa-Gobierno del Estado de Sinaloa-Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México. 67-79.
- Ellis AG, Weis AE & Gaut BS. 2006. Evolutionary radiation of "stone plants" in the genus *Argyroderma* (Aizoaceae): unraveling the effects of landscape, habitat, and flowering time. *Evolution* **6**:39-55.
- Esparza-Olguín LG. 2005. Estudio comparativo de tres especies de cactáceas columnares del género *Neobuxbaumia* que difieren en su nivel de rareza: un enfoque genético-

- demográfico. Tesis doctoral, Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.
- Fehlberg SD & Ranker TA. 2009. Evolutionary history and phylogeography of *Encelia farinosa* (Asteraceae) from the Sonoran, Mojave, and Peninsular Deserts. *Mol Phylogenet Evol* **50**:326–335.
- Figueredo CJ, Nassar JM, García-Rivas AE & González-Carcacia JA. 2010. Population genetic diversity and structure of *Pilosocereus tillianus* (Cactaceae, Cereaceae), a columnar cactus endemic to the Venezuelan Andes. *J Arid Environ* **74**:1392–398.
- Fox CW, Roff DA & Fairbairn DJ. 2001. Evolutionary ecology. Oxford University Press, New York, USA.
- Garrick RC, Nason JD, Meadows CA & Dyer RJ. 2009. Not just vicariance: phylogeography of a Sonoran Desert euphorb indicates a major role of range expansion along the Baja peninsula. *Mol Ecol* **18**:1916–1931.
- Gibson AC & Nobel PS. 1986. *The cactus primer*. Cambridge, MA. Harvard University Press.
- Godínez-Alvarez H & Ortega-Baes P. 2007. Mexican cactus diversity: environmental correlates and conservation priorities. *Bol Soc Bot Mex* **81**:81–87.
- Godínez-Alvarez H, Valverde T & Ortega-Baes P. 2003. Demographic trends in the Cactaceae. *Bot Rev* **69**:173–203.
- Gorelick R. 2009. Evolution of cacti is largely driven by genetic drift, not selection. *Bradleya* **27**: 37–48.
- Hamrick JL, Godt MJW & Sherman-Broyles SL. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest* **6**:95–142.
- Hamrick JL & Godt MJW. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Phil Trans Biol Sci* **351**:1291–1298.
- Hamrick JL, Nason JD & Fleming TH. 2002. Genetic diversity in columnar cacti. En: Fleming T. y Valiente-Banuet A. Eds. *Evolution, ecology and conservation of columnar cacti and their mutualists*. Arizona University Press, 122–133.
- Helsen P, Verdyck P & Dogen SV. 2011. The influence of historical gene flow, bathymetry and distribution patterns on the population genetics of morphologically diverse Galápagos' *Opuntia echios*. *J Mol Evol* **72**:315–325.
- Hershkovitz MA & Zimmer EA. 1997. On the evolutionary origins of the cacti. *Taxon* **46**:217–232.
- Hernández HM & Gómez-Hinostroza C. 2011. *Mapping the cacti of Mexico. Succulent Plant Research* Vol. 7 DH Books. Inglaterra
- Hernández-Hernández T. 2010. Radiaciones evolutivas de linajes de plantas suculentas en el orden Caryophyllales con énfasis en la Familia Cactaceae. Tesis doctoral, UNAM. México, D.F.
- Hunt D. 1999. *CITES Cactaceae checklist*. 2nd ed. Royal Botanic Gardens and International Organization for Succulent Plant Study, Kew, England
- Ibarra-Suárez A. 2009. Estudio de la diversidad genética de cactáceas endémicas del género *Mammillaria* del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla-Oaxaca, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.
- IUNC [International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources]. 2004. Red List of Threatened Species. <http://www.iucn.org>
- Kellner A, Ritz CM, Schlittenhardt P & Hellwig FH. 2011 Genetic differentiation in the genus *Lithops* L. (Ruschioideae, Aizoaceae) reveals a high level of convergent evolution and reflects geographic distribution. *Plant Biol* **13**:368–380.
- Landrum JV. 2002. Four succulent families and 40 million years of evolution and adapta-

- tion to xeric environments: What can stem and leaf anatomical characters tell us about their phylogeny? *Taxon* **51**:463-473.
- Loveless MD & Hamrick JL. 1984. Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. *Annu Rev Ecol Syst* **15**:65-95.
- Mandujano MC, Carrillo-Angeles I, Martínez-Peralta C & Golubov J. 2010. *Reproductive biology of Cactaceae*. En K.G. Ramawat (ed). *Desert Plants - Biology and Biotechnology*. Springer. 197-230 pp
- Molina-Freaner F & Clark-Tapia R. 2005. Clonal diversity and allelic relationships between two closely related species of columnar cacti from the Sonoran Desert: *Stenocereus eruca* and *Stenocereus gummosus*. *Int J Plant Sci* **166**:257-264.
- Moraes EM, Abreu AG, Andrade SCS, Sene FM & Solferini VN. 2005. Population genetic structure of two columnar cacti with a patchy distribution in eastern Brazil. *Genetica* **125**:311-323.
- Mota-Lambert S, Leite-Borba E, Camara-Machado M & Da Silva-Andrade SC. 2006a. Allozyme diversity and morphometrics of *Melocactus paucispinus* (Cactaceae) and evidence for hybridization with *M. concinnus* in the Chapada Diamantina, north-eastern Brazil. *Ann Bot-London* **97**:389-403.
- Mota-Lambert S, Leite-Borba E & Camara-Machado M. 2006b. Allozyme diversity and morphometrics of the endangered *Melocactus glaucescens* (Cactaceae), and investigation of the putative hybrid origin of *Melocactus x albicephalus* (*Melocactus ernestii* x *M. glaucescens*) in north-eastern Brazil. *Plant Spec Biol* **21**:93-108.
- Nason JD, Hamrick JL & Fleming TH. 2002. Historical vicariance and postglacial colonization effects on the evolution of genetic structure in *Lophocereus*, a Sonoran Desert columnar cactus. *Evolution* **56**:2214-2226.
- Nassar JM, Ramírez N & Linares O. 1997. Comparative pollination biology of Venezuela columnar cacti and the role of nectar feeding bats in their sexual reproduction. *Am J Bot* **84**:918-927.
- Nassar JM, Hamrick J & Fleming TH. 2001. Genetic variation and population structure of the mixed-mating cactus, *Melocactus curvispinus* (Cactaceae). *Heredity* **87**:69-79.
- Nassar JM, Hamrick JL & Fleming TH. 2002. Allozyme diversity and genetic structure of the leafy cactus (*Pereskia guamacho* [Cactaceae]). *Heredity* **93**:193-200.
- Nassar JM, Hamrick JL & Fleming TH. 2003. Population genetic structure of Venezuelan chiropterophilous columnar cacti (Cactaceae). *Am J Bot* **90**:1628-1637.
- Nybom H & Bartish IV. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspect Plant Ecol* **3**:93-114.
- Palleiro Dutrenit N. 2008. Estructura poblacional y genética del cactus columnar *Cephalocereus totolapensis* en el estado de Oaxaca. México. Tesis de Maestría. Instituto de Ecología, UNAM. México, D.F.
- Parker KC & Hamrick JL. 1992. Genetic diversity and clonal structure in a columnar cactus *Lophocereus schottii*. *Am J Bot* **79**:86-96.
- Pennington RT, Prado DE & Pendry CA. 2000. Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. *J Biogeog* **27**:261-273.
- Peters EM. 2000. *Conocimiento y conservación de las mamilarias endémicas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. Consejo Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, CONABIO. México, D.F.
- Rebernick CA, Weiss-Schneeweiss H, Schneeweiss GM, Schönswetter P, Obermayer R, Villaseñor JL & Stuessy TF. 2010.

- Quaternary range dynamics and polyploid evolution in an arid brushland plant species (*Melampodium cinereum*, Asteraceae). *Mol Phylogenet Evol* **54**:594–606.
- Riddle BR, Hafner DJ, Alexander LF & Jaeger JR. 2000. Cryptic vicariance in the historical assembly of a Baja California Peninsular Desert biota. *Pro Nat Acad Sci* **97**:14438–14443.
- Ritz CM, Martins L, Mecklenburg R & Goremykin V. 2007. The molecular phylogeny of *Rebutia* (Cactaceae) and its allies demonstrates the influence of paleogeography on the evolution of South American mountain cacti. *Am J Bot* **9**:1321–1332.
- Rivera-Montoya I. 2003. Estudio de la variabilidad genética de la cactácea columnar *Neobuxbaumia mezcalaensis* mediante RAPD. Tesis profesional, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México.
- Rojas-Martínez A & Valiente-Banuet A. 1996. Análisis comparativo de la quireptofauna del Valle de Tehuacán, Puebla, Oaxaca. *Acta Zool Mex* **67**:1–23.
- Rzedowski J. 1962. Contribuciones a la fitogeografía florística e histórica de México I Algunas consideraciones acerca del elemento endémico en la flora mexicana. *Bol Soc Bot Mex* **27**:52–65.
- SEMARNAT [Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales]. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. 2ª Sección, 6 de marzo de 2002.
- Tapia-Salcido HJ. 2011. Análisis de la diversidad y estructura genética poblacional de dos especies del género *Mammillaria*, endémicas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México.
- Terry MK, Pepper AE, Strong AW, Tarin DM, Price DM & James RM. 2012. Genetic structure of a population of the endangered star cactus (*Astrophytum asterias*) in Southern Texas. *Southwest Nat* **57**:182–188.
- Valiente-Banuet A. 1996. Ecological relationships between columnar cacti and feeding bats in Mexico. *J Trop Ecol* **12**:103–119.
- Valverde PL. 2008. Efecto de los patrones de distribución y la biología reproductiva en los niveles de variación genética y estructura de dos especies de cactus endémicos de la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán. Resultados técnicos de investigación del convenio FOSEMARNAT-2004-01-26
- Vazquez Montiel RF. 2005. Diversidad genética de *Cephalocereus columna-trajani* en cuatro regiones del Valle de Tehuacán-Cuicatlán con diferentes rangos de temperatura. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

Recibido: noviembre 2012; Aceptado: enero 2013.
Received: November 2012; Accepted: January 2013.

Capítulo II

Origen cuaternario y divergencia genética del cacto endémico *Mammillaria pectinifera* en un paisaje cambiante en el Valle de Tehuacán, México

La diversificación de cactáceas coincide con la expansión de los ambientes áridos de América, la cual se asocia con el incremento global en la aridez y la actividad tectónica que ocurrieron a partir del Mioceno. El Valle de Tehuacán-Cuicatlán (VTC), en el centro-sur de México, ofrece un sistema ideal para poner a prueba la hipótesis de la influencia de la evolución del paisaje sobre la diversificación de cactáceas, debido a que esta región ha estado sujeta a una compleja dinámica actividad geológica y geomorfológica a lo largo del Cenozoico y es considerado uno de los principales centros de diversidad y endemismo de Norte América.

En este estudio integramos el análisis filogeográfico y filogenético para determinar si el origen la distribución y divergencia de haplotipos de *Mammillaria*

pectinifera ocurrieron bajo el escenario de la evolución geomorfológica del Valle. Analizamos la diversidad haplotípica y diferenciación genética. Se incluyó una filogenia calibrada del clado Mammilloide para estimar las edades de origen y divergencia haplotípica de *M. pectinifera*. Finalmente, se hizo un análisis de demografía histórica para detectar cambios en el tamaño efectivo poblacional en respuesta a los cambios del ambiente.

La edad de origen y divergencia de haplotipos coincide con los cambios geomorfológicos que dieron la configuración actual al Valle de Tehuacán durante la transición Plioceno/Pleistoceno. Es probable que durante esta Época se originara el hábitat de *M. pectinifera*. Los cambios en las geoformas y edáficos ocurridos a lo largo del Pleistoceno (2.58 m.a.) pueden ser responsables de la alta divergencia haplotípica observada. El aislamiento geográfico de las poblaciones y la baja capacidad de dispersión limitan fuertemente el flujo génico. Éste en combinación con la deriva pueden ser las principales fuerzas evolutivas que han moldeado la evolución de *M. pectinifera*.

Se discute la necesidad ampliar estudios filogeográficos a otras especies del género *Mammillaria*, incluyendo especies con características similares a *M. pectinifera* para inferir si los cambios geológicos y geomorfológicos del VTC han contribuido a especiación de uno de los géneros con mayores tasas de especiación dentro de la familia Cactaceae.

El escrito que se presenta a continuación consiste del artículo de investigación que ha sido aceptado para su publicación en la revista *Genetics and Molecular Research* (se anexa carta de aceptación).

RESEARCH ARTICLE

Quaternary origin and genetic divergence of the endemic cactus *Mammillaria pectinifera* in a changing landscape in the Tehuacán Valley, Mexico

Running title: Origin and haplotypic divergence of *Mammillia pectinifera*

A. Cornejo-Romero^{1,4}, J. Medina-Sánchez², T. Hernández-Hernández³, B. Rendón-Aguilar⁴, P.L. Valverde⁴, A. Zavala-Hurtado⁴, S.P. Rivas-Arancibia⁵, M.A. Pérez-Hernández⁴, G. López-Ortega⁴, C. Jiménez-Sierra⁴ and C.F. Vargas-Mendoza⁶

¹ Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, D.F. México

² Department of Geography, University of Leicester, Leicester, United Kingdom

³ Departamento de Biología Evolutiva, Instituto de Ecología A.C., Xalapa, Veracruz, México

⁴ Departamento de Biología, Universidad Autónoma Metropolitana, D.F. México

⁵ Escuela de Biología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México

⁶ Departamento de Zoología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, D.F. México

Corresponding author: A. Cornejo-Romero

Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina, Iztapalapa 09340, D.F., México

Telephone number: (52) 555804-6456

Fax number: (52) 555804-4688

E-mail: ameli.cornejo@gmail.com

ABSTRACT

The endemic Mexican cactus, *Mammillaria pectinifera*, shows low dispersal capabilities and isolated populations within the highly dissected landscape of Tehuacán Valley, these characteristics can restrict gene flow and act upon the genetic divergence and speciation in arid plants. We conducted a phylogeographic study to determine if the origin, current distribution, and genetic structure of *M. pectinifera* were driven by Quaternary geomorphic processes. Sequences of the plastids *psbA-trnH* and *trnT-trnL* obtained from 66 individuals from seven populations were used to estimate genetic diversity. Population differentiation was assessed by an analysis of molecular variance. We applied a stepwise phylogenetic calibration test to determine whether species origin and genetic divergence among haplotypes were temporally concordant with recognizable episodes of geomorphic evolution. The combination of plastid markers yielded six haplotypes, with high levels of haplotype diversity ($h = 0.622$) and low nucleotide diversity ($\pi = 0.00085$). The populations were found to be genetically structured ($F_{ST} = 0.687$; $P < 0.00001$), indicating that geographic isolation and limited dispersal were the primary causes of genetic population differentiation. The estimated origin and divergence time among haplotypes were 1.237 and 0.019 Ma, which correlates with Pleistocene tectonics and erosion events, supporting a hypothesis of geomorphically-driven geographical isolation. Based on a Bayesian skyline plot, these populations showed long term demographic stability, indicating that persistence in confined habitats has been the main response of this species to landscape changes. We conclude that the origin and haplotype divergence of *M. pectinifera* were a response to local Quaternary geomorphic evolution.

Key words: Genetic structure; Population isolation; Divergence time; Geomorphic evolution; Tehuacán Valley; *Mammillaria pectinifera*

INTRODUCTION

The remarkable plant diversification and speciation that gave rise to many modern dry-land communities was the product of complex climatic and geologic phenomena that caused the well-documented Neogene global expansion of arid regions (Cowling et al., 2009; Arakaki et al., 2011). The rapid speciation of North and South American cacti has been related to the tectonic uplifting of orogenic belts that formed intricate landscapes and enhanced aridity due to rain shadow in some of the interior basins, creating a wide variety of new habitats that were successfully colonized by this group (Hershkovitz and Zimmer, 1997; Ritz et al., 2007). According to the estimated speciation rates and divergence times of the family Cactaceae based on molecular phylogeny, the radiation of Mexican cacti coincided with the tectonically driven Miocene-Pliocene expansion of arid environments (Hernández-Hernández, 2010). However, to date, there are no studies at the species level testing this idea and explaining the mechanisms by which the geomorphic deformations could produce geographical isolation, fragmentation, expansion, contraction, colonization and/or interruption of the gene flow that could lead to independent evolution of lineages, promoting the diversification of cacti. Under the general hypothesis that geomorphic evolution had been the main driver of cacti diversification, we present a phylogeographic analysis of the cactus *Mammillaria pectinifera* (Weber), in the northern sector of the Tehuacán Valley region (TVr).

The combination of a highly dynamic Cenozoic geologic history (Dávalos-Alvarez et al., 2007), plus significant processes of diversification and speciation that have occurred in the TVr (Dávila et al., 2002), provide an ideal system for reconstructing the phylogeographic trends of plant species. This 10,000 km² semi-arid region hosts 10 to 14% of the modern Mexican flowering plants and stands out as a main center of diversification and endemism of the family Cactaceae (Dávila et al., 2002). Within this family, the genus *Mammillaria* is represented by 16 endemic species, all adapted to the mosaic-like arrangement of specific habitats of TVr (Peters, 2000). The fact that the patchy distribution of *M. pectinifera* coincides almost exclusively with one particular type of landform strongly suggest that the current distribution and genetic features of this species have been shaped by the same long-term geomorphic processes that have transformed the physical landscape.

After the rise of the “Sierra Madre del Sur” highlands, continuous Cenozoic tectonic activity formed a series of intramontane basins, enhancing the local aridity since the Eocene (Beraldi-Campesi et al., 2006). Further activity of the Oaxaca and Caltepec and other minor faults during most of the Cenozoic widened the valley zones, formed other minor basins and interrupted the topographic continuum of some highland chains, resulting in a variety of micro-environments within this semi-arid region. Most importantly, tectonic, volcanic and erosive geomorphic processes have been actively affecting the regional landscape as recently as the Holocene (Medina-Sánchez, 2010).

Mammillaria pectinifera was used as a model to study the conditions related to cactus diversification, because it shows isolated populations within the highly dissected TVr landscape and because it shows limited dispersal. It is known that when combined, these characteristics can restrict gene flow, acting as a driving force for genetic divergence and speciation in arid lands (Ellis et al., 2006). The species grows exclusively at 1,778 to 2,130 m a.s.l. on plateaus with very gentle slopes (Zavala-Hurtado and Valverde, 2003).

Populations are distributed in the northern sector of the TVr, and separated by 3.66 to 62.68 km (Valverde and Zavala-Hurtado, 2006). Pollination is carried out by small insects (Valverde PL, unpublished results), and seeds can be retained several years within mature fruits limiting dispersal in space and time (Peters et al., 2009). To date, there have been no attempts to explain the processes responsible for the diversification of mammillarias in the TVr.

Some of the likely consequences of the Quaternary geomorphic change on *M. pectinifera* could have been an irreversible isolation of its populations to restricted habitats and the formation of geographical barriers that prevented gene flow. At the molecular level, the interruption of gene flow would have resulted in populations of *M. pectinifera* showing different and geographically structured haplotype lineages, as well as high haplotype differentiation. We tested these hypotheses by using the chloroplast DNA intergenic sequences *trnT-trnL* and *psbA-trnH* to infer if: a) the landscape evolution of the TVr influenced the phylogeographical structure of *M. pectinifera*, b) if its populations experienced demographic historical changes, and c) if there is a temporal correspondence between the origin of *M. pectinifera* and its haplotypes and the Pleistocene geomorphic processes.

METHODS

Study species

Mammillaria pectinifera is a rare and endemic globose cactus (Bravo-Hollis and Sánchez-Mejorada, 1991), whose rarity is due to high habitat specificity, restricted geographical

distribution and small population sizes (Zavala-Hurtado and Valverde, 2003). The main environmental variables that define the high habitat specificity of *M. pectinifera*, besides altitude and limestone summit plateaus, include xerophytic communities with relatively low species richness and coverage; high stoniness and shallow, sandy loam soil with relatively low organic matter and basic pH (Table 1; Zavala-Hurtado and Valverde, 2003; Zavala-Hurtado A, unpublished results). These environmental variables are similar among populations, particularly soil characteristics, supporting field observations of the strong association between *Mammillaria* species and edaphic characteristics (Peters, 2000). The xenogamic nature of *M. pectinifera* (determined from O/P ratios and OIC index) imposes a strong dependency on bees and flies for pollen dispersal (Valverde PL, unpublished results) and consequently restricts gene flow to relatively short distances. Mature fruits and seeds can be retained within the maternal plant for several years, a phenomenon known as serotiny. Seeds are only released during episodes of high precipitation, increasing the chances of germination and establishment (Peters et al., 2009). Pollination by small insects, serotiny, and gravity dispersal can strongly limit pollen and seed mobility among populations, constraining genetic interchange. *Mammillaria pectinifera* populations are under serious extinction risk due to livestock, human activities and habitat deterioration, as well as illegal trade (Table 1). Although this species is included in CITES Appendix I, it should also be granted the extinction risk category by the Mexican environmental laws for wild species protection (SEMARNAT, 2002), and should be re-introduced on the Red List of IUNC (Valverde et al., 2009).

Study site

The study was carried out on the northern part of the TVr, which encompasses part of the Puebla and Oaxaca states in Central Mexico (Figure 1A). Most of the known populations are within the Tehuacán-Cuicatlán Biosphere Reserve polygon. The seven populations studied are spatially segregated and cover all the distribution range of the species (Figure 1A). Climate in the TVr is semi-arid according to Koppen's classification (BS0hw''(w)(e)(g)). Most rain falls in early summer (May and June) and early autumn (September) with an annual average precipitation of 380 mm and mean annual temperature of 21°C (García, 1973).

Sampling, DNA extraction, amplification and sequencing

A total of 98 individuals of *M. pectinifera* from the seven populations were included in the present study. Populations were labeled Coapan (COA), Texcala (TEX), El Riego (RIE), Frontera (FRON), Tecamachalco (TECA), Teteletitlán (TETE) and Zapotitlán (ZAP) (Table 1, Figure 1A). Due to the risk of illegal extraction, geographic coordinates of the populations are not reported here. Approximately 100 mg fresh vegetative tissue were collected from each individual, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Total genomic DNA was isolated from the stem tissue using the DNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) protocol. Two gene cpDNA non-coding regions were amplified and sequenced using the *psbA-trnH* primers reported by Butterworth and Wallace (2004), and the *trnT-trnL* using universal *a* and *b* primers described by Taberlet et al. (1991). PCR was carried out in a total volume of 25 µL containing 10 ng genomic DNA, 0.5 U/µL Taq polymerase (Invitrogen Carlsbad, CA, USA), 1X PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 10 pM each primer, and 2 mM MgCl₂ for the *psbA-trnH* region. For the *trnT-trnL* region the same protocol was followed, except for 14 pM each primer and 1.75 mM MgCl₂. PCR products were checked on 0.8% (w/v) gels and cleaned using the QIAquick PCR

Purification kit (Qiagen) or Montage PCR Centrifugal Filter Devices (Millipore, Darmstadt, Germany). The purified amplicons were sequenced in both directions with an ABI Prism Avant 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the standard methods for the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems). Sequences were assembled and edited using SEQUENCHER 4.8 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) and alignment in MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011). The chloroplast intergenic spacers were sequenced for only 66 individuals from the seven populations. The nucleotide sequences of derived haplotypes were deposited in the GenBank database with accession numbers JX974817, JX974818, JX974819 and JX974820 for the *trnT-trnL* region and JX974821, JX974822, JX974823 and JX974824 for the *psbA-trnH* region.

Data analysis

Genetic diversity and structure

Standard diversity indices were calculated at the species and population levels. Haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (π) were obtained using the software DnaSP 5 (Librado and Rozas, 2009). The mean number of pairwise differences from the infinite-site equilibrium relationships (θ_π) was estimated using ARLEQUIN 3.11 (Excoffier et al., 2005).

To determine hierarchical population structure, an analysis of molecular variance (AMOVA) was performed using pairwise differences and haplotype frequencies with ARLEQUIN 3.11. Measures of DNA divergence between populations and groups (F_{ST}) were calculated, and the level of significance was tested using 1000 permutations.

Demographic analysis

Fu's F_s statistic was calculated to test demographic expansion. A significantly large negative value for F_s is expected in cases of population expansion. F_s values were considered significant at $P \leq 0.02$, which was calculated with DnaSP 5. The demographic history of *M. pectinifera* was inferred from the genealogy of cpDNA sequences using the Bayesian skyline plot (BSP) model, which estimates historical changes in effective population size, N_e . This model employs a Markov Chain Monte Carlo (MCMC) sampling procedure to estimate a posterior distribution of N_e through time based on temporal distribution of coalescent events in gene genealogies, moving backwards from the present. This analysis was performed using the BEAST 1.6.1 software (Drummond et al., 2002-2011); with *prior* settings that included the GTR substitution model for *psbA-trnH* and *trnT-trn-L* regions and uncorrelated lognormal clock models with an estimated rate of nucleotide substitution of $\mu = 1.0 \times 10^{-3}$ substitutions per neutral site per million years ($s \cdot s^{-1} \cdot My^{-1}$), based on a comparison of eight chloroplast genes (Wolfe et al., 1987). Multiple replicates of MCMC were performed with 10 million steps with a burn-in of 10%, genealogies and parameters sampled every 1000 steps. The rest of the parameters were specified by default values. Finally, estimates of $N_e\mu$ and confidence intervals were calculated from the posterior probability distributions with TRACER 1.4.1 (Rambaut and Drummond, 2003-2009) and summarized as a BSP.

Phylogenetic analysis and divergence time estimations

The phylogenetic relationships among *M. pectinifera* haplotypes were reconstructed under a Bayesian approach. This analysis was performed using a concatenated sequence dataset where all individuals with the same haplotype were considered as one. The jMODELTEST 0.1.1 software (Posada, 2008), set with the AIC criterion was used to select the best fit

model of molecular evolution for each region. Selected models were HKY and GTR for the *psbA-trnH* and *trnT-trnL* regions, respectively. Relationships among haplotypes were calculated using MRBAYES 3.2.1 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003) with different partitions in each region. Two parallel MCMC were run simultaneously for 2×10^6 generations. We computed the 50% majority rule consensus tree in MR BAYES 3.2.1 and used the Bayesian estimates of posterior probabilities to evaluate clade support.

To determine if the origin of *M. pectinifera* and its haplotypes could be related to the Plio/Pleistocene events occurring in the TVr, we estimated the age origin of the species and the timing of haplotypes' divergence under a Bayesian approach as implemented in BEAST v 1.6.2. We used a stepwise approach. As a first step, we assembled a DNA sequence matrix for the Mammilloyd clade and used it to estimate the age of origin of *M. pectinifera*. This matrix was assembled with sequences obtained from GenBank. We used the *matK-trnL* and *psbA-trnH* introns and the *rpl16* intergenetic spacer sequences reported by Bárcenas et al. (2011) and Butterworth and Wallace (2004), and employed the sequences of *Ferocactus robustus* as the functional outgroup (accession numbers in Supplementary Data). With this dataset, we implemented an uncorrelated lognormal relaxed clock in BEAST 1.6.2 with a partitioned dataset, setting a GTR+G substitution model for each region based on the results of AIC comparisons from jMODELTEST 0.1.1. The Birth-Death speciation process was used to model the tree prior. We used a secondary calibration point obtained from a previous estimation of divergence of Cactaceae (Hernández-Hernández T, unpublished results; see also Hernández-Hernández, 2010 for a preliminary dating analysis of Cactaceae). We assigned a uniform age prior between 7.97 and 16.14 mya (million years ago) to constrain the crown Mammilloyd.

In a separate step of the dating analyses, and to determine the times when *M. pectinifera* haplotypes started to diverge, we performed a second estimation of divergence times for the *M. pectinifera* haplotypes with the *trnT-trnL* and *psbA-trnH* concatenated matrix described previously. We implemented an uncorrelated lognormal relaxed clock in BEAST 1.6.2 with a partitioned dataset, selecting a coalescent model assuming constant population growth for the tree prior. To calibrate the root, we used the dates estimated for the divergence of *M. pectinifera* derived from the previous step. For both divergence time estimations, we ran three independent 2^8 and 5^8 generation runs for the Mammilloyd and the *M. pectinifera* datasets, respectively. In both cases, the results were analyzed using TRACER 1.5 to assess convergence and effective sample sizes (ESS) for all parameters. In both cases, individual runs were combined using LogCombiner 1.6.1 (Drummond and Rambaut, 2007). Resulting dates were summarized in TreeAnnotator 1.6.1 (Drummond and Rambaut, 2007) by discharging a conservative 50% of trees as burning.

RESULTS

Haplotype distribution, genetic diversity and structure

Sequences of *psbA-trnH* and *trnT-trnL* ranged from 378 and 597 bp, respectively. The total length of the two combining fragments was 957 bp. Site mutations were detected at alignment positions 18, 542,743 and 918. Insertion-deletion polymorphisms included single mononucleotide mutations. These mutations defined six haplotypes, which are shown in Figure 1B.

The distribution and frequencies of cpDNA haplotypes defines a pattern of geographic structuring of the genetic variation (Figure 1B). The number of individuals carrying each haplotype varied from 1 to 38. Haplotype A was carried by 57.57% of all individuals

sampled and had the widest distribution range, covering all populations except COA. Haplotype *B* was detected only in TEX and ZAP with a frequency of 18.2%. FRON, TEX and RIE shared haplotype *C*. Haplotypes *D*, *E* and *F* were exclusive of the COA population (Figure 1B).

Haplotype diversity (h) was variable among populations and ranged from 0.000 in TECA and TETE to 0.667 in FRON with a total $h = 0.622$ for all populations (Table 2).

Nucleotide diversity (π) was low in all populations indicating a few mutations among haplotypes. It ranged from 0.000 in the TECA and TETE to 0.0007 in TEX and FRON populations, and an overall of 0.00085. The average value for pairwise differences at the species level was $\theta_\pi = 0.368$ and differences among haplotypes within populations ranged from 0.167 to 0.667. The lowest θ_π value was detected in RIE and the highest in TEX and FRON, as shows in Table 2.

Genetic variation in *M. pectinifera* was structured geographically. AMOVA (Table 3) revealed that most of the total cpDNA variation (68.19%, $P < 0.00001$) was explained by differences among populations, whereas a smaller fraction was found within populations (31.81%).

Historical demography

F_s values were not statistically significant, indicating no excess of recent mutations; thus, the hypothesis of population stasis was accepted. Values reported in Table 2 indicate that most of the populations sampled are currently not under expansion. BSP showed neither population expansion nor contraction of *M. pectinifera* since at least 0.25 Ma. Effective population size showed a long-term stability, a pattern indicative of regional persistence (Figure 2).

Divergence times

Divergence times estimation using Birth-Death speciation prior showed that *M. pectinifera* diverged from *M. carmenae* around 0.5878 mya (0.0172-2.3902 mya, 95% highest posterior density [HPD]), during Pleistocene (Figure 3A). Based on this result, *M. carmenae* was used as the outgroup of the *M. pectinifera* haplotypes, and a divergence time of 0.0172-2.3902 mya was set to calibrate the root. Under the coalescent model, *M. pectinifera* originated 0.1759 mya (0.019-1.237 mya, 95% HPD), as shown in Figure 3B. The haplotypes *A*, *B*, *D* and *F* diverged from the ancestral clade formed by the *C* and *E* haplotypes at *ca.* 0.0336 mya (0.019-0.22639 mya, 95% HPD), showing a very recent haplotype divergence time.

Haplotype relationships showed two poorly resolved clades (Figure 3B). The topology of the tree showed no correspondence with haplotype distribution. Haplotype *C* is found in RIE, TEX and FRON, whereas haplotype *E* is only present in COA. The second clade is form by *A*, *B*, *D* and *F* haplotypes, from which haplotype *A* shows the widest distribution and frequency among populations and can represent the ancestral one of this clade. Haplotype *B* is found in ZAP and TEX, while *D* and *F* haplotypes are private of COA. This result can be related to a recent divergence and suggests that divergence occurred by geographic isolation and genetic drift.

DISCUSSION

The Pleistocene origin of *M. pectinifera* estimated through dating of the Mammilloyd clade [0.5878 mya (0.0172-2.3902 mya)] corresponds to the time when the broad structural geomorphology of the northern sector of the Tehuacán Valley was close to the current one (Dávalos-Alvarez et al., 2007), but was still experiencing significant erosional, alluvial and

volcanic processes (Figure 3A; Medina-Sánchez, 2010). If this age is reliable, it is very likely that at that time, geomorphic changes, combined with the regional increase in aridity, produced new micro-habitats in some flat summits of the evolving highlands, creating suitable conditions for the appearance of *M. pectinifera*. The ability of these cacti to colonize successfully new drier conditions was due to their adaptations to high levels of water deficit, in a similar way to that described in other regions where coupled geomorphic-climatic changes have promoted divergence (Hershkovitz and Zimmer, 1997). However, our coalescence model showed that *M. pectinifera* diverged from *M. carmenae* more recently (0.1759 mya [0.019-1.237 mya]). It also shows that the haplotypes studied diverged during the Upper Pleistocene (Figure. 3B). This earlier origin age could be related of the low nucleotide diversity detected from the *trnT-trnL* and *psbA-trnH* regions. According to the dating of the Mammilloid clade, based on three chloroplast regions and 3896 bp, other endemic species of the TVr, such as *M. carnea*, *M. hernandezii* and *M. sphacelata*, diverged earlier during the Pleistocene (Figure 3B), suggesting that the most realistic age of *M. pectinifera* correlates with that of its related species. An earlier date of origin (Upper Pleistocene) is difficult to reconcile with the timing and rate of the local geomorphic events that established the initial habitat conditions where *M. pectinifera* diverged. We believe that the tectonic and climatic changes during the Pliocene-Pleistocene transition can explain the formation of new habitats and the appearance of the species, whereas the volcanic, erosive, alluvial and the minor tectonic events that affected the area through the Quaternary better explain the divergence of the haplotypes. Although a definite correspondence between the haplotype relationships and the geographical distribution of *M. pectinifera* could not be established due to low nucleotide variation, the divergence of the haplotypes could have occurred under population isolation. The analysis of variance revealed a strong population structure, suggesting a significant influence of landform evolution. Most of the variance was due to the variability among populations ($F_{st} = 68.19$) and was interpreted as a result of restricted gene flow imposed by the isolation and limited dispersion of the populations. No other factor can account for the confinement of the populations to such specific habitats, and the concomitant limited gene flow and genetic differentiation, better than geomorphic evolution. Even though the modern distribution of the habitats that host *M. pectinifera* is clearly patchy, the geomorphological evidence suggests the presence of an environmental continuum during the early Quaternary. Following the regression of the Neogene lake that covered an important part of the Tehuacán basin (Dávalos-Alvarez et al., 2007), the soil conditions that characterize the upper flat highlands were probably shared by the intramontane valley areas that nowadays separate some of the populations. Widening of minor basins, pyroclastic deposits and alluvial valley fillings that characterized the Quaternary geology of the area (Dávalos-Alvarez et al., 2007; Medina-Sánchez, 2010) could have caused fragmentation of the primary environmental habitats and alteration of the original edaphic conditions, restricting *M. pectinifera* to isolated patches (Figure 1A). With the current knowledge on the geomorphic evolution of the region, it is possible to outline the history of the geographical isolation of the known populations of *M. pectinifera*. The geographical and genetic isolation of TECA, the most distant population, was probably the outcome of the enormous amounts of volcanic ash erupted during the peaks of activity of some of the Trans Mexican Volcanic Belt structures located at distances on the order of tens of kilometers north of the study area. These pyroclastic products were deposited during

the Pleistocene and covered vast valley areas in the northern part of the distribution range of the species, including the valley between Cordón Tierra Colorada (Htc) and Cordón Nopala (Hnop) highlands (Figure 1A). Notably, these thick deposits are not found in the stratigraphic records south of this valley, except for a thin layer of Holocene age south of the Nopala highlands (Medina-Sánchez, 2010), indicating that other geomorphic processes rather than volcanism and ash deposition governed the depositional dynamics below 18° 30' and were more significant in causing isolation of the rest of the populations.

The TETE population is found in a summit of the Cerro Gordo, which is a semi-conic mountain, relatively isolated from the Hnop (Figure 1A). The structure that divides Cerro Gordo from Hnop corresponds to a normal fault. The Pleistocene activity of this fault caused partial subsidence of the Cerro Gordo block relative to Hnop giving rise to the San Juan Raya basin (Medina-Sánchez, 2010). In this case, given the strong restrictions for seed dispersal, the opening of a small “v”-shaped basin between Cerro Gordo and Hnop could prevent gene flow. The Pleistocene tectonic activity that configured the geometry of the San Juan Raya basin could also explain the isolation of the FRON population. It is thought that this tectonic activity enhanced sediment release from Cerro Gordo and Hnop and promoted deposition in the valley zones that separate FRON from the rest (Medina-Sánchez, 2010). The presence of alluvial fillings covered by a thick calcrete (at least 1.5 m) south of Cerro Gordo (Medina-Sánchez, 2010), in what at present is the continental water divide, confirms significant sedimentary and geochemical alteration of the former soil that allowed *M. pectinifera* to expand its geographical range at least up to the area around FRON.

The populations COA, TEX, RIE and ZAP are also separated by small “v”-shaped basins without a defined valley area. Similar to the one formed between Cerro Gordo and Hnop, the shape and size of these basins indicate a recent formation. Considering that these populations are distributed within the influence zone of the Oaxaca and Caltepec faults, two of the most active tectonic faults in the country, and the pre-existing geometry caused by the orogenic folding of the structures, it is likely that the formation of these basins was related to the localized erosion of intramontane depressions and/or to newly-formed fractures associated with tectonic activity. It has been documented that the Caltepec fault was very active during most of the Cenozoic, with traceable episodes as recently as the Holocene (Elías-Herrera et al., 2007). In particular, the activity of the Caltepec fault and/or associated faults could cause minor fracturing of the limestone highlands, initiating the processes of formation of these small basins.

The high number of haplotypes exclusive to COA could represent an extreme case of haplotype divergence under geographical isolation. The apparent independent evolution of this population can be the product of a longer period of isolation of this population, caused primarily by tectonic activity. The northward continuation of the Caltepec fault coincides with the alignment of faults that form the spatial separation of COA with respect to the other groups (Figure 1A). A similar pattern has been observed among populations of *Eucalyptus caesia*, in the southwest arid part of Australia (Byrne and Hopper, 2008). In that case, the granitic rocks that form the substrate, and hence the habitat for the species, have been weathered and fragmented since the Cretaceous.

On the other hand, the low seed and pollen dispersal capacity is an important ecological factor limiting gene flow, and at the same time increases the likelihood of the genetic drift to be a driving mechanism of population divergence. Gravity-dependent seed dispersal and

serotiny constrain seedling recruitment to very local distances, preventing colonization of potential areas and promoting genetic divergence on a small geographical scale (Ellis et al., 2006). Even if seed dispersal to long distances can eventually occur, this has proven to be extremely rare. The case of *M. pectinifera* shows the predominant role of the evolution of the physical landscape on the genetic divergence of isolated populations, indicating that under a history of reduced gene flow, a strong genetic drift is the response mechanism shown by its populations. Other succulent plants that are shown to have experienced the same process belong to the African genus *Argyroderma* (Aizoaceae). These species show small but significant levels of genetic differentiation among populations, associated with long-term restrictions of gene flow, caused in turn by the confinement of the populations to quartz-rich soils, as well as to dispersal-limiting fruit retention by the mother plant (Ellis et al., 2006).

Our reconstruction of the historical demography indicates that at the population level *M. pectinifera* has persisted in highly specific habitats in response to geomorphic evolution. The BSP and demographic expansion analyses indicate that *M. pectinifera* has maintained populations historically stable. Low temporal and spatial seed dispersal capacity plus the high habitat specificity were probably the main functional causes of this habitat persistence. Population persistence has also been reported previously as a response mechanism to geoclimatic changes in arid environments. The cases of *Acacia lobulata* and *Eucalyptus caesia* in Australia and *Discorea biloba* in Chile illustrate persistence in isolated regions or specific habitats with relative long-term stability (Byrne, 2008; Viruel et al., 2012). On the other hand, the demographic stability of *M. pectinifera* contrasts with the contraction and expansion pattern of refugia observed in desert plants of southwestern USA and northern Mexico in response to Pleistocene climatic instability (Rebernick et al., 2010).

The close relationships between the landscape structure (population isolation) and the genetic structure observed in the African species of *Lithops* and *Argyroderma*, support the idea that the limited gene flow and the edaphic and topographic heterogeneity of the landscape played a major role in species radiation (Ellis et al., 2006; Kellner et al., 2011). It has also been proven that morphological divergence is an alternative adaptive response to the edaphic complexity across different basins, constituting an important factor of species radiation. Under this scenario, local adaptation can be facilitated by limited gene flow. In the groups studied by Ellis et al. (2006), serotiny favored local dispersion, facilitating genetic divergence and adaptations to local habitats in fragmented geographies.

The present study showed that limited genetic flow imposed by the configuration of the landscape and the peculiar reproductive biology of *M. pectinifera* may have played a predominant role in the origin and genetic divergence of this plant species. Because most of the endemic species of *Mammillaria* in the TVr present a restricted spatial distribution, high habitat specificity related to altitudinal limits, soil and vegetation type (Peters, 2000), and since some of them show serotiny (*M. hernandezii*, *M. napina* and *M. solisioides*; Rodríguez-Ortega et al., 2006), it is likely that the genetic pattern described for *M. pectinifera* can be found in other related species. The confirmation of an extended pattern would provide additional support to the claim that geomorphological evolution was a crucial factor of diversification of the cacti in this region. It is also essential to carry out further studies on the role of natural selection in the diversification of this group. It is of particular interest to expand our understanding of the relative importance of individual

components of the physical environment, such as soil conditions in promoting processes of local adaptation.

CONCLUSIONS

Mammillaria pectinifera originated during the Pleistocene. It shows a high genetic diversity, spatially structured and with haplotypes restricted or exclusive to some populations. The persistence of small populations in spatially-limited habitats has been the main response of the species to landscape evolution. Our results suggest that geomorphic evolution can play a determinant role in origin, haplotype divergence and speciation because of its indirect effect of restricting gene flow even over small geographical distances. It is essential to take this approach forward and to analyze the phylogeographic pattern of other species of *Mammillaria* endemic to the TVr to gain a better understanding of the mechanisms that lead to speciation within this tribe, which shows one of the highest speciation rates within the family Cactaceae.

Given the observed high haplotype diversity and its structure, as well as the divergence ages, it is crucial to highlight the importance of preserving and protecting the majority of the known wild populations and their environments to maintain the ongoing evolutionary processes that drive the diversification of this group. We urge the implementation of strategies to preserve *in situ* and *ex situ* most of the gene pool of the species, prioritizing the COA and TEX populations because of their high haplotype diversity and perhaps most importantly because of the high disturbance rates reported for their habitats.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by CONACyT through the grant FOSEMARNAT-2004-01-26 and Apoyo Integral para la Formación de Doctores del CONACyT No. 34903. Universidad Autónoma Metropolitana provided logistic support. ACR received support from CONACyT through the PhD grant-158260. This paper is part of the graduate research work of ACR, alumnus of Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud at the Universidad Autónoma Metropolitana. Thanks are due to the following: Pedro G. Miranda Pacheco for field assistance; Monserrat Jiménez for field assistance and for editing figures; Gilberto Hernández for drawing the maps; Alejandra Serrato, Martha G. Rocha and Eduardo Delgadillo for laboratory assistance; Rosaura Grether for her valuable comments on the manuscript; and Caroline Berry for proofreading the English version.

REFERENCES

- Arakaki M, Christin PA, Nyffeler R, Lendel A, et al. (2011). Contemporaneous and recent radiations of the world's major succulent plant lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 8379-8384.
- Bárcenas RT, Yesson C and Hawkins JA (2011). Molecular systematics of the Cactaceae. *Cladistics* 27: 470-489.
- Beraldi-Campesi H, Cevallos-Ferriz SRS, Centeno-García E, Arenas-Abad C et al. (2006). Sedimentology and paleoecology of an Eocene–Oligocene alluvial–lacustrine arid system, Southern Mexico. *Sediment. Geol.* 191: 227–254.
- Bravo-Hollis H and Sánchez-Mejorada H (1991). Las cactáceas de México. Vol.II Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Butterworth CA and Wallace RS (2004). Phylogenetic studies of *Mammillaria* (Cactaceae) insights from chloroplast sequence variation and hypothesis testing using the parametric bootstrap. *Am. J. Bot.* 91: 1086-1098.

- Byrne M and Hopper SD (2008). Granite outcrops as ancient islands in old landscapes: evidence from the phylogeography and population genetics of *Eucalyptus caesia* (Myrtaceae) in Western Australia. *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 93: 177–188.
- Byrne M (2008). Evidence for multiple refugia at different time scales during Pleistocene climatic oscillations in southern Australia inferred from phylogeography. *Quat. Sci. Rev.* 27: 2576–2585.
- CITES(Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna). Available at [<http://www.cites.org/eng/app/appendices.shtml>].
- Cowling RM, Proches S and Partridge TC (2009). Explaining the uniqueness of the Cape flora: Incorporating geomorphic evolution as a factor for explaining its diversification. *Mol. Phylogenet. Evol.* 51: 64–74.
- Dávalos-Álvarez OG, Nieto-Samaniego AJ, Alaniz-Álvarez SA, Martínez-Hernández E et al. (2007). Estratigrafía cenozoica de la región de Tehuacán y su relación con el sector norte de la falla de Oaxaca. *Rev. Mex. Cien. Geol.* 24: 197-215.
- Dávila P, Arizmendi MC, Valiente-Banuet A, Viseñor JL et al. (2002). Biological diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. *Biodivers. Conserv.* 11: 421–442.
- Drummond AJ, Rambaut A and Suchard MA (2002-2011). Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees Version v1.6.2. available at [<http://beast.bio.ed.ac.uk>].
- Elías-Herrera M, Ortega-Gutiérrez F, Sánchez-Zavala JL, Macías-Romo C et al. (2007). The Caltepec fault zone: Exposed roots of a long-lived tectonic boundary between two continental terranes of southern Mexico. In: Alaniz Alvarez, S.A. and Nieto Samaniego, A.F. Geology of Mexico: Celebrating the Centenary of the Geological Society of Mexico. *Geol. Soc. Am.* 422: 317-342.
- Ellis AG, Weis AE and Gaut BS (2006). Evolutionary radiation of “stone plants” in the genus *Argyroderma* (Aizoaceae): unraveling the effects of landscape, habitat, and flowering time. *Evolution*, 6: 39-55.
- Excoffier L, Laval G and Schneider S (2005). Arlequin (version 3): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1: 47–50.
- García E (1973). Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía, UNAM, Mexico, D.F.
- Hernández-Hernández T (2010). Radiaciones evolutivas de linajes de plantas suculentas en el orden Caryophyllales con énfasis en la Familia Cactaceae. Doctoral thesis, Universidad Nacional Autónoma de México. Mexico.
- Hershkovitz MA and Zimmer EZ (1997). On the evolutionary origins of the cacti. *Taxon*. 46: 217-232.
- IUCN (Red List of Threatened Species) (2009). The IUCN Red List of threatened species. Available at [<http://www.iucnredlist.org>].
- Kellner A, Ritz CM, Schlittenhardt P and Hellwig FH (2011). Genetic differentiation in the genus *Lithops* L. (Ruschioideae, Aizoaceae) reveals a high level of convergent evolution and reflects geographic distribution. *Plant Biol.* 13: 368–380.
- Librado P and Rosas J (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinform.* 25: 1451-1452.
- Medina-Sánchez J (2010). Cenozoic environmental evolution of the San Juan Raya Basin, south-central Mexico. PhD thesis, University of Leicester, UK.
- Nieto-Samaniego F Alaniz-Álvarez SA, Silva-Romo G, Eguiza-Castro MH et al. (2006). Latest Cretaceous to Miocene deformation events in the eastern Sierra Madre del Sur,

Mexico, inferred from the geometry and age of major structure. *Geol. Soc. Am. Bull.* 118: 238-252.

Peters EM (2000). Conocimiento y conservación de las mamilarias endémicas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Consejo Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, CONABIO. México, D.F.

Peters EM, Martorell C and Ezcurra E (2009). The adaptive value of cued seed dispersal in desert plants: seed retention and release in *Mammillaria pectinifera* (Cactaceae), a small globose cactus. *Amer. J. Bot.* 96: 537-541.

Posada D (2008). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1253–1256.

Rambaut A and Drummond AJ (2003-2009). TRACER v1.5.0 MCMC Tracer Analysis Tool. Institute for Evolutionary Biology, University of Edinburgh. Available at [<http://tree.bio.ed.ac.uk/>].

Rambaut A (2006-2009). FIG TREE v.1.3.1 Tree Figure Drawing Tool. Institute for Evolutionary Biology, University of Edinburgh. Available at [<http://tree.bio.ed.ac.uk/>].

Ritz CM, Martins L, Mecklenburg R, Goremykin V et al. (2007). The molecular phylogeny of *Rebutia* (Cactaceae) and its allies demonstrates the influence of paleogeography on the evolution of South American mountain cacti. *Am. J. Bot.* 9: 1321–1332.

Rodríguez-Ortega C, Franco J and Mandujano MC (2006). Serotiny and seed germination in three threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *Basic Appl. Ecol.* 7: 533-544.

Ronquist F and Huelsenbeck JP (2003). Mr. Bayes v3.1.2. Bayesian Analysis of Phylogeny. School of Computation Science, Florida State University, General Public License.

SEMARNAT (Secretaría De Medio Ambiente y Recursos Naturales) (2002). Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. México, D.F.

Sequencher 4.8 Sequence Analysis Software, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA. Available at [<http://www.genecodes.com/>].

Taberlet P, Gielly L, Pautou G and Bouvet J (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 17: 1105–1109.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, et al. (2011). MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599.

Valverde PL and Zavala-Hurtado JA (2006). Assessing the ecological status of *Mammillaria pectinifera* Weber (Cactaceae), a rare and threatened species endemic of the Tehuacán-Cuicatlán Region in Central Mexico. *J. Arid. Environ.* 64: 193-208.

Valverde PL, Zavala-Hurtado JA, Jiménez-Sierra C, Rendón-Aguilar B, et al. (2009). Evaluación del riesgo de extinción de *Mammillaria pectinifera*, cactácea endémica de la Región de Tehuacán-Cuicatlán. *Rev. Mex. Biodivers.* 80: 219-230.

Viruel J, Catalán P and Segarra-Moragues JG (2012). Disrupted phylogeographical microsatellite and chloroplast DNA patterns indicate a vicariance rather than long-distance dispersal origin for the disjunct distribution of the Chilean endemic *Dioscorea biloba* (Dioscoreaceae) around the Atacama Desert. *J. Biogeogr.* 39: 1073–1085.

Wolfe KH, Li WH, and Sharp PM (1987). Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 9054-9058.

Zavala-Hurtado JA and Valverde PL (2003). Habitat restriction in *Mammillaria pectinifera*, a threatened endemic Mexican cactus. *J. Veg. Sci.* 14: 891-898.

Table 1. Population, population code, key shared environmental factors and Disturbance Index (ID_R) of the studied populations of *Mammillaria pectinifera*.

Population	Population Code	Altitude (m a.s.l.)	Slope (°)	Stone Content (%)	Sand (%)	Silt (%)	Clay (%)	Soil texture	Deep soil (cm)	Organic Matter	pH	Vegetative coverage (%)	DI _R
Coapan	COA	1778	5.0	40.0	50.4	33.8	15.8	Sandy loam	3.4	4.6	8.0	35.0	91.11
Texcala	TEX	1914	19.	73.0	55.1	36.9	8	Sandy loam	2.7	11.7	7.9	30.0	52.19
El Riego	RIE	1950	10.0	68.3	56.75	35.4	7.9	Sandy loam	6.8	13.8	7.7	60.0	21.21
Frontera	FRON	1950	10.0	61.7	63.1	28.9	8	Sandy loam	4.1	7.3	8.0	73.0	0.39
Tecamachalco	TECA	2070	20.0	9.0	46.4	46.8	6.8	Sandy loam	5.8	2.9	7.7	20.0	100
Teteletitlan	TETE	2100	15.0	77.0	66.2	29	4.8	Sandy loam	7.5	13.1	7.8	30.0	39.64
Zapotitlan	ZAP	2110	12.0	75.0	47.4	39.7	13.0	Sandy loam	7.1	9.7	7.9	60.0	0.0

Soil samples (n=2) were analyzed commercially. All other variables were measured in the field. Disturbance Index (ID_R) is an estimate of three disturbance agents: livestock, human activities and habitat deterioration. It ranges from no impact (0.0) to the highest recorded impact (100.0) according to Valverde et al. (2009).

Table 2. Population code sample size (N) and standard genetic statistics of the studied populations of *Mammillaria pectinifera*. The haplotypes, number of individuals carrying each haplotype and the standard genetic statistics were based on *psbA-trnH* and *trnT-trnL* intergenic sequences. Numbers among parenthesis represent standard error.

Population Code	N	Haplotypes	H	Π	Θ_π	F_s	P
COA	14	D(1), E(3), F(9)	0.500 (0.136)	0.00056 (0.00018)	0.538 (0.534)	-0.413	0.263
TEX	15	A(7), B(5), C(1)	0.603 (0.088)	0.0007 (0.00015)	0.667 (0.613)	-0.021	0.295
RIE	16	A(11), C(1)	0.167 (0.134)	0.00017 (0.00014)	0.167 (0.270)	-0.476	0.310
FRON	15	A(2), C(1)	0.667 (0.314)	0.0007 (0.0007)	0.667 (0.831)	^a n.a.	n.a.
TECA	10	A(10)	0.0000	0.0000	-	n.a.	n.a.
TETE	14	A(1)	0.0000	0.0000	n.a.	n.a.	n.a.
ZAP	14	A(7), B(7)	0.538 (0.052)	0.00056 (0.00005)	0.538 (0.531)	1.287	0.370
Total	98	66	0.622 (0.055)	0.00085 (0.0000)	0.368 (0.397)	-1.397	0.114

h , haplotype diversity; π , nucleotide diversity; θ_π mean number of pairwise differences from the infinite-site equilibrium; F_s , neutrality test according to Fu (1997); P , probability of neutrality test; ^an.a. not analysed because of a lack of variation.

Table 3. Analysis of molecular variance (AMOVA) based on the *psbA-trnH* and *trnT-trnL* sequencing of *Mammillaria pectinifera*. Levels of significance are based on 1023 random permutations.

Source of variation	<i>d.f.</i>	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among populations	6	25.44	0.447	68.19
Within populations	59	12.31	0.208	31.81
Total	65	37.76	0.656	
Fixation index F_{ST}	0.682			
P-value <0.00001				

Figure 1. A. Approximate location of the seven populations of *Mammillaria pectinifera* under study and some tectonic faults mentioned in the text. **B.** Distribution and frequencies of the cpDNA haplotypes of in the TVr. Population names correspond to those listed in Table 1. San Juan Raya Basin (Bsjr); Cordon Tierra Colorada highlands (Htc); Cordon Nopala highlands (Hno). Dotted line encloses the TVr Biosphere Reserve; bold dashed lines show the Oaxaca and Caltepec faults and thin dashed line shows associated minor faults at the northern sector of the TVr. Inner polygon enclosed by a continuous line represents Bsjr. These faults have shown activity until the Holocene and are considered likely major drivers of deformation of highlands and valleys across the distribution range of *M. pectinifera* in the northern sector of the TVr.

Figure 2. BSP showed changes in population size of *Mammillaria pectinifera* through time (mutation per site). The black line represents the median estimate; gray line shows the 95% HPD limits.

Figure 3. Chronograms based on a Bayesian approach. **A.** Mammilloyd clade. Closed black circle shows the calibration point. **B.** *Mammillaria pectinifera* haplotypes. Numbers above branches denote posterior probabilities.

Supplementary Data

Taxa, Genbank Accession Number *matK-trnL*, *psbA-trnH*, *rpl16*
- not available

Coryphantha durangensis (Rünger ex K.Schum.) Britton & Rose, gb FN997271.1, AY545338.1, -
Cochemia halei (K. Brandegee) Walton, gb FN997310.1, AY545386.1, AY545269.1
Cochemia senilis (Lodd. ex Salm-Dyck) Orcutt, gb FN997161.1, AY545440.1, AY545318.1
Coryphantha elephantidens (Lem.) Lem., gb FN997355.1, AY545339.1, AY545231.1
Coryphantha pallida Britton & Rose, gb -, -, AY545232.1
Escobaria chihuahuensis Britton & Rose, gb FN997000.1, AY545341.1, AY545233.1
Escobaria tuberculosa (Engelmann) Britton & Rose, gb FN997185.1, AY545343.1, AY545235.1
Ferocactus robustus Britton & Rose, gb FN997491.1, AY545345.1, AY545237.1
Mammillaria beneckeii Ehrenb., gb FN997206.1, AY545353.1, AY545244.1
Mammillaria candida (Scheidw.) Buxb, gb AY545250.1, AY545360.1, AY545250.1
Mammillaria carmenae Castañeda & Nuñez, gb FN997156.1, AY545362.1, AY545252.1
Mammillaria carnea Zuccarini ex Pfeiffer, gb FN997360.1, AY545363.1, AY545253.1
Mammillaria decipiens Scheidweiler, gb FN997324.1, AY545369.1, AY545255.1
Mammillaria geminispina Haw., gb FN997280.1, AY545379.1, AY545262.1
Mammillaria haageana Wolf., gb FN997493.1, AY545385.1, AY545268.1
Mammillaria hernandezii Glass & R.C. Foster, gb FN997190.1, AY545387.1, AY545270.1
Mammillaria longimamma A. P. de Candolle, gb FN997555.1, AY545399.1, AY545281.1
Mammillaria luethyi Hinton, gb -, AY545400.1, -
Mammillaria magnifica Buchenau, gb FN997404.1, AY545401.1, AY545283.1
Mammillaria magnimamma Haworth, gb FN997573.1, -, AY545284.1
Mammillaria nana Backeberg, gb -, AY545415.1, -
Mammillaria pectinifera Weber, gb FN997165.1, AY545421.1, AY545300.1
Mammillaria picta Meinshausen, gb FN997130.1, AY545427.1, AY545306.1
Mammillaria pondii Greene, gb FN997416.1, AY545431.1, AY545310.1
Mammillaria poselgeri (Hildmann) Britton & Rose, gb -, AY545432.1, -AY545311.1
Mammillaria pottsii Scheer ex Salm-Dyck, gb FN997505.1, AY545433.1, AY545312.1
Mammillaria prolifera (Mill.) Haw., gb FN997087.1, AY545434.1, AY545313.1
Mammillaria rhodantha (Mill.) Haw., gb FN997210.1, AY545437.1, AY545316.1
Mammillaria sinistrohamata Boedeker., gb FN997066.1, AY545441.1, AY545319.1
Mammillaria sphacelata Mart., gb FN997483.1, AY545442.1, AY545320.1
Mammillaria wrightii Engelmann, gb FN997410.1, AY545454.1, AY545331.1
Neolloydia conoidea (A. P. de Candolle) Britton & Rose, gb FN997107.1, AY545458.1, AY545334.1
Ortegocactus macdougallii Edward Alexander, gb FN997009.1, AY545459.1, AY545335.1
Pelecyphora aselliformis Ehrenberg, gb FN997134.1, AY545460.1, AY545336.1
Stenocactus lloydii (Britton & Rose) A. Berger ex A.W. Hill., gb -, -, AY545337.1
Turbincarpus viereckii (Werderm.) John & Riha, gb FN997095.1 -, -
Turbincarpus pseudomacrolele (Backeb.) Buxb. & Backeb., gb M041792.1|, -, -

Figure 1A

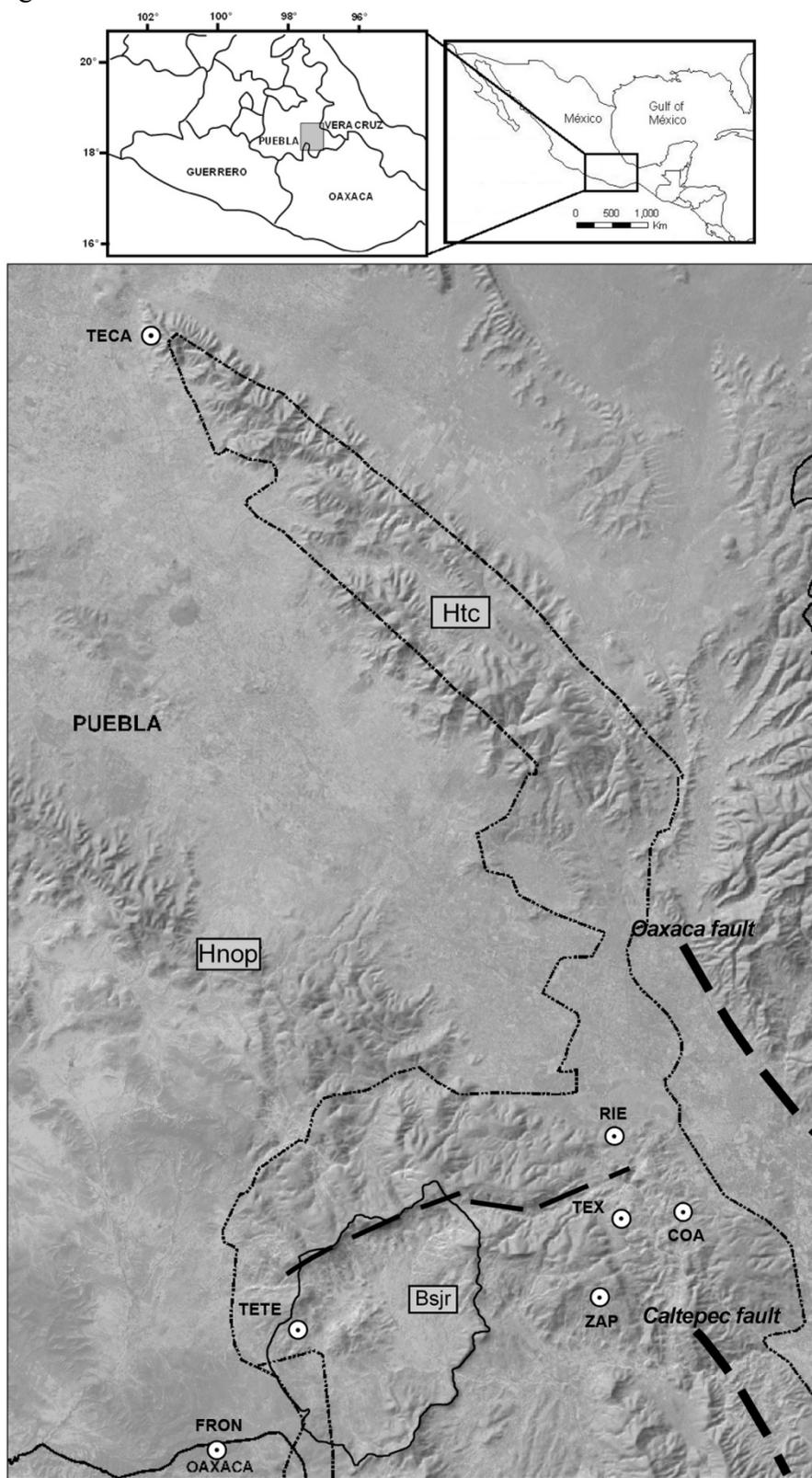


Figure 1B.

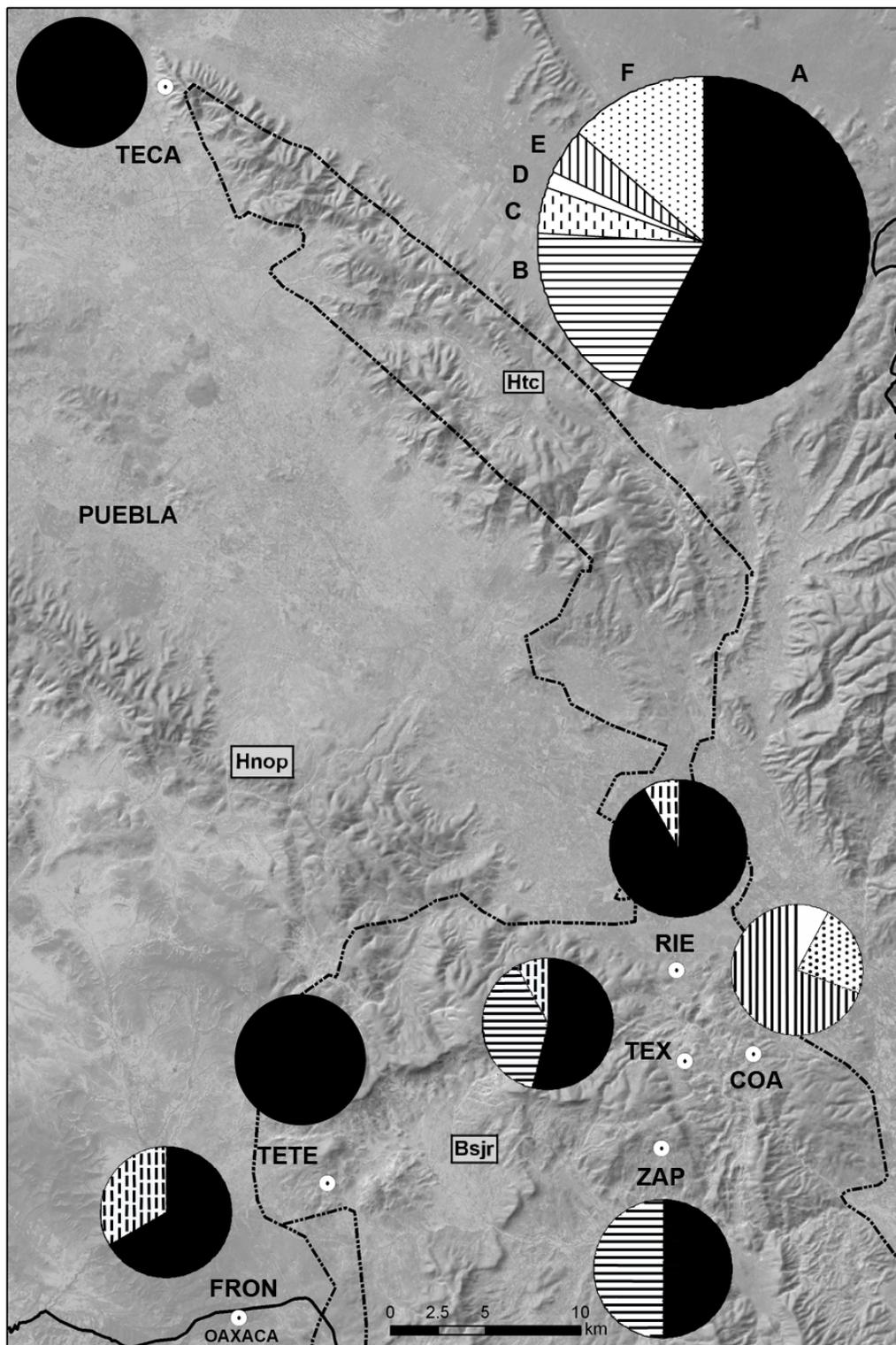


Figure 2.

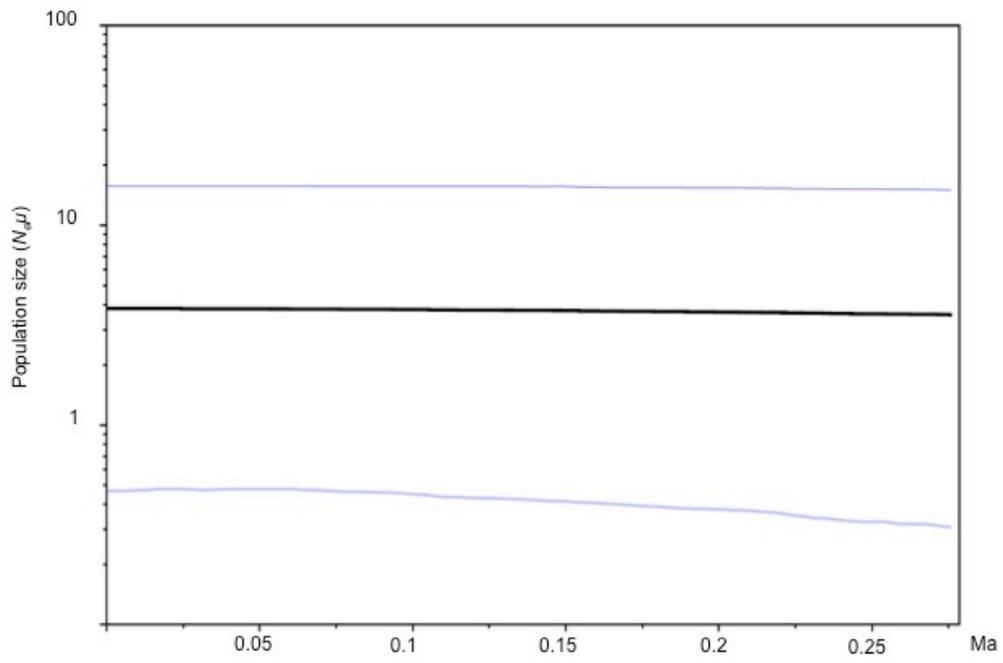


Figure 3A.

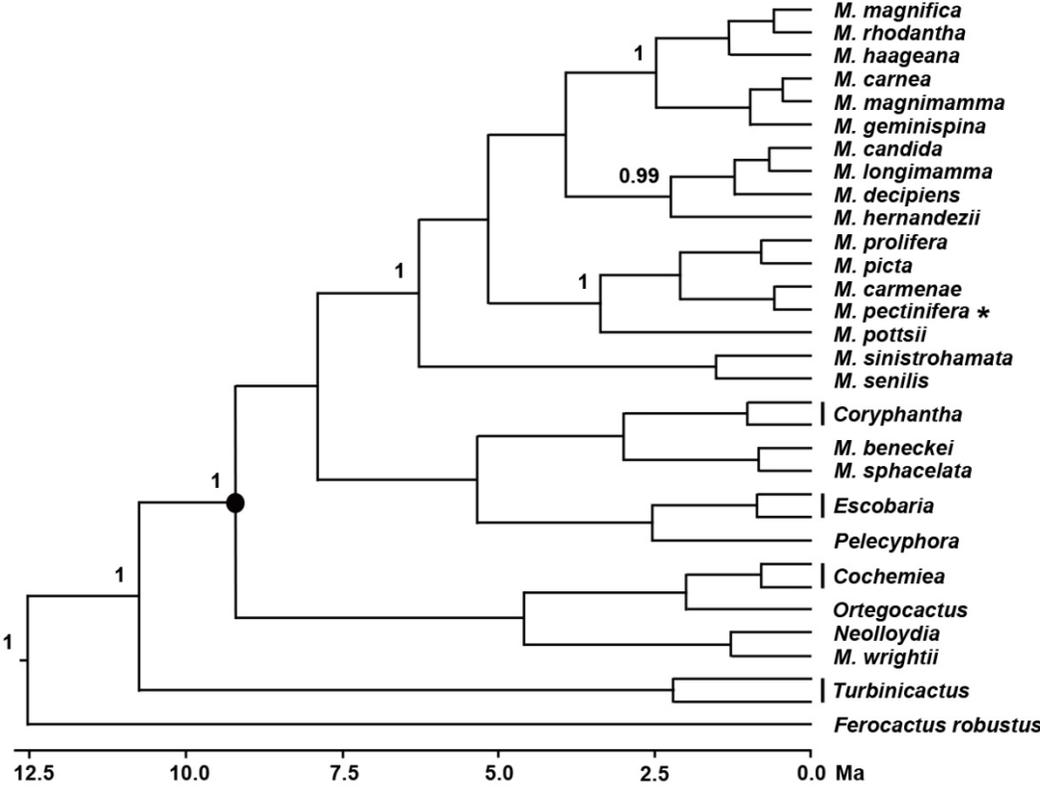
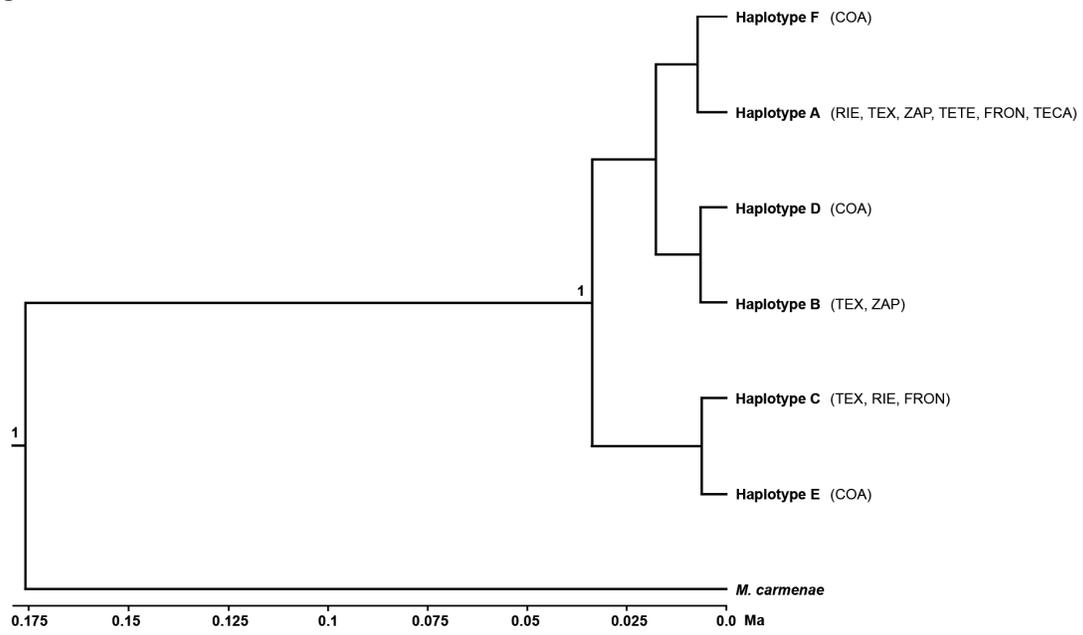


Figure 3B.



Capítulo III

Expansión poblacional reciente de *Cephalocereus columna-trajani* en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán

Cephalocereus columna-trajani se distribuye discontinuamente a todo lo largo del Valle de Tehuacán-Cuicatlán a 800-1800 m snm, en laderas de montañas con pendientes pronunciadas, suelos muy pedregosos, ricos en materia orgánica. Este cacto gigante, polinizado y dispersado por murciélagos, es una de las especies más abundantes dentro del Valle, no obstante de que su origen es reciente (0.99 m.a.). En este capítulo se empleó a *C. columna-trajani* para inferir si ha experimentado una expansión poblacional reciente, conforme se establecían las condiciones microambientales (topográficas y edáficas) necesarias para su desarrollo, posiblemente a lo largo del Pleistoceno (2.58 m.a.), cuando el VTC adquirió su geomorfología y condiciones climáticas actuales.

Se encontró que la especie y sus poblaciones han pasado por una expansión poblacional y espacial reciente, posiblemente en el Pleistoceno superior (0.126-0.01 m.a.). Aunque no fue posible determinar a la población ancestral, ni alguna ruta de expansión hipotética, es probable que la especie colonizara rápidamente el hábitat disponible. La baja diferenciación poblacional indica que el flujo génico mediado por murciélagos ha evitado una fuerte estructuración poblacional. A nivel regional, la diferenciación genética es independiente de la distancia, sugiriendo que los murciélagos han jugado un papel determinante en la expansión. Este resultado también puede reflejar que el tiempo transcurrido no ha sido suficiente para que los linajes diverjan.

INTRODUCCIÓN

El Valle de Tehuacán-Cuicatlán (VTC) junto con la Cuenca del Río Balsas es el centro de diversificación de cactáceas columnares de la tribu Pachycereeae más importante de Norte América (Valiente-Banuet *et al.*, 1996). Esta región alberga a 45 de las 124 especies que se distribuyen exclusivamente en México (Valiente-Banuet *et al.*, 1996; Barba-Montoya, 2012) y algunas llegan a ser elementos dominantes de los bosques de suculentas (Valiente-Banuet *et al.*, 2001).

La filogenia molecular calibrada de la tribu Pachycereeae muestra una radiación reciente (9.07-6.68 m.a.) y una tasa de especiación alta, la cual alcanzo su máximo valor hace aproximadamente 6 millones de años, en el Mioceno tardío (Barba-Montoya, 2012). Estas estimaciones coinciden con el incremento en la aridez en el centro de México que inició hace aproximadamente 10 millones de años (Barba-Montoya, 2009; 2012) y con un periodo de intensa actividad tectónica en la Fosa de Tehuacán, en la cual está inmerso el VTC (Dávalos-Álvarez *et al.*, 2007). En combinación, los eventos geo-climáticos originaron un mosaico de hábitats que con toda probabilidad favorecieron la rápida diversificación del grupo en los últimos millones de años (Rzedowski, 1962; Hernández-Hernández, 2010).

La evolución geológica y geomorfológica del VTC produjo escalones hipsométricos que han creado variaciones por pisos altitudinales de elementos físico-geográficos, como el clima, aguas superficiales y subterráneas, suelos, geoformas y tipos de vegetación (Ortiz-Pérez *et al.*, 2004). El rango altitudinal donde preferentemente habitan la mayoría de las cactáceas de la tribu Pachycereeae, se

encuentra es a 1600-1900 m en planices o laderas de cerros pedregosos con rocas ígneas o calizas, sobre suelos aluviales (Torres-Colín, 2004).

Los estudios filogeográficos y filogenéticos son un poderosa herramienta que permiten inferir la importancia relativa del incremento en la aridez y la configuración geomorfológica sobre la divergencia de linajes, y ofrecen la posibilidad de correlacionar eventos de especiación (a partir de las estimaciones de la divergencia genética dentro de y entre linajes) con eventos geomorfológicos (Schönhuth *et al.*, 2011). Estos estudios son particularmente útiles en sitios donde el escaso conocimiento climático, geomorfológico y paleontológico dificultan la reconstrucción evolutiva de linajes, como sucede en el centro de México y en las cactáceas de las cuales el registro fósil es pobre (Barba-Montoya, 2012). No obstante, hasta ahora no se han reportado estudios filogeográficos que amplíen nuestra comprensión sobre influencia de estos eventos históricos en la evolución a nivel infraespecífico de los miembros de la tribu Pachyceereae en el principal centro de diversificación.

El análisis filogeográfico permitiría inferir el papel de los eventos geológicos y procesos microevolutivos responsables de la diversificación de columnares, por ejemplo permitirían determinar si en especies con amplia distribución dentro del VTC han ocurrido eventos de colonización, expansión, contracción o fragmentación poblacional asociados a la configuración del paisaje.

Aunque se han reportado estudios descriptivos sobre genética de poblaciones en cactáceas columnares del VTC como *Neobuxbaumia tetetzo*, *N. mezcalensis*, *N. macrocephala* y la misma *Cephalocereus columna-trajani* (Alejos, 2002; Rivera-Montoya, 2003; Esparza-Olguín, 2005; Vázquez-Montiel, 2005), éstos no incluyen

todo el rango de distribución de las especies, lo cual no permite hacer inferencias sobre la historia evolutiva a escala regional. Dichas especies muestran una alta diversidad genética y baja diferenciación interpoblacional, atributos genéticos que son consistentes con características de historia de vida como entrecruzamiento y síndrome de dispersión quireptófilo que favorecen un flujo génico intenso (ver Capítulo I).

La cactácea columnar *Cephalocereus columna-trajani* (Karw.) K. Schum se distribuye desde Texcala hasta Cuicatlán, en un área aproximada de 70 km de norte a sur y 40 km de este a oeste (P. L. Valverde, datos no publicados), habita en laderas de montañas que se ubican dentro de un rango altitudinal de 800-1800 m (Arias *et al.*, 2012), sobre afloramientos de rocas calizas, en terrenos muy accidentados (pendiente media = 10.7°) con suelos muy pedregosos, someros y caracterizados por una elevada cantidad de materia orgánica, fósforo, sodio y magnesio (Zavala-Hurtado, 1982). Este cacto representa uno de los elementos más abundantes del VTC (540 ± 180 en Tetitlán y 470 ± 157 plantas/ha en Cuicatlán, Valverde *et al.*, 2007), a pesar de tener un origen reciente.

La edad de divergencia estimada del género (2.13-1.89 m.a.) y la especie [0.99 m.a. (~1.89-0.19 m.a.)] (Barba-Montoya, 2012), coinciden con el tiempo en el cual el VTC adquirió su configuración geomorfológica actual, en la transición del Plio/Pleistoceno (Dávalos-Álvarez *et al.*, 2007, Medina-Sánchez, 2010). Es probable que conforme se establecían o expandían los nuevos hábitats ocurriera una rápida colonización de *C. columna-trajani* a lo largo del VTC, se moldeara su distribución y estructura genética. De acuerdo con estudios empíricos y simulaciones, la expansión

poblacional, a partir de los extremos de la distribución de las poblaciones y con múltiples eventos de fundador, puede reflejarse en el acervo genético como una pérdida progresiva de la diversidad genética conforme las poblaciones expanden su rango (Hewitt 1996).

Los dispersores de semillas de cactáceas columnares en el VTC, incluyendo a *C. columna-trajani*, son los murciélagos *Choeronycteris mexicana*, *Leptonycteris nivalis*, y *Artibeus jamaicensis* (Godínez-Álvarez *et al*, 2000; 2002). Es probable que estos murciélagos tengan un papel importante en la colonización y establecimiento de la especie, por ejemplo, se sabe que la germinación de las semillas de *N. tetetzo* que pasan por el tracto digestivo de *C. mexicana*, es afectada positivamente, además el murciélago deposita las semillas en arbustos que funcionan como nodrizas, promoviendo el reclutamiento de plántulas (Godínez-Álvarez *et al.*, 2002). Sin embargo, es altamente probable que la dispersión de semillas ocurra localmente y/o entre poblaciones vecinas, debido a que las semillas son diseminadas por los murciélagos durante su desplazamiento hacia los arbustos que emplean para descansar y en el mismo lugar de descanso; al hecho de que las semillas permanezcan en el tracto digestivo de los murciélagos por un breve periodo de tiempo (15-35 min en *Artibeus jamaicensis*, Morrison, 1980) y sean defecadas inmediatamente, así como la distancia de traslado estimada entre un evento de alimentación y otro, que es de hasta 8 Km (*A. jamaicensis*, Heer *et al.*, 2010). Por lo que se puede favorecer un vecindario genético reducido y con ello cierto grado de endogamia local, la cual puede promover la diferenciación genética a escala regional.

Los polinizadores efectivos de *C. columna-trajani*, son *Choeronycteris mexicana*, *Leptonycteris curasoae*, *Glossophaga soricina* y *Artibeus jamaicensis*, de las cuales las dos primeras consumen del 60 al 50% del polen (Valverde *et al.*, 2008). Como recurso alimenticio, el polen de *C. columna trajani* está disponible desde febrero hasta septiembre cuando ocurre la floración. Los picos de producción de flores a lo largo del VTC coinciden en los meses de mayo a julio (Valverde *et al.*, 2008). Aunque se ha reportado que los murciélagos se pueden desplazar aproximadamente 40 Km en una sola noche (Rojas-Martínez y Valiente-Banuet, 1996), es poco probable que la polinización ocurra entre las poblaciones ubicadas en los extremos de la distribución, pues la distancia que separa a las poblaciones del norte y el sur va de ~60 a 82.67 Km, lo cual restringe la polinización en los extremos de la distribución de la especie.

En el presente estudio se analiza por primera vez la estructura filogeográfica de un cactus columnar incluyendo todo su rango de distribución dentro del VTC. Se espera que conforme se haya expandido el hábitat de *C. columna-trajani* la estructura genética muestre un patrón de aislamiento por distancia y la especie haya experimentado una expansión demográfica lo cual pudo ocurrir recientemente. Dado que es probable que la dispersión de semillas sea local, se espera encontrar que en *C. columna trajani* exista cierto grado de diferenciación poblacional.

A partir de estas hipótesis se planteó el siguiente objetivo general:

Analizar la estructura genética y relaciones filogeográficas de *C. columna-trajani* a lo largo de su rango de distribución, mediante secuencias de ADN de cloroplasto, para

inferir el efecto de la evolución del paisaje sobre la configuración de la diversidad genética y divergencia de linajes.

Objetivos particulares:

- a. Analizar la asociación entre variación genética y la distribución geográfica de *C. columna-trajani*,
- b. Determinar si existe un patrón de aislamiento por distancia e
- c. Inferir eventos de expansión demográfica, mediante el análisis de la demografía histórica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio

El estudio se llevó a cabo en de la Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán, la cual se ubica en el sureste del estado de Puebla y noroeste de Oaxaca, entre los 17°39' y 18°53' de latitud norte y los 96°55' y 97°44' longitud oeste (Figura 1). El clima es semiárido BS0hw''(w)(e)(g) de acuerdo con la clasificación de Köpen, con lluvias en verano y otoño; la precipitación media anual es de 3800 mm y la temperatura media anual de 21°C (García, 1973). Las comunidades vegetales donde se encuentra *C. columna-trajani* son bosque tropical caducifolio, matorral xerófilo y "organales", cuando es la especie dominante (Arias *et al.*, 2012). *Cephalocereus columna-trajani* es uno de los dos de cactus columnares gigantes (10-16 m), endémicos del VTC (Bravo-Hollis 1978). Una de las características que lo distingue del resto de las columnares es que el tallo no ramifica y, en las poblaciones del norte

del Valle, su ápice está inclinado en dirección norte-noroeste (Zavala-Hurtado *et al.*, 1998).

Métodos

Se muestrearon diez poblaciones abarcando todo el rango de distribución de la especie (Tabla 1). Se colectaron muestras de tejido fotosintético de 14 individuos elegidos al azar en cada una de las localidades. Se extrajeron aproximadamente 5 cm de costilla de cada individuo y se selló la herida con cera de Campeche (Tabla 1). El material se transportó en un termo para nitrógeno líquido y se almacenó en el laboratorio en un ultra congelador a -80°C hasta que se procesó.

Tabla 1. Localidades de colecta tejido de *Cephalocereus columna-trajani* en diez poblaciones del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

Localidad	Municipio	Estado	Altitud (m)	Coordenadas
Zapotitlán	Zapotitlán	Puebla	1500	97° 28' 20.00" N, 18° 19' 43.00" O
Tilapa	Coxcatlán	Puebla	861	97° 07' 00.01" N, 18° 10' 00.01" O
Texcala	Zapotitlán	Puebla	1714	97° 26' 01.21" N, 18° 23' 57.01" O
	San Martín	Puebla	1225	97° 03' 06.50" N, 18° 06' 12.60" O
Toxpalan	Toxpalan			
Arrialco	Tehuacán	Puebla	1422	97° 22' 05.99" N, 18° 23' 14.39" O
	San José	Puebla	1197	97° 19' 44.40" N, 18° 16' 39.61" O
Tetitlán	Miahuatlán			
	San José	Puebla	1174	97° 17' 04.81" N, 18° 12' 43.20" O
Acatepec	Miahuatlán			
Cuicatlán	Valerio Trujano	Oaxaca	1110	97° 00' 02.41" N, 17° 48' 48.60" O
Tomellín	San Pedro	Oaxaca	-	97° 06' 00.00" N, 17° 43' 25.79" O
	Jocotipac			
Santa Lucía	Tepelmeme	Oaxaca	1793	97° 21' 03.60" N, 18° 04' 59.40" O

Análisis genético

Extracción, amplificación, purificación y secuenciación de ADN

Se hizo la extracción de ADN total de cada individuo empleando el protocolo de extracción de ADN vegetal *DNEasy Plant Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA) con modificaciones menores. El ADN extraído se almacenó a 4°C.

Se amplificó la región *psbA-trnH* del cloroplasto en un volumen total de 25 µl de reacción que incluía 2.5 µl de buffer para *PCR* 10X, 0.75 µl de MgCl₂ 50 mM de una solución equimolar de *dNTP*'s 10 mM, 14 pmol de cada *primer* (*psbA-F* [GTTATGCATGGACGTAATGCT] Butterworth y Wallace, 2004; *trnH-R* [CGCGCATGGTGGATTCACAAATC] Sang *et al.*, 1997), 0.5 µl de *Taq* polimerasa (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) y 10 ng/µl de ADN molde (Butterworth y Wallace, 2004). En los casos en los que se dificultó la amplificación se utilizó el protocolo *Readdy Mix PCR Master Mix* (AB-0575/LD/A de *Thermo Scientific*). El volumen total de esta reacción fue de 25 µl, de los cuales 22.5 µl correspondían a la solución *Master Mix*, 0.5 µl de cada *primer* 14 pmol/µl, 0.25 µl de MgCl₂ 25 mM, 0.25 µl de *ABS* 400 ng/ µl y 1 µl de ADN molde. El programa en el termociclador (Hybaid HBPXE02110 *Thermo Scientific*) consistió del precalentamiento de las muestras a 94°C durante 2 minutos; 25 ciclos con las siguientes especificaciones: desnaturalización del ADN a 94°C durante 1 min; el alineamiento a 50°C por 2 min; y la amplificación se llevó a cabo en un lapso de 1 min a 72°C. El tiempo adicional de extensión fue de 10 min a 72°C.

La región *trnT-trnL* se amplificó en un volumen total de 25 µl que incluía 2.5 µl de buffer para *PCR* 10X, 0.875 µl de MgCl₂ 50 mM, 0.5 µl de una solución equimolar de *dNTP*'s 10 mM, 14 pmol de cada *primer* (B48557-F

[CATTACAAATGCGATGCTCT] y B49291-R [TCTACCGATTTGCCATATC], Taberlet *et al.*, 1991), 0.5 µl de *Taq* polimerasa y 10 ng/µl de ADN molde. Se recurrió al protocolo de la solución *Master Mix* con las especificaciones anteriores cuando no era posible obtener la región. Se obtuvo la región *trnT-trnL* de acuerdo con el siguiente programa: precalentamiento a 94°C por 2 min, 25 ciclos que consistieron en una desnaturalización a 94°C por 1 min; alineamiento 55°C por 1 min; extensión a 72°C por 1 min y una de extensión final a 72°C durante 15 min. Se llevó a cabo una electroforesis de los productos de amplificación de cada región en buffer TBE 1X, para asegurarse de que la región había amplificado y continuar con la purificación.

Los productos de la amplificación fueron purificados mediante los protocolos de purificación de *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Valencia, CA, USA) y *Montage PCR Centrifugal Filter Devices* (Millipore Corporation, Beaford, MA, USA). En ambos el purificado se re-suspendió en 20-30 µl de agua ultrapura y se llevó a cabo la segunda electroforesis a fin de constatar la obtención del fragmento de interés.

Las secuencias de cada región se obtuvieron mediante reacciones con interrupción controlada de la replicación, empujando para ello *Big Dye Terminador BDT V3.1* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Se utilizaron aproximadamente 100 ng de producto de *PCR* purificado de cada región. La electroforesis y secuenciación se llevaron a cabo en el secuenciador automático ABI Prism Avant 3100 (Applied Biosystems) del Laboratorio Divisional de Biología Molecular de la UAM-Iztapalapa. Las secuencias fueron alineadas manualmente y

editadas en el programa SEQUENCHER 4.8 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA) para su posterior análisis.

Análisis estadístico

Diversidad genética

Se obtuvieron los descriptores estándar de la diversidad genética por población y especie, entre ellos la diversidad nucleotídica y haplotípica (Nei, 1983). Se usó el programa DNAsp 5 (Librado y Rozas, 2009) para obtener estos estimadores.

La diversidad nucleotídica (π), es el número promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias de ADN elegidas al azar en una población (Nei 1987).

$$\pi = \sum_{ij}^n x_i x_j \pi_{ij}$$

donde, x_i y x_j son las frecuencias de la secuencia i ésima y j ésima, respectivamente y π_{ij} el número de diferencias nucleotídicas por sitio entre las secuencias i ésima y j ésima, y n el número de secuencias en la muestra.

Para calcular la diversidad haplotípica (h) se empleó un estimador no-sesgado de la diversidad haplotípica, el cual calcula la probabilidad de elegir al azar dos secuencias o haplotipos diferentes de una población (ecuación 8.5 de Nei, 1987). Los valores de diversidad van de 0 a 1, el 0 representa el valor mínimo (por ejemplo, un haplotipo único, fijo en una población) y 1 representa la variabilidad genética máxima (por ejemplo, una frecuencia igual de cada uno de los haplotipos).

Estructura genética

La estructura genética se estimó mediante un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), el cual se basa en el cálculo de la varianza de las frecuencias génicas considerando el número de mutaciones entre haplotipos. A partir de una matriz de distancias al cuadrado entre todos los pares de haplotipos se construye un análisis jerárquico de la varianza molecular. En el AMOVA, la varianza total se divide en componentes de covarianza debido a diferencias intra-individuales, inter-individuales y/o inter-poblacionales. Los componentes de covarianza se utilizan para calcular índices de fijación, los cuales se definen en términos de coeficientes de endogamia (estadísticos F_{ST} de Wright).

$$F_{ST} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_T^2}$$

donde σ_a^2 es el componente de varianza debido a diferencias entre las G poblaciones y σ_T^2 es la varianza molecular total.

F_{ST} toma valores que tienden a 0 cuando las diferencias entre poblaciones son bajas y si se acerca a 1 indica que las poblaciones están completamente diferenciadas y existe una alta endogamia local.

La significancia estadística de los índices de fijación se hicieron usando permutaciones no-paramétricas que consisten en permutar haplotipos, individuos o poblaciones (1000 permutaciones son el número recomendado) para obtener una distribución de probabilidades correspondientes al azar (Excoffier *et al.*, 1992). Este análisis se hizo mediante los programas ARLEQUÍN 3.5 (Excoffier, 2011).

Aislamiento por distancia

El aislamiento por distancia ocurre en poblaciones subdivididas, en las que la tasa de intercambio de genes depende de la distancia o bien dentro de una población distribuida continuamente con dispersión de polen o semillas restringidas espacialmente (Wright, 1943). El aislamiento por distancia genera una estructura genética debido a que ocurre deriva local y puede cuantificarse mediante el coeficiente de endogamia estimado a lo largo del área de distribución de la especie.

Se empleó el programa *IBDWS* 3.23 para evaluar la existencia de un patrón por distancia en *C. columna-trajani*. Se calcularon los valores de F_{ST} entre todos los pares de poblaciones como medida de diferencia genética. Se realizó una prueba de Mantel para determinar la asociación no-aleatoria entre la matriz de distancias genéticas entre todos los pares de poblaciones con la matriz de distancias geográficas pareadas y se incluyó un análisis de regresión (Reduced Major Axis, RMA) para calcular la pendiente e intercepción de la curva (Jensen *et al.*, 2005).

Red de haplotipos

En una red de haplotipos se representan las relaciones filogenéticas, en forma de árboles multibifurcantes, entre secuencias de la misma especie con un número pequeño de sustituciones y altos niveles de homoplasia (mutaciones paralelas o convergentes). En contraste a los árboles estándar, donde sólo las puntas están etiquetadas, los nodos en una red representan haplotipos muestreados o haplotipos intermedios inferidos. Este análisis permite inferir haplotipos ancestrales, derivados e

intermedios hipotéticos. Se basa en métodos de distancia genética y minimiza la distancia entre haplotipos para establecer las relaciones.

Se empleó el programa NETWORK 4.6.1.1 (2012) para resolver las relaciones entre haplotipos e inferir el haplotipo ancestral. Las redes de haplotipos proporcionan una representación de datos intraespecíficos que se caracterizan por un número pequeño de sustituciones y altos niveles de homoplasia. La red de máxima parsimonia se construyó mediante el algoritmo *median-joining* (MJ). La distancia genética entre dos secuencias se calculó simplemente como el número de caracteres diferentes entre éstas. De acuerdo con el programa, se incrementó el peso de los eventos que son mucho menos probables que ocurran porque éstos son significativos cuando suceden. Así se asignó un peso de 3 a las transversiones y 1 a las transiciones.

Análisis demográfico

Análisis gráfica de cielo

Se estimaron la magnitud y tiempo en qué ocurrieron cambios en el tamaño efectivo poblacional (periodos de expansión o reducción poblacional) para analizarlos en el contexto de los eventos geomorfológicos del Pleistoceno, mediante un análisis gráfica de cielo o Bayesian Skyland Plot, *BSP*. Con base en la teoría de la coalescencia (unión de linajes) se infirió el tamaño efectivo poblacional (N_e) en diferentes puntos a lo largo del tiempo. A partir del árbol de genes de se identifican los cambios en el N_e , pues todos los haplotipos de una población se unen o coalescen hacia el ancestro común más reciente (ACMR).

Se utilizó el programa BEAST 1.6.1 (Drummond *et al.*, 2011) con las siguientes premisas: modelo de sustitución *HKY* para ambas regiones, reloj relajado log normal (*uncorrelated log normal*) con una tasa estimada de sustitución nucleotídica de $\mu = 1.0 \times 10^{-3}$ sustituciones por sitio neutral por millón de año (s/s/m.a.) (Wolfe *et al.*, 1987). Las réplicas de la cadena MCMC se llevaron a cabo en 10 millones de pasos con un *burnin* de 10%, mientras que los árboles y los parámetros se muestrearon cada 1000 pasos. El resto de los parámetros fueron especificados con valores por *default*. Las estimación de $N_e\mu$ y los intervalos de confianza se calcularon a partir de las probabilidades de distribución con TRACER 1.4.1 y sintetizadas como una *BSP* (Rambaut y Drummond, 2009).

Análisis de *mismatch*

Para inferir cambios en el tamaño poblacional de *C. columna-trajani* a través del tiempo, se hizo un análisis de *mismatch*, en el cual se graficó la distribución de frecuencias de diferencias pareadas entre secuencias por población para evaluar la posibilidad de expansión demográfica. De acuerdo con el modelo, después de un crecimiento explosivo la distribución *mismatch* se aproxima a una curva lisa con un único pico bien definido (hipótesis nula), mientras que en una población estable con un tamaño poblacional constante el histograma es irregular (hipótesis alternativa). La expansión poblacional da como resultado un rápido incremento en el número promedio de diferencias pareadas entre nucleótidos y una caída rápida del coeficiente de variación. Estos efectos se deben a las nuevas mutaciones que ocurren en los nuevos linajes como resultado del crecimiento poblacional. Si el

tamaño poblacional permanece grande, las mutaciones se acumulan de tal manera que, con el tiempo, el promedio de diferencias pareadas incrementa. El modelo asume un crecimiento poblacional rápido de N_0 a N_1 en t generaciones atrás, después del cual la población alcanza un equilibrio demográfico (Rogers y Harpending, 1992).

Se empleó el programa ARLEQUIN 3.5 para estimar tres parámetros demográficos, mediante una aproximación generalizada no-lineal de cuadrados mínimos, $\theta_0 = 2uN_0$, $\theta_1 = 2uN_1$ y $\tau = 2ut$, donde u es la tasa de mutación (Schneider y Excoffier, 1999). La validez del modelo se prueba mediante una aproximación *bootstrap* paramétrico simulando la suma de desviaciones al cuadrado (SSD) entre las diferencias pareadas observadas y esperadas. Los valores no significativos de SSD indican que los datos no se desvían de lo esperado bajo el modelo de expansión. El índice de Raggedness (r) indica la falta de uniformidad de la distribución observada con respecto a la esperada. Un valor grande de r sugiere que modelo no proporciona un buen ajuste a los datos y un valor no significativo indica expansión poblacional.

Excoffier (2004) derivó la distribución *mismatch* esperada a partir de un modelo de expansión espacial. Generalmente, ocurre una expansión espacial si una población inicialmente está restringida a un área muy pequeña y después incrementa el rango de la población en el tiempo y el espacio. La población resultante comienza a subdividirse debido a que los individuos tenderán a aparearse con mayor probabilidad con los individuos cercanos que con los lejanos geográficamente (Excoffier, 2011). Se emplea el modelo continente-isla, donde el demo muestreado

puede intercambiar migrantes con una única población de tamaño infinito a una tasa m . Algunas generaciones en el pasado, el modelo continente-isla pudo haber estado reducido a un demo de tamaño N_0 . Bajo este modelo, se calcula la probabilidad de que dos genes muestreados en el demo de tamaño N difiera en S sitios. Se estimaron los parámetros de expansión espacial τ , $\theta = \theta_0 = \theta_1$ y $M = 2Nm$, usando el mismo método de cuadrados mínimos descritos para la estimación de expansión demográfica. Se construyó la distribución *mismatch* esperada y la prueba de bondad de ajuste al modelo mediante simulaciones de una expansión instantánea bajo el modelo continente-isla; con el programa ARLEQUIN 3.5.

RESULTADOS

Diversidad genética

Se obtuvieron 6 haplotipos cuyos sitios variables se muestran en la Tabla 2. Las secuencias *psbA-trnH* y *trnT-trnL* tienen una longitud de 367 y 500 pb, respectivamente. La longitud total de los fragmentos combinados fue de 867 pb.

Tabla 2. Haplotipos y sitios en los que difieren las secuencias de los fragmentos combinados de las regiones *psbA-trnH* y *trnT-trnL* de *Cephalocereus columna-trajani*.

Haplotipo	140	205	672	740	781
A	T	G	T	G	G
B	T	A	T	G	G
C	A	G	T	G	G
D	T	G	T	A	G
E	T	G	T	G	A
F	T	G	A	G	G

La diversidad haplotípica de *C. columna-trajani* fue baja ($h = 0.188$), las poblaciones que presentaron menor diversidad incluyen Tomellín, Arrialco y Tetitlán ($h = 0$), es decir, muestran un único haplotipo, fijo en la población. Mientras que Texcala presentó la mayor diversidad haplotípica ($h = 0.556$), con una frecuencia similar de cada uno de los haplotipos (Tabla 3). La diversidad nucleotídica obtenida en la especie fue de $\pi = 0.00023$, la población con el valor mayor fue Texcala 0.00029 y el valor menor (0) se obtuvo en Tomellín, Arrialco y Tetitlán (Tabla 3).

Tabla 3. Estimadores estándar de la diversidad genética de las regiones *psbA-trnH* y *trnT-trnL* de *Cephalocereus columna-trajani* en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

Población	N	Haplotipos	h	π
Zapotitlán	10	2 (A, B)	0.200 (0.02376)	0.00023 (0.0000)
Tilapa	10	2 (A, C)	0.200 (0.02376)	0.00023 (0.0000)
Texcala	10	2 (A, D)	0.556 (0.00556)	0.00064 (0.0000)
Toxpalan	13	2 (A, D)	0.154 (0.01590)	0.00018 (0.0000)
Cuicatlán	14	2 (A, E)	0.143 (0.01412)	0.00016 (0.0000)
Tomellín	12	1 (A)	0	0
Arrialco	11	1 (A)	0	0
Tetitlán	13	1 (A)	0	0
Santa Lucía	9	2 (A, F)	0.222 (0.0276)	0.00026 (0.0000)
Acatepec	8	2 (A, E)	0.250 (0.0324)	0.00029 (0.0000)
Total	110	6	0.188 (0.0024)	0.00023 (0.0000)

h , diversidad haplotípica; π , diversidad nucleotídica. El rango de valores de h , π tienden a 1 cuando la diversidad es alta y cero cuando no se detecta variación (Awise 2000).

La figura 1 muestra la distribución y frecuencia de los seis haplotipos. El haplotipo A se distribuye en las diez poblaciones y representa el haplotipo con mayor frecuencia (90%). El haplotipo D es compartido por Texcala y Toxpalan, mientras que el haplotipo E se encuentra en Acatepec y Cuicatlán, los cuales presentaron una

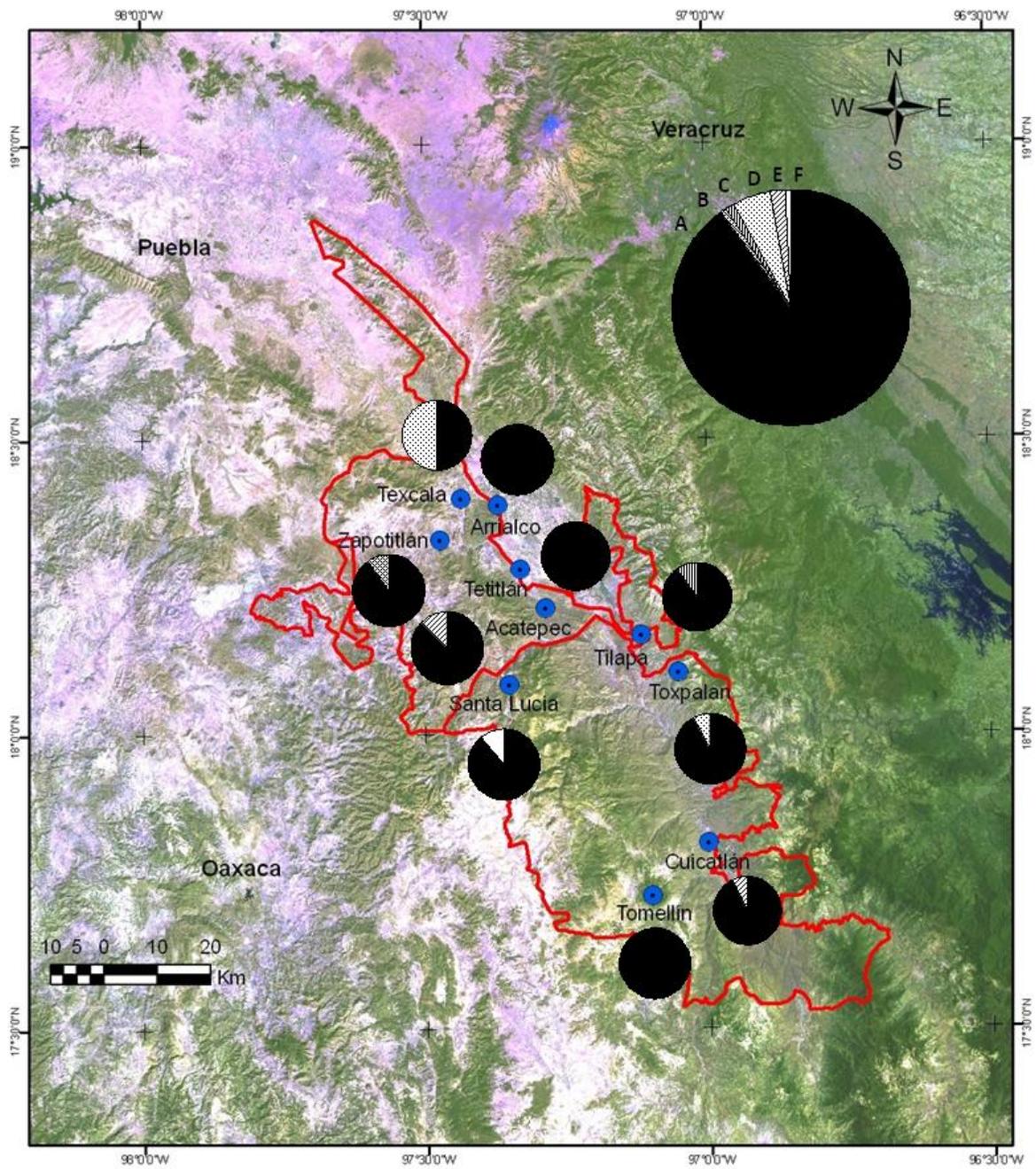


Figura 1. Distribución y frecuencias de los haplotipos de *Cephalocereus columna-trajani* en diez poblaciones del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, obtenidas mediante las regiones de ADN de cloroplasto *psbA-trnH* y *trnT-trnL*. La línea continua representa el polígono de la Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán.

frecuencia de 5 y 2%, respectivamente. Los haplotipos *B*, *C* y *F* están confinados a una sola población (Zapotitlán, Tilapa y Santa Lucía, respectivamente) y presentan una frecuencia baja (1%), es decir, son haplotipos únicos. Los resultados indican que *C. columna-trajani* está conformada por un haplotipo dominante y varios haplotipos en baja frecuencia (Figura 1)

Estructura genética

El AMOVA mostró que la mayor parte de la variación se debe a diferencias dentro de las poblaciones (87.55%) (Tabla 4) y que la diferenciación poblacional es baja ($F_{ST}=0.124$) pero significativa ($P < 0.00001$), indicando cierto grado de endogamia, posiblemente relacionada con el patrón de dispersión de semillas que llevan a cabo los murciélagos.

Tabla 4. Análisis de varianza molecular basado en secuencias de las regiones *psbA-trnH* y *trnT-trnL* de *Cephalocereus columna-trajani*. Los niveles de significancia (P) están basados en 1000 permutaciones. $P < 0.00001$

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	9	4.497	0.027	12.443
Dentro de poblaciones	100	19.53	0.195	87.556
Total	109	24.027	0.223	
Índice de fijación F_{ST}	0.124			

La gráfica de la matriz de diferencias de F_{ST} por pares de poblaciones señala que Texcala y Santa Lucía presentan los valores de diferenciación más altos cuando se compara con las demás poblaciones ($F_{ST} = 0.4-0.3$ y 0.2 respectivamente). Mientras que la mayoría de los pares de poblaciones se diferencian por valores menores a 0.1 (Figura 3).

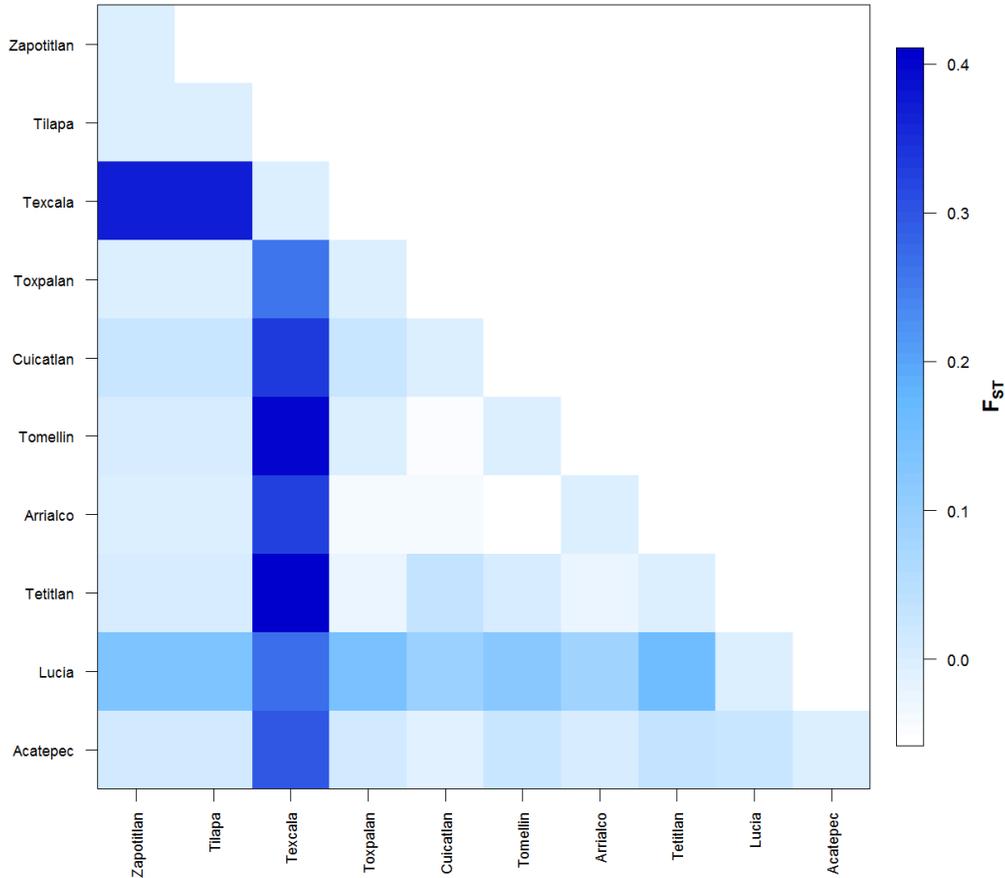


Figura 3. Diferencias de F_{ST} por pares de las poblaciones en *Cephalocereus columna-trajani* a lo largo del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

Aislamiento por distancia

Los resultados señalan que nuestra hipótesis de aislamiento por distancia no puede ser aceptada pues la diferenciación genética de *C. columna-trajani* no estuvo no estuvo significativamente relacionada con la distancia geográfica (Figura 4). Es decir, la diferenciación genética es independiente de la distancia que separa a las poblaciones. Aunque las poblaciones de distribuyan discontinuamente y la dispersión de semillas potencialmente, ocurra a una distancia menor que la de polen, la dispersión es suficiente para contrarrestar los efecto de la diferenciación poblacional.

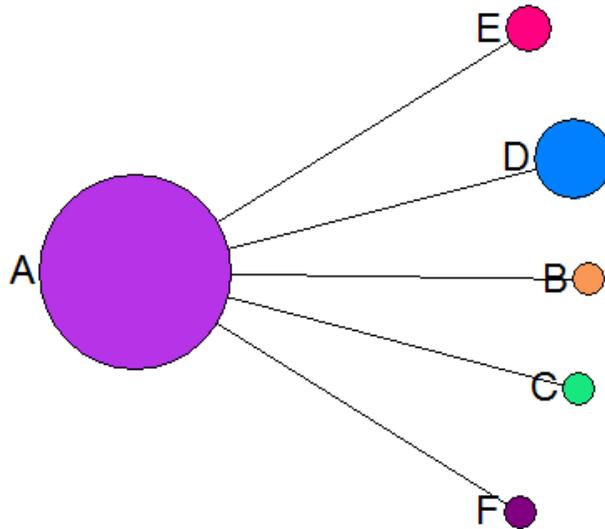


Figura 2. Red de haplotipos de *Cephalocereus columna-trajani* obtenidos mediante las regiones *psbA-trnH* y *trnT-trnL*.

Historia demográfica

El análisis de la distribución *mismatch* indica que la hipótesis de expansión demográfica no puede ser rechazada (Figura 5). Se detectó que la curva de los histogramas fue unimodal y los valores de SSD no son significativos, lo anterior indica que los datos no se desvían de lo esperado y por lo tanto el modelo de expansión demográfica es aplicable a todas las poblaciones (Figura 5). De la misma manera, los valores de *r* no-significativos señalan que *C. columna-trajani* ha experimentado una expansión demográfica. Las gráficas de expansión espacial mostraron la misma tendencia, los valores de SSD indican un buen ajuste al modelo y los valores no-significativos de *r* señalan que las poblaciones han pasado por una expansión espacial (Figura 5).

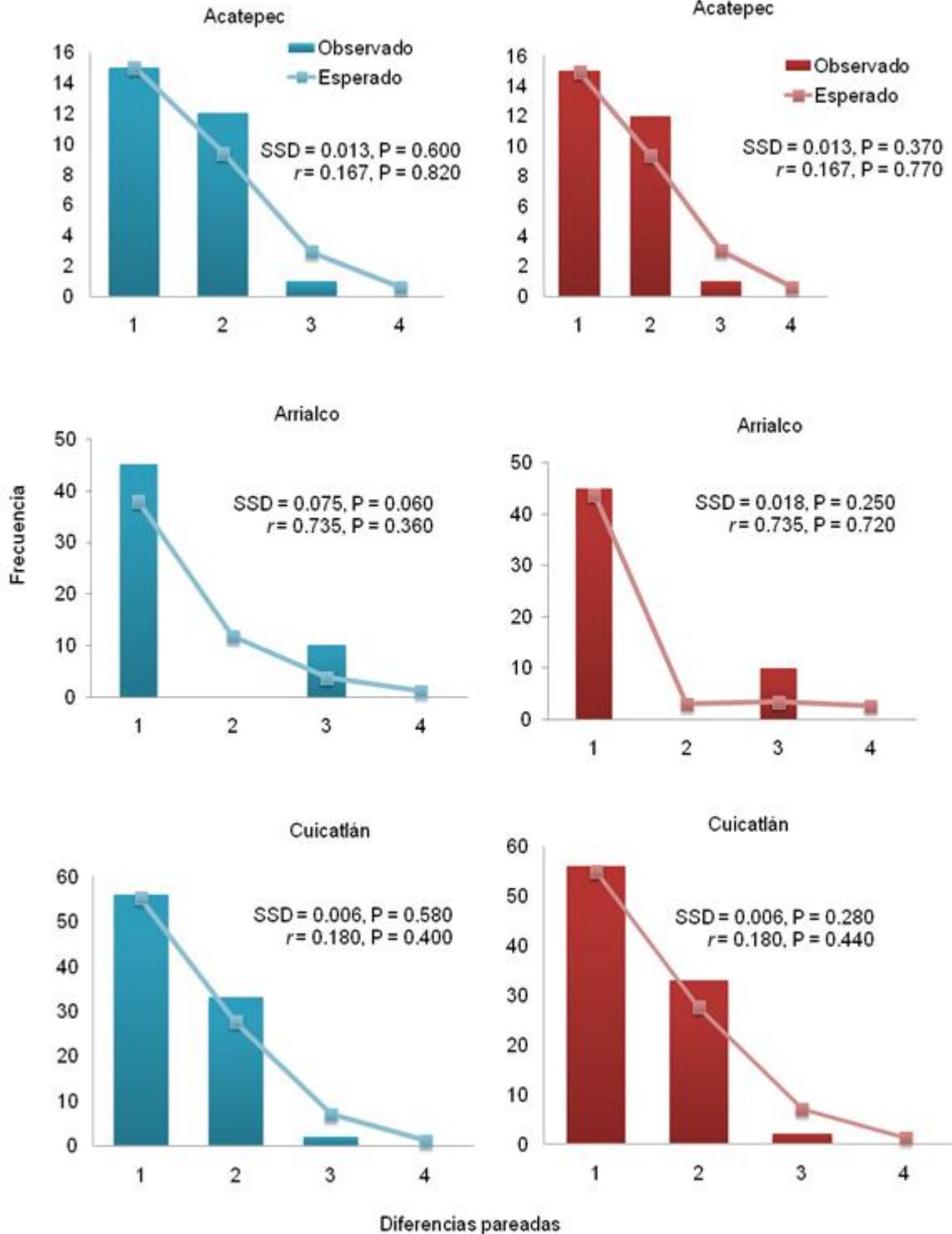


Figura 5. Distribución *mismatch* para cada una de las poblaciones de *Cephalocereus columna-trajani*. De lado izquierdo se muestra la expansión demográfica y de lado derecho la expansión espacial. SSD, suma de desviaciones al cuadrado, un valor no-significativo indica que los datos no se desvían de lo esperado bajo el modelo de expansión poblacional. *r*, índice de Ruggedness, un valor no-significativo señala expansión espacial.

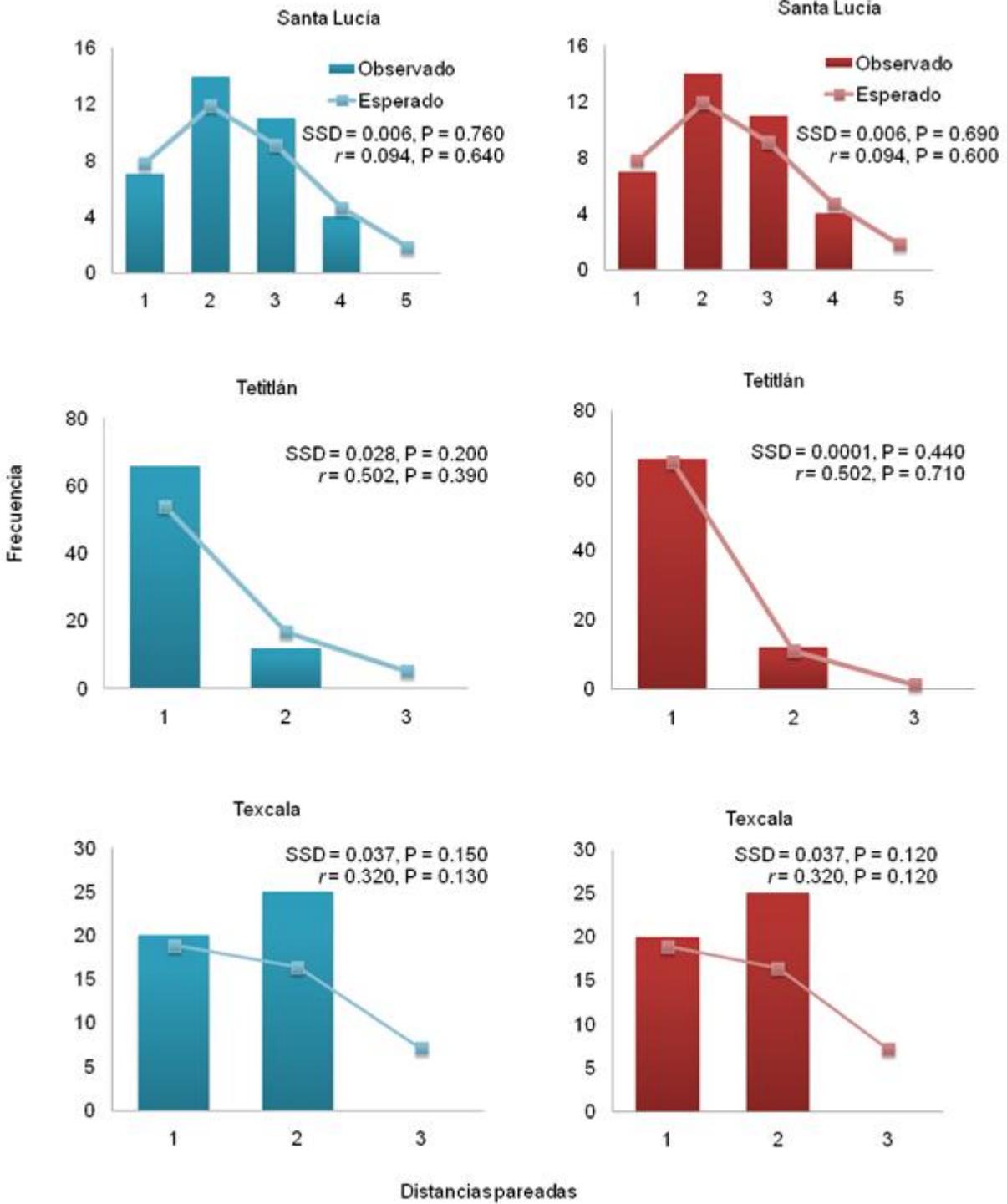


Figura 4. Continua...

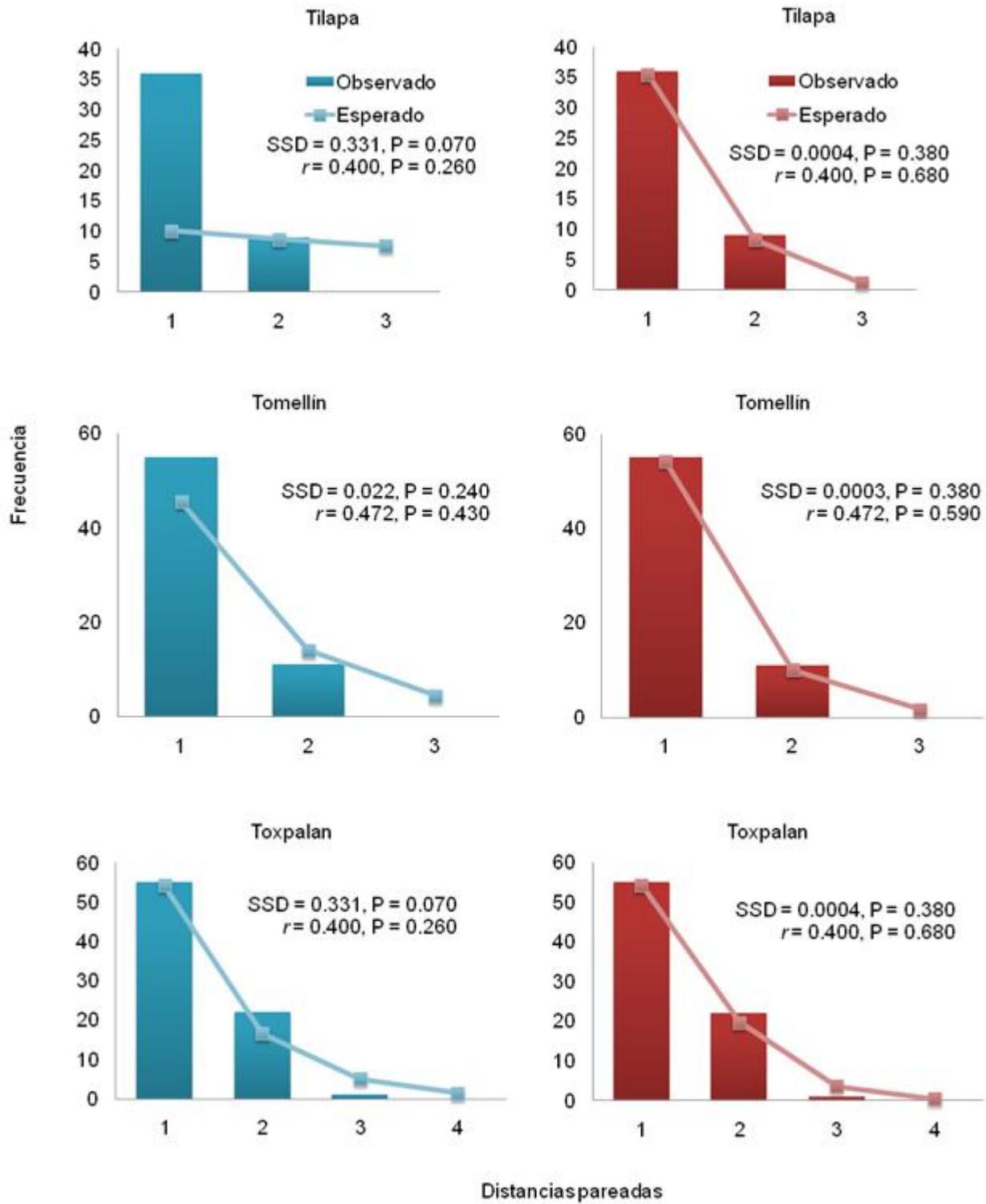


Figura 4. Continúa...

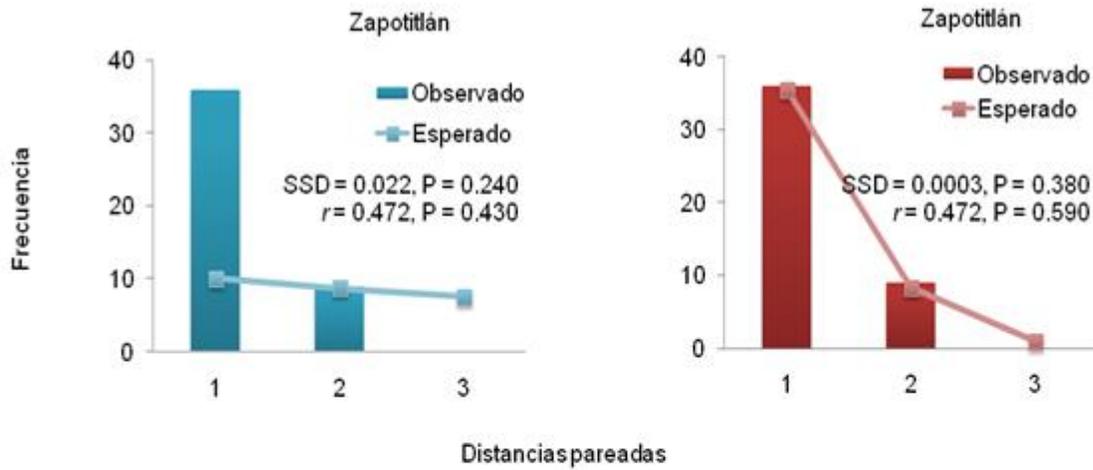


Figura 4. Continúa...

Finalmente, el análisis bayesiano de crecimiento demográfico *BSP* indica que la especie ha experimentado un incremento reciente en el N_e (Figura 6).

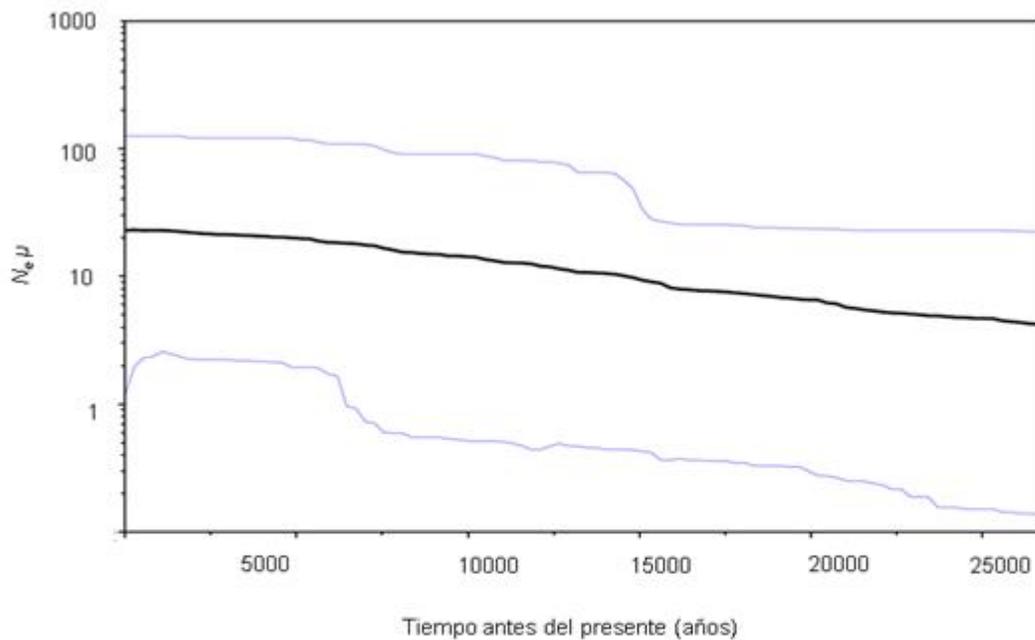


Figura 6. Cambios en el tamaño efectivo poblacional de *Cephalocereus columna-trajani* en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán. La línea negra representa la mediana y las líneas azules representan los límites al 95% de HPD.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados señalan que *Cephalocereus columna-trajani* ha experimentado una expansión reciente. La red de haplotipos en forma de estrella y la curva unimodal del análisis de *mismatch* indican que ha ocurrido una expansión demográfica y espacial. De acuerdo con el análisis *BSK*, ésta expansión ocurrió posiblemente al final del Pleistoceno (0.126-0.01 m.a.) conforme se establecían las condiciones topográficas y edáficas necesarias para el desarrollo de la especie. Durante el Plioceno/Pleistoceno la fosa de Tehuacán adquirió su actual geomorfología y clima (Dávalos-Álvarez *et al.*, 2007; Medina-Sánchez, 2010). La pérdida del lago endorreico, la actividad tectónica menor, los eventos de erosión, depositación y vulcanismo ocurridos a lo largo del Pleistoceno seguramente originaron las condiciones ambientales que favorecieron una colonización rápida por parte de *C. columna-trajani*, en los hábitats recién formados. Sin embargo, debido a la baja variación nucleotídica de los marcadores *psbA-trnH* y *trnT-trnL*, no fue posible determinar cuál es la población ancestral, ni la dirección hipotética de la expansión.

El análisis de estructura genética mostró una diferenciación poblacional baja y significativa ($F_{ST} = 0.124$, $P < 0.00001$), reflejando cierto nivel de endogamia a nivel regional, posiblemente debido a la dispersión local de semillas y entre poblaciones vecinas que promueven los murciélagos. El comportamiento de alimentación de los murciélagos observado en el VTC, particularmente en *Choeronycteris mexicana*, consiste de una serie de visitas a los frutos seguido de un período de descanso. Una vez que los murciélagos remueven una parte del fruto perchan inmediatamente sobre

los árboles y arbustos dominantes de la región (*Mimosa luisana*, *Caesalpinia melandadenia*, *Cerdium praecox*, la misma *N. tetetzo* y *Stenocereus stellatus*).

Durante el vuelo transportan y dejan caer algunas semillas antes de descansar sobre los arbustos, donde consumen la pulpa y escupen la mayoría de las semillas.

Mientras los murciélagos manipulan el fruto, dejan caer muchas semillas al suelo (Godínez-Álvarez *et al.*, 2002). De manera que este comportamiento puede limitar la extensión del vecindario y genético y con ello favorecer cierto grado de endogamia en *C. columna-trajani*.

En otros géneros de columnares, como *Pilosocereus*, *Stenocereus*, *Cereus*, *Praecereus* y *Facheiroa* se ha reportado niveles endogamia local (Figueredo *et al.*, 2010). En *Pilosocereus tillianus*, una especie polinizada y dispersada por murciélagos y aves, la endogamia local se pueden deber a que la especie es autocompatible, así como a la posibilidad de que ocurran apareamientos entre parientes debido a que los polinizadores forrajean a distancias cortas o bien a que una parte de la dispersión ocurre por gravedad (Figueredo *et al.*, 2010).

El patrón de estructura genética observado en *C. columna-trajani* también puede reflejar que el tiempo transcurrió no ha sido suficiente para que se dé la divergencia de linajes, lo cual coincide con el origen reciente de la especie [0.99 m.a. (~1.89-0.19 m.a.)] (Barba-Montoya, 2012). Por otra parte, aunque la dispersión de semillas potencialmente ocurra a una distancia menor que la de polen, nuestros resultados sugieren que los murciélagos pueden tener un papel determinante en la colonización de columnares con amplia distribución dentro del VTC.

El análisis de aislamiento por distancia no mostró una relación positiva entre la distancia genética y la distancia geográfica ($r = 0.167$, $P = 0.219$). Este resultado sugiere que aunque exista cierto grado de endogamia, la dispersión que efectúan los murciélagos contribuye a mantener a la población cohesionada. Además, apoya la hipótesis de que no ha transcurrido tiempo suficiente para que diverjan las poblaciones, debido al origen reciente de la especie (Barba-Montoya, 2012), y que el flujo génico intenso ha sido una fuerza evolutiva determinante en la estructuración genética de *C. columna-trajani*, como se ha reportado para la mayoría de las columnares.

En estudios posteriores es importante emplear regiones de cloroplasto con mayor variación nucleotídica y/o ampliar el uso de marcadores nucleares, para inferir población(es) ancestral (es), ruta hipotética de colonización, y por otra parte determinar la influencia relativa de la topografía y el tipo de suelo en la expansión de *C. columna-trajani*.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la radiación de cactáceas se intensificó con la aridificación, expansión y diversificación de los ambientes áridos e indican que la evolución geomorfológica ocurrida a lo largo del Plioceno/Pleistoceno en el VTC puede ser período determinante en el origen y evolución de algunos miembros de la familia Cactaceae. Finalmente, la evolución paralela de varias familias representativas de los ambientes áridos y semiáridos de México como Agavaceae y Burseraceae apuntan a que la combinación de los eventos geológicos e incremento en la aridez, particularmente aquellos ocurridos a partir del

Mioceno, han sido detonantes de la radiación paralela de estos linajes (Good-Ávila *et al.*, 2006; De Nova *et al.*, 2011).

DISCUSIÓN GENERAL

La estructura filogeográfica de *Mammillaria pectinifera* y *Cephalocereus columna-trajani* sugiere que el origen, distribución espacial y divergencia genética han sido moldeados por la evolución del paisaje, la disponibilidad del hábitat y la capacidad de dispersión de las especies. Es muy probable que la evolución geológica del VTC particularmente aquella ocurrida durante la transición Plioceno/Pleistoceno (2.58 m.a.) haya originado una amplia variedad de microambientes, dando paso al surgimiento de nuevas especies de cactáceas. Por otra parte, los cambios en las geoformas y propiedades edáficas, resultado de la actividad geomorfológica a lo largo del Pleistoceno, parecen haber promovido la divergencia genética de las poblaciones.

Este patrón es más marcado en *M. pectinifera*, en la que el aislamiento espacial, la especificidad del hábitat y la baja capacidad de dispersión han restringido severamente el flujo génico y han promovido la divergencia haplotípica. Bajo estas condiciones de aislamiento reproductivo, la deriva génica y selección natural pueden cobrar fuerza en el proceso de divergencia poblacional (Fox *et al.*, 2001). Nuestros resultados muestran evidencia de que en cactáceas con distribución restringida y tamaños poblacionales pequeños, como las mammillarias la deriva génica tiene un importante en su evolución (Gorelick, 2009). *Mammillaria pectinifera* muestra distribución restringida, una tasa de crecimiento poblacional negativa, tamaño poblacional efectivo pequeño y estable en los últimos miles de años (Valverde y Zavala, 2006; Capítulo II), las cuales favorecen la acción de la deriva e impactan

fuertemente la divergencia, a largo plazo, esta fuerza evolutiva puede tener un papel importante en la especiación (Gorelick, 2009). Asimismo, la endogamia local asociada al tamaño poblacional pequeño, polinización y dispersión de semillas locales refuerzan los efectos de la deriva (Gorelick, 2009).

Aunque desconocemos en qué grado la selección natural ha moldeado la estructura genética de *M. pectinifera*, la selección puede estar dirigida por la evolución geomorfológica y edáfica. La especie se desarrolla exclusivamente en montañas planas con suelos tipo migajón-arenoso, no se encuentra en los valles cuyos suelos están formados por material de origen volcánico (Medina, 2010). En el Desierto de Chihuahua también se ha propuesto que los factores edáficos junto con los cambios climáticos del Pleistoceno hayan estimulado enormemente la especiación y expliquen la existencia de numerosas mammillarias endémicas con distribución restringida (Hernández y Bárcenas, 1995). Es fundamental determinar cuáles han sido los principales factores ambientales que han dirigido la selección de cactáceas en el VTC, mediante el análisis de la estructura filogeográfica y la genética del paisaje.

Aunque las relaciones filogenéticas entre poblaciones de *Cephalocereus columna-trajani* no muestren un patrón claramente definido, en el sentido de que no fue posible revelar cuál(es) población(es) es la ancestral, ni determinar una ruta potencial de colonización, los resultados apoyan la hipótesis de expansión demográfica y espacial reciente. En el futuro sería importante inferir analizar la dirección de alguna ruta de expansión, determinar si ésta ocurrió hacia norte o el sur

en función de la configuración del valle, emplear la reconstrucción filogeográfica para inferir la secuencia de eventos geomorfológicos dentro del valle.

Nuestros resultados señalan que los murciélagos pueden tener un papel determinante en la dispersión, y en los eventos de colonización y expansión regional de *C. columna-trajani*. Estos resultados muestran también que aunque puede darse cierto grado de endogamia, el flujo génico vía polen y semilla evitan la divergencia poblacional. En este caso, también es necesario evaluar el papel de la selección natural y los mecanismos ambientales que la dirigen.

El hecho de que *M. pectinifera* y *C. columna-trajani*, así como otras especies del género *Mammillaria* y gran parte de las cactáceas columnares, se establezcan en planicies o laderas de montañas con características edáficas y altitudes específicas (Bravo-Hollis, 1978; Peters, 2000; Valiente-Banuet, 2001; Serrano-Estrada, 2010), sugiere que la evolución del paisaje, particularmente aquella ocurrida entre la transición del Plioceno/Pleistoceno, puede tener un papel determinante en el establecimiento de linajes evolutivamente independientes y especiación dentro del VTC, particularmente de aquellos linajes con baja capacidad de dispersión o barreras al flujo génico. En este sentido, nuestros resultados apoyan la hipótesis propuesta por Hernández y Gómez-Hinostrosa (2011) sobre especiación alopátrica como principal forma de especiación en cactáceas del Norte América, aunque es necesario poner a prueba esta hipótesis utilizando especies del VTC.

Otro aspecto que está pendiente y es importante determinar se refiere a la influencia del incremento global en aridez a partir del Mioceno, así como de las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno. Posiblemente la reducción global en la

precipitación; un incremento persistente en la aridez regional como resultado de la sombra orográfica y pérdida del paleolago del VTC pueden ser eventos que combinados, intensificaron el de por sí árido valle y fomentaron el surgimiento de nuevas especies.

De acuerdo con los escasos estudios palinológicos (Beraldi-Campesi *et al.*, 2004 y Ramírez-Arriaga *et al.*, 2006), el centro de México ha experimentado un incremento gradual en la aridez desde el Oligoceno, como lo indican la presencia elementos xerofíticos y posibles cambios en la distribución de los paleoambientes. Aunque no se han reportado estudios que incluyan estratos de edad más reciente como el Mioceno, Plioceno y Pleistoceno, el hecho de que varios de estos elementos actualmente sean dominantes de los diferentes tipos de vegetación xerófila de la región, sugiere que se acentuaron las condiciones de aridez y posiblemente se expandieran los ambientes semi-áridos (Ramírez-Arriaga *et al.*, 2006). Por lo que es necesario contar con más datos de la reconstrucción paleoambiental para determinar el impacto del incremento en la aridez debido factores regionales y globales en la divergencia de linajes y estructura filogeográfica, particularmente de cactáceas. La evidencia paleoambiental, filogenética y filogeográfica señalan que las oscilaciones climáticas del Pleistoceno han tenido un fuerte impacto en la distribución, divergencia de linajes y especiación de los biomas áridos del norte de México y suroeste de Estados Unidos (Riddle *et al.*, 2000, Nason *et al.*, 2002; Rebernick *et al.*, 2010). Es importante determinar cuál fue su efecto y magnitud en los ambientes biomas áridos del centro de México.

Recientemente, se ha utilizado la inferencia filogeográfica y filogenética para inferir la importancia relativa de los eventos geomórficos y el incremento en la aridez de las cuencas de los desiertos del norte de (Schönhunth *et al.*, 2011). Dado que el conocimiento detallado de la evolución geomórfica del VTC a partir del Plioceno es escaso, el análisis de la estructura filogeográfica podría servir como registro biológico de dicha evolución, comprender la respuesta de las especies a estos cambios y conocer las condiciones que han contribuido a la diversidad de especies en estas regiones.

Las regiones de ADNcp *psbA-trnH* y *trnT-trnL* mostraron poca variación nucleotídica, lo cual dificultó la determinación de poblaciones ancestrales, rutas de colonización y de la asociación entre distribución espacial y relaciones de parentesco interpoblacional de cada especie. Sería conveniente ampliar la búsqueda de polimorfismos evaluando otras regiones de cloroplasto o bien con otros marcadores moleculares. Los estudios filogeográficos de plantas de biomas áridos de Australia (Byrne 2008;), así como los filogenéticos de los géneros *Lithops* y *Argyrodema* de las regiones áridas del sur de África han empleado *RFLP* de cloroplasto y *AFLP*'s de ADN nuclear, respectivamente, para determinar tanto la estructura como las relaciones filogenéticas de poblaciones, complejos de especies y especies dentro del mismo género (Ellis *et al.*, 2006; Keller *et al.*, 2011). Sería conveniente en el futuro utilizar este tipo de marcadores para ampliar y/o complementar la información obtenida mediante marcadores de herencia uniparental.

Las filogenias moleculares de familias características de las comunidades áridas mexicanas, como agaváceas y burseras; así como de la familia Aizoaceae del

Karoo suculento de Sudáfrica señalan que la rápida diversificación de estas familias coincide con la expansión de los ambientes áridos modernos del mundo, a lo largo del Neogeno (Klak *et al.*, 2004; Good-Ávila *et al.*, 2006; Hernández-Hernández 2010; Arakaki *et al.*, 2011; De Nova *et al.*, 2011). Corresponde ahora llevar a cabo estudios a nivel de especies que permitan comprender los procesos microevolutivos relacionados con el origen y mantenimiento de la diversidad mediante el enfoque filogeográfico.

CONCLUSIONES GENERALES

La divergencia genética y la especiación de cactáceas puede estar fuertemente influenciada por la configuración del paisaje e incremento regional de la aridez del Valle de Tehuacán-Cuicatlán a lo largo del Neogeno.

El aislamiento geográfico de *Mammillaria pectinifera*, resultado de la evolución de las geoformas y suelos, así como su baja capacidad de dispersión han restringido fuertemente el flujo génico. Éste en combinación con la deriva génica, se pueden considerar las principales fuerzas evolutivas que han propiciado la divergencia poblacional. Estos procesos, pueden ser responsables de la especiación en las especies género *Mammillaria* del VTC, en especies con patrón de distribución y capacidad de dispersión similares a *M. pectinifera*.

La expansión poblacional reciente de *Cephalocereus columna-trajani*, puede estar relacionada con una rápida colonización del hábitat, mediada por murciélagos, y apoya la hipótesis que sostiene que la expansión y disponibilidad de nuevos hábitats áridos fue el principal factor de la diversificación de cactáceas.

Es necesario ampliar los estudios filogeográficos para determinar si la alopatría ha sido el modo predominante de especiación en la mayoría de las especies de Norte América y ponderar el impacto de las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno a lo largo del país sobre dicha especiación.

SUGERENCIAS PARA CONTINUAR CON ESTE TEMA DE INVESTIGACIÓN

Se sugiere ampliar los estudios filogeográficos en cactáceas de las diferentes regiones áridas de México para comprender la relación entre estructura genética y la evolución del paisaje en cada región.

Dentro del VTC, se debe seguir estudiando a las especies del género *Mammillaria*, incluyendo análisis de demografía histórica para determinar la importancia de la deriva génica en la estructura genética y especiación del grupo.

Con respecto a las cactáceas columnares se deben incluir especies dominantes del VTC para inferir posibles eventos de expansión, rutas hipótéticas de colonización; así como eventos de fragmentación poblacional y comprender la respuesta de estas especies a la evolución geomorfológica. En ambos casos se sugiere emplear un mayor número de regiones de ADN de cloroplasto o bien un marcador molecular que ofrezca una cobertura mayor como los *AFLP*'s.

LITERATURA CITADA

- Arakaki, M., Christin, P.A., Nyffeler, R., Lendel, A., Eggli, U., Ogburn, R. M., Spriggs, E., Moored, M.J. y Edwards, E.J. 2011. Contemporaneous and recent radiations of the world's major succulent plant lineages. *Proceedings of National Academy of Science USA*, 108:8379-8384.
- Arias, S., Gama-López, S., Guzmán-Cruz, L.U. y Vázquez-Benítez, B. 2012. *Flora del Valle de Tehuacan-Cuicatlán*. 95: Cactaceae. Instituto de Biología, UNAM. México.
- Avisé, J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge, Ma. Harvard University Press.
- Avisé, J.C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36:3-15.
- Barba Montoya J.A. 2009. Origen y diversificación de la tribu Pachycereeae (Cactaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.
- Barba Montoya, J.A. 2012. Diversificación de Pachycereeae (Cactaceae, Caryophyllales, Eudicotylodoneae) en relación al síndrome de polinización. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Beheregaray, L.B. 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology* 17:3754–3774.
- Beraldi-Campesi H., Cevallos-Ferriz, S.R.S., Centeno-García, E., Arenas-Abad, C. y Fernández, L.P. 2006. Sedimentology and paleoecology of an Eocene–Oligocene alluvial–lacustrine arid system, Southern Mexico. *Sedimentary geology*, 191:227–254.
- Bravo-Hollis, H. 1978. *Las Cactáceas de México*. Tomo I. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Byrne, M. 2008. Evidence for multiple refugia at different time scales during Pleistocene climatic oscillations in southern Australia inferred from phylogeography. *Quaternary Science Reviews*, 27:2576–2585.
- Carranza, C. 2001 Palinoestratigrafía del Grupo Balsas. Implicaciones paleoambientales, climáticas y cronoestratigráficas (Municipios de Zacapala y Coatzingo, Estado de Puebla). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Cerca, M., Ferrari, L., López-Martínez, M., Martiny, B., y Iriondo, A. 2007. Late Cretaceous shortening and early Tertiary shearing in the central Sierra Madre del Sur, southern Mexico: Insights into the evolution of the Caribbean–North American plate interaction. *Tectonics*, 26: TC3007.
- Cevallos-Ferriz, S.R.S. y Ramírez, J.L. 2004. Bosquejo de la evolución florística. En: A.J. García, M.J. Ordóñez y M. Briones-Salas (eds.), *Biodiversidad de Oaxaca*. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wide Fund, México, pp. 87-104.

- Clark-Tapia, R. y Molina-Freaner, F. 2003. The genetic structure of a columnar cactus with a disjunct distribution: *Stenocereus gummosus* in the Sonoran desert. *Heredity*, 90:443-450
- Dávalos-Álvarez, O. G., Nieto-Samaniego, A.J., Alaniz-Álvarez, S. A., Martínez-Hernández, E. y Ramírez-Arriaga, E. 2007. Estratigrafía cenozoica de la región de Tehuacán y su relación con el sector norte de la falla de Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 24:197-215.
- Dávila, P., Arizmendi, M.C., Valiente-Banuet, A., Viseñor, J.L., Casas, A. y Lira, R. 2002. Biological diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico *Biodiversity and Conservation*, 11:421–442.
- De Nova, J.A., Medina, R., Montero, J.C., Weeks, A., Rosell, J. A., Olson, M.E., Eguiarte, L. y Magallón, S. 2012. Insights into the historical construction of species-rich Mesoamerican seasonally dry tropical forests: the diversification of *Bursera* (Burseraceae, Sapindales) *New Phytologist*, 193:276–287.
- Ellis, A.G., Weis, A.E. y Gaut, B.S. 2006. Evolutionary radiation of “stone plants” in the genus *Argyroderma* (Aizoaceae): unraveling the effects of landscape, habitat, and flowering time. *Evolution*, 6:39-55.
- Excoffier L. 2004. Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology* 13:853-864.
- Fehlberg, S.D. y Ranker, T.A. 2009. Evolutionary history and phylogeography of *Encelia farinosa* (Asteraceae) from the Sonoran, Mojave, and Peninsular Deserts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50:326–335.
- Figueredo CJ, Nassar JM, García-Rivas AE y González-Carcacia JA. 2010. Population genetic diversity and structure of *Pilosocereus tillianus* (Cactaceae, Cereae), a columnar cactus endemic to the Venezuelan Andes. *Journal of Arid Environments*, 74:1392-398.
- Fox, C.W., Roff, D.A. y Fairbairn, D.J. 2001. Evolutionary ecology. Oxford University Press, New York, USA.
- Garrick, R.C., Nason, J.D., Meadows, C.A., Dyer, R.J. 2009. Not just vicariance: phylogeography of a Sonoran Desert euphorb indicates a major role of range expansion along the Baja peninsula. *Molecular Ecology*, 18:1916–1931
- Good-Avila, S.V., Souza, V., Gaut, B.S. y Eguiarte, L.E. 2006. Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *Proceedings of Natural Academy of Science U.S.A.*, 103:9124–9129.
- Gregory-Wodzicki K. M. 2010. Uplift history of the Central and Northern Andes: A review. *Geology Society of America Bulletin*, 112:1091–1105
- Hernández H.M. y Godínez H. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botanica Mexica* 26:33–52.
- Hernández, H.M. y Bárcenas, R.T. 1995. Endangered cacti in the Chihuahuan Desert: I. Distribution patterns. *Conservation Biology*, 9:1176-1188.
- Hernández, H.M. y Gómez-Hinostrosa, C. 2011. Mapping the cacti of Mexico. *Succulent Plant Research* Vol. 7 DH Books. Inglaterra
- Hernández-Hernández, T. 2010. Radiaciones evolutivas de linajes de plantas suculentas en el orden Caryophyllales con énfasis en la Familia Cactaceae.

- Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México. Mexico, D.F.
- Hewitt, G.M., 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58:247–276.
- Hewitt, G.M. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405:907-913.
- Hewitt, G.M. 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography -or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, 10:537–549.
- Jensen, J.L., Bohonak, A.J., and Kelley, S.T. 2005. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics*, 6:13. v.3.23 <http://ibdws.sdsu.edu/>
- Kellner, A., Ritz, C.M., Schlittenhardt, P. y Hellwig, F.H. 2011. Genetic differentiation in the genus *Lithops* L. (Ruschioideae, Aizoaceae) reveals a high level of convergent evolution and reflects geographic distribution. *Plant Biology*, 13:368–380.
- Klak C., Reeves, G. y Hedderson, T. 2004. Unmatched tempo of evolution in Southern African semi-desert ice plants. *Nature*, 427:63–65.
- Medina-Sánchez, J. 2010. Cenozoic environmental evolution of the San Juan Raya Basin, south-central Mexico. PhD thesis, University of Leicester, UK.
- Moran-Zenteno, D.J., Caballero-Miranda, C.I., Silva-Romo, G., Ortega-Guerrero, B. y Gonzalez-Torres, E. 1993. Jurassic-Cretaceous paleogeographic evolution of the Northern Mixteca terrane, Southern Mexico. *Geofísica Internacional*, 32:453-473.
- Nason, J.D., Hamrick, J.L., Fleming, T.H., 2002. Historical vicariance and postglacial colonization effects on the evolution of genetic structure in *Lophocereus*, a Sonoran desert columnar cactus. *Evolution*, 56:2214–2226.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nieto-Samaniego, A.F., Alaniz-Álvarez, S.A., Silva-Romo, G., Eguiza-Castro, M.H. y Mendoza-Rosales, C.C. 2006. Latest Cretaceous to Miocene deformation events in the eastern Sierra Madre del Sur, Mexico, inferred from the geometry and age of major structure. *Geology Society of America Bulletin*, 118:238-252.
- Peters, E.M. 2000. Conocimiento y conservación de las mamilarias endémicas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Consejo Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, CONABIO. México, D.F.
- Petit, R.J., Brewer, S., Bordács, S., Burge, K., Cheddadi, R., Coart, E., Cottrell, J., Csaikle, U.M., van Dam, B., Deans, J.D., Espinel, S., Fineschi, S., Finkeldey, R., Glaz, I., Goicoechea, P.J., Jensen, J.S., König, A.O., Lowe, A.J., Flemming-Madsen, S., Mátyás, G., Munro, R.C., Popescu, D., Slade, D., Tabbener, H., de Vries, S.G.M., Ziegenhagen, B., de Beaulieu, J.L., y Kremer, A. 2002. Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management*, 156:49–74.
- Ramírez-Arriaga, E., Prámparo, M.B., Martínez-Hernández, E., y Valiente-Baunet, A. 2006. Palynology of the Paleogene Cuayuca Formation (stratotype sections), southern Mexico: Chronostratigraphical and palaeoecological implications. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 141:259–275.

- Rebernic C.A., Weiss-Schneeweiss H., Schneeweiss G.M., Schönswetter P., Obermayer R., Villaseñor J.L. y Stuessy, T.F. 2010. Quaternary range dynamics and polyploid evolution in an arid brushland plant species (*Melampodium cinereum*, Asteraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54:594–606.
- Riddle, B.R. , Hafner D.J., Alexander L.F., y Jaeger, J.R. 2000. Cryptic vicariance in the historical assembly of a Baja California Peninsular Desert biota. *Proceedings of Natural Academy of Science U.S.A.*, 97:14438–14443.
- Rogers, A.R. y Harpending, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552-569.
- Rojas-Martínez, A. y Valiente-Banuet, A. 1996. Análisis comparativo de la quireptofauna del Valle de Tehuacán, Puebla, Oaxaca. *Acta Zoológica Mexicana*, 67:1-23.
- Rzedowski, J. 1962. Contribuciones a la fitogeografía florística e histórica de México I. Algunas consideraciones acerca del elemento endémico en la flora mexicana. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 27:52-65.
- Schönhuth, S., Blum M. J., Lozano-Vilano L., Neely D. A., Varela-Romero A., Espinosa H., Perdices A. y Mayden, R. L. 2011. Inter-basin exchange and repeated headwater capture across the Sierra Madre Occidental inferred from the phylogeography of Mexican stonerollers. *Journal of Biogeography*, 38:1406–1421.
- Serrano-Estrada B. 2010. Regionalización biogeográfica del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla con base en especies de cactáceas columnares. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Soltis, D.E., Morris, A.B., McLachlan, J.S., Manos, P.S. y Soltis, P.S. 2006. Comparative phylogeography of unglaciated eastern North America. *Molecular Ecology* , 15:4261-4293.
- Sosa, V., Ruiz-Sánchez, E., y Rodríguez-Gómez, F.C. 2009. Hidden phylogeographic complexity in the Sierra Madre Oriental: the case of the Mexican tulip poppy *Hunnemannia fumariifolia* (Papaveraceae). *Journal of Biogeography*, 36:18–27.
- Valiente-Banuet, A. 2001. Los bosques de catáceas columnares. En: *El Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Patrimonio natural y cultural*. Fundación ICA A.C., Fomento Cultural Banamex A.C., Fundación para la Reserva de la Biósfera Cuicatlán. pp 93-113
- Valiente-Banuet, A., Casas, A., Alcántara-Eguren, A., Dávila, P., Flores-Hernández, N., Arizmendi, M.C, Villaseñor, J.L. y Ortega Ramírez, J. 2000. La vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 67:17-74.
- Valiente-Banuet, A., Vital-Rumebe, A., Verdú, M. y Callaway, R.M. 2006. Modern Quaternary plant lineages promote diversity through facilitation of ancient Tertiary lineages. *Proceedings of Natural Academy of Science U.S.A.*, 103:16812-16817.
- Valverde, P.L. y Zavala-Hurtado, J.A. 2006. Assessing the ecological status of *Mammillaria pectinifera* Weber (Cactaceae), a rare and threatened species

- endemic of the Tehuacán-Cuicatlán Region in Central Mexico. *Journal of Arid Environments*, 64:193–208.
- Valverde, P.L. 2008. Valverde PL. 2008. Efecto de los patrones de distribución y la biología reproductiva en los niveles de variación genética y estructura de dos especies de cactus endémicos de la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán. Resultados técnicos de investigación del convenio FOSEMARNAT-2004-01-26
- Wright, S.1943. Isolation by distance. *Genetics*, 28:114–138.
- Zavala-Hurtado, J. A. 1982. Estudios ecológicos en el valle de Zapotitlán, Puebla. I. Clasificación numérica de la vegetación basada en atributos binarios de presencia de especies. *Biotica*, 7:99-120.
- Zavala-Hurtado, J. A. y Valverde, P.L. 2003. Habitat restriction in *Mammillaria pectinifera*, a threatened endemic Mexican cactus. *Journal of Vegetation Science*, 14:891-898.