



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00152

Matrícula: 2143800633

GENÉTICA POBLACIONAL DE  
TURBINICARPUS HORRIPILUS  
(CACTACEAE); UNA CACTÁCEA  
MICROENDÉMICA DE LA BARRANCA  
DE METZITLÁN, HGO.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 10 del mes de abril del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. JHOANA DIAZ LARREA  
MTRA. MARIA LORAIN MATIAS PALAFOX  
M. EN C. LAURA MARGARITA MARQUEZ VALDELAMAR  
DR. LUIS MANUEL GUEVARA CHUMACERO

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA

DE: MARIA DE LOS ANGELES GONZALEZ ADAN

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



MARIA DE LOS ANGELES GONZALEZ ADAN

ALUMNA

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

DRA. JHOANA DIAZ LARREA

VOCAL

MTRA. MARIA LORAIN MATIAS PALAFOX

VOCAL

M. EN C. LAURA MARGARITA MARQUEZ  
VALDELAMAR

SECRETARIO

DR. LUIS MANUEL GUEVARA CHUMACERO



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA

---

---

UNIDAD IZTAPALA  
CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“Genética poblacional de *Turbincarpus horripilus*  
(Cactaceae); una cactácea microendémica de la  
Barranca de Metztitlán, Hgo.”

T E S I S

Que para obtener el grado de  
Maestra en Biología

PRESENTA:

**Biól. González Adán María de los Ángeles**

Directora: Dra. Cecilia Leonor Jiménez Sierra

Asesoras: Dra Alejandra Serrato Díaz

Dra. Jhoana Díaz Larrea

Ciudad de México, abril del 2017



La Maestría en Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al  
Padrón del  
Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACyT

El presente trabajo se realizó gracias a la beca No. 2865556198 otorgada por el  
CONACyT durante el periodo 2014-2016 y al proyecto Ecología y aprovechamiento  
de los recursos vegetales en las zonas semiáridas de México (UAM-I), Red de  
investigación temática CONACyT Áreas Naturales protegidas (RENANP) and Red  
Socioecos-CONACyT to CLJS,

La presente investigación se realizó en:  
El Laboratorio Divisional de Biología Molecular  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud Universidad Autónoma Metropolitana  
Iztapalapa

Responsable: Dra. Alejandra Serrato Díaz

El jurado designado por la  
**División de Ciencias Biológicas y de la Salud**  
de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis que presentó

**MARÍA DE LOS ANGELES GONZÁLEZ ÁDAN**

El día 10 de abril del año 2017.

Comité Tutorial y Jurado

Directora: Dra. Cecilia Leonor Jiménez Sierra \_\_\_\_\_

Asesora: Dra. Alejandra Serrato Díaz \_\_\_\_\_

Asesora: Dra. Jhoana Díaz Larrea \_\_\_\_\_

Sinodal: Dr. Luis M. Guevara Chumacero \_\_\_\_\_

Sinodal: M. en C. Laura M. Márquez Valdelamar \_\_\_\_\_

Sinodal: M. en B. Ma. Lorraine Matías Palafox \_\_\_\_\_

*A mamá y a papá por amarnos tanto.*

*A mis hermanos Minerva, José y Carolina por todo su apoyo.*

*A mi niña Ámbar, por enseñarme las maravillas de la vida  
y a Rubén por tantos sueños*

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Cecilia Jiménez Sierra por creer en mí, por todo su apoyo, confianza y por siempre tener esa chispa de curiosidad, que hace que nos sorprendamos del mundo que nos rodea.

A la Dra. Alejandra Serrato Díaz por todo su cariño, paciencia y amistad, por ser una persona siempre dispuesta a dar amor.

A la Dra. Jhoana Díaz Larrea por ser una gran guía, por todo su apoyo incondicional, y por impulsarme hasta el final del trabajo.

A la M. en B. Loraine Matias Palafox por dejarme ser parte de este sueño que se llama *Turbinicarpus horripilus*, por su apoyo durante la colecta de campo y en las revisiones del escrito.

A la M. en C. Laura M. Márquez Valdelamar por su apoyo y sus valiosas observaciones para esta tesis.

Al Dr. Luis M. Guevara Chumacero por su disponibilidad de ser participe en las correcciones hechas a esta tesis.

A Karen Brito por ser mi amiga, eres parte de esta tesis sin ti no lo hubiera logrado, en verdad gracias.

A Yanin por descifrarme los secretos de las técnicas moleculares, por ser una excelente compañera. Pero sobre todo por esa felicidad que inyectas al mundo.

A Loraine, Karen, Alexandra, Memo, Memito y Sonia, por su apoyo en las colectas de campo.

A Aline por compartir conmigo tus grandes conocimientos.

A Victor por todo tu apoyo, consejos y dramas que te hacen unico.

A Santiago por estar siempre dispuesto a ayudarme. Gracias me encantaron los mapas.

A Rodrigo por todos esos cafés que hicieron más ameno el trabajo por las mañanas.

A mis compañeros del Laboratorio Divisional de Biología Molecular y del laboratorio Ecología y aprovechamiento de los recursos vegetales en las zonas semiáridas de México por sus consejos apoyo y buenas vibras. Gracias Ericka, Yazmín, Brayan, Elo, Manuel, Zanni, Amayalli, Laura, Memo, Aurea, Angie, Liz y Daf por compartir conmigo esta experiencia maravillosa.

A mis amigas de la licenciatura que me apoyaron infinitamente Mireya, Diana, Gaby Karla, Moni, Nan, Gis y Yes por todos los momentos compartidos. Las extraño.

A mis compañero de comida Ivonne, Everardo, Felipe y Rodrigo por todas esas epifanías que encontramos entre charlas, aventuras y risas.

A toda mi familia materna y paterna porque cada uno de ustedes ha dejado algo muy especial en mí.

A el Jardín Botánico de la UNAM por el prestamos de ejemplares en especial al. Biólogo Jerónimo Reyes Santiago por las facilidades otorgadas.

Al Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud del Instituto de Biología, UNAM. Responsable M. en C. Laura M. Márquez Valdelamar por su apoyo para poder terminar el trabajo técnico.

## RESUMEN

*Turbinicarpus horripilus* (Lem) V. John y Riha es una cactácea globosa microendémica de la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán (Hidalgo). La especie se encuentra en el Apéndice I de CITES y está señalada como especie vulnerable (VU) en la Lista Roja de la UICN. Hasta la fecha sólo se conocen ocho poblaciones. El objetivo del presente trabajo fue evaluar su diversidad y estructura genética, a través del análisis de la secuenciación de tres regiones del cloroplasto (*petB* intrón D4; *trnL-rp32* y *trnL-trnF*), para inferir los procesos demográficos y evolutivos a los que la especie ha estado sujeta. Se colectaron muestras de tejido de 120 individuos de cuatro poblaciones: Cerro, Jilotla, Santuario y Almolón, cubriendo el área de distribución de la especie. Se obtuvieron las secuencias de 773 pb del gen *petB* intrón D4; 1385 pb del gen *trnL-rp32* y 1190 del gen *trnL-trnF*. La diversidad haplotípica de la especie es  $Hd = 0.693$  y la diversidad nucleotídica ( $\pi = 0.004$ ). Encontramos altos niveles de diferenciación poblacional ( $F_{ST} = 1$ ) y una correlación positiva entre la distancia genética y geográfica de las poblaciones. Esto fue respaldado por la red de haplotipos y el análisis filogeográfico que muestra evidencias de flujo genético restringido o nulo. Sin embargo, a nivel intrapoblacional no se detectaron diferencias entre los individuos ( $Hd = 0.0$ ). Estos resultados pueden estar relacionados con una dispersión limitada de las semillas debido a los potenciales dispersores que son hormigas que visitan los frutos.

Los patrones de diversidad genética encontrados se pueden explicar por el pequeño tamaño de las poblaciones aunado a su aparente aislamiento, lo que nos hace

pensar que la deriva génica y la endogamia son factores importantes en la conformación de la estructura genética observada en estas poblaciones.

Las poblaciones de *Turbinicarpus horripilus* están altamente amenazadas, por lo que proponemos la protección de la especie por la NOM-059-SEMARNAT-2010.

## ABSTRACT

*Turbinicarpus horripilus* (Lem) V. John and Riha is a globose cactus and is microendemic from Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán (Hidalgo). This species is found in Appendix I of CITES and is designated as a Vulnerable Species (VU) on the IUCN Red List. To date only eight populations are known. The aim of the present work was to evaluate the genetic diversity and genetic structure, through the analysis of sequencing three chloroplast regions (*petB* intron D4, *trnL-rp132* and *trnL-trnF*), to infer the demographic and evolutionary processes to which this species has been subject. Tissue samples were collected from 120 individuals from four populations: Cerro, Jilotla, Santuario and Almolón, covering the range of the species. The sequences were obtained, 773 bp from *petB* intron D4 gene; 1385 bp from *trnL-rp132* gene and 1190 bp from *trnL-trnF* gene. The haplotypic diversity of the species is  $Hd = 0.693$  and the nucleotide diversity ( $\pi = 0.004$ ). We found high levels of population differentiation ( $F_{ST} = 1$ ) and a positive correlation between the genetic and geographical distance of the populations. Supported by the haplotypes network and phylogenetic analysis showing evidence of restricted or no genetic flow. However, at the intrapopulation level no differences were detected between the individuals ( $Hd = 0.0$ ). These results may be related to a limited dispersion of the seeds because of the potential dispersers which are ants that visit the fruits.

The patterns of genetic diversity found can be explained by the small size of the populations coupled with their apparent isolation, which suggests that genetic drift

and inbreeding are important factors in the conformation of the genetic structure observed in the populations.

The populations of *Turbinicarpus horripilus* are highly threatened, so we propose the protection of the species by NOM-059-SEMARNAT-2010.

## ÍNDICE

<b>1.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2.- MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>3</b>
2.1 Diversidad genética y genética poblacional .....	3
2.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg .....	4
2.3 Fuerzas evolutivas .....	5
2.4 Estructura genética de las poblaciones.....	7
2.5 Variación genética.....	8
2.6 Marcadores moleculares.....	8
2.6.1 Microsatélites.....	9
2.6.2 Secuenciación de ADN.....	11
2.6.3 ADN de cloroplasto (ADNc) .....	12
2.7 Biología y genética de la conservación .....	13
2.8 Especie de estudio.....	15
2.8.1 Características del género <i>Turbinicarpus</i> (Backeberg) Buxbaum y Backeberg.....	15
2.8.2 <i>Turbinicarpus horripilus</i> (Lem.) John & Riha.....	15
2.8.3 Estatus de Conservación .....	18
2.8.4 Características abióticas de las localidades de <i>T. horripilus</i> .....	18
2.8.5 Antecedentes.....	20
a) Estudios con la especie .....	20
b) Estudios genéticos de cactáceas .....	22

2.9 Área de estudio .....	26
2.10 Justificación.....	29
<b>3.- PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>29</b>
<b>4.- HIPÓTESIS .....</b>	<b>29</b>
<b>5.- OBJETIVOS.....</b>	<b>30</b>
5.1 Objetivo general.....	30
5.2 Objetivos específicos .....	30
<b>6.- MÉTODO .....</b>	<b>31</b>
6.1 Poblaciones seleccionadas.....	31
6.2 Colecta de material biológico .....	33
6.3 Germinación de las semillas .....	34
6.4 Extracción del ADN.....	35
6.5.- Microsatélites.....	36
6.5.1 Selección y amplificación de microsatélites .....	36
6.6.- Secuenciación de ADNc .....	40
6.6.1 Análisis estadísticos.....	45
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
7.1 Microsatélites .....	49
7.1.1. Amplificación de microsatélites.....	49
7.1.2. Electroforesis de los microsatélites en secuenciador automático.....	50
7.2 Secuencias de ADNc .....	52
7.2.1 Diversidad genética .....	52

a) Diversidad genética en la región <i>petB</i> intrón D4.....	52
b) Diversidad genética del marcador <i>trnL-rp32</i> .....	54
c) Diversidad genética del marcador <i>trnL-trnF</i> .....	57
d) Diversidad genética total .....	58
7.2.2 Estructura genética .....	62
a) Gen <i>petB</i> intrón D4.....	62
b) Gen <i>trnL-rp32</i> .....	62
c) Gen <i>trnL-trnF</i> .....	63
7.2.3 Análisis filogenético.....	64
a) Gen <i>petB</i> intrón D4.....	64
b) Gen <i>trnL-rp32</i> .....	64
c) Gen <i>trnL-trnF</i> .....	67
d) Concatenado .....	67
7.2.4 Redes de haplotipos .....	70
a) Red de haplotipos para el gen <i>petB</i> intrón D4 .....	70
b) Red de haplotipos para el gen <i>trnL-rp32</i> .....	71
c) Red haplotipos para el gen <i>trnL-trnF</i> .....	72
d) Red de haplotipos del concatenado.....	73
7.2.5 Distancias Genéticas .....	74
7.6.1 Gen <i>petB</i> intrón D4 .....	74
7.6.2 Gen <i>trnL-rp32</i> .....	75
7.6.3 Gen <i>trnL-trnF</i> .....	76

7.2.6 Aislamiento por Distancia.....	77
a) Gen <i>petB</i> intrón D4.....	77
b) Gen <i>trnL-rpl32</i> .....	78
c) Gen <i>trnL-trnF</i> .....	78
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>80</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>89</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>98</b>
ANEXO 1 Protocolo de extracción “DNeasy Plant Mini Kit” QIAGEN (MODIFICADO).....	98
ANEXO 2. Especies incluidas en los análisis filogenéticos para los genes <i>PetB</i> intrón D4, <i>trnL-rpl32</i> , <i>trnL-trnF</i> . .....	100

## Lista de figuras

Figura 1. Ejemplares de <i>T. horripilus</i> . a) <i>T. horripilus</i> (Lem.) V. John y Riha; b) <i>T. horripilus</i> . (Lem.) Vác. John y Riha subs. <i>wrobelianus</i> Nizschke y Anaya-Montes (Fotos a y b Loraine Matías Palafox 2007).....	17
Figura 2. Polígono y ubicación de la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztlán en el estado de Hidalgo y distribución de las poblaciones de <i>Turbinicarpus horripilus</i> . .	28
Figura 3. Poblaciones seleccionadas de <i>T. horripilus</i> . a) Almolón, b) Cerro, c) Jilotla, d) Santuario.....	31
Figura 4. Distancias geográficas entre las poblaciones seleccionadas de <i>T. horripilus</i> . .....	32
Figura 5. Colecta de tejido en el campo. ....	34
Figura 6. Colocado de las semillas en frascos con tierra para cactáceas. ....	35
Figura 7. Árbol filogenético de máxima verosimilitud para Cactaceae derivado de los análisis de cinco loci, que muestra el clado Cacteeae y las relaciones dentro de ella (Tomado de Hernández-Hernández <i>et al.</i> 2011). ....	37
Figura 8. Genoma del cloroplasto del saguaro ( <i>Carnegia gigantea</i> ), donde se muestran la ubicación de las secciones de ADN estudiadas (Tomado de Sanderson <i>et al.</i> 2015). ....	43
Figura 9. Visualización a través de geles de agarosa (al 0.8) del ADN obtenido en muestras de tres poblaciones: 1) Almolón 2) Cerro 3) Jilotla. La primera marca a la izquierda corresponde a la escalera (50 pb). ....	49

Figura 10. Imagen de la amplificación de los microsatélites mEgR02, mEgR73, mAbR05, mAbR28, mAbR42, mAbR86 y mAbR91 en geles de agarosa (1 %), mostrando individuos de cuatro poblaciones: C = Cerro, J = Jilotla y A = Almolón... 51

Figura 11. Reconstrucción filogenética Bayesiana de las 77 secuencias del gen *petB* intrón D4 usando el modelo Jukes Cantor con 10,000,000 de generaciones, utilizando como grupos externos *Ariocarpus kotschobeyanus*, *Stenocereus thurberi*, *Echinocactus platyacanthus* y *Cephalocereus senilis*. Cada color de la barra representa una población. Sobre las ramas se muestra los valores de probabilidad posterior bayesiana. .... 65

Figura 12. Reconstrucción filogenética Bayesiana de las 53 secuencias del gen *trnL-rp32* usando el modelo Jukes Cantor con 10,000,000 de generaciones, utilizando como grupos externos *Ariocarpus kotschobeyanus*, *Eulychnia iquiquensis* y *Copiapoa desertorum*. Cada color de la barra representa una población. Sobre las ramas se muestra los valores de probabilidad posterior bayesiana..... 66

Figura 13. Reconstrucción filogenética Bayesiana de las 34 secuencias del gen *trnL-trnF* usando el modelo Jukes Cantor con 10 000 000 de generaciones, utilizando como grupos externos *Cephalocereus senilis*, *Ariocarpus brovoanus*, *Strombocactus diciformis*, *Turbinicarpus viereckii*, *Echinocactus grusoni* y *Astrophytum ornatum*. Cada color de la barra representa una población. Sobre las ramas se muestra los valores de probabilidad posterior bayesiana..... 68

Figura 14. Reconstrucción filogenética Bayesiana de las 19 secuencias concatenada de los tres genes usando el modelo Jukes Cantor con 10 000 000 de generaciones. Cada color de la barra representa una población. Sobre las ramas se muestra los valores de probabilidad posterior bayesiana. ....	69
Figura 15. Red haplotípica de <i>T. horripilus</i> formada con las secuencias de la región <i>petB</i> intrón D4. Las líneas pequeñas que están sobre la línea que conecta a los haplotipos indican los pasos mutacionales entre ellos. Los diferentes tamaños de los círculos representan la frecuencia haplotípica. ....	70
Figura 16. Red haplotípica de <i>T. horripilus</i> formada con las secuencias del gen <i>trnL-rp32</i> . Las líneas pequeñas que están sobre la línea que conecta a los haplotipos indican los pasos mutacionales entre ellos. Los diferentes tamaños de los círculos representan la frecuencia haplotípica.....	71
Figura 17. Red haplotípica de <i>T. horripilus</i> formada con las secuencias del gen <i>trnL-trnF</i> . Las líneas pequeñas que están sobre la línea que conecta a los haplotipos indican los pasos mutacionales entre ellos. Los diferentes tamaños de los círculos representan la frecuencia haplotípica.....	72
Figura 18. Red haplotípica de <i>T. horripilus</i> resultado del análisis concatenado. Las líneas pequeñas que están sobre la línea que conecta a los haplotipos indican los pasos mutacionales entre cada haplotipo. Los diferentes tamaños de los círculos representan la frecuencia haplotípica.....	73
Figura 19. Árbol N.J de distancias genéticas de Nei (1987).....	75
Figura 20. Árbol N.J de distancias genéticas de Nei (1987).....	76

Figura 21. Árbol N.J de distancias genéticas de Nei (1987).....	77
Figura 22. Regresión lineal de distancias genéticas y geográficas de la región <i>petB</i> intrón D4.....	77
Figura 23. Regresión lineal de distancias genéticas y geográficas de la región <i>trnL- rpl32</i> . ....	78
Figura 24. Regresión lineal de distancias genéticas y geográficas de la región <i>trnL- trnF</i> .....	79
Figura 25. Mapa donde se muestran las barreras geograficas existentes entre las poblaciones de estudiadas de <i>Turbinicarpus horripilus</i> .....	88

## Lista de Tablas

Tabla 1. Características abióticas y bióticas de las poblaciones conocidas de <i>T. horripilus</i> en la barranca de Metztlán (Matías-Palafox 2007).....	21
Tabla 2. Poblaciones seleccionadas. Se muestra la ubicación de las poblaciones, las características ambientales y la densidad de cada población (Tomado de Matías-Palafox y Jiménez-Sierra (2006) y Matías-Palafox (2007). ....	32
Tabla 3. Primers de microsatélites probados en este estudio. ....	38
Tabla 4. Ciclos de PCR para cada uno de los primers probados. ....	39
Tabla 5. Especies estudiadas con los primers seleccionados para nuestro estudio. ....	41
Tabla 6. Secuencia de los primers seleccionados para el presente estudio. Se muestra el tamaño esperado de amplificación y la referencias. ....	42
Tabla 7. Condiciones de amplificación para la región <i>petB</i> intrón D4 (Arenas 2015). ....	44
Tabla 8. Condiciones de amplificación para la región <i>trnL-rp132</i> (Soto-Trejo 2015). .	44
Tabla 9. Condiciones de amplificación para la región <i>trnL-trnF</i> (Taberlet <i>et al.</i> 1991). .....	44
Tabla 10. Número de extracciones de ADN por población.....	48
Tabla 11. Concentración promedio de ADN (ng/μl) de las población de <i>T. horripilus</i> estudiadas. ....	48
Tabla 12. Primers de microsatélites amplificados exitosamente con tejidos de <i>T. horripilus</i> de tres poblaciones. Se muestra el ajuste en las temperaturas utilizadas en este estudio. ....	50

Tabla 13. Primers de microsatélites utilizados en otros estudios de cactáceas probados sin éxito. Se muestran las diferentes modificaciones de las condiciones probadas. ....	51
Tabla 14. Número de individuos secuenciados por población y región de ADNc.....	52
Tabla 15. Haplotipos detectados considerando <i>indels</i> y sustituciones en la región <i>petB</i> intrón D4. ....	53
Tabla 16. Haplotipos detectados para la región <i>petB</i> intrón D4 sin <i>indels</i> . ....	53
Tabla 17. Estimadores de diversidad genética total del marcador <i>petB</i> intrón D4. N= número de individuos; Pb = Pares de bases; S= sitios polimórficos, <i>h</i> = número de haplotipos, <i>Hd</i> = Diversidad haplotípica, $\pi$ = Diversidad nucleotídica.....	54
Tabla 18. Estimadores de la diversidad genética considerando la región <i>petB</i> intrón D4 por población: N número de individuos; Pb pares de bases S sitios polimórficos, <i>h</i> número de haplotipos, <i>Hd</i> Diversidad haplotípica, $\pi$ Diversidad nucleotídica.....	54
Tabla 19. Haplotipos detectados considerando <i>indels</i> y sustituciones en la región <i>trnL-rpl32</i> .....	55
Tabla 20. Haplotipos de la región <i>trnL-rpl32</i> sin <i>indels</i> .....	55
Tabla 21. Estimadores de diversidad genética total del marcador <i>trnL-rpl32</i> . N número de individuos, Pb pares de bases, S sitios polimórficos, <i>h</i> número de haplotipos, <i>Hd</i> Diversidad haplotípica, $\pi$ Diversidad nucleotídica.....	56
Tabla 22. Estimadores de la diversidad genética para las poblaciones. N número de individuos, Pb pares de bases, S sitios polimórficos, <i>h</i> número de haplotipos, <i>Hd</i> Diversidad haplotípica, $\pi$ Diversidad nucleotídica.....	56

Tabla 23. Haplotipos detectados considerando <i>indels</i> y sustituciones en la región <i>trnL-trnF</i> .....	57
Tabla 24. Haplotipos de la región <i>trnL-trnF</i> sin <i>indels</i> . .....	57
Tabla 25. Estimadores de diversidad genética total del gen <i>trnL-trnF</i> . N número de individuos, Pb pares de bases, S sitios polimórficos, <i>h</i> número de haplotipos, <i>Hd</i> Diversidad haplotípica, $\pi$ Diversidad nucleotídica.....	58
Tabla 26. Estimadores de la diversidad genética para las poblaciones. N número de individuos, Pb pares de bases, S sitios polimórficos, <i>h</i> número de haplotipos, <i>Hd</i> Diversidad haplotípica, $\pi$ Diversidad nucleotídica.....	58
Tabla 27. Número de individuos por población que se utilizaron en el análisis concatenado.....	59
Tabla 28. Haplotipos del concatenado sin <i>indels</i> . .....	60
Tabla 29. Haplotipos obtenidos del concatenado sin <i>indels</i> .....	61
Tabla 30. Estimadores de diversidad genética total del concatenado. N número de individuos, Pb pares de bases, S sitios polimórficos, <i>h</i> número de haplotipos, <i>Hd</i> Diversidad haplotípica, $\pi$ Diversidad nucleotídica.....	61
Tabla 31. Estimadores de la diversidad genética por poblaciones sin <i>indels</i> . N número de individuos, Pb pares de bases, S sitios polimórficos, <i>h</i> número de haplotipos, <i>Hd</i> Diversidad haplotípica, $\pi$ Diversidad nucleotídica. ....	61
Tabla 32. Resultados obtenidos del análisis de varianza molecular (AMOVA). .....	62
Tabla 33. Resultados obtenidos del análisis de varianza molecular (AMOVA). .....	63
Tabla 34. Resultados obtenidos del análisis de varianza molecular (AMOVA). .....	63

Tabla 35. Distancias genéticas de Nei (1987) entre poblaciones apareadas.....	74
Tabla 36. Distancias genéticas de Nei (1987) entre poblaciones apareadas.....	75
Tabla 37. Distancias genéticas de Nei (1987) entre poblaciones apareadas.....	76
Tabla 38. Tamaños de las regiones secuenciadas en estudios de diversas especies de climas semiáridos utilizando al menos una de las regiones empleadas en este estudio.....	82
Tabla 39. Diversidad genética encontrada en especies vasculares a través de secuenciación de regiones del cloroplasto (se eligieron estudios en los que al menos se empleara una de las regiones utilizadas en este estudio): $N$ = Número de individuos; $P_b$ = Pares de bases; $S$ = Sitios polimórficos; $h$ = Número de haplotipos; $H_d$ = Diversidad haplotípica; $\pi$ = Diversidad nucleotídica; $F_{ST}$ = Índice de diferenciación genética.....	83

## **1.- INTRODUCCIÓN**

Las zonas áridas y semiáridas de México ocupan más de la mitad del territorio nacional, aquí se encuentran los centros de origen y diversificación de diversos grupos de plantas como las cactáceas, las agaváceas y las crasuláceas, entre otras (Flores 2011). Estas zonas presentan una gran diversidad ya que en ellas se han descrito más de seis mil especies, cantidad superior a las registradas en las selvas húmedas de México, además en ellas se encuentran altas tasas de endemismos (Flores 2011).

Las cactáceas, son autóctonas del Continente Americano, agrupando a cerca de 2,000 especies, las cuales han logrado adaptarse a los climas desérticos. México es el país con mayor riqueza de estas plantas, con 913 taxones, de los cuales el 80% son endémicos del país (Jiménez-Sierra 2011). Las cactáceas, se distinguen de las demás plantas por algunos de sus caracteres anatómicos y fisiológicos, tales como su estructura crasa, reducción del limbo de la hoja, hipertrofia del pecíolo hasta su transformación en un podario o tubérculo, modificación de las yemas hasta la conformación en areolas, presencia de distintos tipos de espinas y un metabolismo ácido crasuláceo (CAM) (Bravo-Hollis y Scheinvar 1995). Las cactáceas son elementos importantes en la estructura y la dinámica de las comunidades de las zonas semidesérticas. Su desaparición conlleva a un proceso de empobrecimiento biológico y a la pérdida de recursos útiles para las poblaciones humanas (Jiménez-Sierra 2011). En México 239 especies de cactáceas y 16 subespecies de este grupo se encuentran en riesgo (27 de ellas se catalogan en Peligro de Extinción; 81 como

Amenazadas y 157 taxones como Sujetas a Protección especial), lo que representa el 39.83% de las especies de cactáceas del país (Arias *et al.* 2005; Godínez-Álvarez y Ortega-Baes 2007).

*Turbinicarpus horripilus* (Backeberg) Buxbaum (et) Backeberg es una cactácea endémica de México que presenta las siguientes características: rareza, microendemismo, distribución restringida y especificidad de hábitat, por lo que se hace necesario el desarrollo de estudios ecológicos y genéticos para poder tomar decisiones acerca de su conservación y aprovechamiento (Jiménez-Sierra y Matías-Palafox, 2014).

Los estudios realizados para esta especie hasta la fecha han sido de carácter descriptivo (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada 1991b), anatómico fisiológico (Jarquin 2009) y ecológicos (Matías-Palafox 2006; Matías-Palafox 2007; Jiménez-Sierra y Matías-Palafox 2016).

A pesar de esto, la especie no ha sido catalogada por las normas mexicanas como una especie en riesgo, aunque los estudios realizados sugieren que debiera ser considerada como especie en Peligro de extinción (P) (Matías-Palafox y Jiménez-Sierra 2006; Matías-Palafox 2007; Jiménez-Sierra y Matías-Palafox 2016).

Los estudios sobre la genética poblacional de *T. horripilus*, contribuirán sin duda a determinar el estatus de la especie en relación a su diversidad y la estructura y los riesgos de acercarse a un vórtice de extinción genético.

En este estudio, se presenta la diversidad intra e interpoblacional de *T. horripilus* mediante el uso de marcadores moleculares. En un primer acercamiento se probaron

microsatélites, sin embargo, debido a problemas técnicos con los marcadores empleados, se optó por el uso de la secuenciación de tres regiones no codificantes del cloroplasto.

## **2.- MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Diversidad genética y genética poblacional**

Una parte importante de la riqueza biológica se encuentra contenida en la diversidad genética presente en las poblaciones que conforman cada especie, esta diversidad constituye la materia prima para los procesos de evolución y es de gran relevancia ya que a mayor diversidad genética, mayores probabilidades de sobrevivencia de un taxón a los cambios constantes del ambiente (Piñero *et al.* 2008).

El conocimiento de la variabilidad permite: 1) Evaluar la capacidad de respuesta de las poblaciones y especies ante los cambios ambientales; 2) Determinar los riesgos de pérdida de la diversidad; 3) Conocer la riqueza genética y su distribución geográfica; 4) Planear las estrategias de aprovechamiento y conservación a nivel de poblaciones, especies y recursos genéticos y 5) Estimar los riesgos de introducción de especies, variedades mejoradas y modificadas genéticamente sobre las especies nativas (Piñero *et al.* 2008).

**La genética de poblaciones** es la rama de la biología que se encarga de estudiar la naturaleza y la cantidad de la variación genética en y entre las poblaciones que conforman a una especie, así como los procesos por los cuales se origina esta variabilidad y los factores que la alteran (Piñero *et al.* 2008). Dicho de otra forma la

genética de poblaciones trata de explicar, en términos cuantitativos y predictivos, el proceso de adaptación (Eguiarte 1988), y ayuda a comprender el proceso de especiación (Clark 2000).

Los genetistas de poblaciones han definido a la evolución como el cambio en las frecuencias alélicas en una población. Estos cambios puede incrementar o disminuir la adaptación de las poblaciones al ambiente en donde se encuentran (Eguiarte 1988).

Los cambios evolutivos en las poblaciones son generados principalmente por fuerzas evolutivas (mutación, migración, endogamia, deriva génica y selección natural), así como por factores intrínsecos de las especies (el tipo de sistema reproductivo, el área de distribución, el tamaño poblacional, la presencia de barreras físicas, patrones de polinización y dispersión de semillas, entre otros) (Hedrick 2011). Estos factores determinan el incremento o la disminución en las poblaciones locales de las frecuencias alélicas, lo que permite que se presente una estructura genética poblacional (Hedrick 2011).

## **2.2 Equilibrio de Hardy-Weinberg**

La interpretación de la variación genética en las poblaciones de organismos diploides se fundamenta en el principio de Hardy-Weinberg, el cual establece que en las poblaciones panmícticas y en ausencia de fuerzas evolutivas como selección natural, migración, deriva génica, endogamia y mutación, las frecuencias alélicas permanecen constantes de generación en generación (Hedrick 1985). Si se cumplen

los supuestos de Hardy-Weinberg, las frecuencias de alelos y/o genotipos permanecerán constantes y no habrá evolución (Futuyma 1998; Clark 2000).

Este modelo predice a partir de las frecuencias alélicas ( $p$  y  $q$ ), las frecuencias genotípicas presentes en una población; es decir la proporción de organismos homocigos dominantes ( $D$ ), heterocigos ( $H$ ) y homocigos recesivos ( $R$ ) (Eguiarte 1999).

### **2.3 Fuerzas evolutivas**

La **selección natural** es básicamente un proceso que ocurre cuando existe una sobrevivencia y reproducción diferencial de genotipos, es decir, cuando los genotipos difieren en su habilidad para sobrevivir y reproducirse en su ambiente. Como resultado de esto, las frecuencias de los alelos pueden cambiar gradualmente o permanecer estables, promoviendo una mayor adaptación de la población al ambiente (Clark 2000).

La **deriva génica** es una fuerza evolutiva que genera cambios en las frecuencias alélicas solo por errores de muestreo de una generación a otra. Sus efectos son mayores en poblaciones pequeñas, haciendo que se pierdan o se fijen alelos, permitiendo así, que la población pierda variabilidad genética (Hamilton 2009).

La **endogamia** es el apareamiento entre parientes genéticos propiciada cuando el tamaño efectivo de las poblaciones es pequeño. La endogamia disminuye la frecuencia de los heterocigotos y aumenta la frecuencia de los homocigotos en todos los loci dentro de una población (Freeman y Herron 2002).

El **flujo génico** es la transferencia de alelos del conjunto de genes de una población al conjunto de genes de otra población (Freeman y Herron 2002). Las poblaciones de una especie pueden intercambiar genes en mayor o menor grado, ya sea genes nucleares o genomas uniparentales como la mitocondria o el cloroplasto, debido al movimiento de gametos, semillas, individuos juveniles o adultos (en animales y en el caso de algunas plantas) (Slatkin 1985). Si el flujo génico entre poblaciones de una especie es alto, todas ellas evolucionan de manera conjunta (a menos que sea contrarrestado por selección natural o deriva génica), pero si es muy bajo, empiezan a divergir, lo que puede contribuir al aislamiento reproductivo y al establecimiento de linajes evolutivamente independientes (Slatkin 1985).

Gracias al desarrollo de técnicas y análisis moleculares, es posible estimar el flujo génico de una manera detallada y con mayor resolución. Se basan principalmente en observar la distribución espacial de alelos en las poblaciones para hacer inferencias de los niveles o patrones de flujo génico en las poblaciones (Slatkin 1985). Wright (1951,1965) midió la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg con el índice de diferenciación poblacional ( $F_{ST}$ ) que determina indirectamente cuanto flujo genético hay entre las poblaciones, debido a que es una medida de diferenciación genética y calcula la reducción de la heterocigosidad originada por la subdivisión de la población. Este índice va de 0 que significa que las poblaciones comparten todos sus alelos, a 1 cuando las poblaciones no comparten ninguno de sus alelos (Hedrick 2005).

La **mutación** es una fuerza evolutiva muy importante, ya que es la fuente original de la variación. Sin embargo, las tasas de mutación en la naturaleza son muy bajas, se estima que en promedio se presentan entre  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  mutaciones/gameto/generación y que las tasas de mutación promedio para pares de bases son de aproximadamente  $10^{-9}$ . Se considera que la mutación es una fuerza que produce pocos cambios en las frecuencias alélicas (Clark 2000).

Las especies raras (con limitado número de individuos) y endémicas son más susceptibles a la fragmentación del hábitat y fácilmente pierden su capacidad para mantener poblaciones en equilibrio debido a la presencia de mutaciones o a problemas de deriva génica (Hedrick 2011).

## **2.4 Estructura genética de las poblaciones**

La estructura genética de las poblaciones se define como la cantidad de variación genética y su distribución dentro y entre las poblaciones de una especie. Es definida tanto por procesos demográficos, como por procesos genéticos donde actúan las fuerzas evolutivas. Cuando existe una gran cantidad de flujo génico entre poblaciones locales, estas tenderán a compartir la misma información genética y por lo tanto evolucionarán de manera conjunta. Sin embargo cuando el flujo génico está restringido, las poblaciones tenderán a evolucionar de manera casi independiente y su composición genética se irá diferenciando con el paso del tiempo (Slatkin 1994).

Sewall Wright desarrolló un modelo para cuantificar la estructura genética a través de los estadísticos F de Wright (Conner y Hartl 1994):

El coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ): es la medida de endogamia de los individuos ( $I$ ) con relación a la subpoblación a la que pertenece ( $S$ ). El Índice de fijación poblacional ( $F_{ST}$ ): mide la reducción de heterocigosidad originada por la subdivisión de la población ( $S$ ) con relación a la población ( $T$ ) (Hedrick 2011).

## **2.5 Variación genética**

Conocer los niveles de variación genética que hay en las poblaciones es crucial, ya que la variación es el motor de la evolución. La cantidad de variación genética dentro de las especies se relaciona con su historia evolutiva y las características ecológicas de los organismos, por lo que sus valores nos permiten conocer procesos demográficos y evolutivos a los que están sujetos las poblaciones, así como diferenciar entre eventos recientes, históricos, demográficos o selectivos (Hedrick 2011). La variación genética dentro y entre poblaciones de una especie es esencial para el establecimiento de prácticas de conservación de taxones amenazados (Hamrick y Godt 1996)

## **2.6 Marcadores moleculares**

Aunque resulta prácticamente imposible analizar toda la diversidad presente en una población, se pueden hacer estimaciones a través del estudio de las variaciones fenotípicas de los individuos que componen esa población (rasgos morfológicos o fisiológicos) o a través del análisis de sus genotipos utilizando para ello marcadores moleculares (Rentería 2007).

Los primeros marcadores moleculares utilizados fueron las isoenzimas que representan variaciones en la forma de una proteína entre los individuos. Sin embargo, ahora se cuenta con marcadores que detectan diferencias en el ácido desoxirribonucleico (ADN) presente en los individuos. Entre estos marcadores de encuentran: 1) RAPDS (polimorfismo de ADN amplificados al azar) que son marcadores que amplifican aleatoriamente segmentos de ADN en una gran variedad de especies; 2) ISSRs (secuencias simples repetidas) en los que la variación alélica consiste en la presencia o ausencia de los productos amplificados; 3) RFLPs (análisis de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción) donde se expresan diferencias específicas del ADN que son reconocidas por enzimas de restricción particulares (endonucleasas); 4) AFLPs (polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados) es una técnica que a través del uso de electroforesis permite detectar la presencias o ausencia de fragmentos; 5) Microarrays (microarreglos) que es una técnica que permite detectar niveles de expresión de los genes a través del uso de una matriz de cristal; 6) Microsatélites que emplea secuencias de ADN constituidas por repeticiones de motivos nucleotídicos de 1 a 6 pares de bases y 7) Secuenciación de ADN, consiste en la lectura directa de las bases de una sección del ADN (Rentería 2007).

### 2.6.1 Microsatélites

Los microsatélites son secuencias de ADN no codificantes constituidas por repeticiones de motivos nucleotídicos de 1 a 6 pares de bases (Hancock 1999). Pueden estar compuestos por repeticiones del mismo nucleótido (mononucleótidos),

por dos (dinucleótidos), por tres (trinucleótidos) y así hasta seis nucleótidos (hexanucleótidos). Los microsatélites que están compuestos por un motivo único se consideran puros o perfectos (por ejemplo, AAAAAAAAAA o  $(A)_{11}$ ); aquellos conformados por dos o más motivos se denominan compuestos (por ejemplo, AAAAAATTTTTT o  $(A)_7(T)_7$ ) y se conocen como interrumpidos cuando un nucleótido o más se insertan en alguna parte de la repetición (por ejemplo, AAAAAAGAAAAA o  $(A)_6G(A)_6$ ) (Schlötterer 2000). Este tipo de secuencias se han encontrado tanto en genomas eucariontes como procariontes e incluso se han identificado en genomas de mitocondrias y cloroplastos. Los microsatélites se distribuyen en regiones codificantes y no codificantes y se caracterizan por ser altamente polimórficos en cuanto a su longitud, por lo tanto son regiones adecuadas para usarse como marcadores moleculares en el nivel poblacional (Zane *et al.* 2002). Este alto grado de polimorfismo es consecuencia de una elevada tasa de mutación (desde  $10^{-6}$  hasta  $10^{-2}$  mutaciones por sitio por generación; Schlötterer 2000), que se atribuye a eventos de inserción y deleción durante la replicación del ADN. Debido al alto grado de polimorfismo en el tamaño, y a que estos marcadores son codominantes, pueden ser estudiados como electromorfos, lo cual reduce el tiempo y el costo de la técnica en los casos en los que es necesario estudiar numerosas muestras y múltiples loci (Cornejo *et al.* 2004).

Los microsatélites han sido utilizados fundamentalmente en estudios para detectar la variación genética interespecífica e intraespecífica (Edwards *et al.* 1991), análisis de linajes y de sistemas reproductivos. Se han encontrado microsatélites en algunos

organelos citoplasmáticos, como el cloroplasto (Vendramín *et al.* 1998;) y la mitocondria, lo que ha enriquecido la fuente de estudios evolutivos, ya que estos organelos son heredados uniparentalmente y no están sujetos a recombinación, por lo que los cambios acumulados que observamos en las poblaciones obedecen solamente a los procesos de mutación y fenómenos demográficos (Echt *et al.* 1998). El análisis del ADN de estos organelos permite contestar preguntas evolutivas muy puntuales relacionadas con el monitoreo del flujo genético, la introgresión y el análisis de paternidad, al mismo tiempo que se utilizan para establecer inferencias de los parámetros demográficos y para determinar patrones evolutivos de los procesos históricos del origen de diferentes especies, formas o razas (Vendramin *et al.* 1998; Golstein *et al.* 1996).

#### 2.6.2 Secuenciación de ADN

Los análisis más detallados de diferenciación de ADN pueden obtenerse secuenciando la región de interés para diferentes individuos. Este método incluye cuatro pasos: i) identificar secuencias que tengan la variación necesaria; ii) aislar y purificar un número elevado de la secuencia (ya sea por clonación o amplificación); iii) secuenciar; iv) alinear la secuencia (Rentería 2007).

Las técnicas que existen para secuenciar son la química y la enzimática. Actualmente el método enzimático de Fred Sanger es el más utilizado (Rentería 2007).

Una de las grandes ventajas al trabajar con secuencias es que el ADN se encuentra en todas las células de los organismos y se puede recuperar de tejido vivo o muerto.

Otra ventaja es que las diferentes regiones del genoma experimentan diferentes tasas de evolución. Por ejemplo, las regiones codificantes están sujetas a selección natural, la cual previene la acumulación de mutaciones, en cambio, las regiones no codificantes son más variables porque pueden acumular cambios mutacionales de manera neutral (Parker *et al.* 1998). Esta tasa evolutiva diferencial permite realizar estudios a amplias escalas como la evolución del virus VIH en un solo paciente a lo largo de un mes o el árbol de la vida en la Tierra, con seleccionar el fragmento adecuado para nuestro estudio (Page y Holmes 1998). También, se puede trabajar con secuencias de regiones mitocondriales o de cloroplasto que generalmente son heredadas de manera uniparental para desarrollar estudios de efecto fundador, hibridación y relaciones matrilineales (Lewin 2001). La principal desventaja de esta técnica es el costo. Sin embargo, los avances tecnológicos la hacen cada vez más barata (Cornejo *et al.* 2014).

### 2.6.3 ADN de cloroplasto (ADNc)

El ADNc es un genoma circular, haploide que está presente en los cloroplastos de las plantas. En coníferas (Gimnospermas) usualmente los cloroplastos se heredan por vía paterna, mientras que en las plantas con flores (Angiospermas) se hereda casi exclusivamente por vía materna (Birky 1991).

El tamaño de este ADNc es muy pequeño, mide entre 120 y 217 kb (miles de pares de bases de ADN). El número de genes presente en el cloroplasto es muy conservado, entre 110 a 113 (Palmer y Delwiche 1998; Hedrick 2011). El genoma del cloroplasto usualmente presenta dos regiones sin repetir: una larga (LSC, Long

Single Copy) y otra corta (SSC, Short Single Copy), de aproximadamente unos 134-160kb y 80-87kb, respectivamente, y una parte duplicada invertida (IR, Inverted Repeat), formada por dos segmentos idénticos en sentidos opuestos, separados por la región SSC. Las regiones invertidas repetidas pueden tener un tamaño variable, de 12 a 25 kb cada una (Doyle *et al.* 1995; Palmer y Delwiche 1998).

El ADNc es un marcador que ha sido muy eficiente en los estudios filogeográficos de plantas, ya que por sus características permite conocer procesos históricos como rutas de colonización (dispersión) y la fragmentación de las poblaciones (vicarianza) (Petit *et al.* 2002).

## **2.7 Biología y genética de la conservación**

Las poblaciones de muchas especies han sido reducidas por acciones humanas, prevaleciendo algunos fragmentos de estas de manera aislada, lo que amenaza su persistencia debido a que se reduce la diversidad genética y se favorece la endogamia, la deriva génica y la fijación de alelos acentuando la diferenciación de las poblaciones que originalmente constituían un continuo (Rocha y Gasca 2007).

La “**biología de la conservación**” surge como respuesta a la crisis ambiental severa la cual ha sido denominada como la “sexta extinción”, por lo cual ha sido calificada como una “disciplina de la crisis” (DeSalle y Amato 2004). Esta ciencia tiene como objetivos: 1) Documentar el rango completo de la diversidad en la Tierra; 2) Investigar el impacto humano sobre las especies y su variación genética, así como sobre los ecosistemas; 3) Desarrollar enfoques prácticos para prevenir la extinción de las especies manteniendo la diversidad genética dentro y entre las poblaciones, y

4) Proteger y restaurar las comunidades biológicas así como sus funciones (Primack 2010; Barrios-Gómez 2013).

La **genética de la conservación** considera la aplicación práctica y teórica de la genética de las poblaciones, utilizando herramientas moleculares con la finalidad de minimizar los riesgos de extinción y preservar así las especies como entidades dinámicas capaces de responder a los cambios ambientales (Frankham *et al.* 2002).

Se enfoca en los factores que afectan el riesgo de extinción y en los regímenes de manejo genético. Para lograr estas metas, plantea desarrollar investigación en las siguientes temáticas (Frankham *et al.* 2002): 1) Los efectos deletéreos de la endogamia en la adecuación; 2) La pérdida de la diversidad genética y respuesta evolutiva al cambio ambiental; 3) La deriva génica como el principal proceso evolutivo; 4) La fragmentación poblacional y reducción del flujo génico; 5) La acumulación y pérdida de mutaciones deletéreas; 6) La adaptación al cautiverio y sus efectos adversos en la reintroducción; 7) La resolución de las incertidumbres taxonómicas; 8) La definición de unidades de manejo; 9) El análisis genético molecular en estudios de paternidad e identificación de los individuos; 10) El análisis genético molecular en la evaluación del estado de conservación de especies; 11) Los efectos deletéreos en la adecuación provocados por depresión exogámica.

## 2.8 Especie de estudio

### 2.8.1 Características del género *Turbinicarpus* (Backeberg) Buxbaum y Backeberg.

El género *Turbinicarpus* es endémico de México, se distribuye en la región Nororiental de la República (Hidalgo, Querétaro, San Luis Potosí, Zacatecas, Nuevo León, Tamaulipas y Coahuila). Sus veintitrés especies están todas incluidas en el Apéndice I de la Convención Sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestres (CITES) (Guzmán *et al.* 2003., Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada 1991).

Las plantas que constituyen este género son pequeñas, más o menos globosas y simples, están provistas de tubérculos y en algunas ocasiones costillas divididas en tubérculos. Las areolas son monomorfas. Las espinas son suaves no pungentes y escasas. Sus flores surgen en las areolas del ápice del tallo y pueden ser de color rosa o blanco, el pericarpelo se encuentra desnudo y en ocasiones presenta una escama diminuta hacia su porción superior. Los estambres son numerosos. El fruto es una baya dehiscente que posee semillas de testa negra que miden de 1 a 1.5 mm de longitud y no presentan arilo (Bravo-Hollis y Sánchez Mejorada 1991).

### 2.8.2 *Turbinicarpus horripilus* (Lem.) John & Riha.

#### **CLASIFICACIÓN**

*Reino: Plantae*

*División: Magnoliophyta*

*Clase: Magnoliopsida*

*Orden: Caryophyllales*

*Familia: Cactaceae*

*Subfamilia: Cactoideae*

*Género: Turbinicarpus*

*Especie: Turbinicarpus horripilus*

*Turbinicarpus horripilus* es una planta subglobosa, generalmente ramificada. Su tallo mide de 6 a 12 cm de diámetro y de 4 a 10 cm de altura, está formado por numerosos tubérculos piramidales de 1 cm dispuestos en espiral. Presenta de 9 a 12 espinas radiales y una espina central. Sus flores son acampanadas de color rosa purpúreo de 2 cm de longitud, son diurnas y viven alrededor de dos días. Su floración es sincronizada y ocurre en el transcurso de 4 a 5 días. Se requiere de polinización cruzada, y su sistema de apareamiento es xenógama obligada. Los principales visitantes florales son insectos del orden Hymenoptera (abejas y abejorros) y Coleoptera. Sus frutos son secos y ovoides con venación longitudinal. Miden hasta 1 cm de longitud y de 4 a 7 mm de diámetro, contienen de 5 a 75 semillas, las cuales son ovoides de testa negra o rojiza de 1.2 a 1.5 mm de longitud y son dispersadas por hormigas, el viento y la lluvia (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada 1991; Matías-Palafox y Jiménez-Sierra 2004; Matías Palafox y Jiménez-Sierra 2006; Matías-Palafox 20017).



Figura 1. Ejemplares de *T. horripilus*. a) *T. horripilus* (Lem.) V. John y Riha; b) *T. horripilus*. (Lem.) Vác. John y Riha subs. *wrobelianus* Nizschke y Anaya-Montes (Fotos a y b Loraine Matías Palafox 2007).

La especie ha sido clasificada en distintos géneros por diversos autores: *Mamillaria horripila* Lem., 1838; *Echinocactus horripilus* (Lem.) Lem., 1839; *Neolloydia horripila* (Lem.) Britton & Rose, 1923; *Gymnocactus horripilus* (Lem.) Backeb., 1961; *Thelocactus horripilus* (Lem.) Kladiwa & Fittkau in Krainz, 1970; *Pediocactus horripilus* (Lem.) Halda, 1998; *Bravocactus horripilus* (Lem.) Doweld, 1998 (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada 1991a).

Se reconocen dos subespecies: *Turbincarpus horripilus* (Lem.) V. John y Riha subs. *wrobelianus* Nizschke & Anaya-Montes y *Turbincarpus horripilus* (Lem.) Vác. John y Riha subs. *kretae* Chvastek & Halda (Guzmán *et al.* 2003) (Figura 1 a, b).

### 2.8.3 Estatus de Conservación

La especie está en la Lista Roja de Especies Amenazadas en la categoría de en Peligro de Extinción (EN) (Endangered B1ab (v)+2ab (v)) debido a que ocupa un área de distribución pequeña, tiene pocas poblaciones y estas tienen pocos individuos, los cuales están sujetos a tráfico ilegal. Sin embargo, la legislación mexicana, no la ha considerado (NOM-059-SEMARNAT-2001 y NOM-059-SEMARNAT-2010) y por lo tanto la especie, no ha recibido ningún tipo de protección legal a nivel nacional (Matías-Palafox y Jiménez-Sierra 2006 y Jiménez-Sierra y Matías-Palafox 2015).

### 2.8.4 Características abióticas de las localidades de *T. horripilus*

*Turbincarpus horripilus* es una especie endémica de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo (Guzmán *et al.* 2003). Hasta la fecha solo se conocen nueve poblaciones:

Almolón, Jihuico, Jilotla, Metztlán, San Cristóbal, San Juan, San Pablo Tetlapayac, Santuario y El Mogote, las cuales se distribuyen exclusivamente dentro del Municipio de Metztlán, Hidalgo (Jiménez-Sierra y Matías-Palafox 2015). La población de San Cristóbal ha desaparecido debido a la construcción de una casa habitación (Jiménez-Sierra y Matías-Palafox 2015).

Las poblaciones conocidas de *T. horripilus* se distribuyen entre los 1,020 y los 1,498 msnm, en sitios con pendientes que van de los 30° a los 70° (Tabla 1) (Matías-Palafox 2007). El 55.55% de las localidades se encuentran en clima árido semicálido con lluvias de verano e invierno (Bsohw) y el 44.44% restante en clima semiárido semicálido con lluvias en verano e invierno (BS1hw) (Jiménez-Sierra y Matías-Palafox 2015).

El tipo de vegetación presente es matorral xerófilo (crasicaules, rosetófilo o espinoso) (Matías-Palafox 2007). Generalmente *Turbinicarpus horripilus* se encuentra asociado a plantas de la familia Cactaceae como *Astrophytum ornatum* (DC.) Britton y Rose (liendrilla) y *Cephalocereus senilis* (Haw.) Pfeiff. (viejito), además de especies de la familia Agavaceae y a especies de los géneros *Selaginella sp.* y *Mimosa sp.* (Jiménez-Sierra y Matías-Palafox 2015).

El 66.66% de las localidades se encuentra en suelos de tipo Regosol calcáreo (Rc); el 22.22% en Litosoles (I) y el 11.11% en Fluvisoles eutricos (Je) (Jiménez-Sierra y Matías-Palafox 2016).

Las densidades de *T. horripilus* son bajas ya que los individuos se encuentran formando pequeños parches aislados unos de otros. La densidad promedio dentro de

estos parches fue de 0.54 individuos/m<sup>2</sup>, y solamente en la población de San Juan, se presenta una densidad >1 ind/m<sup>2</sup> (Jiménez- Sierra y Matías-Palafox 2015).

Las áreas continuas de comunidad vegetal, donde se encuentran las localidades de *T. horripilus* son muy reducidas debido tanto a cambios en el uso del suelo como a variaciones naturales del ambiente. Sólo en la localidad “El Mogote”, la cubierta vegetal se extiende más de tres hectáreas (Jiménez-Sierra y Matías-Palafox 2015).

Las ocho localidades donde la especie aún existe, presentan algún tipo de disturbio. Las poblaciones más afectadas son las más cercanas a poblados humanos es decir Santuario y San Juan (Jiménez-Sierra y Matías-Palafox 2015). El principal disturbio es el deterioro natural del hábitat, seguido del impacto humano o de infraestructura. (Matías-Palafox y Jiménez-Sierra 2006; Jiménez-Sierra y Matías-Palafox 2015).

#### 2.8.5 Antecedentes

##### a) Estudios con la especie

Hasta hace más de 10 años, los estudios acerca de la biología de *T. horripilus* eran escasos, pues sólo existían descripciones morfológicas de la especie y breves reseñas de su posición taxonómica Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada (1991) la consideran como *Thelocactus horripilus* y presentan una descripción morfológica detallada; Milan (2004) considera a la especie dentro del género *Turbinicarpus* presentando una descripción en latín en la que señala algunos aspectos relacionados con su distribución geográfica y altitudinal. En 2006, Matías-Palafox y

Jiménez-Sierra, publicaron un trabajo donde basándose en el estudio de las poblaciones silvestres de *T. horripilus* proponen que la especie sea considerada en Peligro de Extinción (P) dentro de la Legislación Mexicana.

Matías-Palafox (2007) presenta un trabajo más detallado sobre la estructura poblacional y la biología reproductiva de *T. horripilus* en la localidad “Santuario” donde en un área de 425 m<sup>2</sup> se encontró una densidad poblacional de 0.71 ind/m<sup>2</sup>,

Tabla 1. Características abióticas y bióticas de las poblaciones conocidas de *T. horripilus* en la barranca de Metztlán (Matías-Palafox 2007).

Localidad	Ubicación geográfica	Altitud (msnm)	Pendiente (°)	Área estimada	Densidad ind/m <sup>2</sup>	Comunidad vegetal
Santuario	20° 35.318'N 96°45.33'W	1294	60	900	0.71	Matorral xerófilo con crasicaules
San Juan	25°35.30'N 98°45.33'W	1303	70	1500	1.22	Matorral xerófilo con crasicaules
Jilotla	20°33.08'N 98°44.22'W	1468	45	150	0.33	Matorral xerófilo rosetófilo
San Cristóbal	20°35.95'N 98°45.15'W	1260	40	70	*	*
Almolón	20°43.727'N 98°56.231'W	1020	30	250	0.06	Matorral xerófilo con crasicaules
San Pablo Tetlapayac	20°37.24'N 98°52.50'W	1498	35	500	0.5	Matorral xerófilo espinoso
El Mogote	20° 37.07' 98° 49.50'	1280	80°	*	*	Matorral xerófilo

\* Datos ausentes.

con un patrón de distribución espacial intra-poblacional agregado. La mayoría de los individuos se encontraron no asociados a nodrizas, aunque algunos individuos están asociados a musgos, selaginelas y mimosa.

El seguimiento de la población a través del tiempo (dos años) arrojó una tasa finita de crecimiento poblacional ( $\lambda = 1.004$ ), lo que sugiere que la población estudiada está cercana al equilibrio. Donde el proceso demográfico más importante es la permanencia y especialmente de los adultos más grandes, los que a su vez son los que contribuyen más a la producción de semillas. La máxima producción de flores y frutos se presenta en la época más seca del año (marzo y enero) (Matías-Palafox 2007; Jiménez-Sierra y Matías-Palafox 2015).

Las flores presentan síndrome melitófilo y requieren de entrecruza y el sistema de apareamiento es xenógamo obligado (Matías-Palafox 2007).

Las semillas de *T. horripilus* presentaron fotoblastismo positivo, es decir, requieren de luz para germinar (Matías-Palafox 2007), además, se sabe que no se presenta un banco de semillas ya que la viabilidad de estas se pierden en unos cuantos meses. Para *T. horripilus* la reproducción sexual es de gran relevancia, ya que no se ha observado éxito a través de propagación clonal (Matías-Palafox 2007).

#### b) Estudios genéticos de cactáceas

Los estudios sobre estructura genética que contribuyen a explicar la evolución a nivel infraespecífico en la familia Cactaceae se encuentran en su etapa inicial. De las más de 2,000 especies de cactáceas descritas, sólo se han analizado genéticamente alrededor de 28 especies silvestres, las cuales están comprendidas en 14 de los

cerca de 100 géneros reconocidos. Los cactus de hábito columnar y arbóreo han sido los más estudiados, seguidos de las formas globosas y arbustivas (Cornejo-Romero *et al.* 2013).

De las 28 especies silvestres estudiadas, el 25 % de los trabajos son de especies de amplia distribución, y el 75% de especies endémicas, de las cuales el 79 % pertenecen a México (Cornejo-Romero *et al.* 2013).

Los marcadores RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) han sido utilizados para el análisis de diversidad genética en algunas columnares (Nassar *et al.* 2003, Clark-Tapia *et al.* 2005; Figueroa *et al.* 2010) y en todos los estudios los resultados muestran valores altos de variabilidad genética ( $D = 0.987$ ) (Arenas 2015).

En Norte América el género más estudiado de la Tribu Cacteeae, corresponde a *Mammillaria*. Ibarra (2009) estimó varios atributos genéticos con cuatro microsatélites en *Mammillaria crucigera*, *M. napina* y *M. sphacelata*, las cuales son endémicas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán y mostraron una alta diversidad específica ( $H_E = 0.591$ , 0.722 y 0.699, respectivamente) con una baja diferenciación interpoblacional para las dos últimas especies ( $R_{ST} = 0.091$  y 0.103) y una mayor diferenciación para el caso de *M. crucigera* ( $R_{ST} = 0.591$ ). La estructura genética encontrada en *M. crucigera* y *M. napina* se asoció con su distribución discontinua y una endogamia local propiciada por sus polinizadores (himenópteros, dípteros y coleópteros). La deriva génica puede ser otro factor que propicia la estructuración genética cuando las poblaciones están formadas por un número reducido de individuos. Para el caso de *M. sphacelata*, se ha sugerido que la estructuración poblacional es resultado de la endogamia, ya que

sus poblaciones no son muy pequeñas pero presentan reproducción asexual y dispersión de rametos (Ibarra 2009; Tapia 2011).

En un estudio con microsatélites de *Mammillaria zephyranthoides* se encontró una alta diversidad específica ( $H_E = 0.725$ ) aunque la diferenciación entre sus poblaciones fue moderada ( $R_{ST} = 0.053$ ) lo que se explica por el alto valor de flujo génico obtenido ( $Nm = 4.4$ ), a pesar de la gran distancia existente entre sus poblaciones (405 km) (López-Ortiz 2013). Para *M. supertexta* se encontró una diversidad alta ( $H_E = 0.73$ ), pero sin una diferenciación poblacional ( $R_{ST} = 0.113$ ) debido a que el flujo génico tiene un valor de  $Nm = 5.17$  (Cuevas-Alducin 2013). Macias-Arrastio (2014) encontró para *Mammillaria solisoides* una diversidad alta ( $H_E = 0.68$ ) y estructura genética moderada.

Esparza Olgún (2005), utilizando isoenzimas, encontró una alta diversidad en cactáceas columnares, en tres especies del género *Neobuxbaumia* en el VTC: *N. macrocephala*, *N. mezcalaensis* y *N. tetetzo*, siendo la primera especie de distribución más restringida y la segunda especie de distribución más amplia. La diversidad genética de las tres columnares es relativamente alta ( $H_E = 0.335, 0.402$  y  $0.307$ , respectivamente) y no se encontró relación con el grado de rareza. Además, la alta diversidad observada en *N. macrocephala* sugiere que la especie proviene de poblaciones más amplias y que probablemente transitó por un cuello de botella reciente.

El estudio con nueve microsatélites de otra cactácea arbórea *Pilosocereus machrisii* de Brasil, mostró una alta diversidad genética ( $H_E = 0.38$ ) y la presencia de un gran

número de alelos raros entre sus poblaciones, lo que ha sugerido la existencia de eventos de expansión - contracción de los ambientes áridos que han favorecido el aislamiento de poblaciones pequeñas, la presencia de endogamia biparental, la selección contra heterocigotos y la restricción de flujo génico por largos períodos. La diferenciación interpoblacional así como la falta de 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 los hábitats xéricos (Moraes *et al.* 2005; Pennington *et al.* 2000).

Jiménez-Sierra (2008) utilizando isoenzimas en seis poblaciones de *Echinocactus platyacanthus* del valle de Tehuacan-Cuicatlán, obtuvo muy baja variación genética y baja estructuración poblacional ( $F_{ST} = 0.003$ ), lo que podía ser explicada por la cercanía relativa de las poblaciones estudiadas; Barrios-Gómez (2013), trabajando con poblaciones de todo el rango de distribución de la especie y seis microsatélites encontró una alta diversidad genética a nivel de especie ( $H_E = 0.694$ ) y una baja diferenciación entre las poblaciones ( $F_{ST} = 0.021731$ ). Estos resultados apoyan la hipótesis de que históricamente las poblaciones formaban un continuo en su distribución, y que su aislamiento ha sido reciente debido a la fragmentación del hábitat por factores geológicos, aunados a los factores antropogénicos mucho más recientes, cuyos efectos aún no se ven reflejados en la distribución de la diversidad actual.

Arenas (2015) con base en secuencias de ADN del cloroplasto de *Stenocereus thurberi* una especie de cactácea columnar que se distribuye en la península de Baja

California y en el continente, encontró una alta variabilidad genética para cada grupo ( $Hd = 0.713$  y  $0.813$ , respectivamente), aunque la estructura poblacional dentro de dichos grupos difiere ( $G_{ST} = 0.358$  y  $0.143$ , respectivamente), lo cual se relacionó con eventos de vicarianza y eventos recientes de dispersión a larga distancia a través del Golfo de Baja California llevada a cabo por murciélagos que son los polinizadores y dispersores de esta especie (Cornejo-Romero, 2012).

## **2.9 Área de estudio**

Las poblaciones de *T. horripilus* se distribuyen dentro de la Reserva de la Biósfera Barranca de Metztitlán (RBBM) (Hgo). Ésta fue decretada el 27 de noviembre del 2000. Comprende la cuenca de la Barranca de Metztitlán, entre los paralelos  $98^{\circ} 23' 00''$  y  $98^{\circ} 57' 08''$  longitud oeste y  $20^{\circ} 14' 15''$  y  $20^{\circ} 45' 26''$  latitud norte, con elevaciones que varían entre 1000 a 2000 msnm (CONANP 2003) (Figura 2). Abarcando una superficie total de 96,042.94 hectáreas que se extienden a lo largo de 6 Municipios: Metepec, Acatlán, Huasca de Ocampo, Atotonilco el Grande y San Agustín Metztitlán (Eguiarte y Scheinvar 2008).

La RBBM posee una alta diversidad de especies animales y vegetales y es considerada un refugio pleistocénico de la biota desértica mexicana. Esta reserva, es de especial importancia porque funciona como corredor biológico de las zonas áridas del altiplano del país (Sánchez-Mejorada 1978; CONANP 2003, Matías-Palafox y Jiménez-Sierra 2006; Matías-Palafox 2007; Eguiarte y Scheinvar 2008).

La RBBM presentan dos tipos de clima: seco semicálido con régimen de lluvias en verano (BS0hw) en el Norte y Centro, y semiseco templado con régimen de lluvias en

verano (BS1kw) en el Sur. La temperatura media anual es de 18° C a 22° C y la precipitación media anual no rebasa los 500 mm (CONANP 2003).

Los tipos de vegetación que alberga la reserva son: Bosque tropical caducifolio, Bosque de coníferas, Matorral xerófilo, Matorral submontano, Pastizal y Vegetación ribereña (Eguiarte y Scheinvar 2008).

La flora presente en la Reserva pertenece en su mayoría a la provincia florística de la Altiplanicie, la cual se encuentra constituida por elementos de afinidad geográfica meridional y boreal, además de presentar un gran número de elementos autóctonos y endémicos (Eguiarte y Scheinvar 2008, Sánchez-Mejorada 1978; CONANP 2003).

En este lugar la familia Cactaceae se encuentra representada por alrededor de 70 especies, de las cuales el 11.42% son especies endémicas y al menos el 15% están consideradas en alguna categoría de riesgo por la Norma Ecológica NOM-059-ECOL-2001 (Matías-Palafox y Jiménez-Sierra 2006; Sánchez-Mejorada 1978).

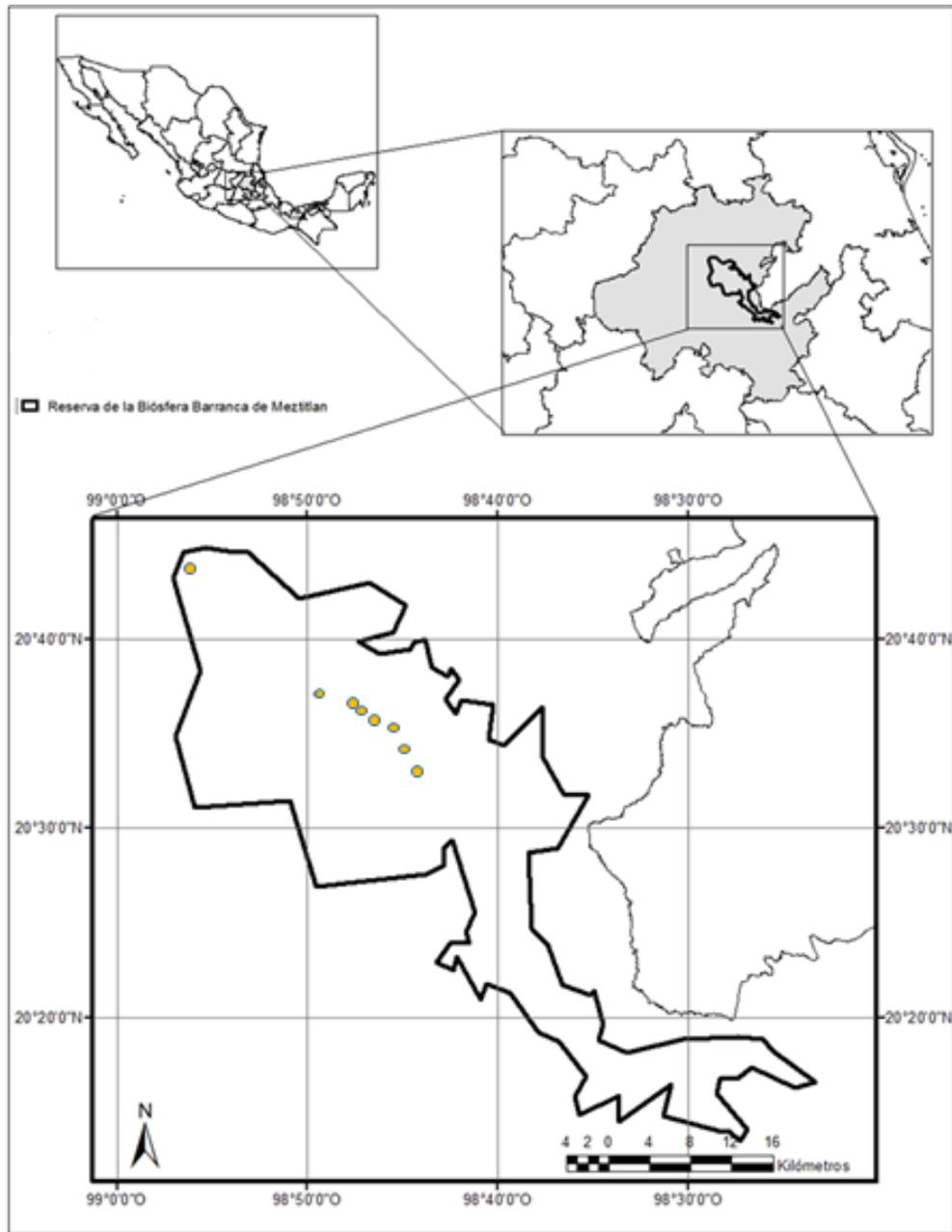


Figura 2. Polígono y ubicación de la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán en el estado de Hidalgo y distribución de las poblaciones de *Turbinicarpus horripilus*.

## **2.10 Justificación**

En este trabajo se aborda el estudio de la diversidad genética de *T. horripilus*, cactácea endémica de un Municipio del Estado de Hidalgo, cuyo rango de distribución espacial es restringido y sus poblaciones son pequeñas en número y se encuentran aisladas unas de otras. Aunque, los estudios de la dinámica poblacional indican que la población estudiada se encuentra estable, los hábitats donde la especie se presenta están sujetos a diversos tipos de disturbios. Los resultados de este estudio, aportaran datos genéticos que apoyaran el planteamiento de planes de manejo con la finalidad de lograr una protección gubernamental que favorezca la permanencia de la especie.

## **3.- PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN**

A través de este trabajo se pretenden contestar las siguientes preguntas: ¿Cuál es la diversidad genética de *T. horripilus*? ¿Cómo se encuentra repartida esta diversidad dentro y entre las poblaciones? ¿Cómo puede explicarse la estructura encontrada? y ¿Cuáles son las poblaciones que deben ser protegidas para garantizar la conservación de la diversidad genética de la especie?

## **4.- HIPÓTESIS**

- Debido a que *Turbinicarpus horripilus* es una especie “microendémica” esperamos encontrar una baja diversidad genética dentro de la especie en comparación con la encontrada en otras especies de cactáceas globosas con más amplia y continua distribución geográfica.

- Debido a que las poblaciones de *T. horripilus* ocupan pequeñas extensiones en localidades aisladas unas de otras por varios kilómetros y a que los polinizadores son pequeños himenópteros (abejas) y la dispersión de semillas es limitada (hormigas, agua y viento) es probable que se encuentren diferencias genéticas entre sus poblaciones (alelos exclusivos o diferentes frecuencias génicas) siendo estas diferencias más acentuadas entre las poblaciones más lejanas o aisladas del resto.

## **5.- OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

- Determinar la estructura genética de cuatro poblaciones de *T. horripilus* a través del uso de marcadores genéticos (microsatélites o secuenciación de ADNc).

### **5.2 Objetivos específicos**

- Realizar el inventario de diversidad genética de las poblaciones de la especie.
- Determinar la distribución de la diversidad génica dentro y entre poblaciones de *T. horripilus*.
- Relacionar la información obtenida con los patrones de aislamiento geográfico presente entre sus poblaciones.
- Comparar los resultados obtenidos con los hallazgos en otras especies de cactáceas con historias de vida similares.

- Determinar las estrategias óptimas para la conservación de la especie tomando en cuenta la información genética obtenida en este estudio.

## 6.- MÉTODO

### 6.1 Poblaciones seleccionadas

Se trabajó con material colectado de cuatro poblaciones de *T. horripilus*: Almolón, Cerro (El Mogote), Jilotla y Santuario (Figura 3; Tabla 2), ubicadas dentro de la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán, en el estado de Hidalgo, tratando de cubrir el rango de distribución geográfica de la especie (Figura 4).



Figura 3. Poblaciones seleccionadas de *T. horripilus*. a) Almolón, b) Cerro, c) Jilotla, d) Santuario.

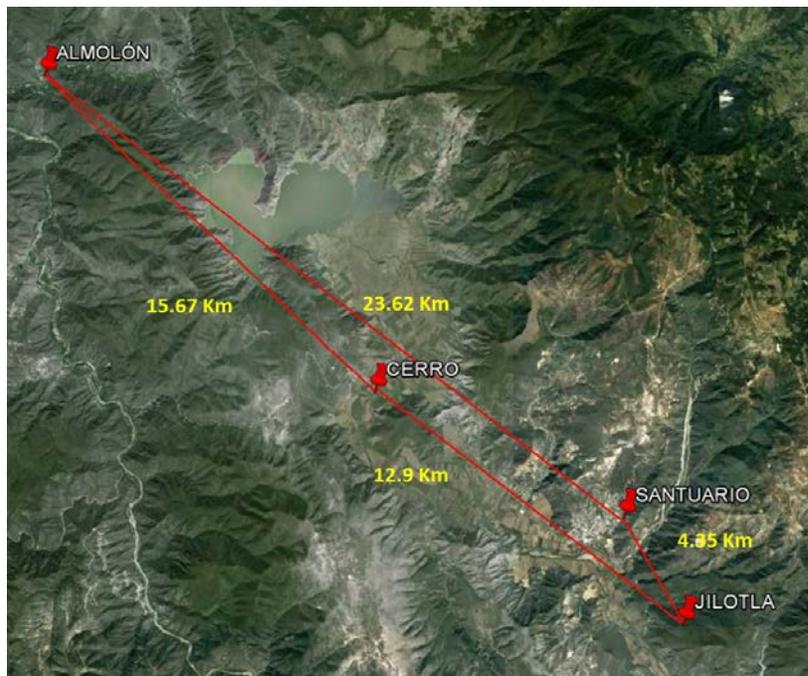


Figura 4. Distancias geográficas entre las poblaciones seleccionadas de *T. horripilus*.

Tabla 2. Poblaciones seleccionadas. Se muestra la ubicación de las poblaciones, las características ambientales y la densidad de cada población (Tomado de Matías-Palafox y Jiménez-Sierra (2006) y Matías-Palafox (2007)).

Localidad	Ubicación geográfica	Altitud (msnm)	Pendiente (°)	Área estimada (m <sup>2</sup> )	Densidad (Ind/m <sup>2</sup> )	Comunidad vegetal
1. Almolón	20° 43.727' 98° 56.231'	1020	30°	250	0.08	Matorral xerófilo
2. Cerro	20° 37.07' 98° 49.50'	1280	80°	*	*	Matorral xerófilo
3. Jilotla	20° 33.08' 98° 44.22'	1468	45°	150	0.33	Matorral xerófilo
4. Santuario	20° 35.318' 98° 45.468'	1294	60°	900	0.74	Matorral xerófilo

\* Datos ausentes

## **6.2 Colecta de material biológico**

Se determinaron los límites de distribución de las poblaciones seleccionadas. Se seleccionaron 30 individuos/población. Se procuró que los individuos seleccionados estuviesen alejados uno de otros ( $> 5$  m) para evitar problemas de parentesco entre ellos y procurando cubrir el área completa de distribución de cada población. Los individuos seleccionados estuvieron constituidos por al menos dos ramas para no poner en riesgo la sobrevivencia de los individuos. Se colectaron de 3 a 5 tubérculos por individuo usando para ello un cúter (Figura 5), y la superficie cortada fue cubierta con cera de campeche con el fin de evitar la entrada de patógenos. Las muestras de tejido fueron envueltas en papel aluminio y depositadas individualmente en bolsas de plástico debidamente etiquetadas. El material fue depositado en hieleras con hielo seco para ser transportadas al laboratorio Divisional de Biología Molecular donde fueron almacenadas en un ultracongelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Debido a que la población de Santuario es muy pequeña, no se realizó colecta de tejido de los adultos, sino que se procedió a colectar los frutos para la obtención de semillas de los individuos seleccionados.



Figura 5. Colecta de tejido en el campo.

### 6.3 Germinación de las semillas

Se extrajeron las semillas de los frutos colectados en la población Santuario y se procedió a su siembra.

El proceso de siembra se hizo siguiendo a Reyes (1997): a) Activación: Las semillas fueron sumergidas por 24 horas en agua caliente (50°C); b) Se desinfectaron mediante un lavado con una solución de hipoclorito de sodio al 30%; c) Se sumergieron unos minutos en una solución con fungicida (1 g de Captan en 100 ml de agua destilada).

La siembra se realizó en frascos de plástico transparente de boca ancha debidamente desinfectados. En cada frasco se colocaron 150 gr de tierra comercial

para cactáceas (70% de tepojal, 20% de tierra negra y 10% de composta) debidamente esterilizada) (Figura 6). El sustrato fue llevado a saturación con agua destilada y se colocaron 15 semillas de la misma planta por frasco. Los frascos fueron tapados para evitar la deshidratación y la contaminación y se colocaron en una cámara de crecimiento (Lumistell<sup>MR</sup>) del Laboratorio de Ecología manteniéndolos a 25°C (12 hrs luz/12 hrs oscuridad).



Figura 6. Colocado de las semillas en frascos con tierra para cactáceas.

#### **6.4 Extracción del ADN.**

Se tomaron de 1 a 2 tubérculos por muestra (0.12 gr), estos fueron macerados con la ayuda de un mortero con un pistilo (previamente esterilizados y mantenidos a -80° C) y nitrógeno líquido para obtener un polvo fino.

La extracción de ADN se hizo utilizando el Kit de extracción DNeasy Plant Mini kit de QIAGEN (Quiagen, Valencia, CA, USA) que ha mostrado ser eficiente con diversas

especie de cactáceas (Cornejo-Romero 2013; Barrios-Gómez 2013). El protocolo de extracción se describe en el Anexo 1.

Una vez extraído el ADN, se verificó la cantidad y concentración por muestra (ng/μl) utilizando para ello un espectrofotómetro (Nanodrop 2000 UV-VIS, Thermo scientific). Para visualizar el ADN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, a 90 V durante 30 min y fueron teñidos con 0.3 μl de gel red.

Las bandas fueron reveladas en el fotodocumentador (gelLogic y la imagen digital del gel se obtuvo mediante el uso del programa Carestream.

## **6.5.- Microsatélites**

### 6.5.1 Selección y amplificación de microsatélites

Se probaron doce primers o cebadores de microsatélites del ADN nuclear, diseñados para especies cercanas filogenéticamente a *T. horripilus* (Figura 7), de ellos ocho fueron diseñados para *Ariocarpus bravoanus*, dos para *Mammillaria crucígera* y dos para *Equinocactus grusonii* (Tabla 3), que son especies de cactáceas que presentan forma de crecimiento globoso o toneliforme.

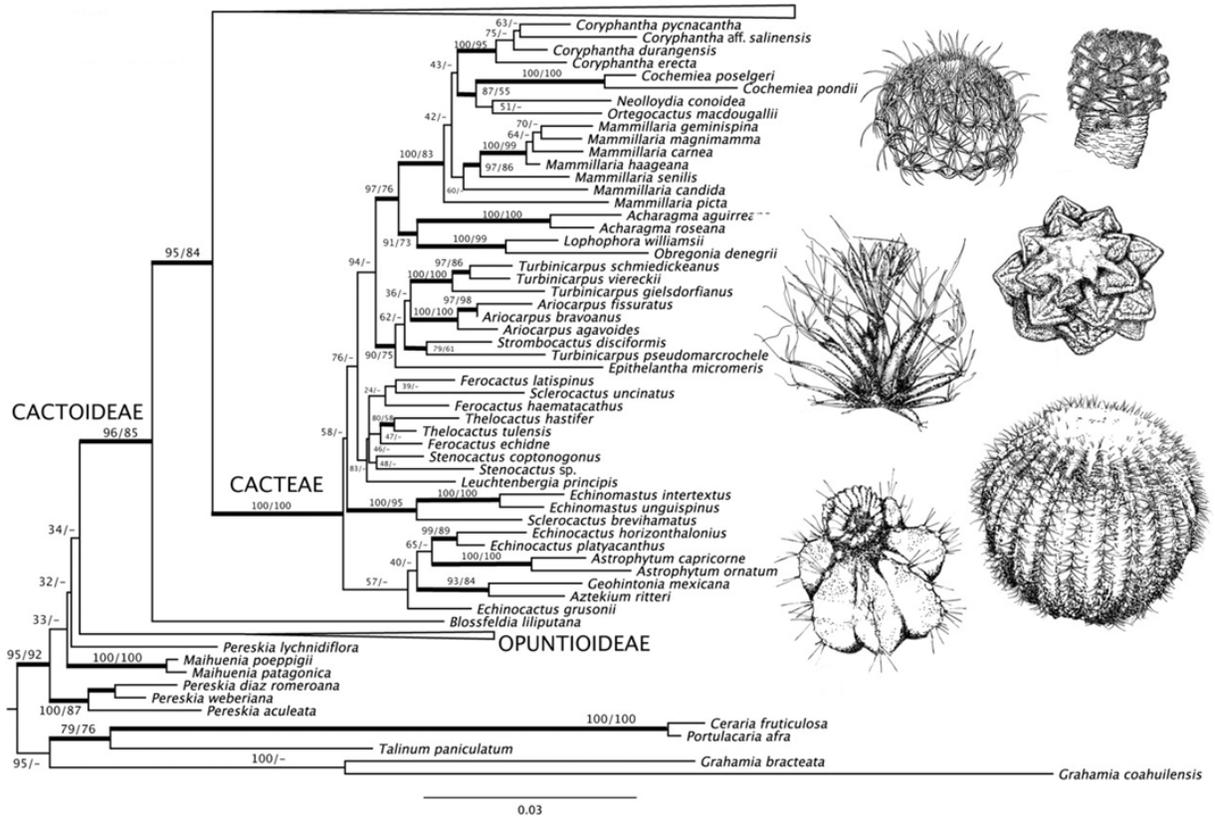


Figura 7. Árbol filogenético de máxima verosimilitud para Cactaceae derivado de los análisis de cinco loci, que muestra el clado Cacteae y las relaciones dentro de ella (Tomado de Hernández-Hernández *et al.* 2011).

Tabla 3. Primers de microsatélites probados en este estudio.

<b>Locus</b>	<b>Ta (°C)</b>	<b>Motivos de repetición</b>	<b>Tamaño de alelos</b>	<b>Especie para la cual se diseñaron los primers</b>	<b>Fuente</b>
mAbR05	53.8	(AG) <sub>9</sub>	293-300	<i>Ariocarpus bravoanus</i>	Hughes <i>et al.</i> (2008)
mAbR28	53.8	(AG) <sub>7</sub>	207-222	<i>Ariocarpus bravoanus</i>	Hughes <i>et al.</i> (2008)
mAbR40	51.4	(TCT) <sub>2</sub> (CT) <sub>3</sub> TT (CT) <sub>10</sub>	238-301	<i>Ariocarpus bravoanus</i>	Hughes <i>et al.</i> (2008)
mAbR42	53.8	(TC) <sub>10</sub>	196-217	<i>Ariocarpus bravoanus</i>	Hughes <i>et al.</i> (2008)
mAbR77	51.4	(AG) <sub>4</sub> CG(AG) <sub>11</sub>	346-374	<i>Ariocarpus bravoanus</i>	Hughes <i>et al.</i> (2008)
mAbR82	51.4	(AG) <sub>20</sub>	245-259	<i>Ariocarpus bravoanus</i>	Hughes <i>et al.</i> (2008)
mAbR86	53.8	(TC) <sub>11</sub> (TG) <sub>2</sub>	432-452	<i>Ariocarpus bravoanus</i>	Hughes <i>et al.</i> (2008)
mAbR91	53.8	(CT) <sub>8</sub> CGC(TC) <sub>8</sub>	329-360	<i>Ariocarpus bravoanus</i>	Hughes <i>et al.</i> (2008)
mEgR02	56	(AG) <sub>10</sub> AC(AG) <sub>2</sub> AC(AG) <sub>7</sub>	260-268	<i>Echinocactus grusonii</i>	Hardesty <i>et al.</i> (2009)
mEgR73	56	(AG) <sub>7</sub> TTGCAA(AG) <sub>2</sub>	183-189	<i>Echinocactus grusonii</i>	Hardesty <i>et al.</i> (2009)
MamVTC11	58	(GA) <sub>24</sub>	222-235	<i>Mammillaria crucigera</i>	Solórzano <i>et al.</i> (2009)
MamVTC12	58	(TC) <sub>4</sub> AT(TC) <sub>10</sub> (C) <sub>4</sub> TC(TG) <sub>4</sub>	222-240	<i>Mammillaria crucigera</i>	Solórzano <i>et al.</i> (2009)

Los pares de microsatélites se ensayaron en PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) individual a un volumen final de 12.5  $\mu$ M, que contenían: Primer Forward 0.25  $\mu$ M, Primer Reserve 0.25  $\mu$ M, cola M-13 0.75  $\mu$ M, Master Mix 6.25  $\mu$ M, MgCl<sub>2</sub> [50  $\mu$ M] 0.15  $\mu$ M, 2.5 de ADN y 2.35  $\mu$ M de agua. En la Tabla 4 se presentan los ciclos de PCR utilizados para cada uno de los primers. La PCR se realizó en un Termociclador SelectCycler (BioProducts).

Tabla 4. Ciclos de PCR para cada uno de los primers probados.

<b>Microsatélite</b>	<b>Desnaturalización</b>	<b>Alineamiento</b>	<b>Extensión</b>
mAbR05, mAbR28, mAbR40, mAbR42, mAbR77, mAbR82 mAbR86 y mAbR91	94 °C /1 min	35 ciclos: (94° C/1 min), (51.4 - 53.8°C / 1 min) y (72°C / 1min)	72 °C / 7 min
mEgR02 y mEgR73	94 °C /1 min	35 ciclos: (94°/1 min), (56°c / 1 min) y (72°c / 1min)	72 °C /7 min
MamVTC11 y MamVTC12	94 °C /2 min	25 ciclos: (94°C/10 seg), (58°C / 10 seg) y (72°C / 1min)	72 °C /10 seg

Para confirmar la amplificación de los microsatélites, se realizó la separación de los productos por electroforesis, en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed (BIOTUM) al 0.3  $\mu$ M. Se utilizó un marcador de peso de 50 pb, para estimar el tamaño de los fragmentos, durante 40 min a 90 V y se observaron con luz ultravioleta y los tamaños de los alelos se determinarán con el programa Peak Scanner™ Versión 1.0 (Applied Biosystem).

Debido a que no se obtuvo éxito con los primers seleccionados para el estudio de microsatélites se optó por explorar resultados con la técnica de secuenciación de ADNc.

## **6.6.- Secuenciación de ADNc**

Se eligieron tres primers universales de regiones no codificantes del cloroplasto que han sido adecuados para una gran gama de especies vegetales (Tabla 5) (Arenas 2015). Las regiones estudiadas fueron: el fragmento intergénico *rp132-trnL* que se encuentra en la sección corta de copia única (Shaw *et al.* 2005), el intrón D4 del fragmento pet B (*petB* intrón D4) y el fragmento intergénico *trnL-trnF* de Taberlet *et al.* (1991) que está en la sección larga de copia única (Tabla 6; Figura 8).

La amplificación de las tres regiones seleccionadas se llevó a cabo mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) en un volumen final de 12.5  $\mu$ M, que contenía: 0.37  $\mu$ M de cada primer, 6.25  $\mu$ M de Master Mix (PROMEGA), 4  $\mu$ M de ADN, 0.5  $\mu$ M de agua y 1  $\mu$ M de BSA (albúmina de suero bovino) al 0.4 %. En las Tablas 7, 8, 9 se presentan las condiciones de amplificación utilizadas para cada región. Para ello se utilizó un Termociclador SelectCycler (BioProducts). Las condiciones de amplificación fueron modificadas a partir de Shaw (2007), Parra (2015), Soto-Trejo (2015) y Arenas (2015).

Tabla 5. Especies estudiadas con los primers seleccionados para nuestro estudio.

<b>Especie</b>	<b>Regiones</b>	<b>N</b>	<b>pb</b>	<b>Referencia</b>
<b><i>Cephalocereus senilis</i></b>	<i>trnL-trnF</i>	55	876	Brito-Castrejón (en proceso)
<b><i>Stenocereus thurberi</i></b>	<i>trnL-trnF</i> , <i>rpl32-trnL</i> , <i>petB</i> intrón D4	165	2338	Arenas-Jiménez (2015)
<i>Agave kerchovei</i>	<i>trnL-trnF</i> , <i>petA-psbJ</i> <i>rpl32-trnL</i>	128	2188	Parra-Leyva (2015)
<i>Agave stricta</i>	<i>trnL-trnF</i> , <i>rpl32-trnL</i> <i>psbJ-peta</i>	54	2100	Martínez-Ainsworth (2013)
<i>Agave striata</i>	<i>trnL-trnF</i> , <i>rpl32-trnL</i> <i>psbJ-peta</i>	57	2100	Martínez-Ainsworth (2013)
<i>Fouquieria shrevei</i>	<i>rpl32-trnL</i> , <i>psbJ-petA</i> <i>ndhF-rpl32</i>	94	2769	Aguirre-Liguori (2012)
<i>Quercus variabilis</i>	<i>trnL-trnF</i> , <i>atpB-rbcL</i> , <i>trnH-psbA</i>	528	167	Chen <i>et al.</i> (2012)
<i>Camellia taliensis</i>	<i>rpl32-trnL</i>	183	858	Liu <i>et al.</i> (2012)
<i>Podocarpus matudae</i>	<i>trnL-trnF</i> , <i>trnH-psbA</i>	157	1034	Ornelas <i>et al.</i> (2010)
<i>Aspladium hookerianum</i>	<i>trnF-trnL</i>	242	929	Shepherd <i>et al.</i> (2007)
<i>Primula secundiflora</i>	<i>trnL-trnF</i> , <i>rps16</i>	109	877	Wang <i>et al.</i> (2008)

N = Número de individuos; pb = Pares de bases; con negritas especies de cactáceas.

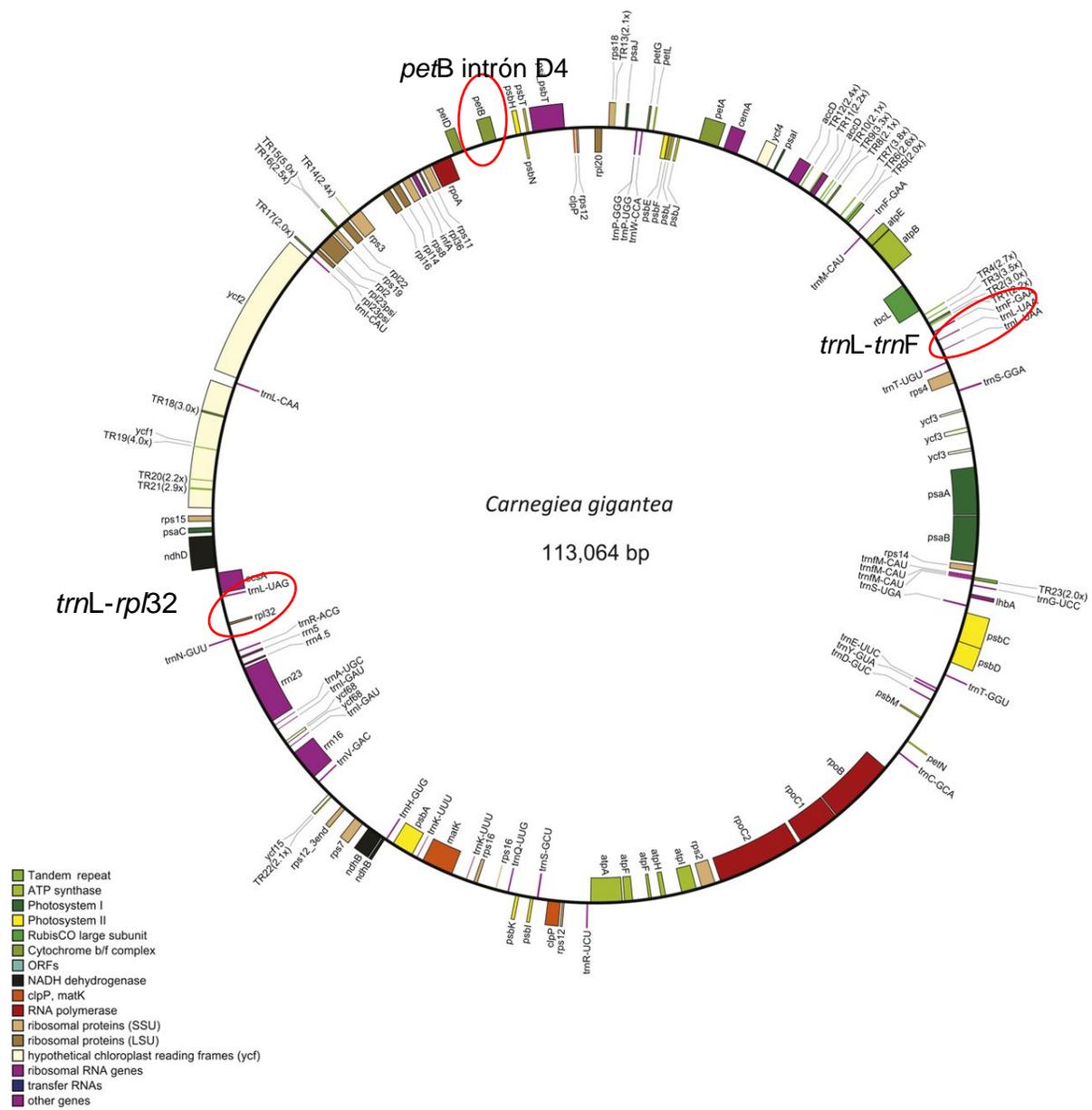
**Tabla 6.** Secuencia de los primers seleccionados para el presente estudio. Se muestra el tamaño esperado de amplificación y la referencias.

Gen	Primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño esperado (pb)	Referencia
<i>petB</i> intrón D4	sak23F(exon/D1)	GGARTAATGAGTGTGTGACTT G	386	Taberlet <i>et al.</i> (1991)
	sak24R(D5)	ATRTGAGANTTTTCATCTCGTAC		
<i>trnL-rpl32</i>	<i>trnL</i> (UAG)	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	649	Shaw <i>et al.</i> (2005)
	<i>rpl32F</i>	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG		
<i>trnL-trnF</i>	<i>trnL</i> 5'UAAF(TabC)	CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT	983	Taberlet <i>et al.</i> (1991)
	<i>trnF</i> 5'UAAF(TabF)	CAG TTC CAAA AAA AA GTA CTT CG		

Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con GelRed (BIOTUM) al 0.3  $\mu$ M. Se utilizó un marcador de peso de 50 pb, para estimar el tamaño de los fragmentos, durante 30 min a 90 V y finalmente se observaron con luz ultravioleta.

Los productos de PCR se purificaron con columnas Centrisep con Shephadex™ G-50 fine DNA Grade (100g), de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo con Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). El producto se purificó en columnas Centrisep (Invitrogen) con sephadex. Las muestras fueron secuenciadas automáticamente en sentido 3'-5' y 5'-3' en el equipo ABI PRISM 3130XL (Applied Biosystems Hitachi) del Laboratorio Divisional de Biología Molecular (LDBM) de la UAM-Iztapalapa.



**Figura 8.** Genoma del cloroplasto del saguaro (*Carnegiea gigantea*), donde se muestran la ubicación de las secciones de ADN estudiadas (Tomado de Sanderson *et al.* 2015).

Tabla 7. Condiciones de amplificación para la región *petB* intrón D4 (Arenas 2015).

<b>Proceso</b>	<b>T ° C</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización			
Inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	0.5	} 35
Alineamiento	56	0.5	
Extensión	72	1	
Extensión final	72	5	1

Tabla 8. Condiciones de amplificación para la región *trnL-rp32* (Soto-Trejo 2015).

<b>Proceso</b>	<b>T ° C</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización			
Inicial	94	5	1
Desnaturalización	94	0.4	} 35
Alineamiento	58	0.4	
Extensión	72	1.20	
Extensión final	72	5	1

Tabla 9. Condiciones de amplificación para la región *trnL-trnF* (Taberlet *et al.* 1991).

<b>Proceso</b>	<b>T ° C</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización			
Inicial	88	5	1
Desnaturalización	94	1	} 35
Alineamiento	55	1	
Extensión	72	2	
Extensión final	72	5	1

Cada secuencia obtenida fue sometida a un análisis de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide por sus siglas en Inglés) (Altschul *et al.* 1990) en la base de datos de GenBank para verificar su autenticidad.

Las secuencias fueron revisadas en pares (*forward* y *reverse* de cada secuencia) con el programa Sequencer 5.4 con el objetivo de obtener una secuencia consenso con calidad y lo más completa posible.

El alineamiento de las secuencias se llevó a cabo en el programa BioEdit v7.2.5 (Hall 1999) utilizando el algoritmo Clustal W. La alineación se hizo por separado para cada marcador y se verificó la alineación obtenida empleando la visualización de los cromatogramas cuando fue necesario.

Para aquellos individuos que se pudieron amplificar las tres regiones se concatenaron las secuencias con el programa Mesquite (Maddison y Maddison 1997).

#### 6.6.1 Análisis estadísticos

Los análisis de diversidad genética se realizaron utilizando el programa DNAsp v5.0 (Librado y Rozas 2009). Se estimó la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) que es la probabilidad de que dos nucleótidos con homología de posición tomados al azar sean diferentes; la diversidad haplotípica ( $Hd$ ) que es la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar sean diferentes; el número de haplotipos ( $h$ ) que es el número de alelos que tiene cada región y el número de sitios polimórficos o segregantes ( $s$ ) que es el número o proporción de sitios variables en las secuencias (Nei 1972; Nei 1978; Zarate 2013).

Para estimar la estructura genética dentro y entre las poblaciones se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA), mediante el programa ARLEQUIN 3.0 (Excoffier *et al.* 2005). Se realizó uno para cada marcador y otro para las secuencias concatenadas.

Las relaciones filogenéticas entre los haplotipos de los tres genes fueron evaluadas usando el método Bayesiano. Para los análisis filogenéticos se incluyeron 77 secuencias para el gen *petB* intrón D4, 53 para el gen *trnL-rp32* y 34 para el gen *trnL-trnF* y para el concatenado final 19 secuencias, además se incluyeron secuencias de otras cactáceas como grupos externos (Anexo 2).

Se usaron como grupos externos trece secuencias pertenecientes a las siguientes especies: *Ariocarpus kotschobeyanus*, *Stenocereus thurberi*, *Echinocactus platyacanthus*, *Cephalocereus senilis*, *Eulychnia iquiquensis*, *Copiapoa desertorum*, *Ariocarpus brovoanus*, *Strombocactus diciformis*, *Turbinicarpus viereckii*, *Echinocactus grusoni* y *Astrophytum ornatum* (Anexo 2).

La selección del modelo evolutivo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajustó a las matrices, se realizó en el programa Modeltest v.3.7 (Posada y Crandall, 1998) bajo los criterios de hierarchical Likelihood Ratio Test (hLRT) y Akaike Information Criterion (AIC). El modelo Jukes Cantor (JC) fue seleccionado como el modelo de sustitución de nucleótidos que más se ajustó a las matrices de los tres genes estudiados.

La filogenia bayesiana fue construida en el programa MrBayes v. 3.1.2 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001) con los modelos evolutivos seleccionados por el ModelTest, cinco cadenas de Markov y 10 000 000 de generaciones.

Para evaluar las relaciones genealógicas entre haplotipos y su distribución geográfica se construyeron redes de haplotipos mediante el método Median-Joining (Bandelt *et al.* 1999) implementado en el programa Network v 5.0 (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>).

Para determinar la diferenciación genética entre los grupos obtenidos en las matrices de los genes se realizaron análisis de distancia genéticas estimadas por el método de Tamura y Nei (1993) en el programa MEGA V. 5.05 (Tamura *et al.* 2011). Para evaluar la posible correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas para cada gen, se empleó el programa Mantel 2.0 (Liedloff, 1999). Se calculó la distancia geográfica (en kilómetros) entre poblaciones con el programa Google Earth 6.2, al cual se ingresaron las coordenadas de las cuatro localidades muestreadas.

## **7. RESULTADOS**

El número de extracciones de ADN por población fue variable (de 20 a 30 individuos por población; Tabla 10), esto debido a dificultades presentadas en el proceso de extracción del ADN con algunos individuos. Las concentraciones de ADN y su pureza fueron verificadas por medio del Nanodrop (Tabla 11).

Para verificar la integridad del ADN obtenido se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 0.8% y estas fueron visualizadas con luz ultravioleta (Figura 9).

Tabla 10. Número de extracciones de ADN por población

<b>Población</b>	<b>Número de extracciones</b>
Almolón	29
Cerro	30
Jilotla	24
Santuario	20

Tabla 11. Concentración promedio de ADN (ng/μl) de las población de *T. horripilus* estudiadas.

<b>Población</b>	<b>Número de individuos</b>	<b>Concentración promedio de ADN total (ng/μl)</b>	<b>Pureza (260/280)</b>
Almolón	29	3.2	1.7
Cerro	30	4.2	1.8
Jilotla	24	2.9	1.6
Santuario	20	1.7	1.4

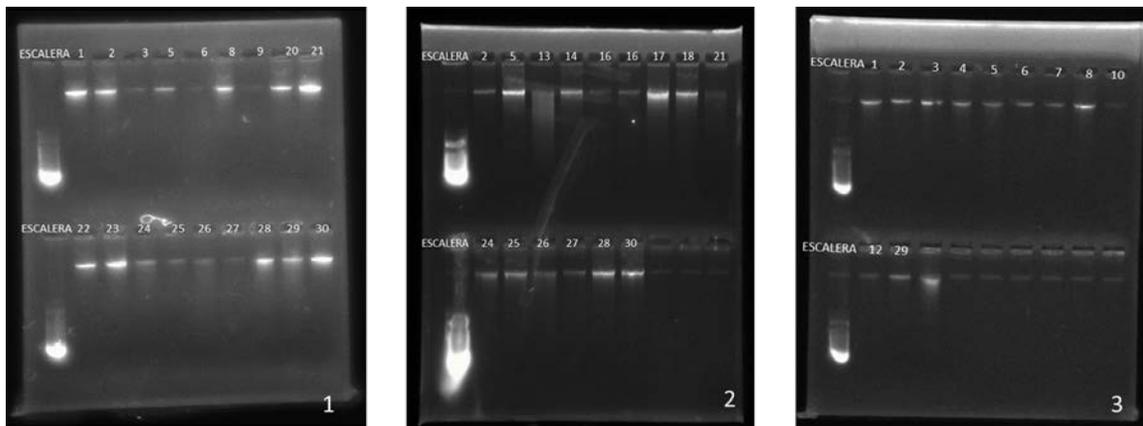


Figura 9. Visualización a través de geles de agarosa (al 0.8) del ADN obtenido en muestras de tres poblaciones: 1) Almolón 2) Cerro 3) Jilotla. La primera marca a la izquierda corresponde a la escalera (50 pb).

## 7.1 Microsatélites

### 7.1.1. Amplificación de microsatélites

En la Tabla 12, se presentan las condiciones sugeridas así como las modificaciones realizadas en este estudio para los siete de los 12 primers de microsatélites que amplificaron adecuadamente para las cuatro poblaciones estudiadas (Figura 10).

Los primers mAbR40, mAbR42, mAbR82, MamVTC11 y MamVTC12 no amplificaron, a pesar de que se realizaron diferentes modificaciones en las temperaturas de alineamiento y en la cantidad de  $MgCl_2$  (Tabla 13).

Tabla 12. Primers de microsatélites amplificados exitosamente con tejidos de *T. horripilus* de tres poblaciones. Se muestra el ajuste en las temperaturas utilizadas en este estudio.

<b>Locus</b>	<b>Temperatura reportada Ta (°C)</b>	<b>Motivos de repetición</b>	<b>Intervalo de tamaño de alelos</b>	<b>Ta (°C) Temperatura modificada</b>
mAbR05	53.8	(AG) <sub>9</sub>	293-300	52.4
mAbR28	53.8	(AG) <sub>7</sub>	207-222	
mAbR77	51.4	(AG) <sub>4</sub> CG(AG) <sub>11</sub>	346-374	
mAbR86	53.8	(TC) <sub>11</sub> (TG) <sub>2</sub>	432-452	52.4
mAbR91	53.8	(CT) <sub>8</sub> CGC(TC) <sub>8</sub>	329-360	52.4
mEgR02	56	(AG) <sub>10</sub> AC(AG) <sub>2</sub> AC(AG) <sub>7</sub>	260-268	
mEgR73	56	(AG) <sub>7</sub> TTGCAA(AG) <sub>2</sub>	183-189	

#### 7.1.2. Electroforesis de los microsatélites en secuenciador automático.

Se realizaron pruebas para determinar los tamaños de los alelos de los microsatélites en el secuenciador automático. Sin embargo, solo se pudieron visualizar los tamaños de los alelos para mEgR02.

Para el resto de los microsatélites amplificados no se tuvo éxito debido a que los fluoroforos de la cola M-13 no se adhirieron a los microsatélites. Debido a esto se abandonó el uso de microsatélites y se exploró la técnica de secuenciación del ADNc.

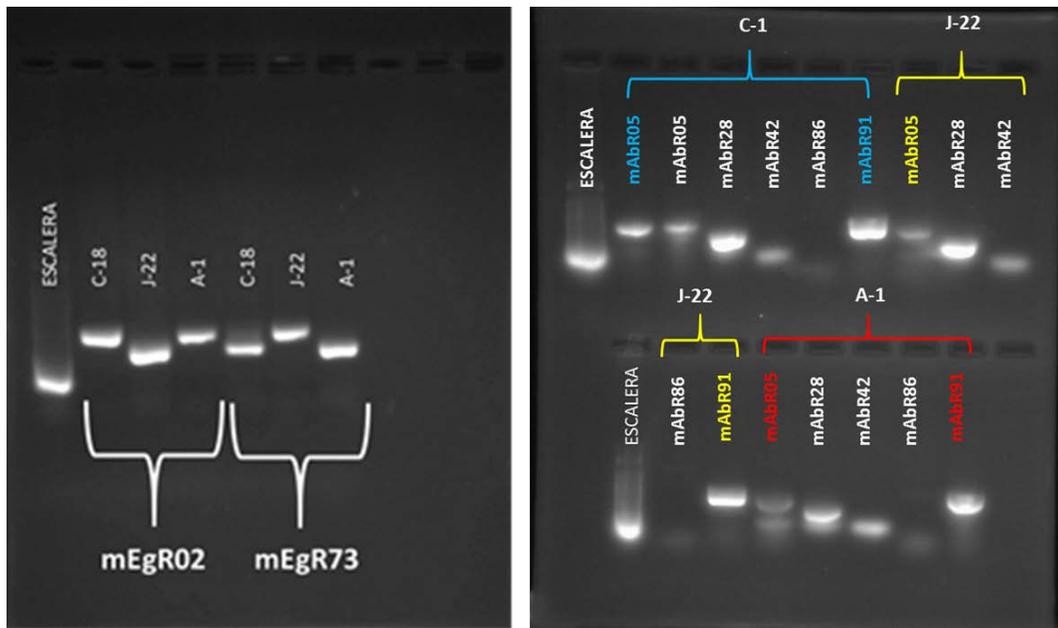


Figura 10. Imagen de la amplificación de los microsatélites mEgR02, mEgR73, mAbR05, mAbR28, mAbR42, mAbR86 y mAbR91 en geles de agarosa (1 %), mostrando individuos de cuatro poblaciones: C = Cerro, J = Jilotla y A = Almolón.

**Tabla 13.** Primers de microsatélites utilizados en otros estudios de cactáceas probados sin éxito. Se muestran las diferentes modificaciones de las condiciones probadas.

Locus	Ta (°C)	TA (°C) modificada	MgCl <sub>2</sub>	MgCl <sub>2</sub> modificado
mAbR40	51.4	50	0.15	0.3
mAbR42	53.8	52.4	0.15	0.3
mAbR82	51.4	50	0.15	0.45 y 0.3
MamVTC11	58		0.15	0.3
MamVTC12	58		0.15	0.3

## 7.2 Secuencias de ADNc

Se amplificaron tres regiones del cloroplasto (*petB* intrón D4, *trnL-rpl32* y *trnL-trnF*) para individuos de las cuatro poblaciones. El número de muestras por población fue variable debido a dificultades en la amplificación de los fragmentos del cloroplasto que presentaron algunos individuos (Tabla 14).

Al recortar las regiones iniciales y finales de los marcadores donde la secuenciación no fue eficiente, el tamaño de cada fragmento quedó en: 748 pares de bases de la región *petB* intrón D4, 1280 pb de *trnL-rpl32* y 1076 pb de *trnL-trnF*. Al concatenar las tres regiones se obtuvo una matriz de 3104 pb.

Tabla 14. Número de individuos secuenciados por población y región de ADNc

<b>Población</b>	<b><i>petB</i> intrón D4</b>	<b><i>trnL-rpl32</i></b>	<b><i>trnL-trnF</i></b>
<b>Almolón</b>	22	17	12
<b>Cerro</b>	23	22	11
<b>Jilotla</b>	19	16	9
<b>Santuario</b>	13	8	2

### 7.2.1 Diversidad genética

#### a) Diversidad genética en la región *petB* intrón D4

Este segmento presentó ocho *indels* (inserciones o deleciones) y dos sustituciones. Teniendo en cuenta los *indels* y sustituciones, *T. horripilus* presentó cuatro haplotipos (Tabla 15). El haplotipo A se encuentra solo en la población Santuario (n=13), el

haplotipo B es exclusivo de la población Almolón (n=22), el haplotipo C solo se encuentra en la población Cerro (n=23) y el haplotipo D solo le pertenece a la población Jilotla (n=19).

Tabla 15. Haplotipos detectados considerando *indels* y sustituciones en la región *petB* intrón D4.

Haplotipo	207	304	482	517	540	687-691
<b>A</b>	A	T	A	-	G	-----
<b>B</b>	G	-	A	A	A	-----
<b>C</b>	A	T	A	-	G	TATTC
<b>D</b>	A	T	-	-	G	-----

Los haplotipos obtenidos sin la variación de los *indels* se muestran en la Tabla 16. El haplotipo A1, lo comparten las poblaciones Cerro, Jilotla y Santuario (n= 55) mientras que el haplotipo B1, es exclusivo de la población Almolón (n=22). El número de sitios polimórficos resultantes es dos. La diversidad haplotípica ( $Hd$ ) fue de 0.414 y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) de 0.00112 (n=77) (Tabla 17).

Tabla 16. Haplotipos detectados para la región *petB* intrón D4 sin *indels*.

Haplotipo	207	540
<b>A1</b>	A	G
<b>B1</b>	G	A

Tabla 17. Estimadores de diversidad genética total del marcador *petB* intrón D4. N= número de individuos; Pb = Pares de bases; S= sitios polimórficos, *h*= número de haplotipos, *Hd*= Diversidad haplotípica,  $\pi$  = Diversidad nucleotídica.

<b>N</b>	<b>Pb</b>	<b>S</b>	<b><i>h</i></b>	<b><i>Hd</i></b>	<b><math>\pi</math></b>
77	748	2	2	0.414	0.00112

Considerando esta región, cada población es monomórfica, por lo que no se encuentra diversidad haplotípica ( $Hd = 0$ ), ni diversidad nucleotídica ( $\pi = 0$ ) (Tabla 18).

Tabla 18. Estimadores de la diversidad genética considerando la región *petB* intrón D4 por población: N número de individuos; Pb pares de bases S sitios polimórficos, *h* número de haplotipos, *Hd* Diversidad haplotípica,  $\pi$  Diversidad nucleotídica.

<b>Población</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b><i>h</i></b>	<b><i>Hd</i></b>	<b><math>\pi</math></b>
Almolón	22	0	1	0	0
Cerro	23	0	1	0	0
Jilotla	19	0	1	0	0
Santuario	13	0	1	0	0

#### b) Diversidad genética del marcador *trnL-rp32*

Este segmento presentó siete indels y trece sustituciones. Teniendo en cuenta *indels* y sustituciones, *T. horripilus* presentó cuatro haplotipos (Tabla 19). El haplotipo A, se encuentra sólo en la población Santuario (n=8), el haplotipo B, es exclusivo de la

población Almolón (n=17), el haplotipo C, solo se encuentra en la población Cerro (n= 22) y el haplotipo D, pertenece a la población Jilotla(n=16).

Tabla 19. Haplotipos detectados considerando *indels* y sustituciones en la región *trnL-rp132*.

Haplotipo	87	98	110	166	167	168	213	275	296	418	724	890	897	899	921	1024	1044	1104	1111	1150
A	T	A	A	T	T	A	G	T	A	G	C	A	T	A	-	C	C	A	T	G
B	C	C	T	-	-	-	G	G	.	A	A	-	G	G	T	C	C	-	C	A
C	C	C	T	T	T	A	A	T	A	A	C	A	T	A	-	A	A	A	T	G
D	T	A	A	T	T	A	G	T	A	A	C	A	T	A	-	C	C	A	T	G

Los haplotipos obtenidos sin considerar *indels* son cuatro. Cada población presenta un haplotipo diferente (Tabla 20). El haplotipo A1 se encuentra solo en la población Santuario (n=8), el haplotipo B1 es exclusivo de la población Almolón (n=17), el haplotipo C1 solo se encuentra en la población Cerro (n=22) y el haplotipo D1 solo le pertenece a la población Jilotla (n=16).

Tabla 20. Haplotipos de la región *trnL-rp132* sin *indels*.

Haplotipo	87	98	110	213	275	418	724	897	899	1024	1044	1111	1150
A1	T	A	A	G	T	G	C	T	A	C	C	T	G
B1	C	C	T	G	G	A	A	G	G	C	C	C	A
C1	C	C	T	A	T	A	C	T	A	A	A	T	G
D1	T	A	A	G	T	A	C	T	A	C	C	T	G

El número de sitios polimórficos fue de 13. La diversidad haplotípica ( $Hd$ ) fue de 0.736 y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) de 0.0041 ( $n=63$ ) (tabla 21).

Tabla 21. Estimadores de diversidad genética total del marcador trnL-rpl32. N número de individuos, Pb pares de bases, S sitios polimórficos,  $h$  número de haplotipos,  $Hd$  Diversidad haplotípica,  $\pi$  Diversidad nucleotídica.

<b>N</b>	<b>Pb</b>	<b>S</b>	<b><math>h</math></b>	<b><math>Hd</math></b>	<b><math>\pi</math></b>
63	1280	13	4	0.736	0.0041

Los estimadores de diversidad para cada población muestran que todas las poblaciones son monomórficas y la diversidad haplotípica y nucleotídica es nula dentro de las poblaciones (Tabla 22).

Tabla 22. Estimadores de la diversidad genética para las poblaciones. N número de individuos, Pb pares de bases, S sitios polimórficos,  $h$  número de haplotipos,  $Hd$  Diversidad haplotípica,  $\pi$  Diversidad nucleotídica.

<b>Población</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b><math>h</math></b>	<b><math>Hd</math></b>	<b><math>\pi</math></b>
Almolón	17	0	1	0	0
Cerro	22	0	1	0	0
Jilotla	16	0	1	0	0
Santuario	8	0	1	0	0

c) Diversidad genética del marcador *trnL-trnF*

Este segmento presentó nueve indels y diez sustituciones. Teniendo en cuenta los *indels*, *T. horripilus* presentó cuatro haplotipos (Tabla 23).

El haplotipo A lo comparten las poblaciones Cerro, Jilotla y Santuario (n=22), el haplotipo B y C son exclusivos de la población Almolón (n= 12) y el haplotipo D es compartido por las poblaciones Cerro y Jilotla (n=20).

Tabla 23. Haplotipos detectados considerando *indels* y sustituciones en la región *trnL-trnF*.

Haplotipos	41	97	98	99	118	138	146	150	206	239	329	330	331	334	340	458	767	768	967
A	A	-	-	-	G	A	T	G	G	A	-	-	-	G	G	G	T	T	G
B	-	A	A	A	A	-	G	A	A	-	T	T	A	A	A	A	G	A	A
C	A	A	A	A	A	-	G	A	A	-	T	T	A	A	A	A	G	A	A
D	-	-	-	-	G	A	T	G	G	A	-	-	-	G	G	G	T	T	G

Los haplotipos obtenidos sin considerar indels son dos (Tabla 24). El haplotipo A1 lo comparten las poblaciones de Cerro Jilotla y Santuario (n=22) y el haplotipo B1 es exclusivo de la población Almolón (n=12).

Tabla 24. Haplotipos de la región *trnL-trnF* sin *indels*.

Haplotipos	118	146	150	206	334	340	458	767	768	967
A1	G	T	G	G	G	G	G	T	T	G
B1	A	G	A	A	A	A	A	G	A	A

Tabla 25. Estimadores de diversidad genética total del gen *trnL-trnF*. N número de individuos, Pb pares de bases, S sitios polimórficos, h número de haplotipos, Hd Diversidad haplotípica,  $\pi$  Diversidad nucleotídica.

<b>N</b>	<b>Pb</b>	<b>S</b>	<b>h</b>	<b>Hd</b>	<b><math>\pi</math></b>
34	1076	10	2	0.471	0.00441

Los estimadores de diversidad para cada población muestran que todas las poblaciones son monomórficas y la diversidad haplotípica  $Hd=0$  y nucleotídica es nula dentro de las poblaciones  $\pi = 0$  (Tabla 26).

Tabla 26. Estimadores de la diversidad genética para las poblaciones. N número de individuos, Pb pares de bases, S sitios polimórficos, h número de haplotipos, Hd Diversidad haplotípica,  $\pi$  Diversidad nucleotídica.

<b>Población</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>h</b>	<b>Hd</b>	<b><math>\pi</math></b>
Almolón	12	0	1	0	0
Cerro	11	0	1	0	0
Jilotla	9	0	1	0	0
Santuario	2	0	1	0	0

#### d) Diversidad genética total

Este análisis considera los resultados concatenados de las secuencias de las tres regiones, (N total = 19 individuos) (Tabla 27).

**Tabla 27.** Número de individuos por población que se utilizaron en el análisis concatenado.

<b>Población</b>	<b>N</b>
<b>Almolón</b>	8
<b>Cerro</b>	7
<b>Jilotla</b>	3
<b>Santuario</b>	1

Al concatenar las tres regiones se encontraron 24 *indels* y 25 sustituciones. Teniendo en cuenta la variación de los *indels*, *T. horripilus* presentó seis haplotipos (Tabla 28). El haplotipo A, le corresponde solo a la población Santuario (n=1), el haplotipo B y E son exclusivos de la población Almolón (n=8), los haplotipos D y F son exclusivos de la población Cerro (n=7) y el haplotipo C es propio de la población Jilotla (n=3). Los haplotipos obtenidos sin la variación de los *indels* son cuatro (Tabla 29). El haplotipo A1 es de la población santuario (n=1), el B1 de Almolón (n=8), C1 de Jilotla (n=3) y D1 le pertenece a la población Cerro (n=7).

La diversidad haplotípica para las secuencias concatenadas fue de  $Hd = 0.696$  y la diversidad nucleotídica de  $\pi = 0.004$  (n=19) (Tabla 30).

Los estimadores de diversidad para cada población por separado muestran que todas las poblaciones son monomórficas, y la diversidad haplotípica ( $Hd = 0$ ) y nucleotídica ( $\pi = 0$ ) es nula dentro de las poblaciones (Tabla 31)

Tabla 28. Haplotipos del concatenado sin *indels*.

Haplotipo	207	304	482	517	540	687	688	689	690	691	835	846	858	914	915	916	961	1023	1044	1472	1638	1645	1647	1669	1772	1793	1852	1859	1898	2074	2125	2126	2127	2146	2166	2174	2178	2234	2267	2357	2358	2359	2362	2368	2486	2795	2796	2995
A	A	T	A	-	G	.	-	-	-	-	T	A	A	T	T	A	G	T	A	C	A	T	A	-	C	C	-	T	G	A	-	-	-	G	A	T	G	G	A	-	-	-	G	G	G	T	T	G
B	G	-	A	A	A	-	-	-	-	-	C	C	T	-	-	-	G	G	-	A	-	G	G	T	C	C	A	C	A	A	A	A	A	-	-	G	A	A	-	T	T	A	A	A	A	G	A	A
C	A	T	-	-	G	.	-	-	-	-	T	A	A	T	T	A	G	T	A	C	A	T	A	-	C	C	A	T	G	A	-	-	-	G	A	T	G	G	A	-	-	-	G	G	G	T	T	G
D	A	T	A	-	G	T	A	T	T	C	T	A	A	T	T	A	A	T	A	C	A	T	A	-	A	A	-	T	G	A	-	-	-	G	A	T	G	G	A	-	-	-	G	G	G	T	T	G
E	G	-	A	A	A	-	-	-	-	-	C	C	T	-	-	-	G	G	-	A	-	G	G	T	C	C	A	C	A	-	A	A	A	-	-	G	A	A	-	T	T	A	A	A	A	G	A	A
F	A	T	A	-	G	T	A	T	T	C	T	A	A	T	T	A	A	T	A	C	A	T	A	-	A	A	-	T	G	-	-	-	-	G	A	T	G	G	A	-	-	-	G	G	G	T	T	G

Tabla 29. Haplotipos obtenidos del concatenado sin *indels*.

Haplotipo	207	540	835	846	858	961	1023	1472	1645	1647	1772	1793	1859	1898	2174	2178	2234	2362	2368	2486	2795	2796	2995
A	A	G	T	A	A	G	T	C	T	A	C	C	T	G	T	G	G	G	G	G	T	T	G
B	G	A	C	C	T	G	G	A	G	G	C	C	C	A	G	A	A	A	A	A	G	A	A
C	A	G	T	A	A	G	T	C	T	A	C	C	T	G	T	G	G	G	G	G	T	T	G
D	A	G	T	A	A	A	T	C	T	A	A	A	T	G	T	G	G	G	G	G	T	T	G

Tabla 30. Estimadores de diversidad genética total del concatenado. N número de individuos, Pb pares de bases, S sitios polimórficos, h número de haplotipos, Hd Diversidad haplotípica,  $\pi$  Diversidad nucleotídica.

N	Pb	S	h	Hd	$\pi$
19	3104	25	4	0.696	0.004

Tabla 31. Estimadores de la diversidad genética por poblaciones sin *indels*. N número de individuos, Pb pares de bases, S sitios polimórficos, h número de haplotipos, Hd Diversidad haplotípica,  $\pi$  Diversidad nucleotídica.

Población	N	S	h	Hd	$\pi$
Almolón	8	0	1	0	0
Cerro	7	0	1	0	0
Jilotla	3	0	1	0	0
Santuario	1	0	1	0	0

## 7.2.2 Estructura genética

### a) Gen *petB* intrón D4

El análisis de varianza molecular (AMOVA) indicó que toda varianza genética se debe a diferencias entre las poblaciones (100%) (Tabla 32). El estimador de estructura genética es alto ( $F_{ST} = 1$ )  $P < 0.05$ , reflejo de que cada población tiene un haplotipo único.

Tabla 32. Resultados obtenidos del análisis de varianza molecular (AMOVA).

Fuente de variación	g.l	Suma de cuadrados	Varianza de los componentes	Porcentaje variación	Valor de <i>P</i>
Entre las poblaciones	3	157.818	2.77063 Va	100	0
Dentro de las poblaciones	73	0	0.00000 Vb	0	0
				<b><math>F_{ST} = 1</math></b>	

### b) Gen *trnL-rp32*

El análisis de varianza molecular (AMOVA) indicó que toda varianza genética se debe a diferencias entre las poblaciones (100%) (Tabla 33). El estimador de estructura genética es alto ( $F_{ST} = 1$ )  $P < 0.05$ , reflejo de que cada población tiene un haplotipo único.

Tabla 33. Resultados obtenidos del análisis de varianza molecular (AMOVA).

Fuente de variación	g.l	Suma de cuadrados	Varianza de los componentes	Porcentaje variación	Valor de <i>P</i>
Entre las poblaciones	3	251.841	5.51669 Va	100	0
Dentro de las poblaciones	59	0	0.00000 Vb	0	0
<b>F<sub>ST</sub>= 1</b>					

c) Gen *trnL-trnF*

El análisis de varianza molecular (AMOVA) indicó que toda varianza genética se debe a diferencias entre las poblaciones (100%) (Tabla 34). El estimador de estructura genética es alto ( $F_{ST} = 1$ )  $P < 0.05$ , reflejo de que cada población tiene un haplotipo único.

Tabla 34. Resultados obtenidos del análisis de varianza molecular (AMOVA).

Fuente de variación	g.l	Suma de cuadrados	Varianza de los componentes	Porcentaje variación	Valor de <i>P</i>
Entre las poblaciones	3	140.831	5.90954 Va	95.99	0
Dentro de las poblaciones	30	7.704	0.24680 Vb	4.01	0
<b>F<sub>ST</sub>= 0.95</b>					

### 7.2.3 Análisis filogenético

#### a) Gen *petB* intrón D4

La filogenia obtenida para las poblaciones de *T. horripilus*, incluyendo datos de grupos externos: *Echinocactus platyacanthus* (N=4), *Cephalocereus senilis* (N=1), *Ariocarpus kotschobeyanus* (N=1) y *Stenocereus turberi* (N=1), muestra que todas las poblaciones de *T. horripilus* comparten un ancestro común. Se observa la formación de una gran politomia que incluye a las cuatro poblaciones, en donde la población de Almolón presenta una diferenciación del resto. Cabe destacar que la población de Almolón es la más lejana geográficamente (figura 11).

#### b) Gen *trnL-rp32*

La filogenia obtenida para las poblaciones de *T. horripilus*, incluyendo *Ariocarpus kotschobeyanus*, *Euluchnia iquiquensi*, *Copiapoa cinerea* y *C. rupestri* como grupos externos muestra que todas las poblaciones de *T. horripilus* son un grupo monofilético el cual se divide en dos grupos hermanos, el primer grupo incluye las poblaciones de Cerro, Jilotla, Santuario, el segundo grupo incluye a los individuos de la población de Almolón (figura 12).

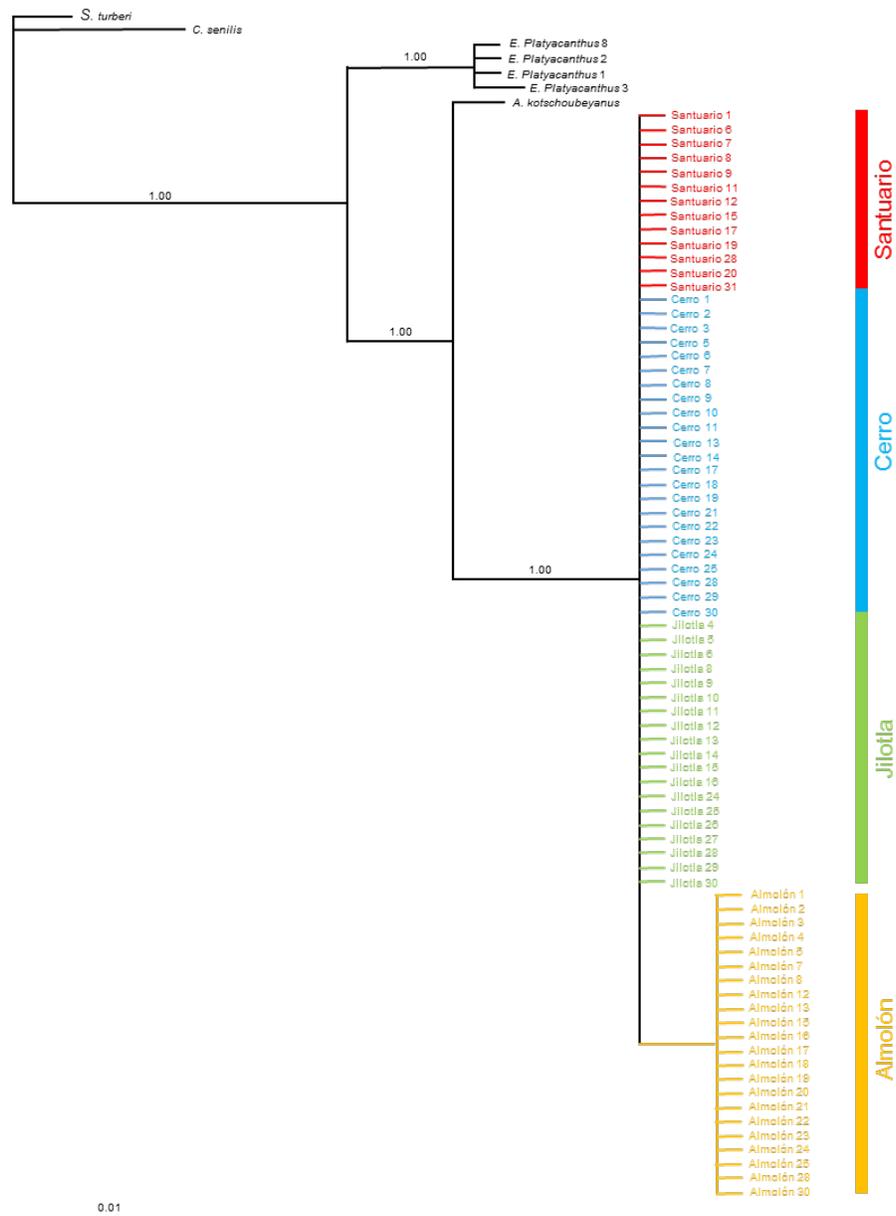


Figura 11. Reconstrucción filogenética Bayesiana de las 77 secuencias del gen *petB* intrón D4 usando el modelo Jukes Cantor con 10,000,000 de generaciones, utilizando como grupos externos *Ariocarpus kotschobeyanus*, *Stenocereus thurberi*, *Echinocactus platyacanthus* y *Cephalocereus senilis*. Cada color de la barra representa una población. Sobre las ramas se muestra los valores de probabilidad posterior bayesiana.

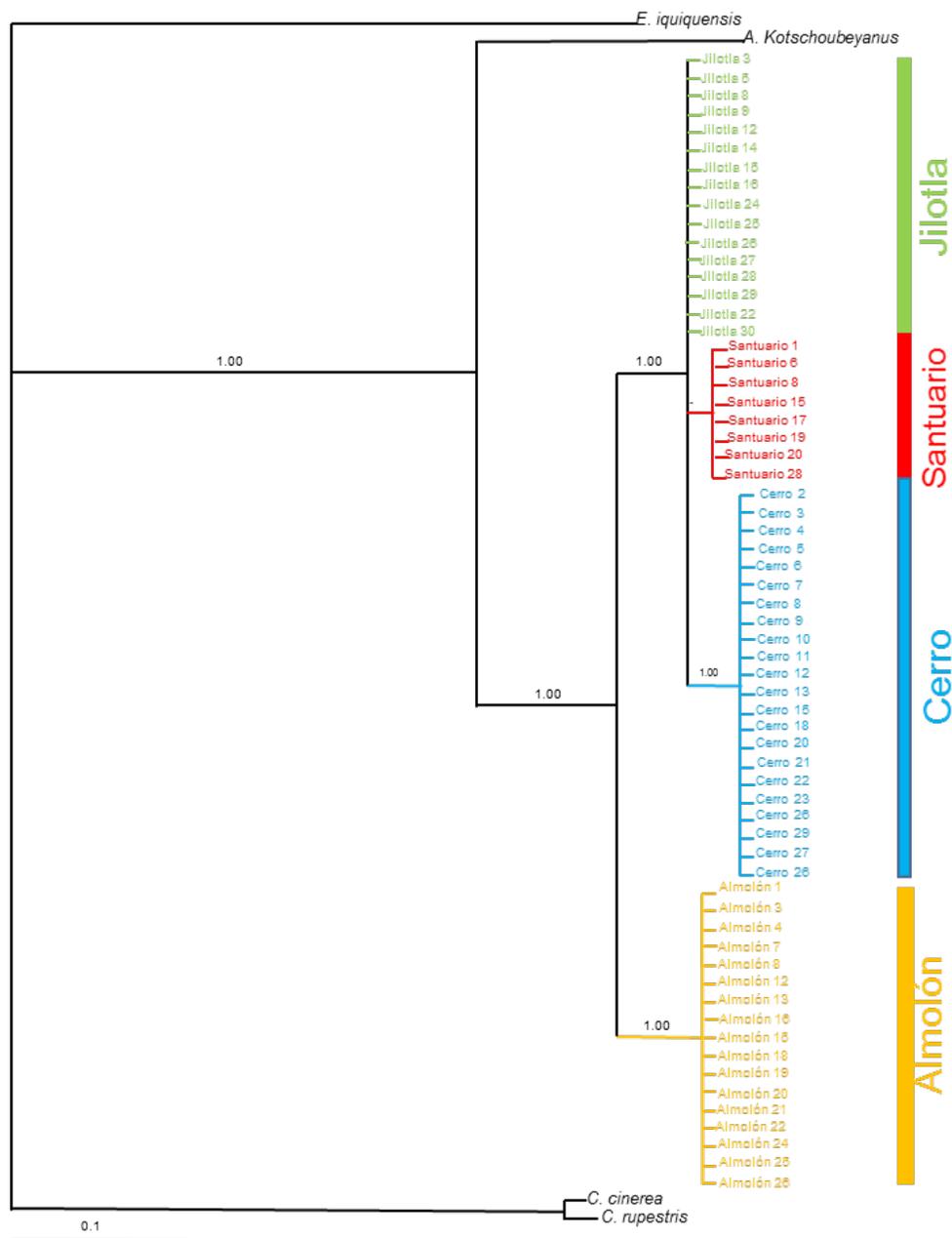


Figura 12. Reconstrucción filogenética Bayesiana de las 53 secuencias del gen *trnL-rp32* usando el modelo Jukes Cantor con 10,000,000 de generaciones, utilizando como grupos externos *Ariocarpus kotschobeyanus*, *Eulychnia iquiquensis* y *Copiapoa desertorum*. Cada color de la barra representa una población. Sobre las ramas se muestra los valores de probabilidad posterior bayesiana.

c) Gen *trnL-trnF*

La filogenia obtenida para las poblaciones de *T. horripilus*, incluyendo *Cephalocereus senilis*, *Ariocarpus brovoanus*, *Strombocactus diciformis*, *Turbincarpus viereckii*, *Echinocactus grusoni* y *Astrophytum ornatum* como grupos externos muestra que todas las poblaciones de *T. horripilus* comparten un ancestro común y es similar a la obtenida con el gen *trnL-rp132* en que se observa que las poblaciones de *T. horripilus* están incluidas en un grupo monofilético que se divide en dos grupos hermanos. El primer grupo incluye a las poblaciones de Cerro, Jilotla, Santuario que en las más cercanas geográficamente, mientras que el segundo grupo incluye a los individuos de la población de Almolón (figura 13).

d) Concatenado

La filogenia obtenida muestra, de igual forma que en las topologías obtenidas para cada marcador, que todas las poblaciones de la especie se incluyen en un grupo monofilético. Dentro de este grupo monofilético se forman dos grupos hermanos. El primer grupo incluye a las poblaciones de Cerro, Jilotla, Santuario que son las más cercanas geográficamente, mientras que el segundo grupo incluye a los individuos de la población de Almolón (figura 14).

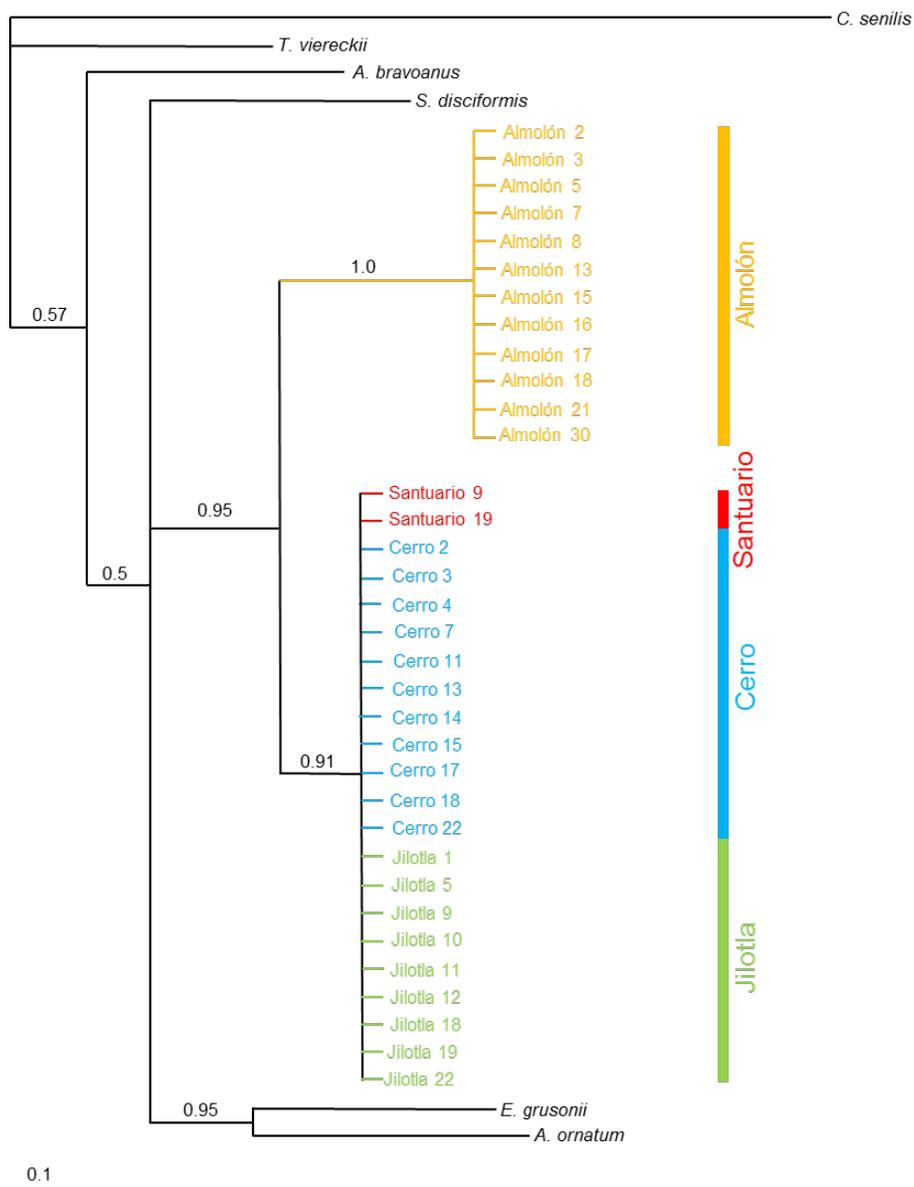


Figura 13. Reconstrucción filogenética Bayesiana de las 34 secuencias del gen *trnL-trnF* usando el modelo Jukes Cantor con 10 000 000 de generaciones, utilizando como grupos externos *Cephalocereus senilis*, *Ariocarpus bravoanus*, *Strombocactus disciformis*, *Turbincarpus viereckii*, *Echinocactus grusonii* y *Astrophytum ornatum*. Cada color de la barra representa una población. Sobre las ramas se muestra los valores de probabilidad posterior bayesiana.

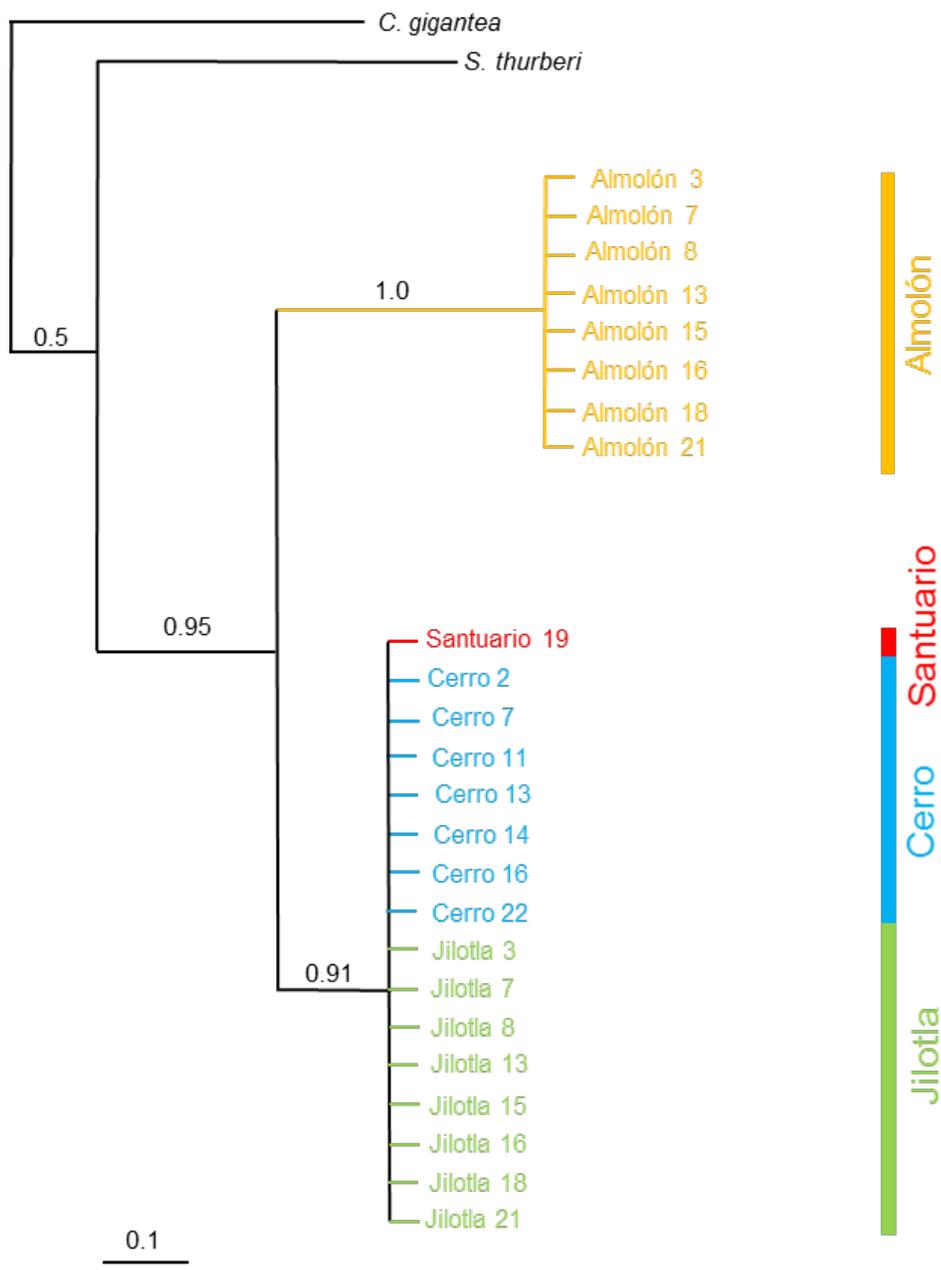


Figura 14. Reconstrucción filogenética Bayesiana de las 19 secuencias concatenada de los tres genes usando el modelo Jukes Cantor con 10 000 000 de generaciones. Cada color de la barra representa una población. Sobre las ramas se muestra los valores de probabilidad posterior bayesiana.

## 7.2.4 Redes de haplotipos

### a) Red de haplotipos para el gen *petB* intrón D4

En la red haplotípica se ubican dos haplotipos que concuerdan con la estructura encontrada en las topologías filogenéticas (Figura 11), mostrando que las poblaciones Cerro, Jilotla y Santuario comparten el mismo haplotipo (CJS), probablemente por resultado de su proximidad geográfica. Por consiguiente Almolón que es la población más lejana muestra un haplotipo exclusivo (A). Solo se observan dos cambios mutacionales de un haplotipo a otro (líneas pequeñas) (Figura 15).

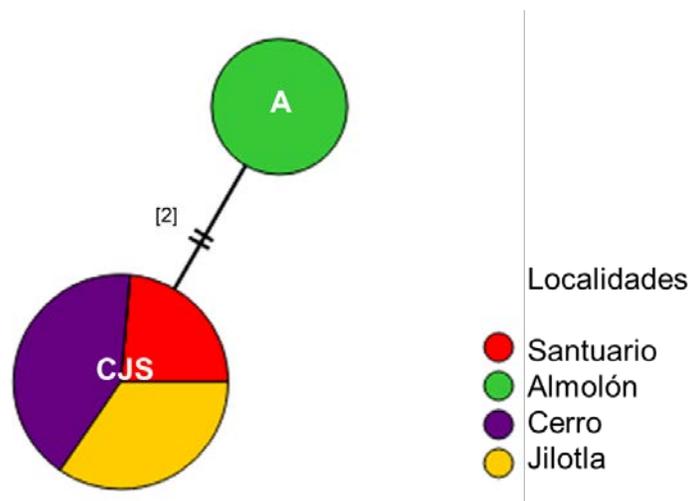


Figura 15. Red haplotípica de *T. horripilus* formada con las secuencias de la región *petB* intrón D4. Las líneas pequeñas que están sobre la línea que conecta a los haplotipos indican los pasos mutacionales entre ellos. Los diferentes tamaños de los círculos representan la frecuencia haplotípica.

b) Red de haplotipos para el gen *trnL-rp32*

El resultado obtenido mostró una red haplotípica formada por cuatro haplotipos, donde cada haplotipo corresponde a una población: C= Cerro, J= Jilotla, S= Santuario y A= Almolón. El número de pasos entre haplotipos varió entre 1 y 9 (Figura 16).

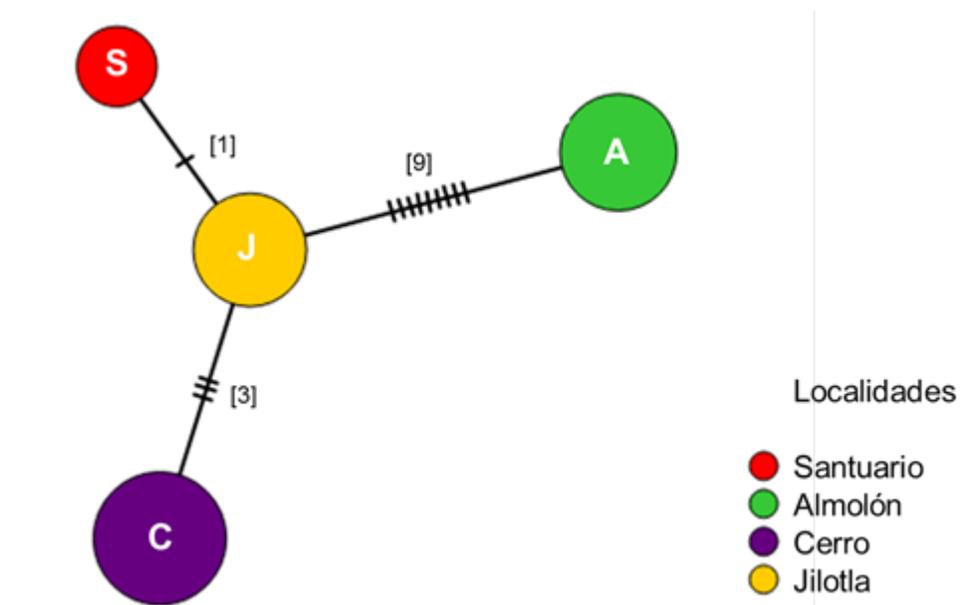


Figura 16. Red haplotípica de *T. horripilus* formada con las secuencias del gen *trnL-rp32*. Las líneas pequeñas que están sobre la línea que conecta a los haplotipos indican los pasos mutacionales entre ellos. Los diferentes tamaños de los círculos representan la frecuencia haplotípica.

c) Red haplotipos para el gen *trnL-trnF*

En la red haplotípica se pueden observar dos haplotipos. El haplotipo CJS pertenece a las poblaciones Cerro, Jilotla y Santuario, que presentan una proximidad geográfica. Almolón, la población más lejana muestra un haplotipo exclusivo (A). Se observan diez cambios mutacionales de un haplotipo a otro (figura 17).

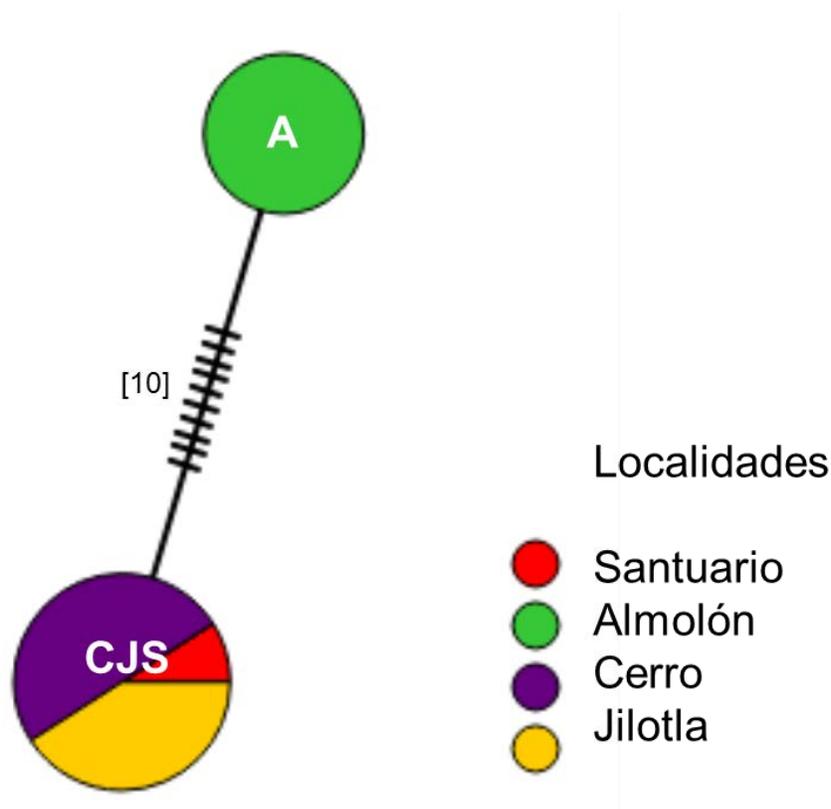


Figura 17. Red haplotípica de *T. horripilus* formada con las secuencias del gen *trnL-trnF*. Las líneas pequeñas que están sobre la línea que conecta a los haplotipos indican los pasos mutacionales entre ellos. Los diferentes tamaños de los círculos representan la frecuencia haplotípica.

d) Red de haplotipos del concatenado

En la red haplotípica de las matrices combinadas se ubican cuatro haplotipos (A, C, J, S). Cada haplotipo se corresponde a una población A= Almolón, C= Cerro, J= Jilotla y S= Santuario. Se observa que C, J, S forman un pequeño grupo y corresponde a las poblaciones que están más cercanas geográficamente, mientras que el haplotipo A está más alejado y corresponde a la población más lejana geográficamente (figura 18).

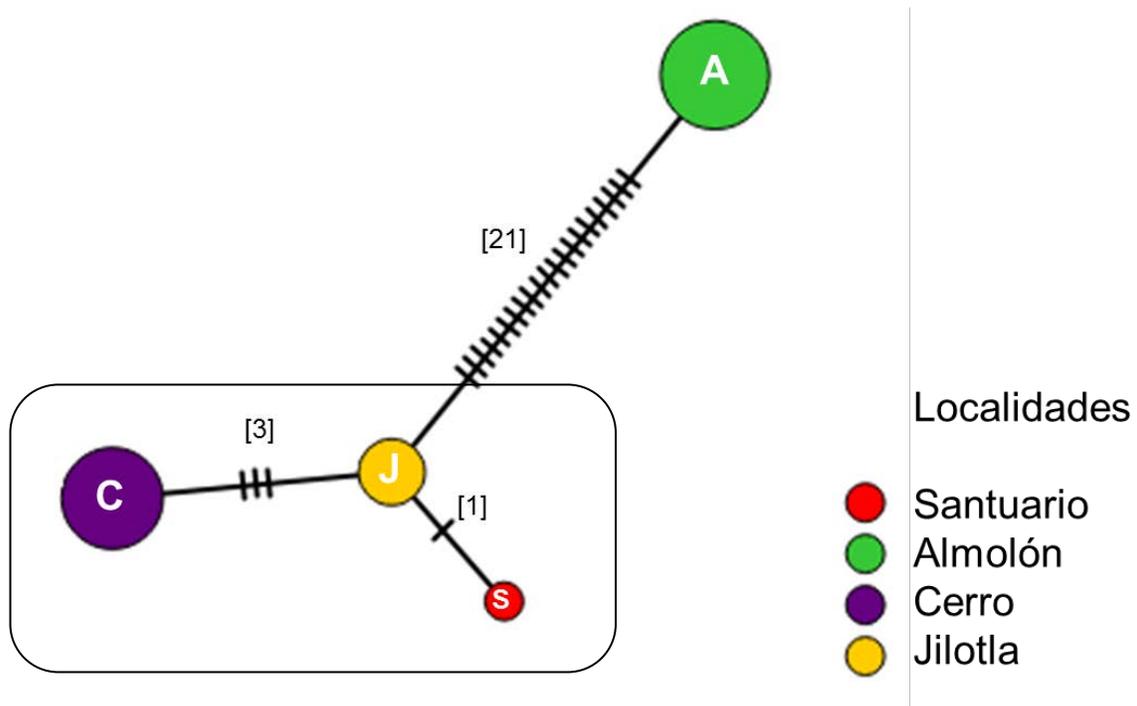


Figura 18. Red haplotípica de *T. horripilus* resultado del análisis concatenado. Las líneas pequeñas que están sobre la línea que conecta a los haplotipos indican los pasos mutacionales entre cada haplotipo. Los diferentes tamaños de los círculos representan la frecuencia haplotípica. El rectángulo engloba el haplogrupo formado por las poblaciones más cercanas geográficamente.

## 7.2.5 Distancias Genéticas

### 7.6.1 Gen *petB* intrón D4

Las distancias genéticas de Nei (Nei *et al.* 1972) entre las localidades presentaron valores pequeños que oscilaron entre 0 y 0.003 (Tabla 35).

Tabla 35. Distancias genéticas de Nei (1987) entre poblaciones pareadas.

	<b>Santuario</b>	<b>Almolón</b>	<b>Cerro</b>	<b>Jilotla</b>
<b>Santuario</b>	0			
<b>Almolón</b>	0,003			
<b>Cerro</b>	0,000	0,003	0	
<b>Jilotla</b>	0,000	0,003	0,000	0

Los valores más elevados se presentaron entre la localidad de Almolón con Cerro, Almolón con Jilotla, Almolón con Santuario, lo que concuerda con la distancia geográfica existente entre las localidades (las poblaciones más cercanas geográficamente (Cerro, Jilotla y Santuario) también son genéticamente más cercanas) (Figura 19). Este resultado concuerda además con los resultados reportados en las topologías bayesianas y en las redes de haplotipos donde las poblaciones más cercanas geográficamente comparten haplotipos.



Figura 19. Árbol N.J de distancias genéticas de Nei (1987).

### 7.6.2 Gen *trnL-rp32*

Las distancias genéticas presentaron valores más elevados comparados con los obtenidos en el gen *petB* intrón D4. Estos valores oscilaron desde 0 hasta 0.010 (Tabla 36).

Tabla 36. Distancias genéticas de Nei (1987) entre poblaciones pareadas.

	<b>Santuario</b>	<b>Almolón</b>	<b>Cerro</b>	<b>Jilotla</b>
<b>Santuario</b>	0			
<b>Almolón</b>	0,008			
<b>Cerro</b>	0,003	0,010	0	
<b>Jilotla</b>	0,001	0,007	0,002	0

Siendo nuevamente la población de Almolón la más lejana genéticamente y geográficamente, mientras que las poblaciones más cercanas geográficamente (Cerro, Jilotla y Santuario) también lo son genéticamente (figura 20). Este resultado

concuerta con los resultados reportados en las topologías bayesianas y en las redes de haplotipos.

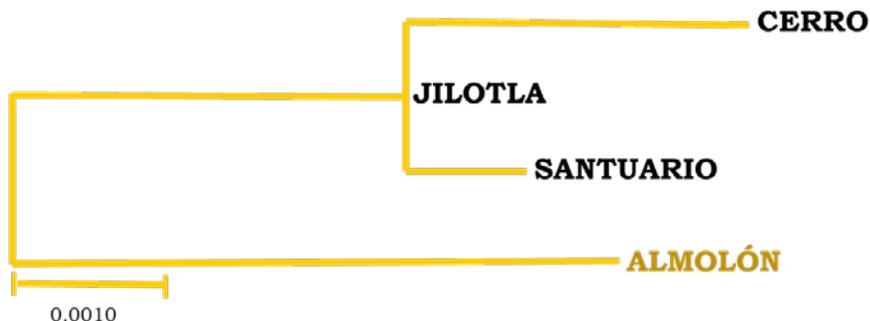


Figura 20. Árbol N.J de distancias genéticas de Nei (1987).

### 7.6.3 Gen *trnL-trnF*

Las distancias genéticas presentaron valores más altos que el gen *petB* intrón D4, estos valores van desde 0 a 0.009 (Tabla 37), indicando aislamiento por distancia.

Tabla 37. Distancias genéticas de Nei (1987) entre poblaciones pareadas.

	<b>Santuario</b>	<b>Almolón</b>	<b>Cerro</b>	<b>Jilotla</b>
<b>Santuario</b>	0			
<b>Almolón</b>	0.009	0		
<b>Cerro</b>	0.000	0.009	0	
<b>Jilotla</b>	0.000	0.009	0.000	0

Siendo nuevamente la población de Almolón la más lejana genéticamente y geográficamente, mientras que las poblaciones más cercanas geográficamente

(Cerro, Jilotla y Santuario) también lo son genéticamente (figura 21). Este resultado concuerda con los resultados reportados en las topologías bayesianas y en las redes de haplotipos.



Figura 21. Árbol N.J. de distancias genéticas de Nei (1987).

### 7.2.6 Aislamiento por Distancia

#### a) Gen *petB* intrón D4

Se realizó una prueba de Mantel (1969) para determinar si hay aislamiento por distancia para el gen *petB* intrón D4 (Figura 22). Esta prueba mostró una correlación positiva ( $r = 0.85$ ,  $g = 1.68$ , valor crítico = 1.645), indicando aislamiento por distancia.

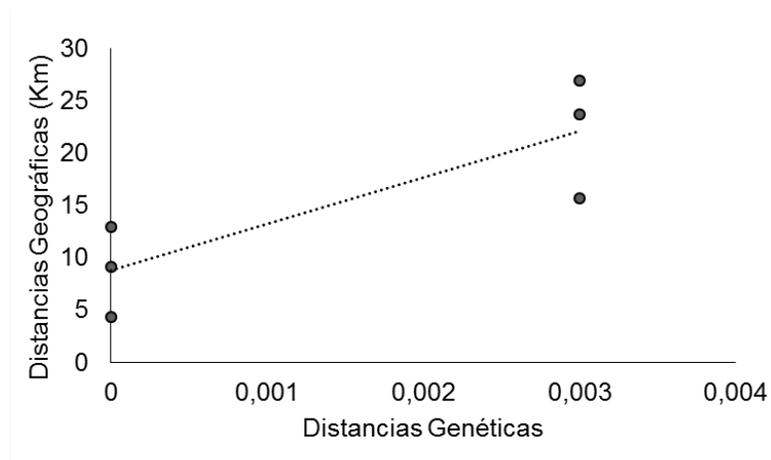


Figura 22. Regresión lineal de distancias genéticas y geográficas de la región *petB* intrón D4.

b) Gen *trnL-rpl32*

Se realizó una prueba de Mantel (1969) para determinar si hay aislamiento por distancia para el gen *trnL-rpl32* (Figura 23). Esta prueba mostró una correlación positiva pero no es significativa, por lo tanto para esta gen no existe aislamiento por distancia ( $r = 0.732$ ,  $P = 0.05$ ,  $g = 1.4525$ , valor crítico = 1.645).

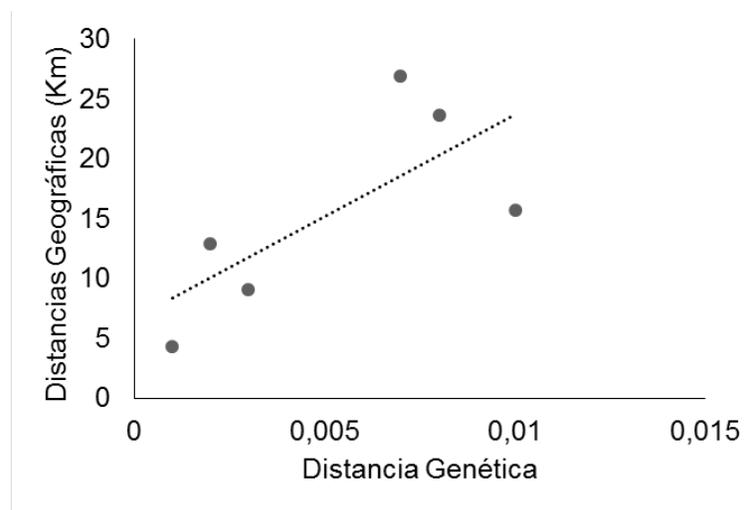


Figura 23. Regresión lineal de distancias genéticas y geográficas de la región *trnL-rpl32*.

c) Gen *trnL-trnF*

Se realizó una prueba de Mantel (1969) para determinar si hay aislamiento por distancia para el gen *petB* intrón D4 (Figura 23). Esta prueba mostró una correlación positiva ( $r = 0.8525$ ,  $P = 0.05$ ,  $g = 1.6894$ , valor crítico = 1.645).

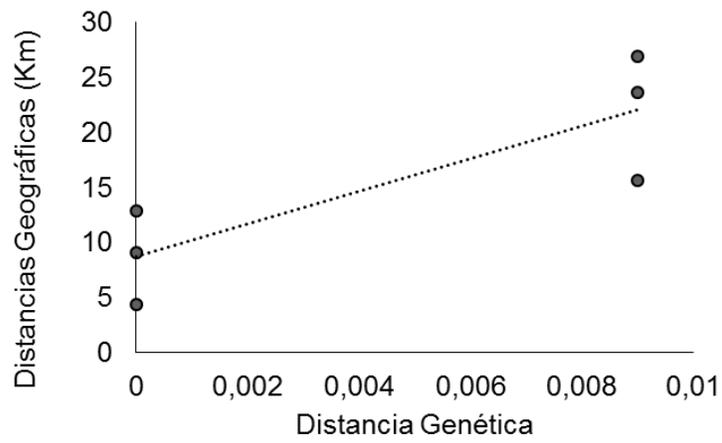


Figura 24. Regresión lineal de distancias genéticas y geográficas de la región *trnL-trnF*.

## 8. DISCUSIÓN

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en el concatenado de las tres regiones (*petB* intrón D4; *trnL-rp32*; *trnL-trnF*) para *T. horripilus*, se obtuvo la secuenciación de 3104 pares de bases lo que resulta ser mayor que el número de pares de bases obtenido para *Stenocereus thurberi* (2338) usando estas mismas regiones (Arenas-Jiménez 2015) (Tabla 38).

Los datos de diversas especies de plantas vasculares usando secuenciación de cloroplastos, muestran que el número de haplotipos obtenidos oscila entre 12 y 2, y para *T. horripilus*, encontramos 4 haplotipos ( $h=4$ ), valor que aunque es bajo, no difiere significativamente del valor medio obtenido en otros estudios ( $X=6.43 \pm 3.87$ ) (Tabla 38). El número de sitios polimórficos ( $S$ ) obtenido para *T. horripilus* fue de 25, que es el valor más alto reportado hasta la fecha en estudios que utilizaron al menos una de las regiones empleadas en este estudio (Tabla 39). La diversidad haplotípica ( $Hd$ ) encontrada para *T. horripilus* fue de 0.696, que corresponde a un valor relativamente bajo, aunque no difiere significativamente del valor medio tomando en cuenta los resultados de otros estudios ( $X=0.767 \pm 0.114$ ). Sin embargo, el valor de *T. horripilus* resulta ser menor al de *S. thurberi*, cactácea columnar estudiada usando las mismas regiones ( $Hd=0.87$ ). Estas diferencias pueden explicarse debido a diferencias en los ciclos de vida y formas de crecimiento de ambas especies, ya que se ha predicho que las especies de ciclo largo y con gran longevidad tienden a presentar mayores niveles de diversidad genética que las especies de ciclos más cortos como el que se presenta en las globosas (Hamrick *et al.* 2002). Además el

intervalo de distribución de ambas especies difiere, ya que *S. thurberi* presenta un patrón que cubre los estados de Sonora, Baja California y Baja California Sur y aunque están separadas geográficamente existe cierto flujo genético entre ellas gracias al movimiento de sus polinizadores y dispersores que son principalmente quirópteros migratorios (Arenas-Jiménez, 2015; Valiente-Banuet et al. 1996; Bustamante et al. 2010).

Sobresale el hecho de que no se detectó diversidad genética intrapoblacional ( $Hd = 0$ ) con ninguna de las tres regiones ni con el concatenado. Este dato inusual en estudios de genética poblacional quizás pueda ser explicado por el tipo de dispersión de las semillas, ya que estas se encuentran en frutos no carnosos que se abren estando sujetos en la planta y cuyas semillas parecen ser dispersadas por hormigas o por factores abióticos como el agua o el viento, por lo cual las distancias de dispersión de estas semillas probablemente son muy pequeñas y las poblaciones presentan muy escaso o nulo flujo génico. Se ha documentado que la polinización de las flores de esta planta se lleva a cabo con la ayuda de abejas y avispas solitarias, y a que no se presenta autocruza o geitonogamia (Matías-Palafox 2007; Jiménez-Sierra y Matías-Palafox, 2016). Estos polinizadores, aunque pueden desplazarse algunos kilómetros, su desplazamiento no alteraría la constitución del DNAC de cada población, ya que éste es transmitido exclusivamente por vía materna y esto explicaría la ausencia de flujo génico en nuestro marcador molecular.

El pequeño tamaño de las poblaciones aunado a su aparente aislamiento nos hace pensar que la deriva génica y la endogamia son factores importantes en la conformación de la estructura genética observada en estas poblaciones.

Al mismo tiempo, es probable que aunque no se detectó flujo génico a través del estudio del DNAc, quizás el estudio del DNA nuclear evidencie la existencia de flujo génico interpoblacional y variación intrapoblacional.

Tabla 38. Tamaños de las regiones secuenciadas en estudios de diversas especies de climas semiáridos utilizando al menos una de las regiones empleadas en este estudio.

Especie	Numero de pb de <i>petB</i> intrón D4	Número de pb <i>trnL-rp32</i>	Número de pb de <i>trnL-trnF</i>	Total de Pb	Referencia
<i>Cephalocereus senilis</i>	-	-	876	876	Brito-Castrejón (en proceso)
<i>Stenocereus thurberi</i>	657	764	917	2338	Arenas-Jiménez (2015)
<i>Agave kerchovei</i>	-	590	640	1230	Parra-Leyva (2015)
<i>Agave stricta</i>	-	681	732	1413	Martínez-Ainsworth (2013)
<i>Agave striata</i>	-	681	732	1413	Martínez-Ainsworth (2013)
<b><i>Turbinicarpus horripilus</i></b>	<b>748</b>	<b>1280</b>	<b>1073</b>	<b>3104</b>	<b>Presente estudio</b>

Tabla 39. Diversidad genética encontrada en especies vasculares a través de secuenciación de regiones del cloroplasto (se eligieron estudios en los que al menos se empleara una de las regiones utilizadas en este estudio): N = Número de individuos; Pb = Pares de bases; S = Sitios polimórficos; h = Número de haplotipos; Hd = Diversidad haplotípica;  $\pi$  = Diversidad nucleotídica;  $F_{ST}$  = Índice de diferenciación genética.

Espece	Regiones	N	pb	S	h	Hd	$\pi$	$F_{ST}$	Referencia
<i>Cephalocereus senilis</i>	trnL-trnF	55	876	1	2	0.105	0.00014	0.498	Brito-Castrejón en proceso
<i>Stenocereus thurberi</i>	trnL-trnF, rp32-trnL, petB intrón D4	165	2338	10	12	0.87	0.001	0.31	Arenas-Jiménez (2015)
<i>Agave kerchovei</i>	trnL-trnF, petA-psbJ, rp32-trnL	128	2188	16	10	0.71	0.00078	0.92	Parra-Leyva (2015)
<i>Agave stricta</i>	trnL-trnF, rp32-trnL, psbJ-peta	54	2100	6	3	0.524	0.0004	0.89	Martínez-Ainsworth (2013)
<i>Agave striata</i>	trnL-trnF, rp32-trnL, psbJ-peta	57	2100	16	5	0.713	0.001	0.93	Martínez-Ainsworth (2013)
<i>Fouquieria shrevei</i>	rp32-trnL, psbJ-petA, ndhF-rp32	92	2769	16	9	0.743	0.00077	0.651	Aguirre-Liguori (2012)
<i>Quercus variabilis</i>	trnL-trnF, atpB-rbcl, trnH-psbA	528	2167	-	-	0.88	0.0008	0.85	Chen <i>et al.</i> (2012)
<i>Camellia taliensis</i>	rp32-trnL	183	858	-	-	0.836	0.004	0.31	Liu <i>et al.</i> (2012)
<i>Podocarpus matudae</i>	trnL-trnF, trnH-psbA	157	1034	-	-	0.811	-	0.81	Ornelas <i>et al.</i> (2010)
<i>Primula secundiflora</i>	trnL-trnF, rps16	109	877	-	-	0.895	0.0049	0.816	Wang <i>et al.</i> (2008)
<b><i>Turbincarpus horripilus</i></b>	petB intrón D4, trnL-rp32, trnL-trnF	<b>19</b>	<b>3104</b>	<b>25</b>	<b>4</b>	<b>0.696</b>	<b>0.001</b>	<b>1</b>	<b>Presente estudio</b>

En lo que respecta al Índice de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ), que nos indica el grado de estructuración o diferenciación entre las poblaciones encontramos que *T. horripilus* tiene un valor alto ( $F_{ST} = 1$ ), ya que en cada población se encuentra un haplotipo exclusivo, el cual es compartido por todos los individuos pertenecientes a cada una de las cuatro poblaciones estudiadas. A pesar de que el tamaño de muestra de nuestro estudio, tomando en cuenta los individuos considerados en la concatenación de las tres regiones es bajo ( $N=19$ ), el  $F_{ST}$  obtenido para la especie se ajusta a la realidad ya que en el análisis de las regiones individuales se obtuvieron lecturas de al menos 34 individuos por región y para todos los casos se detectaron haplotipos exclusivos para cada población. Este resultado fue respaldado por el AMOVA, donde se observó que la mayoría de la variación genética se distribuyó entre poblaciones y no dentro de ellas (Tablas 32, 33 y 34). Estos datos sugieren que la capacidad de dispersión de *Turbinicarpus horripilus* es limitada y que debido al tamaño pequeño de las poblaciones de la especie los distintos haplotipos se han fijado en cada población por deriva genética (Hedrick 2005)

La topología bayesiana muestran que las poblaciones más cercanas filogenéticamente son Cerro, Jilotla y Santuario, mientras que Almolón se ubica en un clado hermano. Estos resultados concuerdan con la similitud genética de las poblaciones más cercanas geográficamente. El patrón de diversidad genética observado podría explicarse por fragmentación y asilamiento de las poblaciones que

en un primer momento formaban un continuo, constituyendo poblaciones vicariantes. Posterior a la fragmentación pudieron haber intervenido procesos como la deriva génica, efectos de fundador o cuellos de botella (Hedrick 2005). Una aproximación a la determinación del tiempo en que esta fragmentación pudo haber ocurrido requeriría de otros análisis (Drummond *et al.* 2013), pero es probable que ésta haya sucedido en un tiempo relativamente lejano ya que el DNAC presenta tasas de mutación relativamente bajas ( $1.1 \times 10^{-9}$ ; Zurausky *et al.* 19984), aunque también tendríamos que considerar que como los fragmentos estudiados son no codificantes sus mutaciones podrían acumularse rápidamente sin ser purgadas por la acción de la Selección Natural.

La significancia de la prueba de Mantel demostró que hay aislamiento por distancia entre las poblaciones analizadas sugiriendo un equilibrio entre flujo genético y deriva génica que ha diferenciado a las poblaciones de acuerdo a la distancia. Se realizó un árbol de distancias genéticas para conocer las relaciones entre poblaciones. Con este dendograma se vio que las poblaciones más cercanas fueron las más parecidas. Almolón que es la población más alejada, fue la que presentó mayor diferenciación genética respecto a las demás. Lo anterior podría estar indicando que hay un efecto de las sierras sobre la diferenciación de estas dos poblaciones.

En las redes haplotípicas de las regiones *petB* intrón D4 y *trnL-trnF* se observa la formación de dos haplotipos (CJS y A) (Figura 15 y 17). El haplotipo CJS es compartido por las poblaciones más cercanas geográficamente (Cerro, Jilotla y Santuario), mientras que el haplotipo A es exclusivo de la población Almolón.

Mientras que para la región *trnL-rp32* y para el concatenado de las tres regiones se observan cuatro haplotipos diferentes, uno por cada población, y la formación de un haplogrupo formado por las poblaciones más cercanas geográficamente (Cerro, Jilotla y Santuario) quedando el haplotipo A separado de este grupo (Figura 16 y 18). Debido a que la teoría de la coalescencia predice que el haplotipo ancestral debe ser el más común y más distribuido entre las poblaciones, así como el haplotipo central de la red de haplotipos (Crandall y Templeton 1993) consideramos al haplotipo CJS o al haplotipo CJS el haplotipo ancestral o que surgió de alguna de las poblaciones que forman el haplogrupo. Este patrón sugiere que entre las poblaciones ocurrió un evento de vicarianza y que de este se derivó un aislamiento por distancia. La población de Almolón esta separa del resto por sierras altas y la laguna de Metztitlán (Figura 25). Es probable que las sierras y la laguna funcionen como barreras al flujo genético entre las poblaciones y por lo tanto hayan provocado la diferenciación entre las poblaciones.

Nitzschke y Montes (2000) proponen una subespecie de *Turbinicarpus horripilus* llamada *Turbinicarpus horripilus subs. Wrobelianus* que presenta características morfológicas que difieren ligeramente a ssp. *horripilus*, como el color de las espinas y el tamaño de las flores. Esta subespecie se encuentra en la población de Almolón que es la más aislada geográficamente, es importante recalcar que no solo presenta diferencias morfológicas si no también genéticas comparada a las demás poblaciones de *Turbinicarpus horripilus*. Se deben hacer más estudios morfológicos,

génicos y ecológicos de la especie para determinar el grado de diferenciación que presenta esta subespecie.

Las poblaciones pequeñas son de especial interés en conservación dado que son más vulnerables a sufrir los efectos de la deriva genética, que tiende a empobrecerlas genéticamente, y de la endogamia, que disminuye la actitud de los individuos para finalmente entrar en un vórtice de extinción (Lacy y Lindenmayer 1995) es por eso, que la protección por la Norma Oficial Mexicana, el manejo adecuado y la de protección del hábitat de *Turbinicarpus horripilus* es importante porque la pérdida de esta especie significaría la pérdida de una parte singular de la biodiversidad de nuestro planeta.

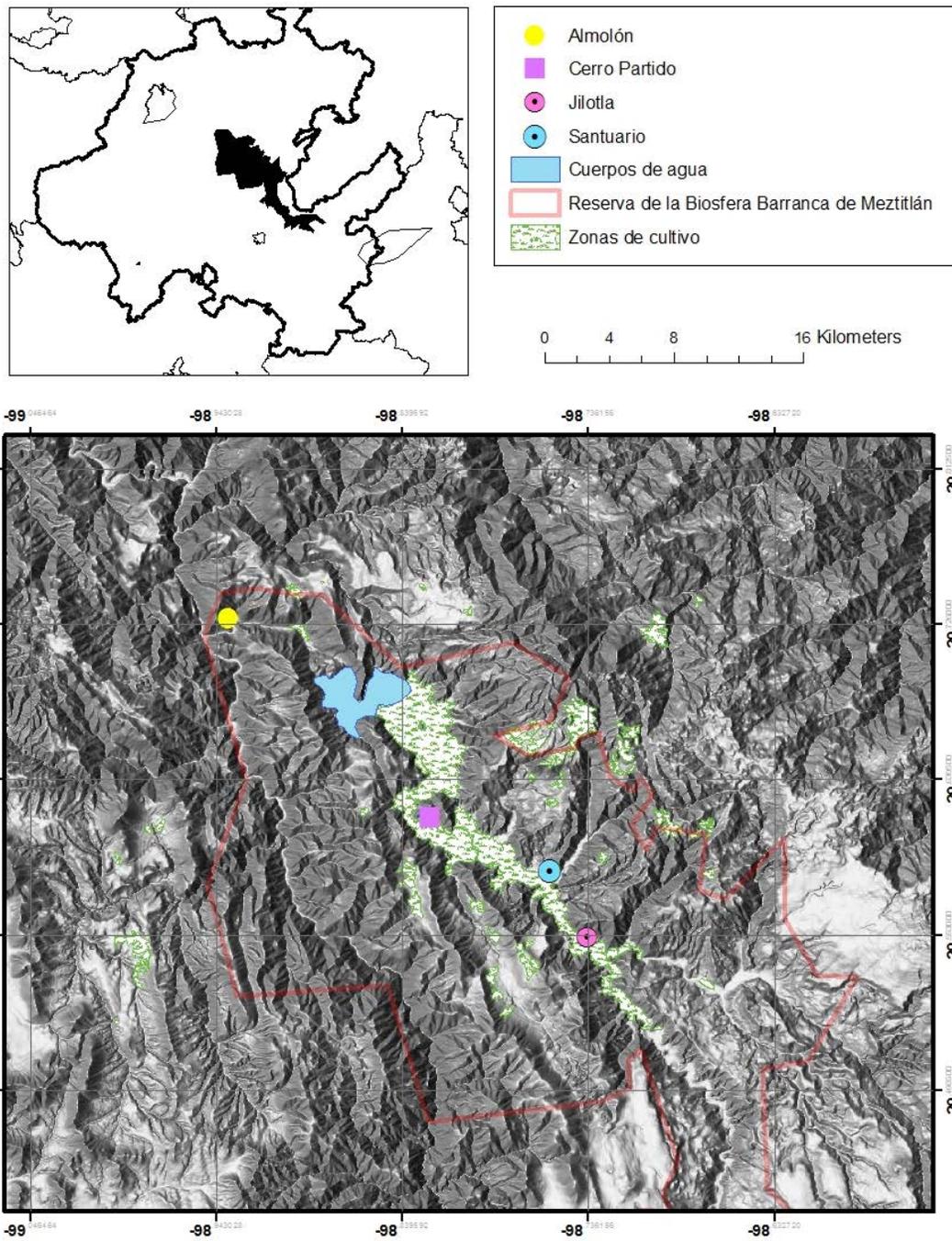


Figura 25. Mapa donde se muestran las barreras geograficas existentes entre las poblaciones de estudiadas de *Turbinicarpus horripilus*.

## 9. CONCLUSIONES

- ✓ La diversidad genética fue similar a la de otras plantas perennes de ambientes áridos estudiadas hasta la fecha con secuencias de ADNc.
- ✓ La estructuración genética de la especie es alta lo que sugiere que existe poco flujo genético.
- ✓ Las poblaciones más cercanas geográficamente (Santuario, Cerro, Jilotla) son más similares genéticamente. Almolón es la población más lejana geográfica y genéticamente.
- ✓ Los resultados de este estudio sugieren que las poblaciones en el pasado formaban un continuo y que fueron separadas por efecto de la vicarianza provocando un aislamiento geográfico entre las poblaciones y la deriva génica se ha fijado distintos alelos en cada una de las poblaciones.
- ✓ Para tener una historia más completa de esta especie, es importante que se analicen las poblaciones con marcadores nucleares para poder conocer mejor la historia evolutiva del grupo y el efecto que tienen los polinizadores en el flujo genético.
- ✓ Para fines de conservación, se deben conservar las cuatro poblaciones, ya que estas poseen haplotipos únicos y si desaparece una de ellas, la diversidad genética de la especie se verá afectada (disminuye).
- ✓ Debido a las características demográficas y reproductivas ya conocidas y a los hallazgos en el campo genético en este trabajo, es prioritario

que la especie sea considerada como una especie en Riesgo (P) por la NOM-059-SEMARNAT-2010.

- ✓ Es importante promover la idea de la cosecha sostenible de *T. horripilus* en UMAs de la región para lograr la conservación genética y taxonómica de la especie de la especie, además de que puede generar bienes y servicios ambientales de incalculable valor

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre J. 2012. Genética de poblaciones y filogeografía de *Fouquieria shrevei* (Familia Fouquieriaceae), especie gipsófila endémica de Coahuila. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México D.F.
- Aoki K., Matsumura T., Hattori T. y Murakami N. 2006. Chloroplast DNA phylogeography of *Photinia glabra* (Rosaceae) in Japan. *American Journal of Botany*, 93 (12): 1852-1858.
- Arenas S. 2015. Dispersión a larga distancia vs vicarianza: variación genética en un cactus columnar (*Stenocereus thurberi*) con distribución insular, peninsular y continental en el Golfo de California. Tesis de doctorado. Instituto de Ecología. UNAM. México D.F.
- Arias S., Guzmán U., Mandujano M., Soto-Galván M. y Golubov J. 2005. Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. *Cactáceas y Suculentas de México*, 4: 101-124.
- Bandelt H., Forster P. y Röhl A. 1999. Median-Joining Networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37-48.
- Barrios-Gómez K. 2013. Diversidad genética de las poblaciones de *Echinocactus platyacanthus* (CACTACEAE, CACTEAE). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México D.F.
- Barrios-Gómez K., Jiménez-Sierra C., Rocha-Manive M. y Serrato Díaz A. 2013. Conceptos básicos utilizados en genética de poblaciones. *Contactos*, 87: 52-58.
- Birky W. 1991. Evolution and population genetics of organelle genes: mechanisms and models. En Selander R. (compiladores). *Evolution at the molecular level*. Sinauer, Sunderland, Mass. 112-149pp.
- Bravo-Hollis H. y Sánchez-Mejorada H. 1991. Las cactáceas de México. Volumen 2. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- Bravo-Hollis H. y Scheinvar L. 1995. El interesante mundo de las cactáceas. Fondo de Cultura Económica. México D.F.
- Brito-Castrejón K. (en proceso). Estructura genética de las poblaciones de *Cephalocereus senilis* (Haw.) Pfeiff. (Cactácea). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa. México D.F.
- Bustamante E., Casas A. y Búrquez A. 2010. Geographic variation in reproductive succes of *Stenocereus thurberi* (Cactaceae): effects of pollination timing and pollinator guild. *American Journal of Botany*, 97: 2020-2030.
- Chen D., Zhang X., Kang H., Sun X., Yin S., Du H., y Liu C. 2012. Phylogeography of *Quercus variabilis* based on chloroplast DNA sequence in East Asia: multiple glacial refugia and mainland-migrated island populations. *PloS one*, 7: 10.
- Clark R., Alfonso-Corrado C., Eguiarte L. y Molina-Freaner F. 2005. Clonal diversity and distribution in *Stenocereus eruca* (cactaceae), a narrow endemic cactus of the Sonoran desert. *America Journal of Botany*, 92: 272-278.

- Clark R. 2000. Estructura genética de dos cactáceas columnares del desierto sonorense: *Stenocereus Gummosus* y *S. eruca* (Cactaceae). Tesis de Maestría. Unidad de los ciclos profesional y de posgrado del CCH. UNAM. México, D.F.
- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. 2003. Programa de Manejo Reserva de la Biósfera Barranca de Metztitlán. México. 202 pp.
- 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.
- Cornejo-Romero A. 2013. Estructura genética y filogeografía de dos cactus endémicos del valle de Tehuacán-Cuicatlán. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- Crandall M. y Templeton R. 1993. Empirical test of some prediction from coalescent theory whit application to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* 134: 959-969
- Cruden R. 1977. Pollen/ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution*, 31: 32-46.
- DeSalle R. y Amato G. 2004. The expansion of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics*, 5: 702-712.
- Doyle J. 1995. DNA data and legume phylogeny: a progress report. En Crisp M., Doyle J. (compiladores) *Advances in legume systematics, parte 7: phylogeny*, Royal Botanic Gardens, Kew. 11–30pp
- Echt C., De Verno L., Arzide M. y Vendramin G. 1998. Chloroplast microsatellites reveal population genetic diversity in red pine, *Pinus resinosa*. *Molecular Ecology*, 7: 307-309.
- Edwards A., Civetello A., Hammond H. y Caskey T. 1991. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal Human Genetics*, 49: 746-756.
- Eguiarte L. y Búrquez A. 1988. Reducción en la fecundidad en *Manfreda brachystachya* (Cav.) Rose, una agavácea polinizada por murciélagos: los riesgos de la especialización en la polinización. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 48: 147-149.
- Eguiarte L. y Scheinvar E. (Compiladores). 2008. *Agaves y cactáceas de Metztitlan: Ecología, Evolución y conservación*. Semarnat-Conacyt, INE, UNAM. México D.F. 1-11.
- Esparza-Olguín L., 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.
- Excoffier L., Laval G. y Schneider S. 2005. Arlequin 3.01: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Figueroa C., Nassar J., García-Rivas A. y González-García A. 2010. Population genetic diversity and structure of *Pilosocereus tillianus* (Cactaceae, Cereae), a

columnar cactus endemic to the Venezuelan Andes. *Journal of Arid Environments*, 74: 1392-1398.

- Flores. M., 2011. Zonas áridas de México, las menos exploradas. Página digital de la UNAM. Boletín UNAM-DGCS-763. [Consultada: 17 de abril de 2013]. [http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2011\\_763.html](http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2011_763.html)
- Frankham R., Ballou J., y Biscoe D. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press. Nueva York. 617pp.
- Freeman S., y Herron, J. 2002. *Evolutionary analysis*. Pearson Prentice Hall. USA. 800pp.
- Futuyma D., 1998. *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates. Nueva York. 763pp.
- Godínez-Alvarez H., y Ortega-Baes P. 2007. Mexican cactus diversity: environmental correlates and conservation priorities. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 81: 81-87.
- González-Medrano F. 2003. *Las comunidades vegetales de México*. Semarnat-INE. México. 77pp.
- Golstein D.B. y Pollok D.D. 1994. Least-squares estimation of molecular distance-noise abatement in phylogenetic reconstruction. *Theoretical Applied Genetics*, 12: 432-440.
- Golstein D., Zhivotovsky L., Nayar K., Ruíz L., Cavalli-Sforza L. y Feltman M. 1996. Statistical properties of the variation at linked microsatellite loci: implications for the history of human Y-chromosome. *Molecular Biology and Evolution*, 13: 1213-1218.
- Guzmán U., Arias S. y Dávila P. 2003. *Catálogo de cactáceas*. UNAM, CONABIO. México, D.F. 320pp.
- Hamrick J., Nason J., Fleming T. y Nassar J. 2002. Genetic diversity in columnar cacti. En Fleming T. y Valiente A. (compiladores). *Columnar cacti and their mutualist: evolution, ecology and conservation*. University of Arizona Press, Tucson, Arizona, USA. 122-133pp.
- Hamrick J. Golt J. 1996. Effect of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Biological Sciences*, 351: 1291-1298.
- Hancock J. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomics context and mutational mechanisms. En Goldstein D. y schlötterer (editores). *Microsatellites, evolution and applications*. Oxford University Press. Oxford, Nueva York, USA. 1-10pp.
- Hamilton M. 2009. *Population Genetics*. John Wiley & Sons. Malasia 407pp.
- Hardesty B., Hughes S., Rodríguez V. y Hawking J. 2008. Characterization of microsatelli loci for the endangered cactus *Echinocactus grusonii*, and their cross-species utilization. *Molecular Ecology Resource*, 8: 164-167.
- Hedrick P. 2011. *Genetics of Populations*. 4a edición. Jones and Bartlett, Sudbury MA, USA. 368pp.
- Hedrick P. 1985. *Genetics of Populations*. Jones and Bartlett, Boston. 325pp
- Hedrick P. 2005. Conservation genetics: where are we now? *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 629-636.

- Hernández-Hernández T., Hernández M., De-Nova J., Puente R., Eguiarte L y Magallon S. 2011. Phylogenetic relationships and evolution of grown form in cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). *American Journal of Botany*, 98: 44-61.
- Huelsenbeck J. y F. Ronquist. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17: 754-755.
- Hughes S., Rodríguez V., Hardesty B., Barcenas-Luna R., Hernández H., Robson S. y Hawkins J. 2008. Characterization of microsatellite loci for the critically endangered cactus *Ariocarpus bravoanus*. *Molecular Ecology Resources*, 8: 1068-1070.
- Ibarra-Suárez A. 2009. Estudio de la diversidad genética de cactáceas endémicas del género *Mammillaria* del Valle de Tehuacán-Cuicatlan, Puebla-Oaxaca, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México, D.F.
- Jarquin M. 2009. Estudio morfofisiológico del desarrollo de la plántula de *Turbinicarpus horripilus* (Lem) Vac Jhon & Riba (Cactaceae). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México D.F.
- Jiménez-Sierra C. 2008. Demografía y biología de *Echinocactus platyacanthus* Link et Otto en el Valle de Tehuacán, Puebla. Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias UNAM. México D.F.
- Jiménez-Sierra, C. 2011. Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista Digital Universitaria*, 12(1): 3-22. [Consultada: 10 de abril de 2014]. <http://www.revista.unam.mx/vol.12/num1/art04/index.html>
- Jiménez-Sierra, C. y Matías-Palafox M. 2015. Dinámica poblacional de cactáceas amenazadas. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Informe final SNIB-CONABIO, proyecto No. HK026. México D.F.
- Lacy C., Lindenmayer B. 1995. A simulation study of the impacts of population subdivision on the mountain brushtail possum *Trichosurus caninus* Ogilby (Phalangeridae, Marsupialia) in southeastern Australia. Loss of genetic variability within and between subpopulation. *Biological Conservation* 73:131-142.
- Lewin B. 2001. *Genes VII*. Oxford University Press. Massachusetts, USA. 990pp.
- Liu Y., Yang S., Ji P. y Gao L. 2012. Phylogeography of *Camellia taliensis* (Theaceae) inferred from chloroplast and nuclear DNA: insights into evolutionary history and conservation. *BMC Evolutionary Biology*, 12: 92.
- López N. 2013. Diversidad y estructura genética poblacional de *Mammillaria zephyranthoides* (Cactaceae): una especie endémica de México. Tesis de licenciatura. FES Iztacala, UNAM. Estado de México, México.
- Martínez N. 2013. Genética de poblaciones de *Agave stricta* Salm-Dyck, especie endémica al valle de Tehuacán-Cuicatlan, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de ciencias. UNAM. México D.F.
- Matías-Palafox M. y Jiménez-Sierra C. 2004. *Turbinicarpus horripilus* (Lem.) Vác. John & Riha. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 49: 128.
- Matías-Palafox M. L. y Jiménez-Sierra C. L. 2006. Evaluación del riesgo de extinción de las poblaciones de *Turbinicarpus horripilus* (Lem.) Vác. John & Riha,

cactácea endémica de la Barranca de Metztitlán, México. *Cactáceas y suculentas mexicanas* 51 (4): 100-110.

- Matías-Palafox M. 2007. Estructura poblacional y biología reproductiva de *Turbincarpus horripilus* (Lem) Vac Jhon & Riba (Cactaceae). Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- Milan Z. 2004. The genus *Turbincarpus*. Vydavatelstvo Ilgor Dráb & Spolocnost Cactaceae. Bratislava-Slovakia.
- Moraes E., Abreu A., Andrade S., Sene F. y Solferini V. 2005. Population genetic structure of two columnar cacti with a patchy distribution in eastern Brazil. *Genetica*, 125: 311-323.
- Nassar J., Hamrick J. y Fleming T. 2003. Population genetic structure de Venezuela chiropterophilus columnar cacti (Cactaceae). *America Journal of Botany*, 90: 1628-1637.
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. *The America naturalist*, 106: 949.
- Ornelas J., Ruiz E. y Sosa V. 2010. Phylogeography of *Podocarpus matudae* (Podocarpaceae): pre Quaternary relicts in northern Mesoamerican Cloud forests. *Journal of Biogeography*, 37: 2384-2394.
- Page R. y Holmes E. 1998. *Molecular Evolution*. Blackwell Science. USA. 545pp.
- Parker P., Snow A., Schug G., Booton C y Fuerst P. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79: 361-382.
- Palmer, J., y Delwiche C. 1998. The origin and evolution of plastids and their genomes. En Soltis P., Soltis D. and Doyle J, (compiladores). *Molecular systematics of plants. II. DNA sequencing*. Kluwer Academic, Boston. 375–409pp.
- Parra-Leyva J. 2015. Variación genética y diferenciación en poblaciones de *Agave Kerchovei* Lem. Usando marcadores de cloroplasto. Tesis de Licenciatura. Facultad de ciencias. UNAM. México D.F.
- Pennington R., Prado D. y Pendry C. 2000. Neotropical seasonally dry forests and quaternary vegetation changes. *Journal of Biogeography*, 27: 261-273.
- Petit R., Latouche-Halle´ C., Pemonge M., Kremer A. 2002. Chloroplast DNA variation of oaks in France and the influence of forest fragmentation on genetic diversity. *Forest Ecology and Management*, 156: 115–129.
- Piñero, D., Caballero-Mellado J., Cabrera-Toledo D., Canteros E., Casas A., Castañeda A., Castillo A., Cerritos R., Chassin-Noria O., Colunga-GarcíaMarín P., Delgado P., Díaz-Jaimes P., Eguiarte L., Escalante A., Espinoza B., Fleury A., Flores S., Fragoso G., González-Astorga J., Islas V., Esperanza M., Martínez F., Martínez-Castillo J., Mastretta A., Medellín R., Medrano-González L., Molina-Freaner F., Morales Vela B., Murguía Vega A., Payró E., Reyes-Montes M., Robles Saavedra M., Rodríguez-Arellanes G., Rojas L., Romero-Martínez R., Sahaza-Cardona J., Salas R., Sciutto E., Scott C., Schramm Y., Silva C., Souza V., Taylor M. Urbán J., Uribe-Alcocer M., Vázquez M., Vázquez-Domínguez E., Vovides A., Wegier A., Zaldívar A y Zúñiga G. 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, en *Capital*

natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México. 437-494pp

- Posada D. y Crandall K. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 14: 817-818.
- Primack R. 2010. *Essentials of conservation biology*, Fifth Edition. Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts. 603pp
- Rentería M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. En Eguiarte L., Souza V y Aguirre X (compiladores). *Ecología Molecular*. SEMARNAP, CONABIO, INE, UNAM, México D.F. 541-566pp.
- Reyes J. 1997. Cultivo y propagación como plantas de ornato. En *Suculentas Mexicanas: Cactáceas*. CONABIO. México. D. F.
- Rocha M. y Gasca J. 2007. *Ecología molecular de la conservación*. En Eguiarte L., Souza V. y Aguirre X. (compiladores). *Ecología Molecular*. Instituto Nacional de Ecología. México, D. F. 251-278pp.
- Sánchez-Mejorada H. 1978. *Manual de campo de las Cactáceas y Suculentas de la Barranca de Metztitlán*. Sociedad Mexicana de Cactología.
- Sanderson F., Pople R. y Leronymidou C. 2015. Assessing the performance of EU legislation in protecting target bird species in an era of climate change. *Conservation Letters a journal of the Society for Conservation Biology*, 9: 172-180.
- Schlötterer S. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109: 365-371.
- Shaw J., Lickey E., Beck J., Farmer S., Liu W., Miller J., Siripun K., Winder C., Schilling E. y Small R. 2005. The tortoise and the hare II: Relative utility of noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany*, 92(1): 142-166.
- Shaw J., Lickey E., Schilling E. y Small R. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, 94(3): 275-288.
- Shepherd D., Perrie R., y Brownsey J. 2007. Fire and ice: volcanic and glacial impacts on the phylogeography of the New Zealand forest fern *Asplenium hookerianum*. *Molecular Ecology*, 16: 4536-4549.
- Simpson J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms. *Boletín de la Sociedad Botánica Mexicana*. México, 60 (4): 73-76
- Slatkin M. 1981. Estimating levels of gene flow in natural populations. *Genetics*, 99: 323-335.
- Slakin M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16: 393-430.
- Soranzo N., Porvan J. y Powell W. 1999. An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. *Genome*, 42: 158-161.
- Solorzano S., Cortez-Palomec A., Ibarra A., Davila P. y Oyama K. 2009. Isolation, characterization and cross-amplification of polymorphic microsatellite loci in the

threatened endemic, *Mammillaria crucígera* (Cactaceae). *Molecular Ecology Resource*, 9: 156-158.

- Soto-Trejo F. 2015. Filogenia y diversificación de *Florestina* (Asteraceae) en regiones áridas y semiáridas de México. Tesis de doctorado. Facultad de estudios superiores Iztacala. UNAM. México, D.F.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G. y Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17: 1105-1109.
- Tamura K. Stecher G. Peterson D. Filipski A. y Kumar S. 2011. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- Tapia Salcido H. 2011. Análisis de la diversidad y estructura genética poblacional de dos especies de género *Mammillaria*, endémicas del Valle de Tehuacan Cuicatlan. Tesis de Maestría. FES Iztacala, UNAM. Estado de México, México.
- Valiente-Banuet A., Arizmendi M., Rojas-Martinez A y Domínguez-Canseco L. 1996. Ecological relationships between columnar cacti and néctar-feeding bats in Mexico. *Journal of Tropical Ecology*, 12:103-119.
- Vázquez-Sánchez M., Terrazas T., Arias S. y Ochoterena H. 2013. Molecular phylogeny, origin and taxonomic implications of the tribe Cacteeae (Cactaceae). *Systematics and biodiversity* 11: 103-116.
- Vendramin G., Lelli L., Rossi P. y Morgante M. 1996. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae. *Molecular Ecology* 5: 595.
- Vendramin G., Anzide M., Madaghiele A. y Bucci G. 1998. Distribution of genetic diversity in *Pinus pinaster* Ait. As revealed by chloroplast microsatellites. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 456-463.
- Wang F., Xue-Jun E., Gong X., Hu C. y Hao G. 2008. Strong genetics differentiation of *Primula sikkimensis* in the East Himalaya –Hengduan Mountains. *Biochemical Genetic*, 46: 75-87.
- Weir B. y Cockerham C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38:1358-1370.
- Wright S., 1951. The genetical structure of populations. *Ann Eugen.* 15: 323-354.
- Wright S., 1965. The interpretation of population structure by F-statistics whit special regard to systems of mating. *Evolution*, 19: 395-420
- Zane L., Bargelloni L. y Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolate: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1-16
- Zarate D. 2013. Variación genética entre poblaciones de *Pteronotus personatus* (Chiroptera: Mormoopidae) en México. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México D.F.

## ANEXOS

### ANEXO 1 Protocolo de extracción “DNeasy Plant Mini Kit” QIAGEN (MODIFICADO)

Se señala con negritas las modificaciones al protocolo.

1. Moler la planta con nitrógeno líquido en un mortero (De uno a dos tuberculos).  
Transferir el polvo obtenido a tubos eppendorf de 2 ml.
2. Añadir 500 µl de buffer AP1 y 4 µl de RNasa, y pasar por el vortex.
3. Incubar la mezcla por **20 min a 65° C**. Invertir los tubos de 2 a 3 veces durante la incubación.
4. Añadir 130 µl de buffer P3 e incubar por 5 min en hielo.
5. Se recomienda centrifugar el lisado por 5 min a 14000 rpm.
6. Vaciar el lisado a las columnas QIashredder spin (lilas) y centrifugar por 2 min a 14000 rpm.
7. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo sin mover ni tocar el sedimento (en este paso se tiene que medir la cantidad de líquido que se pasa al siguiente tubo para saber cuánto Buffer AW1 se adicionará).  
  
Para saber cuánto adicionar de buffer AW1, se multiplicó por 1.5 el volumen del líquido (sobrenadante) obtenido en el paso anterior.
8. Transferir 650 µl de la mezcla del paso anterior, a una DNeasy mini column spin (columna blanca) con su tubo colector y centrifugar a 1 min por 8000 rpm. Descartar el sobrenadante.
9. Repetir el paso anterior con el volumen remanente de muestra.

10. Poner la DNeasy mini column spin (columna blanca) en un nuevo tubo colector de 2 ml (se puede rehusar el del paso anterior), y añadir 500 µl de Buffer AW2. Centrifugar 1 min a 8000 rpm, descartar el líquido del tubo colector.
11. Adicionar otros 500 µl de Buffer AW2 y centrifugar por 2 min a 14000 rpm.
12. Transferir la columna a un nuevo tubo de 1.5 ó 2 ml.
13. Adicionar **50 µl de agua desionizada** e incubar por **30 min a temperatura ambiente**. Centrifugar 1 min a 8000 rpm.
14. **Repetir la incubación de 15 min realizada en el paso anterior.**

**ANEXO 2. Especies incluidas en los análisis filogenéticos para los genes *PetB* intrón D4, *trnL-rp32*, *trnL-trnF*.**

<b>Especie</b>	<b>Marcador</b>	<b>Número de Genbank</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Referencias</b>
<i>Ariocarpus Kotschobeyanus</i> <sup>a,d</sup>	<i>petB</i> intrón D4	--	Querétaro, México.	González-Adán (presente estudio)
<i>Stenocereus thurberi</i> <sup>c</sup>	<i>petB</i> intrón D4	--	Jardín Botánico, UNAM.	Brito-Castrejon (proceso).
<i>Echinocactus platyacanthus</i> 1 <sup>a,d</sup>	<i>petB</i> intrón D4	--	Hidalgo, México	González-Adán (presente estudio)
<i>Echinocactus platyacanthus</i> 2 <sup>a,d</sup>	<i>petB</i> intrón D4	--	Hidalgo, México	González-Adán (presente estudio)
<i>Echinocactus platyacanthus</i> 8 <sup>a,d</sup>	<i>petB</i> intrón D4	--	Hidalgo, México	González-Adán (presente estudio)
<i>Echinocactus platyacanthus</i> 3 <sup>a,d</sup>	<i>petB</i> intrón D4	--	Nuevo León, México	González-Adán (presente estudio)
<i>Cephalocereus senillis</i> <sup>c,d</sup>	<i>petB</i> intrón D4	--	Hidalgo, México	González-Adán (presente estudio)
<i>Carnegia gigantea</i>	<i>petB</i> intrón D4	KT164771.1	Sonora, México	Sanderson <i>et al.</i> 2015.
<i>Ariocarpus Kotschobeyanus</i> <sup>a,d</sup>	<i>trnL-rp32</i>	--	Queretaro, México	González-Adán (presente estudio)
<i>Eulychnia iquiquensis</i> <sup>b,d</sup>	<i>trnL-rp32</i>	LN868011.1	Jardin Botanico Nacional de Chile	Larridon <i>et al.</i> (2015).
<i>Copiapoa rupestris</i> <sup>b,d</sup>	<i>trnL-rp32</i>	LN868064.1	Desierto de Atacama, Chile.	Larridon <i>et al.</i> 2015.
<i>Copiapoa desertorum</i> <sup>b,d</sup>	<i>trnL-rp32</i>	LN868058.1	Desierto de Atacama, Chile.	Larridon <i>et al.</i> (2015).
<i>Cephalocereus</i>	<i>trnL-trnF</i>	--	Hidalgo, México.	Brito-Castrejon,

<i>senillis</i> <sup>c,d</sup>				(proceso)
<i>Ariocarpus bravoanus</i> <sup>c,d</sup>	<i>trnL-trnF</i>	HM041227	México	Hernandez-Hernandez <i>et al.</i> (2011)
<i>Strombocactus disciformis</i> <sup>c,d</sup>	<i>trnL-trnF</i>	HM041362	México	Hernandez-Hernandez <i>et al.</i> (2011)
<i>Turbincarpus viereckii</i> <sup>c,d</sup>	<i>trnL-trnF</i>	HM041374	México	Hernandez-Hernandez <i>et al.</i> (2011)
<i>Echinocactus grusoni</i> <sup>c,d</sup>	<i>trnL-trnF</i>	HM041257	México	Hernandez-Hernandez <i>et al.</i> (2011)
<i>Astrophytum ornatum</i> <sup>c,d</sup>	<i>trnL-trnF</i>	KC776948	Desierto de Chihuahua, México.	Vázquez-Lobo <i>et al.</i> (2015)
<i>Turbincarpus horripilus</i> <sup>a</sup>	petB intrón D4	--	Metztlán, Hidalgo.	González-Adán (presente estudio)
<i>Turbincarpus horripilus</i> <sup>a</sup>	<i>trnL-rp32</i>	--	Metztlán, Hidalgo.	González-Adán (presente estudio)
<i>Turbincarpus horripilus</i> <sup>a</sup>	<i>trnL-trnF</i>	--	Metztlán, Hidalgo.	González-Adán (presente estudio)

<sup>a</sup> secuencias obtenidas en este estudio, <sup>b</sup> secuencias tomadas del GenBank, <sup>c</sup> secuencias obtenidas por Brito-Castrejon (tesis en proceso), <sup>d</sup> grupos externos, -- datos ausentes.