



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE BIOLOGÍA
SISTEMA DE APAREAMIENTO Y ESTRUCTURA GENÉTICA EN
POBLACIONES DE *Mammillaria pectinifera* (Rümpel) F. C. A.
Weber (Cactaceae)**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA:
Biol. Reyna Maya García**

Director de proyecto

Doctor en Ciencias. Pablo Cuevas Reyes

Co-Director

Doctor en Ciencias. Ken Oyama Nakagawa

Morelia, Michoacán, Marzo del 2014

U.M.S.N.H



Agradecimientos

Al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), por brindarme la oportunidad para llevar a cabo la realización de este proyecto, así como la formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT), al otorgarme la beca (270338) de manutención durante la realización de la Maestría para poder llevar a cabo la realización de este proyecto.

A la ENES-Morelia (Escuela Nacional de Enseñanza Superior), por el financiamiento otorgado para este estudio.

Al laboratorio de Genética y Biología Molecular, del Centro de Investigaciones en ecosistemas campus Morelia de la Universidad Autónoma de México (UNAM), y en forma muy especial al Dr. Ken Oyama quién además es co-director del este proyecto, por su invaluable apoyo, orientación y disponibilidad.

A los integrantes del comité tutorial, Dr. Pablo Cuevas Reyes, Dr. Omar Chassin Noria, Dra. Deneb García Ávila y al Dr. Antonio González Rodríguez. A cada uno de ustedes por su valiosa ayuda, orientación y comentarios para enriquecer este trabajo.

Al Dr. Víctor Rocha Ramírez, por el aprendizaje, la capacitación y orientación en la realización de este proyecto.

Al Dr. Santiago Arizaga, por su colaboración y ayuda en la colecta de las poblaciones de estudio que se incluyeron en este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Gabriela López, Will Ramírez, Carmen J. Figaredo, Claudia Citlali Farias, Francisco Rivera, por su valiosa ayuda y apoyo

con los programas de análisis genéticos. Gracias por los buenos momentos que hemos pasado, su solidaridad y compañerismo. A la Sra. Lolita por su valioso apoyo durante la etapa de laboratorio.

A Fabiola Parra, por su valiosa ayuda en la parte técnica de laboratorio y sobre todo por tu amistad.

A mi familia, Carlos, Ben Lamat, Said y Karla, por el apoyo que siempre he recibido por ayudarme a lograr mis sueños y por ser parte de ellos.

A mis compañeros y amigos de maestría, por compartir esta experiencia.

INDICE

• RESUMEN GENERAL.....	4
• SUMMARY	4
• INTRODUCCIÓN GENERAL.....	6
ANTECEDENTES.....	9
FAMILIA CACTACEAE, CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	10
SISTEMA REPRODUCTIVO.....	11
SÍNDROME DE POLINIZACIÓN	13
POLINIZADORES DE CACTÁCEAS.....	13
ESTRUCTURA GENÉTICA.....	14
MICROSATÉLITES.	15
OBJETIVOS.....	17
ESTRUCTURA DE LA TESIS.....	18
• CAPÍTULO UNO	19
SISTEMA DE APAREAMIENTO EN POBLACIONES DE	
<i>Mammillaria pectinifera</i>	20
INTRODUCCIÓN.....	22
MATERIAL Y MÉTODOS	27
Descripción del sitio de estudio	27
Descripción de la especie	28
Desarrollo de la inflorescencia	29
Síndrome de polinización	30
Descripción floral.....	30
Sistema de Apareamiento	31
Autopolinización espontánea.....	32
Endrocruzamiento.....	32
Exocruzamiento.....	32
Apomixis.....	32
Índice de germinación.....	33
RESULTADOS.....	34
Fórmula floral	36

Síndrome floral.....	36
Sistema de apareamiento	37
DISCUSIÓN	43
• CAPÍTULO DOS.....	45
• ESTRUCTURA GENÉTICA EN POBLACIONES DE <i>Mammillaria</i>	
<i>pectinifera</i>	46
INTRODUCCIÓN.....	48
MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
Extracción de ADN	51
Análisis de datos.....	54
RESULTADOS.....	57
Frecuencias alélicas.....	57
Estadísticos F.....	60
AMOVA.....	61
Estructura genética	62
DISCUSIÓN	66
CONCLUSIONES.....	68
BIBLIOGRAFÍA.....	69
GLOSARIO.....	77
ANEXOS.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Distribución de las poblaciones de <i>M.pectinifera</i> dentro de la Reserva de la Biosfera de Tehuacán Puebla.....	28
Fig. 2 Esquema de planta adulta de <i>M. pectinifera</i>	29
Fig. 3 Disección de una flor de <i>M. pectinifera</i>	31
Fig. 4 Flores aisladas, marcadas con el tratamiento correspondiente de cruce controlada.....	31
Fig. 5 Desarrollo de cada una de las etapas de los brotes florales florales de <i>M. pectinifera</i>	34
Fig. 6 Porcentaje de floración en cada una de las poblaciones que presentan brotes florales.....	35
Fig. 7 Proporción de frutos obtenidos con exocruzamiento.....	38

Fig. 8 Producción de frutos obtenidos con exocruzamiento	38
Fig. 9 Obtención de semillas	40
Fig. 10 Promedio del número de semillas por población.....	41
Fig. 11 Germinación de semillas tomadas de diferentes frutos	42
Fig. 12 Tejido fotosintético tomado de plantas de <i>M. pectinifera</i>	51
Fig. 13 Amplificación de ADN en individuos de <i>M. pectinifera</i>	51
Fig. 14 Productos de PCR para diferentes individuos	52
Fig. 15 Porcentaje de variación genética	62
Fig. 16 Resultados de análisis de asignación bayesiana mediante el programa STRUCTURE.....	62
Fig. 17 Valores de ΔK	63
Fig. 18 Proporción de ancestría	65

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Estimación del tiempo de desarrollo de cada una de las etapas de floración	35
Cuadro 2 Atributos florales que presenta <i>M. pectinifera</i> para determinar el síndrome de polinización	37
Cuadro 3 Características de los frutos obtenidos con polinización Cruzada.....	39
Cuadro 4 Porcentaje de semillas por población.....	40
Cuadro 5 Número de alelos por población.....	53
Cuadro 6 Número de alelos por locus por población.....	57
Cuadro 7 Variación genética en 18 poblaciones de <i>M. pectinifera</i> , dentro de la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán	58
Cuadro 8 Valores de diversidad genética por locus.....	59
Cuadro 9 Valores promedio de los diferentes parámetros que se utilizaron en las poblaciones de <i>M. pectinifera</i>	59
Cuadro 10 Índice de fijación genética en poblaciones de <i>M. pectinifera</i>	60
Cuadro 11 Porcentaje de variación entre y dentro de poblaciones de <i>M. pectinifera</i>	61
Cuadro 12 Cálculo del valor de K	63

RESUMEN GENERAL

La familia Cactaceae es endémica del Continente Americano, cuenta con alrededor de 100 géneros y 1500 a 1800 especies. Su rango de distribución para nuestro país, desde Baja California hasta Yucatán, además cuenta con el 68% de las especies descritas a nivel mundial (Anderson, *et al.*, 1994). Dentro de la Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán se encuentra la especie *Mammillaria pectinifera* F.C.A. Weber, endémica de esta reserva, catalogada como amenazada en la NOM-059-ECOL-2001 e incluida en el apéndice I de CITES (SEMARNAT 2002, IUCN 2007, CITES 2008) en la categoría de peligro crítico. Las poblaciones han declinado severamente por actividades antropogénicas, Es fundamental analizar su, biología floral, sistema reproductivo, pueden estar ocasionado efectos sobre la diversidad y estructura genética. Los objetivos planteados fueron determinar, el sistema de apareamiento y la estructura genética, Los resultados infieren que la especie presenta un sistema de exocruza y un sistema de apareamiento xenogamo. Los parámetros genéticos obtenidos con seis pares de microsatélites, muestran un alto nivel de heterocigosidad $H_e = 0.739 \pm 0.009$, un exceso de heterocigos $F = -0.169$ y los resultados del AMOVA indican que existe mayor porcentaje de diferenciación genética dentro de poblaciones (95.33%) que entre poblaciones (4.67%).

Palabras clave: *Mammillaria pectinifera*, heterocogosis, estructura genética.

SUMMARY

The Cactaceae is endemic to America, has about 100 genera and 1500-1800 species (Solomon, 2001). In Mexico its range is very wide, from Baja California to the Yucatan. It has 68% of the species described worldwide. Inside Biosphere Tehuacán- Cuicatlán species is *Mammillaria pectinifera* FCA Weber, is endemic to the book, listed as threatened under NOM -059- ECOL -2001 and included in Appendix I of CITES (SEMARNAT 2002, IUCN 2007, CITES 2008) in the category of critically endangered. Populations have declined sharply mainly by anthropogenic activities, is vital to analyze their distribution,

population size, floral biology reproductive system may be caused effects on genetic diversity and structure. The objectives of this study were to determine the mating system and genetic structure of *M. pectinifera*. The results infer that the species has a system and outcrossing mating system xenogamo. Genetic parameters obtained with six pairs of microsatellites, show a high level of heterozygosity $H_e = 0.739 \pm 0.009$, an excess of heterozygous $F = -0.169$ and the results of MANOVA indicate that there is a higher percentage of genetic differentiation within populations (95.33 %) between populations (4.67 %).

Key words: genetic structure, *Mammillaria pectinifera*, heterozygous

INTRODUCCIÓN GENERAL

La familia Cactaceae es endémica del continente americano, su distribución es desde Canadá, en una latitud de 56° N, hasta el estrecho de Magallanes en América del Sur (Bravo-Hollis, 1978). Una explicación acerca del endemismo de la familia es su aparición reciente, la evolución de estas plantas ya como cactáceas pudo ser a partir de posibles antecesores africanos después que el continente Americano se separó de África por el Océano Atlántico, sin que pudieran dispersarse, establecerse o evolucionar en otros continentes (Bauxbaum, 1969). No se tiene registro de la época en que se originaron y aparecieron, debido a que se carece de ejemplares fosilizados (Bravo-Hollis, 1978). Sin embargo en un estudio filogenético reciente llevado a cabo por Arakaki *et al.*, (2011) sugieren que la familia Cactaceae apareció hace aproximadamente 35 millones de años, que es mucho más joven de lo que se había reportado anteriormente 80 (Ma) (Gibson y Nobel, 1986). Se han adaptado a condiciones sumamente adversa de las zonas áridas donde se encuentran. Han desarrollado características morfológicas y fisiológicas para hacer un uso eficiente del agua (Becerra, 2002). La familia cuenta con alrededor de 100 géneros y unas 1500-1800 especies (Solomon, 2001).

En México las cactáceas desde tiempos prehispánicos han tenido un lugar privilegiado, principalmente en jardines de emperadores como Nezahualcóyotl. Durante la conquista los españoles colectaron grandes cantidades de especies las cuales fueron enviadas a Europa durante el siglo XVI, es en ese momento cuando se crearon los primeros jardines botánicos en España, y las primeras colecciones particulares en países como Holanda, Italia y Alemania, lo que provocó un intenso comercio causando que muchas especies de esta familia hayan declinado y se encuentren amenazadas o en peligro de extinción (Sánchez-Mejorada, 1982).

Para nuestro país la distribución de las cactáceas es muy amplia, se pueden encontrar desde Baja California hasta la península de Yucatán. México cuenta con 48 géneros y 563 especies, lo que representa el 45% del total de especies de la familia (Hernández y Godínez, 1994; Reyes, 1994; Zavala-Hurtado,

1997). Dicha diversidad se debe a que el 60% del territorio nacional presenta condiciones de aridez; las regiones áridas y semi-áridas abarcan parte de los estados de Sonora, Chihuahua, Tamaulipas, Hidalgo, Puebla, Guerrero, Veracruz y Yucatán. Las zonas áridas del sur (semi-áridas) presentan carácter tropical como es el caso de el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, el Cañón de Tomelín y la del Istmo de Tehuantepec (Miranda, 1955). De acuerdo a la SEMARNAT (1994), las precipitaciones para los ambientes que presentan mayor grado de aridez van alrededor de los 0 a los 400 mm, como ocurre en el desierto de Chihuahua. La vegetación que se observa la componen principalmente especies de *Ferocactus sp.* *Ariocarpus sp.* y algunas especies de *Mammillaria* entre otras. En zonas con precipitaciones anuales que van de los 300 a los 1800 mm, se desarrollan cactáceas como los pitayos perteneciente al género *Stenocereus* y órganos de los géneros *Neobuxbaumia* y *Pachycereus*. (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1978). En la zona central del país se encuentra el Valle de Tehuacán- Cuicatlán, con una gran diversidad vegetal, destacando las cactáceas con alrededor de 81 especies, de las cuales el 25% son endémicas (Arias *et al.*, 1997). Destacan especies columnares como teteches (*Neobuxbaumia macrocephala*) pitayas, xoconoxtles (*Stenocereus sp.*), chendes (*Polaskia sp.*), y una gran diversidad de biznagas (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1978). El género *Mammillaria* es uno de los más diversos Arias (2004), con alrededor de 2000 especies, se considera que México es el principal centro de diversificación, y en donde se puede encontrar un alto grado de endemismo (alrededor de 150 especies). La especie *Mammillaria pectinifera* es endémica del Valle de Tehuacán-Cuicatlán catalogada como amenazada por la NOM-059-ECOL-2001, además de ser una de las dos especies del género *Mammillaria* incluida en la lista del apéndice I de CITES (SEMARNAT 2002, IUCN 2007, CITES 2008). Recibe esta categoría debido a la disminución de sus poblaciones y número de individuos principalmente debido al cambio de uso de suelo, al desarrollo de comunidades urbanas, a la sobre colecta para fines comerciales y al deterioro del hábitat donde se desarrolla (Matorell y Peters, 2005). Desde que se descubrió esta especie en el año 1800 ha sido muy demandada y colectada de manera intensa pese a que se encuentra en un área restringida (Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán). Taxonómicamente se encuentra aislada ya que sólo se

conoce otra especie relativamente cercanas a esta como es *Mammillaria solisoides* que también está en calidad de “amenazada” (Anderson, *et al.*, 1994). Se sabe que la madurez reproductiva de esta especie en condiciones naturales se da cuando los individuos han alcanzado una talla de 19 ± 2.01 mm, lo cual corresponde a un individuo con una edad aproximadamente de 14 años, lo cual contrasta con lo reportado en plantas en viveros, las cuales alcanzan una madurez reproductiva alrededor de los dos años de edad (Anderson, *et al.*, 1994).

Existen pocos estudios ecológicos sobre esta especie, los cuales evidencian que la especie se encuentra en peligro de extinción (Peters, 2008; Valverde, *et al.*, 2009), y no en calidad de amenaza como se asienta en la NOM-059-ECOL-2001. Valverde (2009) sugiere que *M. pectinifera* debe ser nuevamente considerada en la Lista Roja de la UICN con la categoría en peligro crítico (CR), categoría que equivale también al Apéndice I de la CITES (Arias *et al.*, 2005) de ahí que se haya realizado un estudio acerca del grado de amenaza del género *Mammillaria* (Gastón, 1994). Se han estudiado aspectos como la En un estudio filogeografía de la misma *M. pectinifera* llevado a cabo por Cornejo-Romero (2014), también se evaluó el sistema reproductivo. A nivel de género se han hecho estudios de germinación de semillas (Flores-Martínez, 2008) y propagación *in vitro* (Ordoñez, 2003), en las especies *Mammillaria oteori*, *M. dixanthocentrari* y *M. mathildae* respectivamente. Se han desarrollado estudios acerca de las relaciones filogenéticas dentro de la familia Cactaceae en donde se incluyeron 113 taxa del género *Mammillaria* (Butterworth y Wallace del 2004), se ha puesto interés en la distribución espacial de la especie (Rodríguez y Ezcurra, 2000). En cactáceas columnares se han realizado estudios de fenología y biología reproductiva (Bustamante *et al.*, 2005), dentro de nuestra especie de estudio se desconocen muchos aspectos sobre su biología reproductiva, así como de su estructura genética, la poca información obtenida de los escasos estudios ecológicos revelan que muchas de sus poblaciones se encuentran en severo peligro de extinción (Velarde *et al.*, 2009), de ahí que surja el interés de llevar a cabo este estudio el cual proporcionará información para el diseño de programas de manejo y conservación de la especie.

ANTECEDENTES

EVOLUCIÓN DE LAS CACTÁCEAS

Se ha demostrado que esta familia evolucionó a partir de las Caryophyllales de los Andes sudamericanos como un grupo monofilético (Wallace, 1995; Hershkovitz y Zimmer, 1997; Nyffeler, 2002), con radiación subsecuente de especies hacia el Norte y Sur del Continente Americano, con una diversificación que ha llevado a la formación de grupos específicos, como *Copiapoa*, *Echinopsis* y *Maihuenia* en América del Sur; *Opuntia*, *Mammillaria* y *Ariocarpus* en Norte América (Anderson, 2001). La familia se encuentra asociada principalmente a las zonas áridas y semi áridas cuyos entornos están caracterizados por precipitaciones anuales bajas y variables, alta evaporación y temperaturas contrastantes (Gibson y Nobel 1986). Las características más notables en la evolución de esta familia son anatómicas y fisiológicas.

Las cactáceas se dividen en 3 subfamilias *Pereskioideae*, *Opuntioideae* y *Cactoideae*, entre las características más notables se encuentra el tallo, cuyo tejido está constituido por una estructura succulenta o crasa, el tallo adquiere relación con la aridez, su función es almacenar y conservar agua en los tejidos, desarrollando el parénquima, estructura que permite la succulencia, además de reducir la superficie transpiratoria lo que origina el desarrollo de formas globosas y es en la superficie de los tallos en donde se lleva a cabo la fotosíntesis. Las hojas se han modificado o han desaparecido completamente, reduciendo con esto la evapotranspiración. El peciolo se ha transformado en una estructura llamada podario o tubérculo, las yemas se han transformado en areolas, aquí se pueden desarrollar las estructuras reproductivas (flores y frutos), también se desarrollan espinas, pelos, cerdas y lana, cuya abundancia dependerá de la especie. La función de estas estructuras es la de proteger, así como la de evitar que la planta esté expuesta a la radiación (Jiménez-Sierra y Reyes, 2003). Aunado a estas modificaciones, las raíces juegan un papel importante en el establecimiento y desarrollo de las cactáceas en ambientes áridos (Bravo-Hollis, 1978).

Las flores son estructuras modificadas a partir de las hojas, en ellas se encuentran los tejidos reproductivos (androceo y gineceo) y estériles (cáliz y corola). En estas estructuras se llevan a cabo la reproducción sexual, producción de gametos y la fecundación. Las flores que presentan las cactáceas son hermafroditas, es decir, los órganos reproductivos masculinos y femeninos están dentro de la misma flor. La gran diversidad de formas y tamaños que existen depende del tipo de polinizador que las frecuente. En algunas cactáceas las flores son diurnas, solitarias, poseen una gama de colores que van desde los amarillos pasando por el naranja hasta tonalidades rosas, son polinizadas por diferentes animales desde insectos, aves y murciélagos. Los frutos que producen son diversos, muchos de los cuales son consumidos por los mismos animales que muchas veces actúan como dispersores de semillas promoviendo que nuevos ambientes sean colonizados independientemente de la planta madre (Jiménez-Sierra y Reyes, 2003).

FAMILIA CACTACEAE, CARACTERÍSTICAS GENERALES

Esta familia se caracteriza principalmente por ser plantas perennes, suculentas, por lo general espinosas, terrestres, rupícolas o epífitas, xerófilas, tallo globoso, cilíndrico, columnar o aplanado; provistas de aréolas, las más primitivas desarrollándose como árboles o arbustos con hojas laminares, en los demás géneros las hojas reducidas y efímeras o ausentes; tallo a menudo con tubérculos en forma de mamilas dispuestas en series de espirales cuyo número es más o menos constante para cada especie y que siguen la secuencia de los números de Fibonacci, otras veces los tubérculos coalescentes formando costillas; las ramas, flores, espinas, glóquidas, pelos, cerdas y glándulas, espinas generalmente presentes; flores por lo común solitarias, hermafroditas pero a veces fisiológicamente unisexuales, casi siempre actinomorfas, constituidas de tres partes a) zona pedicelar (en la base); b) pericarpelo y tubo receptacular y c) verticilos florales (perianto, androceo y gineceo), las partes a y b pueden estar cubiertas de series de espirales de aréolas; perianto constituido por segmentos petaloides por lo general numerosos; estambres numerosos; ovarios semiínfero o ínfero, multicarpelar pero unilocular y con 1

solo estilo, lóbulos del estigma generalmente más de 4, óvulos numerosos de placentación falsamente parietal, generalmente con largos funículos que a veces son concrescentes en fascículos; el fruto es una baya en la cual intervienen otros órganos como el pericarpelo y la zona pedicelar, su succulencia está dada en gran parte por los funículos que acumulan azúcares durante la maduración: semillas sin endospermo, testa delgada o gruesa. Entre 965 y 235 (según diferentes criterios) géneros y entre 1550 y 2900 especies distribuidas casi exclusivamente en América tropical y subtropical. Algunas tienen importancia en la alimentación humana, otras son medicinales, algunas son usadas como materia prima en la pequeña industria rural y casi todas tienen importancia por ser ornamentales (Rzedowski, 2005).

SISTEMA REPRODUCTIVO

En las plantas el sistema reproductivo aporta los patrones de transmisión de genes, y como resultado de esta la variabilidad genética, lo cual afectará la adecuación biológica a nivel poblacional o individual (Frankel & Galun, 1977; Richards, 1986; Barret, 1988). Darwin (1877) menciona que el sistema reproductivo es la forma en que se encuentran dispuestas espacial y temporalmente las estructuras reproductivas tanto femenina como masculina dentro de los individuos en una población. Por tanto, los sistemas reproductivos tienen consecuencias directas sobre el sistema de apareamiento.

Los mecanismos de reproducción y apareamiento que han surgido en plantas y en animales son sumamente complejos (Reynolds, 1996; Sakai y Weller, 1999; Webb, 1999). Además de ser de vital importancia en el ciclo de vida de los organismos. Las plantas producen flores para reproducirse, la singamia se convierte en el vínculo entre los genotipos presentes y futuras generaciones y el proceso de fertilización de las especies de plantas, mediada por los sistemas reproductivos determina el modo de transmisión de la información genética de una generación a la siguiente, lo que finalmente establece la estructura de las poblaciones silvestres (Brown, 1990; Waser, 1983).

Aunque la investigación de la biología reproductiva de plantas comenzó hace 200 años, los fundamentos teóricos son relativamente nuevos, sólo recientemente se han incluido en los estudios empíricos. En particular, la biología reproductiva de la familia de los cactus es un campo relativamente inexplorado, y debido a las formas de vida, vías fotosintéticas, arreglos florales, y la diversidad, la investigación se ha concentrado en su taxonomía, morfología y fisiología (Gibson y Nobel ,1986; Nobel ,1988).

Arias *et al.*, (2005) menciona que las cactáceas, son particularmente importantes debido a su alta diversidad de especies y endemismo (84% son endémicas). Además de que existe una falta de información en cuanto a su biología reproductiva en sus poblaciones naturales. Una de las subfamilias más estudiada es Opuntioideae el cual presenta un sistema de apareamiento mixto, puede ser auto compatible hasta presentar entrecruzamiento, en cambio la subfamilia Pereskioideae es de las menos estudiadas presenta un sistema totalmente de entrecruza (Cornejo-Romero, 2013). Recientemente Bustamante *et al.*, (2005) realizó un estudio sobre fenología y reproducción en cactáceas columnares, donde se determinó que la gran mayoría de las especies del trabajo presentan un sistema de apareamiento xenógamo y que son auto incompatibles, cabe resaltar que muchas de las especies de este estudio fueron incluidas por tener un alto valor comercial. Sin embargo, falta mucho por conocer en otros géneros, lo cual debe ser prioritario porque muchas especies están incluidas en la lista Roja Mexicana con 239 especies, 59 especies en la UICN y 64 especies en peligro de extinción en el CITES (apéndice I).

La vulnerabilidad de las cactáceas se debe en gran parte a una combinación de factores entre otros; bajo crecimiento y bajas tasas de reclutamiento, los ciclos de vida largos, distribución limitada, tamaño de población pequeño (Valverde *et al.*, 2004; Esparza *et al.*, 2005) que, junto con la pérdida del hábitat y la recolección ilegal por personas, genera un impacto negativo y el decline de muchas poblaciones (Mandujano *et al.*, 2007; Martínez-Ávalos, 2004). Como lo demuestra un estudio realizado por Jiménez (2011), acerca de las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan, de 257 especies incluidas en este estudio, 24 están en peligro de extinción, 96 en

calidad de amenazadas, 135 son consideradas como raras, y 2 están sujetas a protección especial, en muchos de los casos de estudio se carece de información acerca de su fenología y reproducción.

SINDROME DE POLINIZACIÓN

La polinización es el resultado de la selección natural cuya finalidad es la transportación de polen de las anteras maduras hacia un estigma receptivo. Las plantas han desarrollado en el transcurso de miles de años características que ofrecen como recompensas y que atraen a visitantes florales los cuales han desarrollado características de conducta, morfológicas y fisiológicas para obtener dicha recompensa (Fenster, *et al.*, 2004).

Se define como un síndrome de polinización al conjunto de rasgos florales, incluyendo recompensas, lo cual está asociado con la atracción y la utilización de un grupo específico de animales que fungen como polinizadores. Se espera que los rasgos florales se correlacionen entre sí a través de eventos evolutivos independientes, sin embargo, los resúmenes de los datos de observación muestran que muchas flores son visitadas por numerosas especies de animales (Waser *et al.*, 1996; Ollerton, 1996). Las características florales son consideradas como atributos adaptativos resultado de presiones de selección que han impuesto los polinizadores (Faegri y Van der Pijl, 1971). Esto implica que la especialización funcional en grupos es una ocurrencia común en la evolución de las plantas. Por lo tanto, una planta se ha especializado si se polinizan con éxito sólo por un subconjunto de polinizadores potenciales, (Beattie 1971; Armbruster *et al.*, 1994; Gómez y Zamora, 1999). En estudios recientes se observa cierta incongruencia entre los síndromes de polinización que presentan algunas flores y los distintos polinizadores (Fenster *et al.*, 2004).

POLINIZADORES DE CACTACEAS

Las flores de las cactáceas están muy asociadas con la polinización por animales (Gibson y Nobel, 1986) entre ellos, abejas, colibríes, polillas y murciélagos (Grant y Grant, 1979). En algunos estudios de hecho se ha

reportado la asociación de cada grupo a ciertos género de cactáceas, para cactáceas columnares por ejemplo se reporta un síndrome de polinización quiropterofila (Valiente-Banuet, *et al.*, 1996).

ESTRUCTURA GENÉTICA

La estructura y diversidad genética de las poblaciones se define como la distribución no aleatoria de genotipos y alelos en el espacio y tiempo (Hamrick y Loveless, 1984), dicha distribución origina que existan diferencias dentro y entre poblaciones (González-Astorga y Castillo-Campos, 2004) y es el resultado de la acción conjunta de factores ecológicos y abióticos y de la historia evolutiva de las poblaciones de estudio. Para determinar la estructura genética dentro de una población se deben tomar en cuenta parámetros genéticos como las frecuencias alélicas, las frecuencias genotípicas, el equilibrio de Hardy Weinberg, las fuerzas evolutivas que pueden estar interactuando dentro de las poblaciones y evolución biológica.

- Frecuencia alélica: que es el porcentaje o proporción de individuos de cada genotipo, para cada uno de los caracteres que se encuentran en una población.
- Frecuencia génica: es la proporción de los distintos alelos de un gen, para un locus determinado dentro de una población.
- Equilibrio Hardy-Weinberg. Este modelo se basa en el fundamento de segregación mendeliana para organismos diploides que se reprodujeron sexualmente, en combinación con los principios de probabilidad (Hartl, 2000; Allendorf y Luikart, 2007). En la población se deben cumplir ciertos supuestos para que se encuentren en equilibrio. Dentro de la población deben ocurrir apareamientos al azar (panmíctica), debe ser lo suficientemente grande y no debe estar sometida a la acción de las fuerzas evolutivas (migración, mutación, deriva génica y selección natural), y las frecuencias génicas y genotípicas deben mantenerse constantes de generación en generación.
- Existen dos consecuencias importantes de dichas condiciones. La primera postula que la herencia mendeliana no tiene tendencia a favor de un alelo, en consecuencia las frecuencias genotípicas y alélicas se

mantienen constantes de una generación a la siguiente (la población no debe evolucionar). Esto se conoce como equilibrio de Hardy-Weinberg. La segunda hace referencia a que las frecuencias genotípicas después de una generación por apareamiento al azar será una función binomial de frecuencias alélicas (Hartl, 2000; Allendorf y Luikart, 2007).

- En el caso más sencillo con un locus con dos alelos A y a, con frecuencias alélicas de p y q respectivamente, el principio de Hardy-Weinberg predice que la frecuencia genotípica para el homocigoto dominante AA es p^2 , la del heterocigoto Aa es $2pq$ y la del homocigoto recesivo aa es q^2 . El principio Hardy-Weinberg es una expresión de la noción de una población que está en equilibrio genético, y es el principio básico de la genética de poblaciones.

MICROSATÉLITES

El reciente desarrollo de la biología molecular y las nuevas herramientas estadísticas, permiten identificar la existencia de variación genética (polimorfismos). Esas variantes observadas van desde la substitución de una sola base hasta mutaciones, que son detectables a través de estas herramientas (Dodgson, *et al.*, 1997).

La técnica de microsatélites o SSRs (Simple Sequence Repeats), son secuencias muy abundantes en el genoma de los eucariontes, son unidades cortas de 1 a 6 pares de bases, las cuales se repiten en tándem en un elevado número de veces. Cada una de las secuencias SSRs está definida por el tipo de unidad repetida (mono, di, tri, tetra, en algunos casos se han reportado penta y hexa nucleótidos) y por el lugar que ocupa en el ADN (locus). Para el caso específico de plantas la frecuencia y repetición es menos abundante (González, 2003).

El uso de la técnica de microsatélites está ligado con el desarrollo de la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), desarrollada por Mullis, *et al.*, (1986), y es a finales de esta década cuando se publican los primeros trabajos sobre el aislamiento y caracterización de microsatélites. Algunos objetivos de

esta técnica son determinar la diversidad genética y análisis poblacionales, así como la construcción de mapas genéticos. Son marcadores co-dominantes, lo que nos permite distinguir homocigotos y heterocigotos, al tener una amplia distribución a lo largo del genoma, y al ser reproductibles y multialélicos, los hace marcadores altamente informativos. Una ventaja de utilizar este tipo de marcadores, es que no requiere grandes cantidades de ADN, el tejido utilizado para obtenerlo puede no ser de calidad e incluso el ADN puede estar degradado y aún así puede ser analizado (Tautz, 1989).

Dentro de la familia Cactaceae se han llevado a cabo trabajos de diversidad genética de poblaciones silvestres y sistemas agroforestales, utilizando microsatélites en las especies *Stenocereus stellatus*, *S. pruinosus*, *Escontria chiotilla*, *Polaskia chichipe* y *P. chende* en el Valle de Tehuacán (Casas *et al.*, 2007). En agaves se han llevado a cabo estudios de diferenciación poblacional con técnica RAPDs (Eguiarte *et al.*, 2006, Navarro, 2003). Para el caso específico de *M. pectinifera* no se han reportado estudios con la técnica molecular de microsatélites.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Describir la biología floral, el sistema de apareamiento y la diversidad y estructura genética de las poblaciones de *Mammillaria pectinifera*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1.-** Describir la biología floral de *M. pectinifera* en poblaciones mantenidas bajo condiciones de invernadero.
- 2.-** Determinar el sistema de apareamiento de la especie.
- 3.-** Evaluar los patrones de variación y estructura genética en cada una de las poblaciones de estudio, mediante el uso de técnicas moleculares (SSRs).

ESTRUCTURA DE LA TESIS

El presente trabajo está dividido en dos capítulos. En el primer capítulo el objetivo particular es describir la biología floral de *M. pectinifera*, desarrollo y fórmula floral, síndrome de polinización, en poblaciones que fueron colectadas y están mantenidas bajo condiciones de invernadero así como determinar el sistema de cruza y sistema de apareamiento de la especie de estudio.

En el segundo capítulo se evaluaron los patrones de variación y estructura genética en cada una de las poblaciones de estudio, mediante la técnica molecular SSR. Como objetivo particular se evalúa la estructura genética en dieciocho poblaciones de *Mammillaria pectinifera*, con seis pares de microsatélites.

CAPITULO UNO

SISTEMA DE APAREAMIENTO EN POBLACIONES DE *Mammillaria pectinifera* (Cactaceae)

Reyna Maya-García¹, Pablo Cuevas-Reyes¹, Santiago Arizaga², Ken Oyama²

¹ Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo: reyna-maya@hotmail.com, pcragalla@gmail.com

² Centro de Investigaciones en Ecosistemas, UNAM: kenoyama@cieco.unam.mx

Abstract. The species *Mammillaria pectinifera* F. C. A. Weber is an endemic of the Biosphere Reserve Tehuacan.-Cuicatlan, their populations are declining mainly due to antropogenic activities globose cactus. What has led to considerably reduce the number of individuals within these, there has been listed as threatened under NOM-059-ECOL-2001 and included in Appendix I of CITES. There are few ecological studies on this species, unknown aspects of the reproductive system and population structure, so the following objectives: (i) determine the mating system, (ii) evaluate the different stages of flower development, pollination syndrome description and floral formula. System crosses and mating system was determined by controlled crosses with different treatments. The results indicate that *M. pectinifera* is a kind of cross-pollination with xenogamous mating system. By Kaplan-Meier duration of each of the different stages of flowering to mature flowers was evaluated observing the value was 55 ± 1.332 days. Formula floral species developed by madre according to the different floral attributes pollination syndromes is presented by: *pectinifera* melitophily.

Key Word. *Mammillaria pectinifera*, mating system, xenogamus,

Resumen

Mammillaria pectinifera F.C.A. Weber es una cactácea globosa, endémica de la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán donde muchas de sus poblaciones se encuentran declinando principalmente debido a actividades antropogénicas. Lo que ha ocasionado que disminuyan

considerablemente el número de individuos dentro de estas, de ahí que se haya catalogado como amenazada en la NOM-059-ECOL-2001 e incluido en el apéndice I de CITES. Esta problemática ha generado una gran preocupación ya que existen pocos estudios ecológicos sobre esta especie, desconociéndose aspectos del sistema reproductivo y estructura poblacional, por lo que se plantearon los siguientes objetivos: (i) determinar el sistema de apareamiento; (ii) evaluar las diferentes etapas de desarrollo floral, el síndrome de polinización y descripción de la fórmula floral. Se determinó el sistema de cruce y el sistema de apareamiento mediante cruces controladas, con diferentes tratamientos. Los resultados indican que *M. pectinifera* es una especie de polinización cruzada con un sistema de apareamiento xenógamo. Mediante el método de Kaplan-Meier se evaluó la duración de cada una de las diferentes etapas de la floración, para observar flores maduras el valor fue de 55.00 ± 1.332 días. Se desarrolló la fórmula floral de la especie mediante disecciones de inflorescencias maduras, de acuerdo a los diferentes atributos florales el síndrome de polinización que presenta *M. pectinifera* es por melitofilia.

Palabras clave: *Mammillaria pectinifera*, sistema de apareamiento, xenógamo

INTRODUCCIÓN

La familia Cactaceae es particularmente importante debido a que presenta una alta diversidad ya que cuenta con alrededor de 1500 especies (Hunt, 1999) Su distribución es muy amplia, se pueden encontrar tanto en selvas tropicales lluviosas, hasta desiertos extremadamente áridos (Bustamante, *et al.*, 2005). Para el caso especial de México, el cual se considera como el centro de diversificación más importante del mundo, ya que se reconocen 913 taxones, conformando 663 especies, agrupados en 63 géneros y se reconocen 244 subespecies (Guzmán *et al.*, 2003). Además de un alto porcentaje de endemismo (84% son endémicas; Arias, *et al.*, 2005). Existen estudios sobre taxonomía, morfología y fisiología de cactáceas (Gibson y Nobel, 1986, Nobel, 1988). En cuanto a su biología reproductiva se han documentado pocos trabajos, lo cual es preocupante ya que muchas especies se encuentran incluidas en alguna categoría dentro de la NOM-052 (239 especies), 59 especies en la Unión Internacional para la conservación de los Recursos Naturales (UICN) y 64 especies en CITES Apéndice 1. Desconociéndose aspectos importantes sobre su biología reproductiva. Dentro de esta familia, el género *Mammillaria* es uno de los más abundantes con alrededor de 350 especies, teniendo también un alto grado de endemismos.

Los sistemas reproductivos incluyen, en forma general, todos los aspectos de la expresión sexual en las plantas que afectan a las contribuciones genéticas relativas a la próximas generaciones de individuos dentro de una especie (Wyatt, 1983). El conocimiento de los sistemas sexuales es una base esencial para la evaluación de la dependencia de la producción de semillas en la tasa de polinización y la comprensión de los mecanismos de flujo de genes dentro y entre las poblaciones (Barret, y Eckert, 1990).

El mismo Darwin (1876), reconoció que la progenie como resultado de un exocruzamiento se desempeña de una forma mejor que las plantas que presentan un sistema autógamo, también sugiere que la progenie proveniente de este sistema se verá afectada en cuanto a su éxito o disminución de rasgos

florales que pueden promover la polinización cruzada. Darwin también documentó (1859) que la combinación de varias características determinantes, son el resultado de los sistemas reproductivos.

En las cactáceas las flores presentan caracteres típicos, como resultado posiblemente de la adaptación al medio árido en el que se desarrollan y a las interacciones que existen con el tipo de polinización (Bravo-Hollis, 1978). La morfología floral es un factor determinante y sumamente complejo en el proceso de la polinización. Las flores zigomorfas están especializadas en la recepción de visitas por insectos. La forma en que están dispuestas sus estructuras florales hace más eficiente el contacto del vector además de prevenir la autofecundación a diferencia de las flores actinomorfas (Glover, 2007). Los diferentes morfotipos que existen entre los diferentes arreglos florales (labiadas, resupinadas, acampanuladas, etc.) son el resultado de las presiones de los vectores de polinización y son distinguibles por estos (Ingrouille y Eddie, 2006).

Desde hace más de dos siglos los naturalistas han mostrado un gran interés por las complejas interacciones que ocurren entre las plantas y los animales que las visitan. Desde entonces, se ha incrementado el número de estudios sobre polinización y se han acumulado gran cantidad de ejemplos que dan muestra de la complejidad de las adaptaciones y las relaciones que han evolucionado entre insectos y plantas (Faergri y Van der Pijl, 1979; Barth 1989; Thompson, 1994; Proctor, *et al.*, 1996). De hecho uno de los principales modelos de estudio sobre la evolución adaptativa en la naturaleza son las interacciones entre las plantas y sus polinizadores, la función de los polinizadores como agentes selectivos de ciertos caracteres reproductivos de las plantas es sólo uno de los temas en donde se llevan a cabo numerosos estudios en la actualidad (Campbell, 1991; Johnston 1991; Campbell *et al.*, 1997).

Stebbins (1970), postuló el principio del polinizador más eficiente, el cual dice que la selección natural favorecerá a aquellos rasgos morfológicos, fisiológicos o ecológicos de las plantas que sean utilizados para atraer a

aquellos visitantes que sean polinizadores más eficientes (Faegri y van der Pijl, 1979, Armbruster, *et al*, 2000; Johnson y Steiner 2000). De acuerdo a este principio la mayoría de las plantas deberían ser polinizadas por reducidos grupos de polinizadores eficientes, lo cual se conoce como especialización adaptativa mediada por polinizadores (Thompson, 1994; Armbruster; *et al*, 2000; Johnson y Steiner, 2000).

El síndrome de polinización es el conjunto de caracteres que presentan las flores cuya función es atraer a un tipo particular de polinizador (Proctor, *et al.*, 1996). De acuerdo al vector estos pueden ser:

Abióticos: Se incluye la polinización por agua (hidrofilia) y por viento (anemofilia), ocurre de forma más común tanto en angiospermas como en gimnospermas, el viento ejerce función de forma individual o con otro vector, el cual puede ser biótico (Faegri y van der Pijl, 1979).

Bióticos: Existe una interacción de manera regular entre planta y polinizador, y forma parte vital de la actividad del animal, esta interacción se establece debido a que existen ciertos atractivos primarios y secundarios con recompensas (Faegri y van der Pijl, 1979). Entre los primarios se encuentran el polen y el néctar, como sustancias más frecuentes, aceites, resinas y ceras en menor cantidad (Ingrouille y Eddie, 2006). El atrayente más primitivo es el polen, el cual puede ser fértil y otro estéril utilizado como fuente alimento (Faegri y van der Pijl, 1979; Luo, *et al*, 2008).

El néctar, que se restringe a angiospermas, es una mezcla heterogénea principalmente compuesta de azúcar. Esta secreción depende de la fisiología de la planta y la relación que se lleva a cabo con el vector polinizador. Los insectos vectores poseen quimiorreceptores muy sensibles que detectan los azúcares, de ahí la gran importancia que tiene el néctar como un atrayente para que se lleve a cabo la interacción planta-polinizador (Faegri y van der Pijl, 1979).

Como atrayentes secundarios encontramos aromas, colores y formas. El aroma puede ser un atrayente o un repulsor a larga distancia característica

específica que puede tener más relevancia sobre vectores bióticos (insecto y mamíferos). Hay que notar que la atracción o repulsión, una especie tiene la capacidad de atraer a un vector y de igual forma repeler a otro distinto (Ingrouille y Eddie, 2006). En el caso de interacciones nocturnas, el néctar funge como un localizador de la flor (Faegri y van der Pijl, 1979).

Los aromas pueden estar presentes por toda la superficie de la planta, en los pétalos y en estructuras particulares (osmóforos). Un factor determinante correlacionado con la concentración de sustancias aromáticas, es la temperatura que presenta la flor (Ingrouille y Eddie, 2006).

El color un factor determinante, es un atrayente con una amplia variedad de polinizadores. La gama de colores presentes en la flor indica al polinizador la ubicación del centro de esta, el órgano visual de los insectos está adaptado de tal forma que puede detectar el movimiento y, en ocasiones se producen ilusiones ópticas de movimiento sobre el vector, mediante la combinación de colores en forma ordenada y repetida (Ingrouille y Eddie, 2006).

Las cactáceas presentan diversos mecanismos de reproducción, tales como, mecanismos sexuales, de forma clonal, una combinación de ambos y aquellas que sólo se propagan de forma vegetativa, lo cual puede ser una ventaja cuando se colonizan nuevos hábitats. La mayoría de las especies que pertenecen a esta familia son auto-incompatibles, presentan flores bisexuales. Son polinizadas por lo regular por abejas, aves, murciélagos y esfíngidos (Fleming y Valiente-Banuet, 2002).

Los sistemas de cruce se refieren a las limitaciones que presenta la planta para producir descendencia a través de autocruzamiento (autopolinización) o entrecruza (polinización de cruzada). El sistema de apareamiento es la manifestación de la sexualidad, de ahí que las especies se clasifiquen como a) Cleistógamas, cuando la reproducción se presenta sin que la flor sea dehiscente (apomixis o automixis) b) Autógamas, cuando la descendencia se produce por autopolinización y c) Xénogamas, cuando la fecundación requiere de polen de otros individuos (Cruden, 1977). Estos

sistemas determinan las características genéticas de las poblaciones (Charlesworth & Charlesworth, 1987; Eguiarte *et al.*, 2003). Y uno de los resultados del tipo de reproducción que presente la especie son los frutos, que por lo regular producen grandes cantidades de semillas, dichas cantidades pueden depender del sistema de apareamiento y de la densidad poblacional (Schemske *et al.*, 1994; Kunin, 1997; Gigon *et al.*, 2000), así como la disponibilidad del número de óvulos y la probabilidad de que estos sean polinizados (Orians, 1997), los mecanismos de dispersión puede ser por pequeños roedores, aves, murciélagos, e insectos. El reclutamiento es bajo y el desarrollo de las plántulas suele ser lento, en las primeras etapas muchas de ellas requieren de nodrizas (Arias y Véliz, 2006).

Para el caso especial de *Mammillaria pectinifera*, es necesario conocer acerca de las características demográficas y reproductivas, ya que al evaluar estos aspectos se puede tener la posibilidad de que las poblaciones se mantengan evolutivamente en el tiempo (Jiménez-Sierra, *et al.*, 2007; Godínez-Alvarez, *et al.*, 2008).

A la fecha no existen estudios que aborden la biología floral de la especie. Se desconocen muchos aspectos de su biología reproductiva, de ahí la gran importancia de llevar a cabo este estudio, el cual nos permitirá conocer el sistema de apareamiento, descripción floral así como el desarrollo de la inflorescencia.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo con plantas colectadas en 18 poblaciones con diez individuos cada una, dentro de la Reserva de la Biosfera de Tehuacán Cuicatlán, Puebla, las cuales se aclimataron en condiciones de invernadero.

Descripción del sitio de estudio

La Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán se encuentra localizada al sureste del Estado de Puebla, al noroeste del Estado de Oaxaca. Se ubica en las provincias fisiográficas de las Selvas Secas del Balsas, Xerófila del Valle de Tehuacán y en menor proporción en la provincia de los Bosques Templados de las Sierras Meridionales, con una extensión de 490, 186 has, ubicada entre los paralelos 17°32'24.00" y latitud Norte 18°52'55.20" y los meridianos 96°59'24.00" y 97°48'43.20" de longitud oeste. Presenta un clima cálido semi-desértico BSOhw"(w)(e)(g) de acuerdo con la clasificación de Köpen, modificada por García (1973); la temperatura media anual es de 21°C. La temporada de lluvias en el verano ocurre entre mayo y junio, durante el otoño en septiembre (García, 1973).

Esta región presenta una gran diversidad biológica, destacando principalmente las comunidades xéricas así como también un alto grado de endemismo, posiblemente debido al relieve, las condiciones climáticas, aislamiento geográfico de la zona, el cual pudo haberse originado en el plioceno cuando apareció el Eje Neovolcánico Transversal (Rzedowski, 1988). Dentro de esta zona se ubican 21 géneros de cactáceas e incluye alrededor de 15 especies endémicas (Dávila *et al.*, 1995). Alrededor del 10% de las especies del género *Mammillaria* del mundo se encuentran en esta zona (Arias, *et al.*, 1997), la distribución geográfica dentro del área de estudio de las dieciocho poblaciones de *M. pectinifera* incluidas en este trabajo se representa en la Fig.1

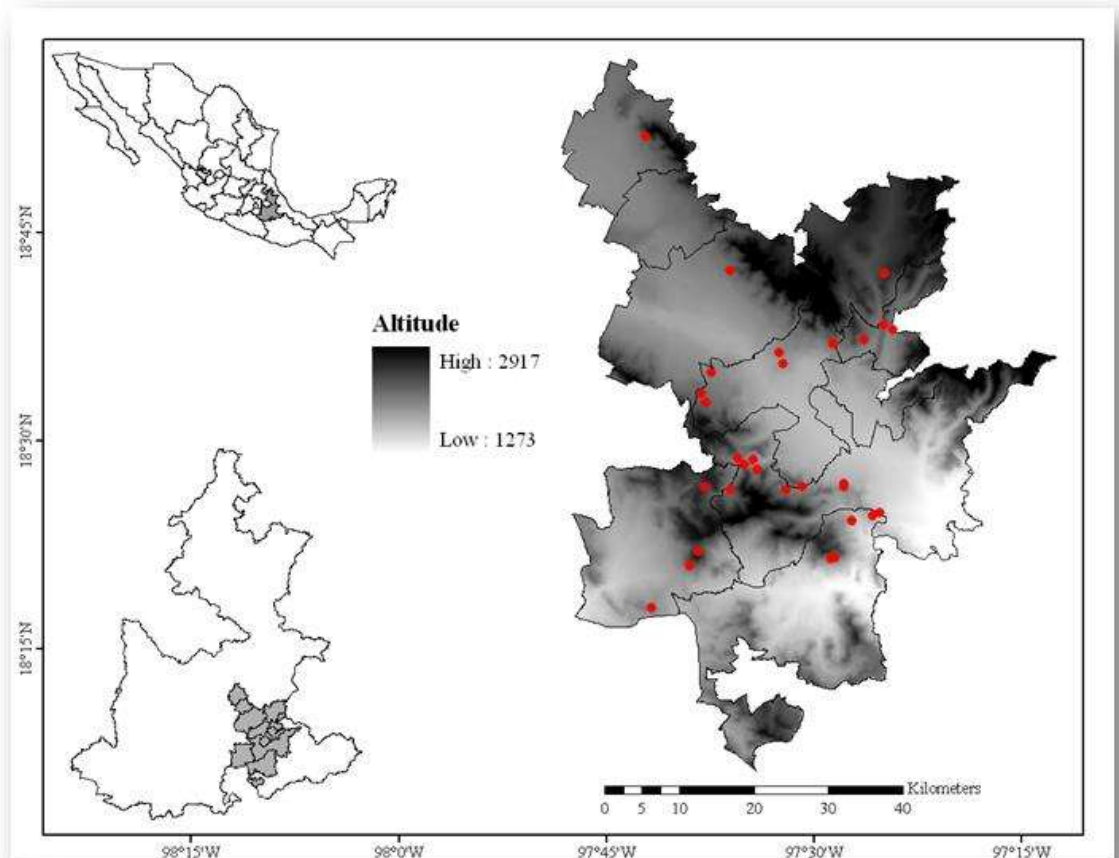


Fig. 1 Distribución de las poblaciones de *M. pectinifera* dentro de la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla

Descripción de la especie

Mammillaria pectinifera es una cactácea globosa semigeofítica con un tallo cilíndrico simple de 3-4 cm de diámetro, compuesto de tubérculos (mamilas) con una areola linear en el ápice. Las areolas tienen de 20 a 40 espinas blancas completamente adpresas de 2 mm de largo arregladas en forma de peines en ambos lados de la areola y cubriendo casi por completo a la planta. Las flores se reproducen cerca del ápice formando coronas y emergen entre los tubérculos, desde “axilas” desnudas y pasan a través de las espinas (Fig. 2). Las flores abiertas tienen unos 2.5 cm tanto de largo como de ancho, y son de color blanco con matices rosas o amarillos. Los frutos son blanquecinos y se encuentran inmersos en el interior de las axilas que forman los tubérculos, causando que las semillas sean retenidas en el interior del tallo

de la planta. Las semillas tienen 1-2 mm de diámetro y están cubiertas de una testa negra. La época de floración ocurre de noviembre a enero (Bravo y Sánchez- Mejorada 1991; Arias *et al.*, 1997).

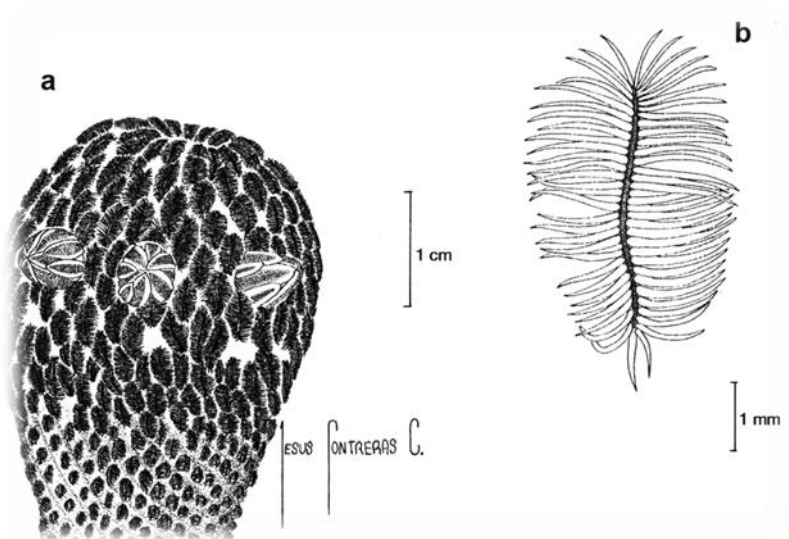


Fig. 2 Esquema de a) Planta adulta de *Mammillaria pectinifera* b) Aréolas y espinas (Tomado de Flora del Valle de Tehuacán. Fascículo 95).

Desarrollo de la inflorescencia: En un total de 135 brotes florales se llevaron a cabo mediciones cada tercer día en todas las plantas que presentaron brotes florales. Se tomaron en cuenta medidas del diámetro, altura de cada brote, la altura del estigma se midió cuando la flor estuvo abierta. Para determinar el número total de días para cada categoría se utilizó el método no paramétrico de Kaplan-Meier, mediante el modelo que representa el desarrollo de la flor, el cual estima la probabilidad de que ocurra el evento para cada lapso de tiempo con su correspondiente error estándar. Combina dos variables, una cualitativa y una variable numérica. La cualidad corresponde a si se ha producido o no el suceso y es una variable dicotómica. El número indica cuanto tiempo ha tardado en llegar a ese desenlace (*Time to event*). El único supuesto en este procedimiento es que la censura (brotes muestreados que no pasaron a la siguiente etapa de desarrollo) no sea informativa. Es una probabilidad condicional, y el resultado es un producto. Lo que expresa este estimador no es

una cantidad sino una función que varía a lo largo del tiempo, por eso indica que el desarrollo es distinto de un tiempo a otro (Wayne, 2004).

Síndrome de polinización: Se hicieron observaciones directas y de forma minuciosa en las flores maduras que se encontraban dehiscentes. Para determinar la longevidad de las flores se determinó a la hora en que ocurría la apertura (antesis), registrando también la hora en que ocurría el cierre floral. Se observó la presencia de polen a fin de poder determinar el momento en que ocurre la dehiscencia de las anteras.

La receptividad del estigma se evaluó haciendo observaciones minuciosas con ayuda de una lupa, se buscó la presencia de exudados o pequeñas gotas, y si las había se tomaba como un estigma receptivo.

Se anotó el color que presentaba cada una de las estructuras florales, así como la presencia de algún aroma

Descripción floral: Se llevaron a cabo disecciones en quince flores dehiscentes tomadas al azar, en cada una de las estructuras disectadas (anteras, pétalos y sépalos) se hicieron observaciones en cuanto a coloración en las diferentes piezas florales, se realizaron cortes muy finos de forma longitudinal y transversal en los ovarios para determinar la posición de los óvulos, con ayuda de un microscopio estereoscópico marca Leika, se contaron y midieron cada una de las estructuras con la ayuda de un vernier digital (Fig. 3). El análisis se realizó al obtener el número de estructuras, color y tamaño: longitud y diámetro del perianto, androceo y gineceo, en material fresco, los datos obtenidos nos permitieron determinar un rango de tamaño y color que presentaba cada uno de los verticilos disectados.



Fig. 3 Disección de una flor de *M. pectinifera* a) pétalos b) estigma

Sistema de apareamiento: Para poder evaluar el tipo de sistema de apareamiento en *Mammillaria pectinifera*, se utilizaron plantas reproductivas establecidas en condiciones de invernadero, todos individuos procedentes de dieciocho poblaciones dentro de la Reserva de Tehuacán-Cuicatlán, aunque solo en diez poblaciones que presentaron flores suficientes para poder desarrollar el experimento. Se realizaron cruza controladas con cuatro tratamientos: exocruzamiento, endocruzamiento, apomixis y autopolinización espontánea. Los tratamientos se aplicaron en 145 flores. Se marcaron los brotes florales al azar con el tratamiento correspondiente, y fueron aisladas hasta el momento de la producción de frutos, esto con el fin de evitar interacción con el polen de otras flores (Fig.4).



Fig. 4. Flores aisladas, marcadas con el tratamiento correspondiente de cruz controlada.

Autopolinización espontánea. 40 brotes florales tomados al azar fueron embolsados con tela de fino tul, hasta su desarrollo como flor dehiscente, para evitar interacción con polen de otras flores y observar si es posible la producción de frutos sin que sean polinizadas.

Endocruzamiento. Se aislaron 40 brotes florales al azar, las cuales fueron cubiertas con bolsas de tul. Una vez desarrolladas en inflorescencias maduras fueron polinizadas con su propio polen, cubriéndose nuevamente, para evitar contacto con polen exógeno.

Exocruzamiento. Se aislaron 40 brotes florales aleatoriamente elegidos, también con bolsas de tul. Una vez que llegaron a ser flores dehiscentes se realizaron pruebas de receptividad del estigma, con una lupa se observó presencia de exudados, cambio de color, las flores cuyo estigma estaba receptivo fue polinizada con polen de flores de la misma población. Cubriéndose nuevamente hasta que desarrollaron frutos.

Apomixis. Se embolsaron 25 brotes florales tomados al azar, cuando la flor estuvo en preantésis fueron emasculadas y excluidas las anteras. Con la finalidad de observar si existe un mecanismo de reproducción en la especie sin que ocurra la dehiscencia de las flores, estas fueron marcadas con etiquetas de diferente color, en cada una de ellas se indicaba el respectivo tratamiento.

Durante el mes de Noviembre se colectaron los frutos maduros que se produjeron, los cuales fueron únicamente con el tratamiento de exocruzamiento. Para ello se utilizaron pinzas finas tratando de no dañar la planta ya que estas son sumamente susceptibles a cualquier corte: Se aplicó una mezcla de fungicida marca tecto 60 al 1% con 150 µl de ampicilina y lugol. La fructificación fue evaluada mediante la proporción de fructificación o fruit-set (Dafni, 1992). Utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Producción de frutos} = \text{Número de frutos} / \text{Número de plantas marcadas}$$

Cada uno de los frutos fue pesado y medido, posteriormente se obtuvieron las semillas de cada uno de ellos, las cuales fueron pesadas en una balanza analítica.

Índice de germinación

Las semillas fueron desinfectadas para lo cual se utilizó hipoclorito de sodio al 30% durante 5 minutos, enjuagando posteriormente con agua destilada y se sumergieron en una solución de fungicida marca Captan al 1% y posteriormente se secaron a temperatura ambiente y fueron colocadas en medio de agar bacteriológico al 8%. Cada tercer día se hicieron revisiones y se anotaba la fecha y el número de semillas germinadas por día de observación, a partir del día en que se sembraron.

Mediante la fórmula (2) se calculó el índice de Germinación de Scott, para el total de semillas germinadas.

$$IG = \frac{\sum n_i t_i}{N} \quad (1)$$

En donde:

n_i = es el número de semillas germinadas el día i ;

t_i = es el número de días transcurridos desde el inicio del experimento

N = número total de semillas germinadas

De acuerdo al valor que se obtenga con esta fórmula, se podrá determinar la velocidad a la que ocurre la germinación en la especie de estudio, entre mayor sea el resultado obtenido, mayor será la velocidad a la que ocurre la germinación de las semillas (González-Zertuche y Orozco Segovia, 1996).

RESULTADOS

Desarrollo de la inflorescencia:

La temporada de floración de *Mammillaria pectinifera* comienza en Noviembre y se extiende hasta febrero. Por lo que durante este periodo se evaluó el tiempo de desarrollo para cada una de las etapas de los brotes florales. Con el método de *Kaplan–Meier*, se determinó el tiempo de duración de las diferentes etapas florales, el tiempo que transcurre de primordio a botón floral es de 45 ± 1.60 días, el tiempo de desarrollo que transcurre en un brote para llegar a ser flor latera ocurre a los 53 ± 1.42 días, y el paso a flor madura es a los 55 ± 1.33 días, teniendo un período de longevidad floral de aproximadamente dos días. (Fig. 5). Este resultado coincide con el reportado para esta especie, en un estudio llevado a cabo por Velarde, *et al.* (2009).

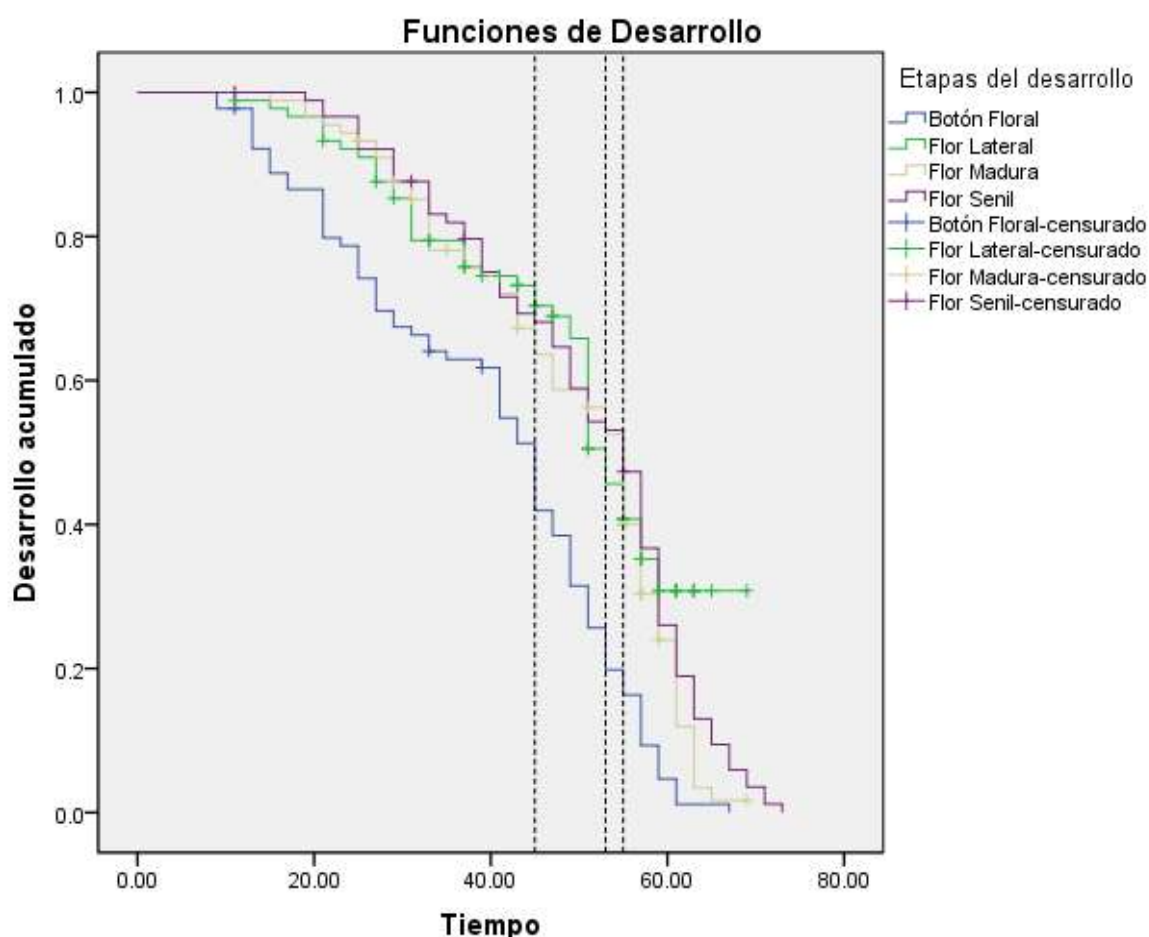


Fig. 5 Desarrollo de cada una de las etapas de los brotes florales de *M. pectinifera*. El desarrollo acumulado es la razón de el número de individuos que logran llegar a la siguiente

etapa de desarrollo, entre el total de individuos que fueron muestreados. Los valores de 0.0 a 1 indican la razón total acumulada de la muestra.

Cuadro 1. Estimación del tiempo de desarrollo de las etapas de floración de *Mammillaria pectinifera*.

Medias y medianas del tiempo de supervivencia								
desarrollo	Media ^a				Mediana			
	Intervalo de confianza al 95%				Intervalo de confianza al 95%			
	Estimación	Error típico	Límite inferior	Límite superior	Estimación	Error típico	Límite inferior	Límite superior
Botón Floral	39.691	1.659	36.438	42.943	45.000	1.601	41.862	48.138
Flor Lateral	51.114	1.811	47.564	54.664	53.000	1.425	50.207	55.793
Flor Madura	48.793	1.445	45.960	51.626	55.000	1.332	52.389	57.611
Flor Senil	50.471	1.458	47.613	53.328	55.000	1.929	51.220	58.780
Global	47.278	.822	45.668	48.888	51.000	1.129	48.787	53.213

a. La estimación se limita al mayor tiempo de supervivencia si se ha censurado.

El seguimiento de desarrollo de los brotes florales se realizó en 135 individuos de diez poblaciones. Se observó un éxito de floración para la poblaciones de FR y CQ de 100%, mientras los más bajos fueron para las poblaciones SM, EC, SB y LA, con 70%. (Fig. 6).

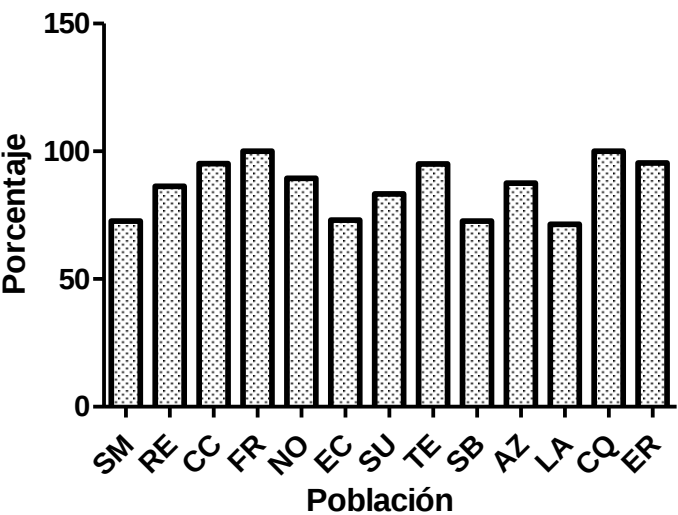


Fig. 6 Porcentaje de floración en cada una de las poblaciones que presentaron brotes y desarrollaron flores maduras.

Fórmula floral

Flores solitarias, axilares, campanuladas, de 2 a 3 cm de diámetro en antesis, generalmente de color rosa fuerte a pálido, y blanco con un tono amarillento; segmentos exteriores del perianto ca.13, oblongos, de 0.8 a 15 mm de longitud y de 0.24 a 0.4 mm de ancho, ápice agudo, de color blanco del margen al centro y en el margen con una línea verde, en la parte central una franja de color café oscuro; segmentos interiores del perianto ca 12, oblongos, de 12 a 18 mm de longitud, de 0.3 mm de ancho, ápice agudo, apículado, de color rosa fuerte a pálido y blanco, en la parte central presenta una franja de color rosa fuerte a café; estambres ca, 88, insertos, introsos, basifijos, filamentos de 0.5 a 0.9 mm de longitud, color blanco en la parte basal a 1/3 de altura y 2/3 presentan coloración rosa fuerte a tenue; ovario ínfero, unilocular, óvulos unidos a la pared del ovario.

Síndrome floral

Las observaciones en condiciones de invernadero de las flores de *M. pectnifera* indicaron que la dehiscencia comienza a las 11:00 am y el cierre ocurre alrededor de las 3:00 pm., estos resultados difieren de los obtenidos por Valverde *et al.* (2009), quienes registraron un horario de dehiscencia de 9:00 a las 13:00 hrs, en observaciones realizadas directamente en campo en la Reserva de la Biósfera de Tehuacán- Cuicatlán. Las diferentes inflorescencias presentan tonalidades que van desde los blancos pasando por los amarillos, hasta llegar a los rosa pálidos y fuertes. No se percibió ningún tipo de fragancia en las flores, tampoco se observan estructuras que contengan néctar, se observa gran cantidad de polen (Cuadro 2).

Cuadro 2. Atributos florales que presenta *M. pectinifera* con los que se determinó el síndrome de polinización.

	<i>Mammillaria pectinifera</i>
Antesis	Diurna
Color	Blanco
Fragancia	Imperceptible
Forma y Simetría	Campana-Radial
Néctar	*
Polen	Presente
Síndrome de Polinización	Melitofilia

Sistema de apareamiento

Al aplicar el tratamiento de endocruza en *M. pectinifera* no se produjo ningún fruto, lo que posiblemente indica la existencia de barreras genéticas que impiden la formación de frutos y semillas a partir de polen y óvulos del mismo individuo, en apomixis no hay forma en que se produzcan semillas sin fertilización, con autopolinización espontánea no se produjeron frutos, únicamente con el tratamiento de exocruza se observaron frutos viables (Fig. 7). Los frutos presentan una coloración blanca al inicio de su desarrollo y cuando son frutos maduros exhiben una coloración oscura. El desarrollo de semillas es evidente, están contenidas en una estructura muy delgada, lo que ocasiona que cuando se están obteniendo los frutos, estos se fracturen fácilmente. Con los tratamientos de autopolinización, apomixis y endocruzamiento se obtuvieron las estructuras florales, con la finalidad de observar si se habían desarrollado semillas, de las estructuras obtenidas ninguna presentó formación de semillas. En cuanto al resultado de fructificación se obtuvo un 87% del total de la producción de frutos con exocruzamiento. Las poblaciones con mayor porcentaje de fructificación fueron

ER con 18.18 %, NO y CQ con 12.12% el resto de las poblaciones presento de un 9.09 % a 6.06%. (Fig.8).

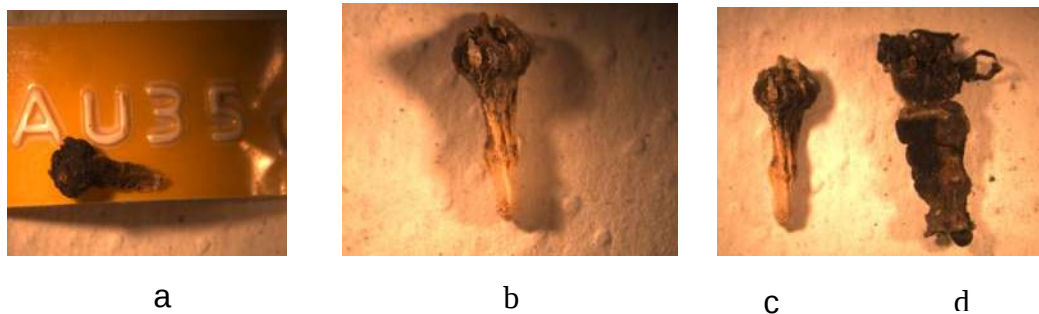


Fig. 7. Fructificación a) autopolinización b) endocruzamiento c) apomixis d) fruto viable (exocruzamiento)

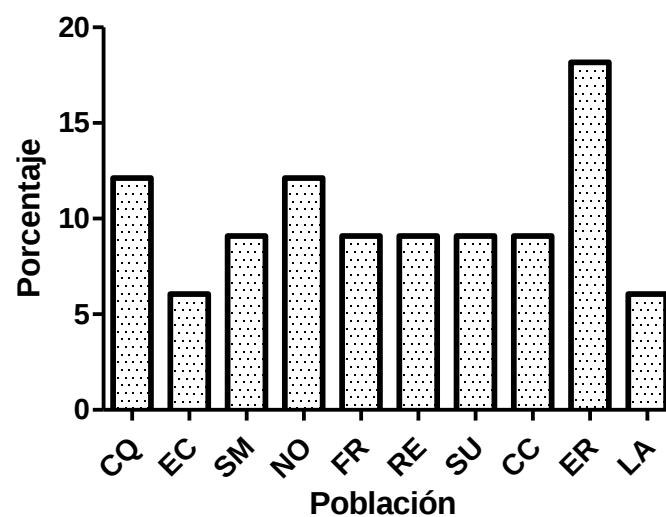


Fig. 8. Distribución de la producción de frutos obtenidos con exocruzamiento, por población.

El valor que se obtuvo para el *fruit-set* es la proporción de flores marcadas que produjeron fruto, para *M. pectinifera* es elevado (0.825) y fue calculado únicamente para aquellos que se obtuvieron con el tratamiento de exocruzamiento.

Cada uno de los frutos fue pesado y medido, posteriormente se obtuvieron las semillas (Fig. 9), observando diferencias en la cantidad.

Cuadro 3. Características de los frutos obtenidos con polinización cruzada.

INDIVIDUO	FRUTO/TRATAMIENTO	PESO grs	DIÁMETRO mm	ALTURA mm	NÚMERO DE SEMILLAS
CQ3	X-18	.039	3.66	9.45	33
CQ6	X-22	.034	3.64	10.65	22
CQ9	X-25	.036	4.37	11.03	24
CQ11	X-8	.040	4.13	13.0	36
EC2	X-15	.042	4.29	10.46	33
EC5	X-34	.036	4.18	11.59	22
SM1	X-3	.044	4.37	13.20	26
SM5	X-6	.042	4.55	12.06	32
SM5	X-20	.029	7.0	12.12	23
NO4	X-5	.023	5.56	10.19	12
NO5	X-4	.033	4.83	12.17	41
NO5	X-10	.049	5.66	12.38	43
NO8	X-33	.032	5.08	12.18	37
FR6	X-7	.033	3.10	8.74	20
FR7	X-9	.021	3.59	10.41	9
FR7	X-40	.019	4.20	11.66	9
RE1	X-23	.025	6.54	11.30	12
RE3	X-1	.033	4.77	9.28	27
RE3	X-14	.034	4.72	8.69	26
SU6	X-17	.026	2.82	10.31	11
SU8	X-13	.021	3.04	10.31	11
SU8	X-16	.020	4.27	7.69	12
CC5	X-24	.033	6.11	12.00	21
CC8	X-37	.023	3.61	9.29	23
CC9	X-26	.023	5.67	11.32	15
ER1	X-29	.037	4.12	12.18	33
ER3	X-19	.037	4.45	9.38	37
ER5	X-12	.046	4.11	10.19	28
ER5	X-15	.037	4.40	13.11	24
ER6	X-11	.024	3.59	8.35	18
ER8	X-30	.028	4.78	7.88	15
LA2	X-2	.025	3.61	11.77	25
LA11	X-36	.022	4.03	6.83	22

De las semillas obtenidas se observan diferencias por fruto y población, el menor número obtenido fueron 9 semillas y el más alto 43 (Cuadro 3). A nivel poblacional los porcentajes más altos de semillas se reportan para la población de Cruz de Quiote con 19.82%, mientras que para la población de Frontera y

San Lucas se obtuvieron los valores más bajos 4.39% y 4.89% respectivamente (Cuadro 4).

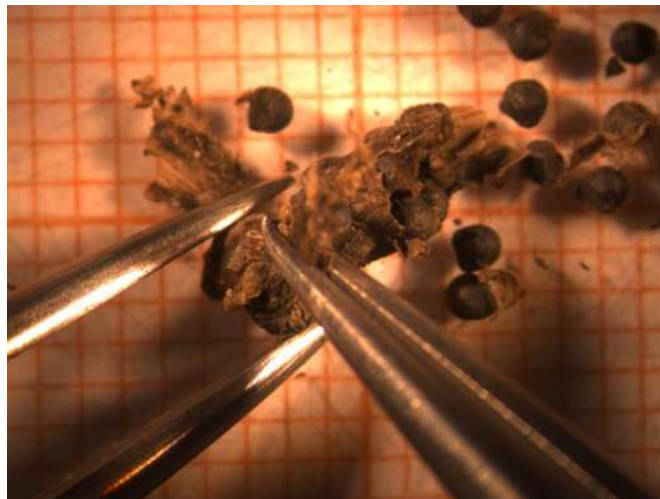


Fig.9 Obtención de semillas

Los porcentajes obtenidos con el número de semillas muestran que hay poblaciones que obtuvieron más de 100 semillas CQ (115), NO (133) y ER (155). En condiciones naturales los frutos de *M. pectinifera* presentan 31 semillas como mayor valor y 3 como el más bajo (Vázquez-Díaz *et al.*, 2005).

Cuadro 4 Porcentaje de semillas por población obtenidas mediante tratamientos de exocruzamiento

POBLACIÓN	NÚMERO DE SEMILLAS	PORCENTAJE
CQ	115	14.71%
EC	55	7.03%
SM	81	10.36%
NO	133	17.01%
FR	38	4.86%
RE	65	8.32%
SU	34	4.35%
CC	59	7.54%
ER	155	19.82%
LA	47	6.01%

Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), para determinar si todas las poblaciones presentaban valores similares en cuanto al promedio del número de semillas por fruto en cada población (Fig. 10), se observa una distribución normal ($F= 2.47$, $gl=9$ sig= 0.038), con la prueba post hoc de HDS Tukey en donde todas las poblaciones forman un mismo subconjunto homogéneo en un rango de valores promedio mínimo de 11.33 hasta un máximo de 33.25, con un p valor de significancia estadística de ($p=0.042$).

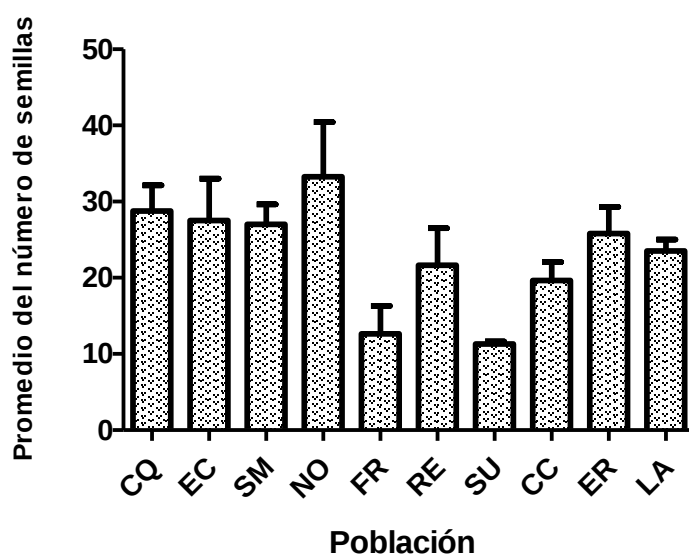


Fig. 10 Promedio de número de semillas por población

Índice de germinación

De los frutos viables se obtuvo el índice de germinación, el cual se tomó a partir del día 6, momento en que las semillas empezaron a germinar (Fig. 11). Cada tercer día se realizaron observaciones de cada una de las cajas de germinación, y se contó el número de semillas que germinaron, para posteriormente mediante el índice de germinación de Scott se obtuvo la velocidad de germinación de semillas para *M. pectinifera* cuyo valor fue de 8.8, el resultado indica que la germinación de semillas para nuestra especie ocurre lentamente. Con estos resultados podemos determinar que *M. pectinifera*

presenta un sistema de exocruza y un sistema de apareamiento xenógamo, estos resultados coinciden con los obtenidos por Zavala, *et al.* (2014), quienes determinaron el sistema de apareamiento a partir de las relaciones P/O (Cuantificación de los granos de polen contenidos en las tecas no dehiscentes por flor, entre el número de óvulos), y el índice de entrecruza OCl (por sus siglas en inglés *out crossing index*) (Cruden 1977, Cruden *et al.*, 1983)

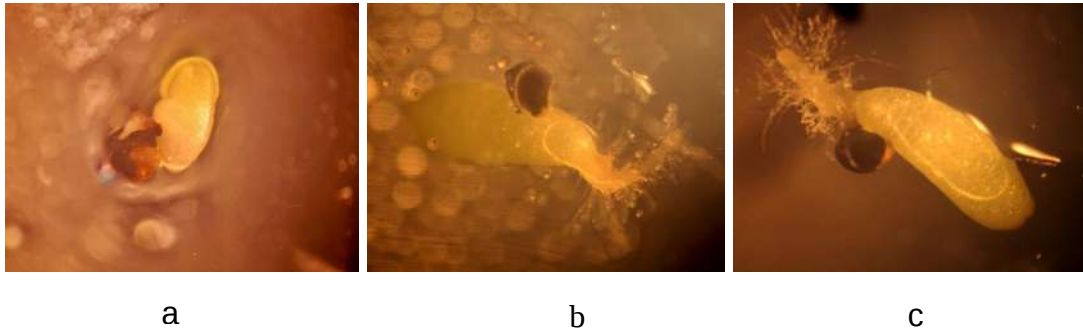


Fig. 11 Germinación de semillas tomadas de diferentes frutos a) a los 6 días b) 10 días c) 14 días

DISCUSIÓN

Dentro de la familia Cactaceae se observa que existen diferentes periodos de floración durante el año, hay especies que florecen durante todo el año como por ejemplo *Echinocactus*, *Escontria* y *Stenocereus*, entre otras (Nassar, *et al.*, 1997; Godinez-Alvárez, *et al.*, 2003). En el caso de *Mammillaria pectinifera* el período de floración ocurre después de la época de lluvias, durante los meses de Noviembre a Febrero, como ocurre con especies de los géneros *Cereus*, *Myrtillocactus*, y *Opuntia* (Pimienta-Barrios y del Castillo, 2002; Mandujano, *et al.*, 2010). La floración se presenta posiblemente debido a que los tejidos de las plantas suculentas han retenido gran cantidad de agua y el sustrato mantiene la suficiente humedad para el desarrollo de las inflorescencias (Pimienta-Barrios y del Castillo, 2002). El período de antesis en *Mammillaria pectinifera* es diurno y ocurre alrededor de las once de la mañana a las tres de la tarde, es decir que requiere de la luz solar de forma directa para que se lleve a cabo este fenómeno, al igual que ocurre con *Mammillaria huitzilopochtli* (Flores-Martínez, 2013). El tiempo de duración de las flores de *M. pectinifera* fue de 2 a 3 días, mientras que para *M. huitzilopochtli* se reporta un promedio de 3 a 6 días (Flores-Martínez, 2013). Dicha longevidad puede deberse a las características que presentan especies catalogadas como raras, con distribución restringida y con un sistema de apareamiento de exocruza, cuya finalidad es prolongar el período de visita de los polinizadores (Orians, 1997).

En el tratamiento de endocruza no se produjo ningún fruto, lo que posiblemente indica que existen barreras genéticas que impiden la formación de frutos y semillas con polen y óvulos del mismo individuo. En todos los casos no hubo producción de frutos en el tratamiento de polinización espontánea, al emasculas las anteras (apomixis) no se observó producción de frutos lo que sugiere que no existen mecanismos para que se produzcan semillas sin fertilizar. Únicamente con el tratamiento de exocruzamiento, hubo producción de frutos viables lo que indica que *M. pectinifera* requiere de un agente polinizador que transporte polen a flores de diferentes individuos, para su reproducción sexual. Gibson y Nobel (1986), mencionan que en las cactáceas

los sistemas de entrecruza y xenogamia obligada son los que predominan de ahí que el síndrome de polinización sea melitofilia.

De acuerdo con estos resultados podemos indicar que *Mammillaria pectinifera*, presenta un mecanismo de exocruza y un sistema de apareamiento xenógamo, para *M. grahamii* también se ha documentado que presenta un sistema de exocruza, los cual es frecuente en cactáceas raras, y que se encuentran catalogadas como amenazadas o en peligro de extinción (flores-Martínez, 2013). Para *M. huitzilopochtli* se reporta como una especie xenógama facultativa, aunque podría autofecundarse (Flores-Martínez, 2013).

En cuanto a la producción de semillas, se registraron diferencias, hubo frutos que produjeron 9 semillas, y el mayor número obtenido fue de 43. En la especie *M. gaumeri* se han reportado 72 semillas por fruto (Nobel, et al., 2002). Mientras que Godínez-Álvarez, et al., (2003) mencionan que el éxito reproductivo en especies de cactáceas depende de la forma de vida, en especies globosas la producción de semillas es menor a 100, mientras en columnares el número de semillas es mayor a 1000.

El índice de germinación de Scott, muestra que la velocidad de germinación para las semillas de *M. pectinifera* es lenta (8.80), mientras que para *M. humata* y *M. sphacelata* la velocidad es de 32.2 y 32.4, respectivamente (Navarro et al., 2008), cabe resaltar que en los resultados reportados se utilizaron varios tratamientos de escarificación de ahí que el resultado sea mayor, mientras que para este estudio se determinó únicamente la viabilidad de las semillas obtenidas frutos tratados con polinización artificial.

CAPÍTULO DOS

ESTRUCTURA GENÉTICA EN POBLACIONES DE *Mammillaria pectinifera* (Cactaceae)

Reyna Maya-García¹, Pablo Cuevas-Reyes¹, Víctor Rocha Ramírez², Santiago Arizaga³, Ken Oyama²

¹ Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo: reyna-maya@hotmail.com, pcragalla@gmail.com

² Centro de Investigaciones en Ecosistemas, UNAM: kenoyama@cieco.unam.mx, vrocha@cieco.unam.mx

³ Escuela Nacional de estudios superiores, UNAM, Santiago_arizaga@enesmorelia.unam.mx

Abstract. Whithin the Biosphere Reserve is Tehuacan-Cuicatlan, *M. pectinifera* is endemic. Presents restricted distribution and many of their populations are disappearing mainly due to the massive looting of reproductive individuals, human activities and land use change. It is a plant that has sexual reproduction, but aspects of its reproductive biology and genetic structure of their populations. Eighteen populations were analyzed with the molecular technique of microsatellites (SSRs). Genetic results show high genetic diversity within populations ($H_e = 0.711$ $H_o = 0.851$), detecting an excess of heterozygotes ($F = -0.206$), low genetic differentiation among populations ($F_{ST} = 0.053$ and $G_{ST} = 0.048$). Gene flow is high ($N_m = 2.612 \pm 0.378$).

Key Words: genetic diversity, microsatellites

Resumen

Mammillaria pectinifera, es una especie endémica de la Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México. Presenta distribución restringida y muchas de sus poblaciones se encuentran declinando debido principalmente al saqueo masivo, actividades antropógenicas y al cambio de uso de suelo. Es una planta que presenta reproducción sexual, con un síndrome de polinización melitofila. Existe poca información acerca de su biología reproductiva así como de la estructura genética de sus poblaciones. Se ha catalogado como una especie amenazada (Nom-052) y vulnerable a la extinción (CITES, IUNC). De ahí la gran importancia de llevar a cabo este estudio. Los objetivos de este trabajo fueron determinar la estructura y diversidad genética de poblaciones de *M. pectinifera* dentro de la Reserva de la Biósfera de Tehuacán-Cuicatlán. Se analizaron dieciocho poblaciones, con la técnica molecular de microsatélites

(SSRs). Para *M. pectinifera* los resultados genéticos muestran alta diversidad genética dentro de las poblaciones ($H_e = 0.711$, $H_o = 0.851$), detectando un exceso de heterocigotos ($F = -0.206$), baja diferenciación genética entre las poblaciones ($F_{ST} = 0.053$ y $G_{ST} = 0.048$). El flujo génico es elevado ($N_m = 2.612 \pm 0.378$).

Palabras clave: *Mammillaria pectinifera*, diversidad genética, heterocigotos

INTRODUCCIÓN

ESTRUCTURA GENÉTICA

Las diferencias que existen en las frecuencias alélicas entre las poblaciones constituyen la estructura genética, consecuentemente la variabilidad está determinada por el número y la frecuencia de los diferentes alelos que conforman el conjunto de genes de una población (Eguiarte, *et al.*, 2010). Es resultado de las interacciones que existen entre las fuerzas evolutivas: mutación, deriva génica, flujo génico, selección natural y sistemas reproductivos, las cuales van a condicionar la historia evolutiva de las poblaciones. La mutación incrementa la diferenciación genética en las poblaciones de forma mínima. La deriva génica es un proceso azaroso que ocasiona diferenciación entre las poblaciones de una especie entre más pequeñas sean estas (Hedrick, 2005; Eguiarte, 2009). La migración o flujo génico homogeniza las frecuencias alélicas evitando que estas diverjan. La selección natural origina que las poblaciones se adapten a las diferentes condiciones locales aumentando la diferenciación (Eguiarte, 2009).

Para determinar la variación genética que existe entre las poblaciones se emplean usualmente los estadísticos F de Wright o sus análogos, los cuales permiten una comparación cuantitativa entre las diferentes especies. Tienen la ventaja de que pueden dar un estimado en conjunto de la deriva génica y el flujo génico (Nm), los valores > 1 indican que las poblaciones se comportan como una población panmíctica y el flujo genético restringe el efecto de la deriva génica (Hartl y Clark, 1989, Saltkin, 1994), mientras los valores sufren de diferenciación genética, lo cual puede ser debido a la deriva genética actuando independientemente en cada población (Stalkin, 1994).

La variación genética (polimorfismo) que presentan las diferentes especies, se pueden apreciar como resultado del desarrollo que han tenido la biología molecular y las nuevas herramientas estadísticas, las cuales permiten identificar dicha variación. Esas variantes observadas van desde la substitución

de una sola base hasta mutaciones que son detectables a través de estas herramientas (Dodgson, *et al.*, 1997).

Los microsatélites o SSRs (Simple Sequence Repeats), son secuencias muy abundantes en el genoma de los eucariontes, son unidades cortas de 1 a 6 pares de bases, las cuales se repiten en tándem un elevado número de veces. Cada una de las secuencias SSRs está definida por el tipo de unidad repetida (mono, di, tri, tetra, en algunos casos se han reportado penta y hexa nucleótidos) y por el lugar que ocupa (locus) en el ADN. Para el caso específico de plantas la frecuencia y repetición es menos abundante (González, 2003).

El uso de los microsatélites (SSRs) como marcadores moleculares está ligado con el desarrollo de la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), desarrollada por Mullis *et al.*, (1986), y es a finales de esta década cuando se publican los primeros trabajos sobre el aislamiento y caracterización de microsatélites. Algunos objetivos de esta técnica son determinar la diversidad genética y análisis poblacionales, así como construcción de mapas genéticos. Los microsatélites son marcadores co-dominante que permiten distinguir homocigotos y heterocigotos, al tener una amplia distribución a lo largo del genoma, y al ser reproducibles y multialélicos, los hace marcadores altamente informativos. Una ventaja de utilizar este tipo de marcadores, es que no requieren grandes cantidades de ADN, el tejido utilizado para obtenerlo puede no ser de calidad e incluso el ADN puede estar degradado y aún así puede ser analizado (Tautz, 1989).

Dentro de la subfamilia Cactoideae se han llevado a cabo estudios con diferentes técnicas moleculares, que se han enfocado en conocer la diversidad genética presente en las poblaciones de estudio, pero aún se desconocen aspectos importantes de su biología reproductiva, que son aspectos importantes dentro de la estructura genética de las poblaciones (Anexo 1). Se han llevado a cabo trabajos de diversidad genética de poblaciones silvestres y sistemas agroforestales, utilizando microsatélites en las especies *Stenocereus stellatus*, *S. pruinosus*, *Escontria chiotilla*, *Polaskia chichipe* y *P. chende* en el Valle de Tehuacán (Casas, *et al.*, 2007). A nivel familia se han llevado a cabo

estudios de diferenciación poblacional sobre todo en Agaves (Eguiarte *et al.*, 2006; Navarro, 2003), con técnica de RAPDs. En nuestra especie de interés no se han reportado estudios con la técnica molecular de microsatélites.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción de ADN.

Se obtuvo tejido fotosintético de cada uno de los individuos de las dieciocho poblaciones, para evitar contaminación por hongos y bacterias en la herida de la planta, se implementó una mezcla de fungicida y ampicilina, (Fig. 12). Se observó que las heridas de las plantas cicatrizaron y no se produjo ningún tipo de infección. Posteriormente el tejido fue mantenido en congelación a -70°C congelado hasta ser utilizado en la extracción de ADN.



Fig. 12 Tejido fotosintético tomado de plantas de *M. pectinifera*.

Se extrajo ADN de 184 individuos. Utilizando el protocolo de extracción de Cullings (1992), Doyle and Dickson (1987), Doyle and Doyle (1987), en corridas de geles de agarosa al 1% se verificó la calidad del ADN (Fig. 13).

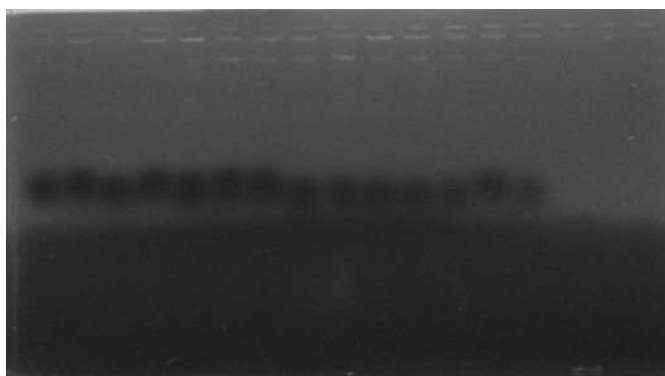


Fig.13 Visualización de ADN genómico en individuos de *M. pectinifera*

Para obtener la temperatura óptima de alineamiento de los primers se realizaron gradientes de temperatura con reacciones de PCR en un termociclador Eppendorf Mastercycler, con el siguiente programa: desnaturalización 95 °C por 4 min, 35 ciclos que comprenden: desnaturalización, alineamiento y extensión, a 94 °C por 30 seg. de 39.5 – 60.1 °C por 35 seg. y 72°C por 1 min, y una extensión final de por 1 min a 72 °C.

En geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ml) y en buffer TBE al 5% se corrieron los productos obtenidos del PCR, posteriormente se observaron con luz ultravioleta y se definió la temperatura adecuada de alineamiento de 54°C y 56°C, para cada uno de los mix (Fig.14). Se realizó un mix con cuatro pares de *primers* (Tabla 4) diseñados por Solórzano *et al.* (2009) y un mix con dos (Tabla 5) marcadores de la especie *Polaskia chichipe* (Otero-Arnaiz, 2005).

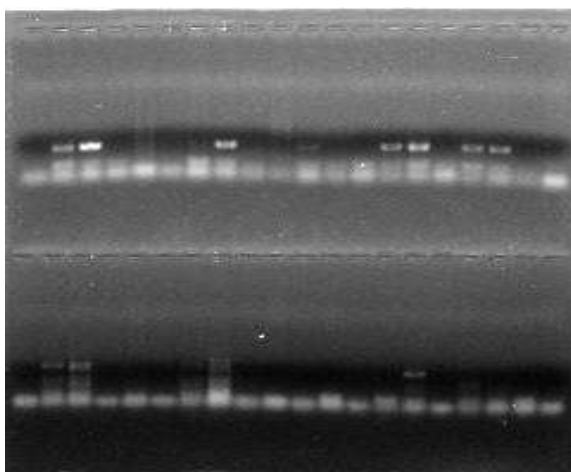


Fig. 14 Productos de PCR, para diferentes individuos

Cuadro 5. Características de los primers que se utilizaron en este estudio

Secuencia (5'3')		
Nombre		Repetición
MamVT C2	F-FAM TCTCACTGCCCCGTTTTCTCT R:ACGGTGATGGTGGGTGTTAT	(GAA) ₁₄
MamVT C8	F-FAM TCGATTATCTGCTGCTTCCA R:CCGAGAAAGCCCTAAACCT	(GA) ₁₅ GGG (GAA) ₅
MamVT C9	F-FAM TGGATACGTGGCTCTTCGAT R:CCAAATGCCAATCCTCCTAA	(GT) ₃ G(GT) ₃
MamVT C11	F-NED CAGGGGTAAGGGAGACAACA R:CTTCAGTGCCCCCTTTGAAT	(GA) ₂₄
P44 AY1478 37	F-FAM ATTCAAACAGGCCACACAGGGGTGTTAGAAG GAATAATAGCTG	(CA) ₁₇

Se muestra la secuencia de los *primers*, el motivo de repetición, y marcador fluorescente.

Para llevar a cabo las reacciones de PCR, se utilizó el kit QUIAGEN multiplex con un volumen total de 5 µl:

2 µl Multiplex
1 µl de Mix
1 µl DNA
1 µl de H₂O

Con los productos de PCR multiplex (1µl) se realizó la mezcla con 10µl de foramida Hidi (Applied Biosystems), 0.3µl de GeneScan-500 Liz (Applied Biosystems) para correr en el secuenciador ABI PRISM 3100-Avant sequencer (Applied Biosystems). Los productos que amplificaron fueron leídas con ayuda del programa Peak Scanner software v 1.0. Y se generó una base de datos con los rangos de lectura de cada uno de los pares de *primers*.

Análisis de datos

Para analizar las bases de datos generados con los productos de cuatro pares de primers (Mam VTC2, Mam VTC8, Mam VTC9, Mam VTC111, P44 y P50) en 18 poblaciones, las lecturas de los alelos con ayuda del programa Peak Scanner, la base de datos, fue revisada con el programa Micro-Checker v 2.2.3 (Van-Oosterhout, *et al.*, 2006) con 1000 permutaciones y un intervalo del 95%. Este programa ayuda identificar errores sistemáticos de genotipado a partir de datos poblacionales obtenidos. Identifica la presencia de alelos nulos los cuales pueden ser tomados como homocigos (Shaw, *et al.*, 1999). Identifica stuttering que se presentan durante la amplificación, puede ocurrir un deslizamiento el cual es producido por “tartamudeos” que difieren del original presentando múltiplos de repeticiones de la unidad de longitud (Shinde, *et al.*, 2003). El tartamudeo se presenta por lo general en locus di nucleótidos por la amplificación de alelos pequeños “dropout”, es decir, cuando ocurre la deserción de alelos grandes o de alelos cortos (Wattier, *et al.*, 1998).

Con el programa GenAlex (Peakall y Smouse 2006, 2012) se obtuvo el número de alelos por locus en cada una de las poblaciones, así como el equilibrio Hardy-Weinberg para cada una de los locus por población.

Para determinar si existe estructura genética entre las diferentes poblaciones se utilizó el programa Structure v 2.3 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003; Hubisz, *et al.*, 2009), el cual nos permite determinar la cantidad de grupos genéticos agrupando a los individuos a un grupo determinado (K), de manera probabilística (Evanno, *et al.*, 2005). Se realizaron simulaciones sustituyendo el valor de K de 1 a 10 y así obtener el número de grupos, se corre de 1 a 10 para obtener el valor máximo de la probabilidad posterior bayesiana.

Se utilizó el programa GENETIX 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004) para obtener los índices de variación genética como son número promedio de alelos por locus (A), número efectivo de alelos (Ne), la heterocigosidad esperada (He) y la heterocigosidad observada (Ho).

La riqueza Alélica (A) o número de alelos observados (N_a). Es el número medio de alelos que son diferentes en cada locus de cada población, además de determinar el número de alelos diferentes (Sytsma & Schaal, 1985; González-González, 2008). La riqueza alélica detecta posibles reducciones en la variabilidad genética así como en posibles reducciones debido a la deriva génica (Sosa, *et al.*, 2002; González-González, 2008). Se determina mediante la fórmula:

$$A = \sum (n_i/m) \quad (4)$$

n_i = número de alelos observados en el locus i

m = número total de loci

Número efectivo de alelos: Es el número de alelos que presenta la misma frecuencia, los cuales pueden llegar a generar homocigosis (Hartl & Clark, 1997). Se calcula mediante la fórmula de Nei:

$$N_e = 1/\sum p_i^2 \quad (5)$$

Heterocigosidad observada H_o y heterocigosidad esperada H_e

Es la proporción observada de loci, heterocigotos por individuo. Y la H_e es la probabilidad de que en un locus único, cualquier par de alelos tomados al azar, sean diferentes entre sí (0-1) (González-González, 2008).

El promedio de heterocigosidad o diversidad genética es el método de medición más utilizado para determinar variación genética, ya que toma los valores de frecuencias alélicas, además permite determinar la estructura genética de las poblaciones (Nei, 1987).

Estos parámetros se pueden calcular mediante las fórmulas:

$H_e = 1 - \sum p_i^2$, en donde p_i^2 = homocigosidad

$H_e = \sum p_i (1 - p_i)$

Siendo conocido como la diversidad génica de Nei (1977)

Se realizó el análisis de varianza (AMOVA) con el programa Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005), el análisis se lleva a cabo mediante la subdivisión de la varianza molecular total en los componentes inter poblacional e intra poblacional, utilizando los estadísticos Φ , que son análogos a los estadísticos F de Wright, mediante 10 000 permutaciones al azar. Este análisis no paramétrico tiene como resultado determinar la variabilidad genética dentro y entre poblaciones, se basa en la varianza de las frecuencias de los genes y el número de mutaciones que existen entre los haplotipos a nivel molecular (Excoffier, *et al.*, 1992).

RESULTADOS

Frecuencias alélicas

Los locus que presento mayor cantidad de alelos fueron el P50, P44 y MAM2 con 27, 21 y 19 alelos respectivamente. Las poblaciones Texcala, San Marcos, Nopala y Frontera fueron las que exhiben el mayor número de alelos en todos los locus, 48, 42, 42 y 40 para cada una de ellas (Cuadro 6).

Cuadro 6 Número de alelos para cada uno de los locus por población.

POBLACION	MAM2	MAM8	MAM9	MAM11	P50	P44
COAPAN	5	6	7	4	10	7
CHAPULCO	6	5	10	3	8	3
TEXCALA	9	6	11	6	8	8
SAN MARCOS	5	6	7	3	11	10
RELLENO	6	5	6	4	9	8
NOPALA	9	8	6	4	5	10
TECAMACHO	4	6	8	3	9	5
S. BARTOLO	6	5	10	3	9	5
SITIO	4	5	6	4	6	4
ZAPOTITLAN	6	5	10	4	7	7
FRONTERA	8	8	5	3	7	9
SAN LUIS	4	6	7	3	6	8
EL CALVARIO	4	4	5	3	4	7
CERRO DE LA CRUZ	5	6	8	4	10	5
LA VIBORA	6	5	7	4	4	5
AZUMBILLA	7	4	8	3	4	5
CRUZ DE QUIOTE	5	6	7	3	3	5
Total	19	15	17	6	27	21

Variación genética

La variación genética dentro y entre las poblaciones se muestra en el cuadro 7, donde se observan los diferentes parámetros para determinar la variación genética dentro y entre las poblaciones de *M. pectinifera* para este estudio. Observándose que el menor número de individuos fue de 6 ± 0.167 para cada locus, se observaron más de 3 alelos efectivos por locus, el valor

promedio para el índice de fijación F, fue negativo en todas las poblaciones lo cual indica un exceso de heterocigos. El análisis genético se realizó en dieciocho poblaciones, con 184 individuos, utilizando un mix de seis pares de *primers* por población, para el primer MAM11 se registraron 6 locus, siendo el número más bajo; mientras que para el locus P50 registró el mayor número de alelos con 27.

Cuadro 7 Componentes empleados para medir la variación genética en 18 poblaciones de *M. pectinifera*, muestreadas dentro de la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán. N= número de individuos muestreados por locus, Na= número de alelos por locus, Ne= número efectivo de alelos, I= índice de diversidad de Shanon-Weiner, Ho= heterocigosidad observada, He= heterocigosidad esperada (según modelo Hardy-Weinberg), UHe= heterocigosidad esperada no sesgada y F= Índice de fijación.

POBLACIÓN		N	Na	Ne	I	Ho	He	UHe	F
CO	Media	11.000	6.667	4.882	1.672	0.894	0.769	0.805	-0.169
	EE	0.000	0.882	0.813	0.141	0.043	0.033	0.034	0.063
CH	Media	6.833	5.833	4.460	1.488	0.734	0.708	0.764	-0.022
	EE	0.167	1.138	0.985	0.228	0.100	0.068	0.073	0.099
TE	Media	8.667	7.000	4.958	1.663	0.826	0.751	0.797	-0.113
	EE	0.211	1.033	0.905	0.194	0.048	0.056	0.059	0.047
SM	Media	12.833	7.000	4.718	1.629	0.859	0.754	0.784	-0.156
	EE	0.167	1.238	0.831	0.182	0.058	0.040	0.042	0.100
RE	Media	10.333	6.333	4.682	1.630	0.933	0.764	0.804	-0.226
	EE	0.333	0.760	0.772	0.131	0.036	0.028	0.030	0.056
NO	Media	9.833	5.667	3.863	1.498	0.842	0.737	0.777	-0.143
	EE	0.401	0.494	0.216	0.064	0.045	0.014	0.016	0.060
TC	Media	9.667	5.667	4.160	1.472	0.826	0.719	0.758	-0.195
	EE	0.558	0.989	0.755	0.177	0.066	0.047	0.048	0.156
SB	Media	10.000	6.333	4.426	1.581	0.950	0.753	0.792	-0.275
	EE	0.365	1.085	0.579	0.156	0.034	0.034	0.035	0.076
SI	Media	6.333	4.833	3.649	1.385	0.849	0.706	0.768	-0.217
	EE	0.333	0.401	0.397	0.099	0.068	0.038	0.042	0.103
ZA	Media	10.000	6.667	4.428	1.597	0.867	0.751	0.790	-0.175
	EE	0.000	0.882	0.678	0.146	0.042	0.032	0.033	0.100
FR	Media	8.000	5.333	3.973	1.424	0.854	0.710	0.757	-0.227
	EE	0.000	0.843	0.672	0.172	0.068	0.047	0.050	0.123
SU	Media	9.833	6.667	4.211	1.599	0.796	0.746	0.786	-0.079
	EE	0.167	0.919	0.515	0.136	0.052	0.029	0.030	0.091
EC	Media	11.000	5.667	3.813	1.450	0.773	0.713	0.747	-0.068
	EE	0.000	0.760	0.475	0.141	0.087	0.042	0.044	0.090
CC	Media	8.500	4.500	3.243	1.291	0.771	0.689	0.735	-0.115
	EE	0.922	0.563	0.145	0.059	0.061	0.014	0.016	0.069
LA	Media	10.167	6.333	4.147	1.545	0.887	0.739	0.778	-0.210
	EE	0.477	0.919	0.539	0.137	0.043	0.031	0.031	0.074
AZ	Media	9.667	4.833	3.449	1.367	0.948	0.709	0.748	-0.337
	EE	0.211	0.477	0.076	0.051	0.023	0.006	0.006	0.037
ER	Media	10.000	5.167	3.762	1.384	0.750	0.696	0.732	-0.063
	EE	0.000	0.792	0.651	0.159	0.099	0.046	0.048	0.114
CQ	Media	9.000	5.167	3.837	1.431	0.903	0.727	0.770	-0.254
	EE	0.632	0.749	0.349	0.123	0.058	0.028	0.030	0.091

El valor más alto del coeficiente de diversidad genética G_{st} se observa en el Locus P44 ($G_{st} = 0.166747$) cuadro 8, el valor medio para este parámetro fue de 0.083 y es un valor bajo, lo que indica que la variabilidad no se debe a diferencias entre los grupos sino a diferencias dentro de cada grupo, ya que dentro de estos se muestra una alta heterocigosidad ($H_e = .769$), cuadro 9. Otros estudios realizados por Cornejo (2013), para el género *Mammillaria* reportan altos niveles de diversidad genética como es el caso de *M. crucígera*, *M. napina* y *M. sphacelata* ($H_e = 0.591$, 0.722 y 0.699 respectivamente) y una baja diferenciación genética, excepto *M. crucígera* ($R_{st} = 0.591$). En la especie *Polaskia chichipe* se reportan valores de $H_e = 0.631$ y 0.498 con microsatélites e isoenzimas respectivamente en *P. chende* los valores para $H_e = 0.421$ con isoenzimas (Otero-Arníz *et al.*, 2005b, Ruíz-Durán, 2006, Casas, *et al.*, 2006). En estudios realizados en otras especies de cactáceas se reportan bajos valores de diversidad, se toma en cuenta la región a la que pertenece cada especie de estudio (ANEXO2).

Cuadro 8. Valores de diversidad genética por Locus

	MAM2	MAM8	MAM9	MAM11	P50	P44
Gst	0.09032	0.070624	0.084282	0.052315	0.082471	0.166747
Gst Nei	0.093089					

Cuadro 9 Componentes promedio utilizados para la medición de la variación genética en 18 poblaciones de *M. pectinifera*, se indican los promedios y el error estándar, el valor de F fue significativamente menor que 0 ($P < 0.05$).

	N	Na	Ne	I	Ho	He	UHe	F
Media	9.537	5.870	4.148	1.506	0.848	0.730	0.772	-0.169
SE	0.163	0.200	0.143	0.033	0.015	0.009	0.009	0.021

Estadísticos F

El promedio para el valor de flujo génico es alto ($N_m = 2.62 \pm 1.27$), se observa que las poblaciones analizadas en este estudio son muy parecidas genéticamente, ($F_{st} = 0.096 \pm 0.015$) cuadro 10 y $G_{st} = 0.093089$ (cuadro 8), puede deberse a cuestiones históricas, o que compartan el acervo genético (polimorfismos ancestrales),

La diversidad media total $F_{it} = -0.055 \pm 0.043$ indica bajo grado de divergencia en las poblaciones y la diversidad media entre las poblaciones $F_{is} = -0.166 \pm 0.032$ y en todas las poblaciones $F_{st} = 0.096 \pm 0.015$ (cuadro 10). En un reciente estudio realizado con microsatélites de cloroplasto en seis poblaciones de *M. pectinifera* (Fig. 18 color negro) Zavala *et al.*, (2014), encontraron una fuerte estructura poblacional, utilizando microsatélites de cloroplasto la mayor parte de la varianza fue debido a la variabilidad entre las poblaciones ($F_{st} = 0.682$)

Cuadro 10. Índice de fijación genética, dentro de poblaciones (F_{is}), entre las poblaciones (F_{st}) y en todas las poblaciones (F_{it}) y valores para flujo génico (N_m). Para poblaciones de *M. pectinifera*.

Locus	Fis	Fit	Fst	Nm
MAM2	-0.122	-0.013	0.098	2.307
MAM8	-0.224	-0.133	0.074	3.112
MAM9	-0.099	0.002	0.092	2.473
MAM11	-0.294	-0.219	0.058	4.066
PRIMER P50	-0.154	-0.047	0.093	2.434
PRIMERP44	-0.099	0.081	0.164	1.278
Mdia	-0.166	-0.055	0.096	2.612
EE	0.032	0.043	0.015	0.378

En cuanto a los resultados sobre el equilibrio de Hardy-Weinberg (Anexo 3) se observa que el locus MAM 9 es el único que se encuentra en equilibrio, para todas las poblaciones, mientras que los locus MAM2, MAM8, MAM11, P44 y P50 se encuentra en desequilibrio en diferentes poblaciones

AMOVA

El análisis de varianza molecular (AMOVA), calculado con el programa ARLEQUIN, muestra que existe mayor variación dentro de las poblaciones de *M. pectinifera* con un valor de 95.33%, mientras que la variación entre poblaciones es de 4.67%, como se observa en la tabla y en el cuadro 11 y Fig. 15. En un estudio reciente realizado con microsatélites de cloroplasto se reportan valores de AMOVA de 61.19% entre poblaciones y 31.81% dentro de poblaciones (Zavala, *et al.*, 2014).

Cuadro 11. Porcentaje de variación entre y dentro de poblaciones, para *M. pectinifera*

Fuente de variación	d.f.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	17	12.823	0.011848Va	4.67
Dentro de poblaciones	350	131.932	0.37695Vb	95.33
Total	367	144.755	0.39543	
Índice de fijación		FST: 0.04674		
P-value = 0.00000+-0.00000				



Fig. 15 Gráfica de AMOVA para las poblaciones de *M. pectinifera*

Estructura genética

Se calculó la proporción de ancestría para cada población de *M. pectinifera*, por medio del programa de asignación bayesiana STRUCTURE. Los resultados obtenidos con este programa analizados mediante el estadístico ΔK , indican que el número efectivo de grupos genéticos corresponde a dos, el cual se obtuvo mediante la reglas de Evanno, *et al.*, (2005) (Fig. 16). Se observa que ambos grupos genéticos están presentes en todas las poblaciones destacando la número 2 y 10 (CH y ZA) con la mayor proporción del grupo genético representado en color rojo, mientras que las poblaciones 13, 16 y 18 (EC, CQ y AZ), representan la más alta proporción para el grupo genético marcado en color verde (Fig. 15).

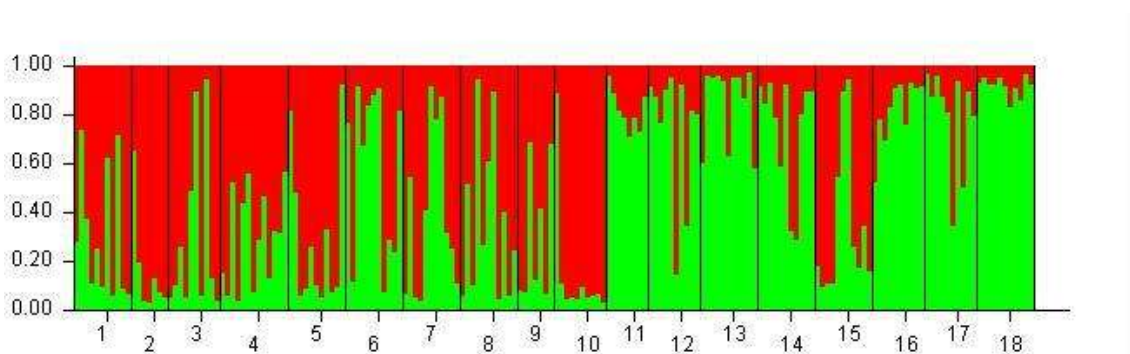


Fig.16 Resultados del análisis de asignación bayesiana, mediante el programa STRUCTURE para 2 grupos genéticos $K=2$. Representado para cada uno de los individuos de cadauna de las poblaciones, se observa la proporción de ancestría derivada a cada color.

Se definió el valor más probable de grupos genéticos (K) usando el máximo valor de ΔK de acuerdo con Evanno et al (2005) e implementado en el programa STRUCTURE HARVESTER V.0.6.8. (Earl et al., 2011).

Cuadro 12 Cálculo del valor de K, y determinar el número de grupos

K	$\Delta K = L''(K) / L'(K+1) - L'(K) $
1	0
2	81.32813987
3	0.694818983
4	19.70824984
5	0.60838781
6	6.343339794
7	0.397951361
8	0.039823056

$$\Delta K = \text{mean}(|L''(K)| / \text{sd}(L(K)))$$

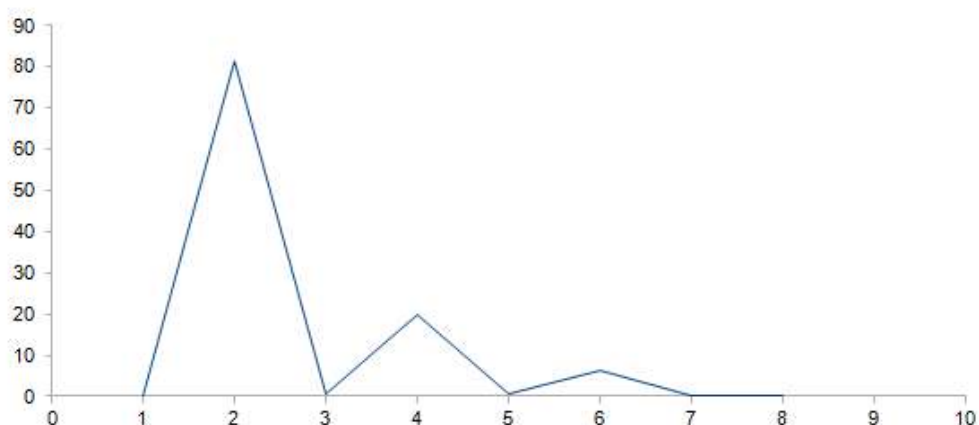


Fig 17. Valores de ΔK como función de K. El pico más elevado con el valor máximo de ΔK corresponde al valor de K con mayor probabilidad (en este caso K=2).

Mediante los programas STRUCTURE HARVESTER V.0.6.8. (Earl et al., 2011) y Barries (Manni, et al., 2004), utilizando una matriz pareada con valores de F_{st} , se pudo representar geográficamente la proporción de ancestría genética para cada población (Fig. 18), se identificaron dos posibles barreras que impiden la dispersión de los individuos, la primer barrera separa a seis

poblaciones (SU, EC, CC, LA, AZ. y CQ, en la figura 16 se observa con mayor proporción de color verde), las cuales se encuentran ubicadas en la parte central de la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán a excepción de la población FR la cual queda completamente aislada en la parte sur del área de distribución. Una segunda barrera separa a ocho poblaciones (CO, CH, TE, SM, RE, NO, TC, SB, SI y ZA, en la figura 16 se observa con mayor proporción de rojo). Las poblaciones que presentaron más del 90% del porcentaje de floración se encuentran incluidas dentro de la primer barrera genética exceptuando las poblaciones TE y RE incluidas en la segunda. Destacan las poblaciones ER y CQ las cuales presentaron mayores porcentajes de floración, fructificación y mayor número de semillas (90%,100%, 19%, 12%, 155 y 115, respetivamente), así como mayor variación genética en la población CQ ($H_o = 0.903 \pm 0.050$).

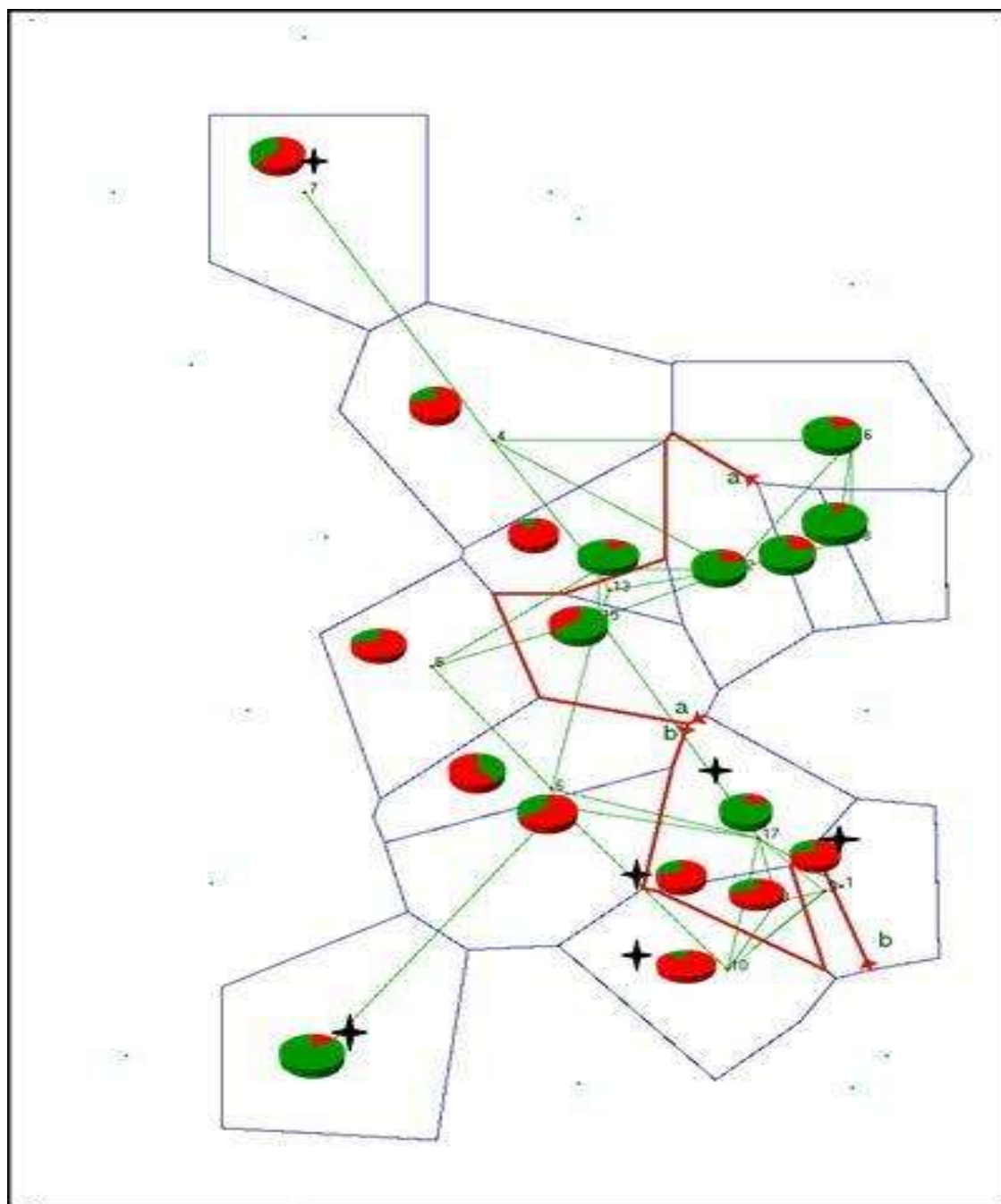


Fig.18 Proporción de ancestría y ubicación geográfica de las poblaciones de *M. pectinifera*.

DISCUSIÓN

Las poblaciones de *M. pectinifera* han sido saqueadas masivamente y en particular en su época reproductiva lo que ha llevado a una disminución significativa de sus poblaciones. El saqueo ha sido producto de actividades antropogénicas. Factores que modifican los hábitats donde se encuentran establecidos estos organismos, pueden ocasionar la reducción del tamaño poblacional, aislamiento y modificaciones en la estructura genética de sus poblaciones (Jump & Peñuelas, 2006). En este estudio se analizó la estructura genética de dieciocho poblaciones de *Mammillaria pectinifera*. Los resultados obtenidos del análisis de microsatélites nucleares (SSRs) muestran que la especie de estudio presenta valores de diversidad genética elevados. En las poblaciones RE, SB, AZ, CQ, los valores de heterocigosidad observada fueron mayores a los valores de heterocigosidad esperada ($H_o = 0.933, 0.950, 0.948$ y 0.903 , $N_e = 4.682, 4.426, 3.446$ y 3.837 , respectivamente), en el resto de las poblaciones los valores obtenidos (H_o) van de 0.734 a 0.87 y el (N_e) varió de 3.24 a 4.905 . Los valores de F (índice de fijación) muestran que existe un exceso de heterocigotos, posiblemente la selección natural esté favoreciendo a los individuos que presentan esta condición sobre los homocigotos. Las poblaciones se establecen sobre laderas con cierta pendiente, en suelos calcáreos, en un rango altitudinal que va de los 1950 msnm hasta los 2380 msnm (Peters, 2000). Posteriormente estas características podrían ser de utilidad para inferir si estos factores ambientales están influyendo en la diversidad genética que presentan las poblaciones.

Los resultados obtenidos con la técnica de SSRs, muestran que las poblaciones colectadas para este estudio mantienen valores altos de diversidad genética, el valor $G_{st} = 0.093$ fue bajo lo que indica, que la variabilidad no se debe a diferencias entre los grupos si no a diferencias dentro de cada grupo. Esto confirma el entrecruzamiento de *M. pectinifera* y su naturaleza altamente heterocigota. Su condición xenógama (polinización cruzada) favorece el mantenimiento de la variación genética.

Los valores obtenidos para el flujo génico fueron altos, es probable que el flujo génico sea por medio de polen y el cual podría ser dispersado por agentes bióticos (polinizadores). La característica de serotonina que presenta la especie podría estar favoreciendo la dispersión de semillas a nivel local, como lo mencionan Ellis, *et al.* (2006) en un estudio que incluyó varios grupos de cactáceas. Los resultados sugieren que aquellas plantas que presentan esta característica aumentan la dispersión de semillas en las áreas locales.

La proporción de ancestría y ubicación geográfica de las poblaciones de *M. pectinifera* obtenidos con el programa STRUCTURE y Barriers, detectaron dos grupos genéticos más probables y dos posibles barreras genéticas, se sugiere la posibilidad exista un banco de semillas y que este juegue un papel importante el reclutamiento de nuevos individuos, que junto con el sistema de cruza y el papel determinante de los polinizadores estarían propiciando la alta diversidad genética que presenta *M. pectinifera*.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio para la especie *M. pectinifera*, especie endémica de la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, con una distribución restringida y catalogada en peligro crítico, presenta una antesis diurna lo que indica que requiere de luz directa para poder llevar a cabo la apertura de sus flores, éstas presentan una longevidad de 2 a 3 días, presenta un síndrome de polinización melitofilia, aunque se desconoce a los polinizadores potenciales el papel que juegan en la reproducción de la especie es de vital importancia para que se lleve a cabo la reproducción sexual.

Las características de crecimiento y la historia de vida de la especie han mantenido la alta diversidad que presenta, la cual está determinada por el sistema de cruce. Es una especie cuya condición xenogáma requiere de polen para que sean fertilizados los óvulos. Las poblaciones de estudio se encuentran estructuradas genéticamente en dos grupos y presentan dos posibles barreras genéticas, el grupo en la figura 16 en donde predomina el rojo tiene presencia en toda el área de distribución de *M. pectinifera*, mientras que el grupo en color verde presenta una distribución en la parte central del área de distribución,

Las poblaciones de *M. pectinifera* presentan altos valores de diversidad genética que sugieren que pese a la fragmentación y la extracción masiva de ejemplares no ha tenido un efecto sobre las poblaciones, y que las características en la forma de crecimiento y la historia de vida de la especie han mantenido la diversidad genética.

BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, F. E., S. Arias y N. P. Taylor. 1994. **Threatened cacti of Mexico**. *Royal Botanic Gardens Kew*. England. 135 pp.
- Anderson, G. J., G. Bernardello, T. F. Stuessy y D. J. Crawford. 2001. **Breeding system and pollination of selected plants endemic to Juan Fernández Islands**. *American Journal of Botany*. 88: 220-233.
- Arakaki, M., C. Pascal-Antoine., R. Nyffeler., A. Lendel., U. Eggli., R. Matthew-Ogburn., E. Spriggs., M. Moore y E. Edwards. **Contemporaneous and recent radiations of the world's major succulent plant lineages**. 2011. *PNAS*. Vol. 108. No.20. 8379-8384.
- Arias, S., S. Gama y L. U. Guzmán–Cruz. 1997. **Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán**. *Cactaceae* 14: Instituto de Biología, UNAM. México. 146 pp.
- Arias S. y T. Terrazas. 2004. **Seed morphology and variation in the genus Pachycereus (Cactaceae)**. *Journal of Plant Research* 117: 277-289
- Arias. S., U. Guzmán., M. C. Mandujano., M. Soto-Galván y J. Golubov. 2005. **Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. I. Una comparación entre los listados NOM-059-ECOL-2001 (México). La Lista Roja (UICN) y CITES**. *Cactáceas y succulentas mexicanas* 50: 100-125.
- Arias, S., M. y E. Véliz-Pérez. 2006. **Diversidad y distribución de las Cactaceae en Guatemala**. *Biodiversidad de Guatemala* 1: 229-238.
- Armbruster, W. S., M. E. Edwards y E. M. Debevec. 1994. **Floral character displacement generates assemblage structure of Western Australian triggerplants (Stylidium)**. *Ecology* 75: 315-329.
- Armbruster, W. S., C. B. Fenster y M. R. Dudash. 2000. **Pollination “principles” revisited: specialization, pollination syndromes, and the evolution of flowers**. *Det Nor. Vidensk. Acad.I. Mat. Natur. Kl. Skr. Ny Ser.* 39:179–200.
- Armbruster, W., Y. Wong., Gong y S. Huang. 2011. **Are Pollination “Syndromes” Predictive? Asian Dalechampia Fit Neotropical Models**. *The American Naturalist* Vol. 178, No. 1, pp. 135-143

- Barrett, S. C. H. y C. G. Eckert. 1990: **Variation and evolution of mating systems in seed plants** In: Kawano. *Biological Approaches and evolutionary Trends in plants*. 229-254.
- Beattie A. J. 1971. **A technique for the study of insect-borne pollen.** *Pan-Pac. Entomol.* 47: 82
- Becerra R. 2002. **La cactáceas, plantas amenazadas por su belleza:** www.conabio.gob.mx/otros/biodiversitas/doctos/pdf/biodiv49.pdf. (Accesada en noviembre 2011)
- Butterworth, C. y R. Wallace. 2004. **Phylogenetic studies of Mammillaria (Cactaceae) insights from chloroplast sequence variation and hypothesis testing using the parametric bootstrap.** *American Journal of Botany* 91(7): 1086-1098.
- Buxbaum, F. 1969. **Die entwicklungswege der Kakteen in Sudamérica:** *Biogeography and Ecology of South America*, (eds.), pp. 583-623. W. Junk. The Hague, Netherlands
- Bravo-Hollis, H. 1978. **Las cactáceas de México. Vol. I.** Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México.
- Bravo, H. y H. Sánchez-Mejorada. 1991. **Las cactáceas de México. Vols. II y III.** Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Brown, S. y A. Lugo. 1990. **Tropical secondary forest.** *Journal of tropical ecology* 6:1-31.
- Bustamante, E. y A. Búrquez. 2005. **Cactáceas y Suculentas Mexicanas.** Vol. 50. No.3. ISSN 0526-717X.
- Campbell, D., N. M. Waser, M. V. Price, E. A. Lynch, y R. J., Mitchell. 1991. **Components of phenotypic selection: pollen export and flower corolla width in Ipomopsis aggregata.** *Evolution* 45:1458–67
- Campbell, D. R., N. M. Waser y E. J. Meléndez-Ackerman. 1997. **Analyzing pollinator-mediated selection in a plant hybrid zone: hummingbird visitation patterns on three spatial scales.** *Am. Nat.* 149:295–315
- Casas, A., A. Otero-Arnaiz, E. Pérez-Negrón, y A. Valiente-Banuet. 2007. **In situ management and domestication of plants in Mesoamerica.** *Annals of Botany*. 100(5):1101-1115.
- Charlesworth, D. y B. Charlesworth. 1987. **Inbreeding depression and its evolutionary consequences** *Annual Review of Ecology and Systematics* 18 237–268.

- Cornejo-Romero, A., J. Medina-Sánchez, T. Hernández-Hernández, B. Rendón-Aguilar, P. L. Valverde, S. P. Zavala-Hurtado, S. P. Rivas-Arancibias, M. A. Pérez-Hernández, G. López-Ortega, C. Jimenez-Sierra. y C. F. Vargas-Mendoza. 2014. **Quaternary origin and genetic divergence of the endemic cactus *Mammillaria pectinifera* in a changing landscape in the Tehuacán Valley, Mexico.** *Genetics and Molecular Research* 13 (1): 73-88 (2014)
- Cruden R. W. 1977. **Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants.** *Evolution* 31:32-46.
- Cullings K. W. 1992. **Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies.** *Molecular Ecology* 1: 233-240.
- Dafni A. 1992. **Pollination Ecology: The Practical Approach.** *Oxford University Press*, New York.
- Dávila, A. P., R. M. Lemos., A. Ramírez., A. Salinas y P. Tenorio. 1995. **Análisis de la flora del Valle de Tehuacán- Cuicatlán: endemismos y diversidad. In conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques.** E. Linares, P. Dávila. F. Chiang. R. Bye y T. Elías (eds.). *Instituto de Biología*. Unam. México, D. F. P133-141.
- Dávila, A., M. del C. Arizmendi., A. Valiente-Banuet., J. L. Villaseñor., A. Casas, A. y R. Lira. 2002. **Biological diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, México.** *Biodiversity and Conservation* 11: 421-442.
- Dodgson, J. B., H. H. Cheng y R. Okimoto. 1997. **DNA marker technology: a revolution in animal genetics.** *Poultry Science*. 76: 1108-1114.
- Doyle, J. J. y J. L. Doyle. 1987. **Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis.** *Taxon* 36: 715-722.
- Doyle, J. J. y J. L. Doyle. 1987. **A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.** *Phytochemistry Bulletin* 19: 11-15.
- Eguiarte, L., X. Aguirre., M. Rocha., C. Torres., A. Silva y A. Valera, 2003. **Diversidad genética de dos especies mezcaleras.** Proyecto Conabio V038, Informe final.
- Eguiarte-Frutos, L. E., A. González González. y E. Sheinvar Gottdiener, 2006. **Genética de poblaciones en viveros de *Agave cupreata* e impacto de los planes de manejo en la diversidad y**

estructuración de esta especie. Universidad Nacional Autónoma de México. Informe final SNIBCONABIO proyecto No. CS016. México.

Eguiarte L., E. Aguirre-Planter., E. Scheinvar., A. González, y V. Soza. **Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicana Versión 4 de octubre del 2010.** Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México

Esparza-Olguín L., T. Valverde y E. Vilchis-Anaya. 2002. **Demographic analysis of a rare columnar cactus (*Neobuxbaumia macrocephala*) in the Tehuacan Valley, Mexico.** *Biological Conservation* 103:349-359

Excoffier L., G. Laval y S. Schneider. (2006) Arlequin v3.1: **An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. User Manual Available.** At <http://cmpg.unible.ch/software/arlequin3>.

Faegri, K. y L. van der Pijl. 1971. **The principles of pollination ecology.** Pergamon, Londres. 291 p.

Faegri, K., y L. van der Pijl. 1979. **The principles of pollination ecology.** Second edition . Pergamon Press, New York and London.

Fenster, C. B., W. S. Armbruster., P. Wilson., M. R. Dudash y J. D. Thomson. 2004. **Pollination Syndromes and Floral Specialization.** *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 35:375-403.

Flores-Martínez A., G. Manzanero., J. Golubov y M. Mandujano. **Biología floral de *Mammillaria huiatzilopochtli*, una especie rara que habita acantilados.** *Botanical Sciences* 91 (3): 349-356, 2013.

Flores-Martínez, A., G. Manzanero y M. Rojas-Aréchiga. 2008. **Importancia de la latencia de las semillas para la conservación de una cactácea endémica de Oaxaca, México.** *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. Vol. 53. No.4. ISSN 0526-717X.

García, E. 1973. **Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen.** Instituto de Geografía. UNAM. México, D.F. 246 p.

Grant, P. R. y B. R. Grant, 1979. **Darwin's finches: population variation and sympatric speciation.** *Proceedings of the National Academy Sciences (USA)* 76: 2359-2363.

Gibson A. C. y P. S. Nobel. 1986. **The Cactus Primer.** Harvard University Press, Londres.

- Godínez-Álvarez, H., T. Valverde y P. Ortega-Baes. 2003. **Demographic trends in the Cactaceae**. *The Botanical Review* 69:173-203.
- González, E. G. 2003. **Microsatélites: Sus Aplicaciones en la Conservación de la Biodiversidad**. *Graellsia* . 59:. 377-388
- Guzmaán, U., S. Arias., y P. Dávila. 2003. **Catálogo de cactáceas mexicanas**. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Hedrick, P. W. 2005. **"Genetic restoration": a more comprehensive perspective than "genetic rescue"**. *Trends in Ecology and Evolution*, 20: 109.
- Hernández, H. M. y H. Godínez. 1994. **Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas**. *Acta Botánica Mexicana* No. 26: 33-52.
- Herskovitz, M. A. y E. A. Zimmer. 1997. **On the evolutionary origins of the cacti**. *Taxon* 46(2): 217- 232.
- Ingrouille, H. y B. Eddie. **Plants diversity and evolution**. Cambridge: Cambridge university Press. 2006. 247 p.
- Jiménez, S. 2011. Las **Cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan**. *Revista Digital Universitaria*. Vol. 12, No.1. ISSN:1607-6079.
- Jiménez-Sierra C., Mandujano M. C y L. E. Eguiarte. 2007. **Are populations of the candy barrel cactus (Echinocactus platyacanthus) in the desert of Tehuacán, Mexico at risk? Population projection matrix and life table response analysis**. *Biological Conservation* 135:278-292.
- Johnson, S, D y K. E. Steiner. 2000. **Generalization vs. specialization in plant pollination systems**. *Trends in Ecology. Evolution*. 15:140–43
- Johnston, M. O. 1991. **Natural selection on floral traits in two species of Lobelia with different pollinators**. *Evolution* 45:1468–79
- Mandujano, M. C., I. Carrillo-Angeles., C. Martínez-Peralta y J. Golubov. 2010. **Reproductive biology of Cactaceae**. En K.G. Ramawat (ed). **Desert Plants. Biology and Biotechnology**. Springer. 197-230 pp
- Mandujano, M. C., J. Golubov y L. F. Huenneke L.F. 2007. **Effect of reproductive modes and environmental heterogeneity in the population dynamics of a geographically widespread clonal desert cactus**. *Population Ecology* 49:141-153.

- Martínez-Ávalos, J. G., M. C. Mandujano., J. Golubov., M. Soto y J., Verhulst. 2004. **Análisis del método de evaluación de riesgo (MER) del "falso peyote" (*Astrophytum asterias* (Zucc) Lem.) México.** *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. 94: 118-127
- Matorell, C. y E. Peters. 2005. **The measurement of chronic disturbance and its effects on the threatened cactus *Mammillaria pectinifera*.** *Biological Conservation* 124: 199-207.
- Mullis, K. B., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn y H. Erlich. 1986. **Specific enzymatic amplification of DNA invitro: the polymerase chain reaction.** Cold Spring. Harbor. Symposium. Quantitative .Biology. 51: 263-273.
- Navarro-Quezada, A., R. González-Chauvet., F. Molina-Freaner., L. E. Eguiarte. 2003. **Genetic differentiation in the *Agave deserti* (Agavaceae) complex of the Sonoran Desert.** *Heredity* 90:220-227.
- Nyffeler, R. 2002. **Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from trnK/matK and trnL-trnF sequences.** *American Journal of Botany* 89: 312–326.
- Ollerton, J. 1996. **Reconciling ecological processes with phylogenetic patterns: the apparent paradox of plant-pollinator systems.** *Journal of Ecology* 84: 767-769.
- Ordoñez M., 2003. **Propagación in vitro de *Mammillaria voburnensis* Scheer. (Cactaceae)** Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala, Guatemala. 70 p,
- Orians, G. H. 1997. **Evolved consequences of rarity.** En: Kunin W.E.y Gaston K.J. Eds. *The Biology of Rarity: Causes and Consequences of Rare-Common Differences*, pp. 190-208, Chapman and Hall, Londres.
- Oosterhout V. C, D. Weetman., W. F. Hutchison. 2006. **Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in non-equilibrium populations.** *Molecular Ecology Notes* 6: 255-256.
- Otero-Arniz A., Casas A., Hamrick JL. Direct and indirect estimates of gene flow among wild and managed populations of *Polaskia chichipe*, an endemic columnar cactus in Central Mexico. *Mol Ecol*, 2005 Dec, 14 (14) 4313-22
- Pardo, A y M. A. Ruiz. 2002.. **SPSS 11. Guía para el análisis de datos.** Madrid: McGraw-Hill. ISBN 84-841-3750-7

- Peters, E. M., C. Martorell y E. Ezcurra 2008. **Nurse rocks are more important than nurse plants in determining the distribution and establishment of globose cacti (Mammillaria) in the Tehuacán Valley, México.** *Journal of Arid Environments* 72: 593-601.
- Pimienta-Barrios, E y R. F. del Castillo. 2002. **Reproductive biology.** En: **Nobel P.S. Ed. Cacti. Biology and Uses**, pp. 75-90, University of California Press, Berkeley.
- Reyes J. 1994. **Métodos para la propagación de cactáceas mexicanas.** *Amaranto* 7: 1-12
- Rodríguez, C y E. Ezcurr.. 2000. **Distribución espacial en el hábitat de Mammillaria pectinifera y M. carnea en el valle de Zapotitlán Salinas, Puebla, México.** *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 45:5-14.
- Rzedowski, J. 1991. **Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México.** *Acta Botánica. Mexicana.* 14: 3-21.
- Rzedowski, J. 1988. **Vegetación de México.** *Limusa*, México, D. F. 432p
- Sánchez-Mejorada, H., "Mexico's problems and programmes monitoring trade in common and endangered cacto", *Cactus & Succulent. Journal of Great Britain*, 44, 1982, pp. 36-38.
- Schemske, D. W., B. C. Husband., M. H. Ruckelshaus, C. Goodwillie, I. M. Parker y J. G. Bishop. 1994. **Evaluating approaches to the conservation of rare and endangered plants.** *Ecology.* 75: 584-606.
- Solomon, J. 2001. **Flora de Nicaragua; Introducción Gimnospermas y Angiospermas (Acanthaceae–Euphorbiaceae).** Eds. W.D. Stevens; C. Ulloa; A. Pool; O.M. Montiel. Missouri, U.S.A., *Missouri Botanical Garden Press.* v. 85, tomo I, 943p.
- SEMARNAT. 2002 (Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales). NOM-059-ECOL-2001.
- Solorzano, S., A. Cortés-Palomec., A. Ibarra., Dávila, P., y Oyama, K. 2009. **Isolation, characterization and cross-amplification of polymorphic microsatellite loci in the threatened endemic Mammillaria crucigera (Cactaceae).** *Molecular Ecology Resources* (2009) 9, 156-158
- Tapia-Salcido, H. J. 2011. **Análisis de la diversidad y estructura genética poblacional de dos especies del género Mammillaria, endémicas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.** Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México.

- Tautz D. (1989) **Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers.** *Nucleic Acids Res* 17: 6463-6471.
- Thompson, J. N. 1994. **The Coevolutionary Process.** Chicago: Univ. Chicago Press. 376 pp.
- Valiente-Banuet A., M. C. Arizmendi., A. Rojas-Martínez y L. Domínguez-Canseco L. 1996. **Ecological relationships between columnar cacti and nectar-feeding bats in Mexico.** *Journal of Tropical Ecology* 12:103-119.
- Valverde T., S. Quijas., M. López-Villavicencio y S. Castillo. 2004. **Population dynamics of *Mammillaria magnimamma* Haworth. (Cactaceae) in a lava-field in central Mexico.** *Plant Ecology* 170:167-184
- Valverde, P., J. Zavala-Hurtado., C. Jiménez-Sierra., B. Rendón-Aguilar, A. Cornejo-Romero., S. Rivas-Arancibia., G. López-ortega y M. Pérez-Hernández. 2009. **Evaluación del riesgo de extinción de *Mammillaria pectinifera*, cactácea endémica de la Región Tehuacán-Cuicatlán.** *Revista Mexicana de Biodiversidad* 80:219-230
- Valverde P. L. y J. A. Zavala-Hurtado 2006. **Assessing the ecological status of *Mammillaria pectinifera* Weber (cactaceae), a rare and threatened species endemic of the Tehuacán-Cuicatlán Region in central México.** *Journal of Arid Environments*. 64: 193-208.
- Van-Osterhout C., D. Weetman y W. F. Hutchinson. **Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium,** *Ecology Notes*. Vol. 6 No. 1.255.256
- Wallace, R. S. 1995. **Molecular systematic study of the Cactaceae: using chloroplast DNA variation to elucidate Cactus phylogeny.** *Bradleya* 13:1-12.
- Waser, N. M., L. Chittka, M. V. Price., N. M. Williams., y J. Ollerton. 1996. **Generalization in pollination systems, and why it matters.** *Ecology* 77: 1043-1060.
- Zavala, J. A. 1997. **Estatus ecológico de *Mammillaria pectinifera* Weber y *Pachycereus fulviceps* Weber en el Valle de Zapotitlán, Puebla.** *Suculentas mexicanas/Cactáceas*. Edit. UNAM. CONABIO. CVS Publicaciones. México.

GLOSARIO

Acervo genético (Gen pool): corresponde a todos los alelos compartidos por los individuos de una población.

Adecuación o Fitness (W): Es el éxito reproductivo relativo de un genotipo comparado con otros genotipos en una población (W: $0 \rightarrow 1$).

ALELO: Son formas alternativas de un gen que se hallan en el mismo locus de cromosomas homólogos. Los alelos se segregan durante la meiosis y el nuevo individuo sólo recibe uno de cada par de alelos de cada progenitor.

Apomixis: Fenómeno en las plantas superiores donde hay formación asexual de un embrión, sin fecundación.

Deriva génica: Fuerza evolutiva que modifica las frecuencias alelicas y produce cambios evolutivos por acontecimientos al azar lo que da como resultado cambios en el acervo génico entre generaciones sucesivas de una población.

Diferenciación genética F_{st} : Este parámetro mide la variación de las frecuencias alelicas entre poblaciones, y por lo tanto la diferenciación genética entre ellas.

Distancia genética: Es el grado de afinidad entre subgrupos o poblaciones estimado mediante diversos estadísticos.

Diversidad genética: Es la variedad de alelos y genotipos presentes en un grupo bajo estudio (población, especie o grupo de especies).

Endogamia: Apareamiento entre individuos que se encuentran más emparentados que el promedio de parentesco de una población. Se trata de un apareamiento dirigido, es decir, no panmítico.

Equilibrio Hardy-Weinberg: La distribución estable de frecuencias de genotipos, AA, Aa y aa, en las proporciones p^2 , $2pq$ y q^2 , respectivamente (donde p y q son las frecuencias de los alelos, A y a), que es una consecuencia del apareamiento al azar en ausencia de mutación, migración, selección natural o deriva al azar.

Estigma: Parte viscosa situada en el ápice de los carpelos, que permite la fijación del polen para la posterior fecundación del óvulo.

Estructura genética: Es la variación genética o cambios de las frecuencias alélicas de una población a otra.

Flujo génico: Intercambio de material genético entre poblaciones diferentes. Puede usarse en el sentido de la reproducción de plantas (es decir, debido a la dispersión de gametos y cigotos) o debido a la influencia del hombre, como la introducción de nuevas variedades de cultivos por parte de los agricultores.

Frecuencia alélica: Es la mitad de la abundancia de un alelo en una población; proporción en la población de todos los alelos de un gen que son de un tipo concreto.

Gen: Unidad fundamental física y funcional, de la herencia que transmite la información de una generación a la siguiente, porción de ADN compuesto de una región que se transcribe y una secuencia reguladora que hace posible la transcripción.

Haplotipo: Es una combinación de alelos ligados a múltiples *loci* que se transmiten juntos de una generación a otra. También se define como el conjunto de genes los cuales determinan un cierto fenotipo (Hamilton, 2009)

Heterosigocidad: Medida de la variación genética de una población respecto a un locus particular. Se define como la frecuencia de heterocigotos para ese locus.

Homocigoto: Un individuo diploide que tiene alelos idénticos en uno o varios *loci* genéticos.

Homologo: Similitud en base a la misma estructura ancestral.

Índice de heterocigosis (F): Es un indicador de variación genética de una población. El índice varía entre -1 a + 1. Cuando F tiene un valor positivo, significativamente mayor que 0 ($F > 0$), hay una diferencia entre individuos heterocigotos (menor variación genética en una población).

Índice de heterocigosis (FIS). Mide la variación genética dentro de una población. Mide de forma indirecta el nivel de consanguinidad en una población. El valor de este índice varía entre -1 (Máxima diversidad en la población) y +1 (Consanguinidad completa, sin diversidad) (Hamilton 2009).

Índice de fijación genética (FST): Se basa en genes que son polimórficos, cuantifica la diferenciación genética (distancia genética) entre poblaciones. Los valores varían entre 0 y 1. Cuando es 0 existe un entrecruzamiento completo (panmixia) entre los individuos de las diferentes poblaciones. Cuando el valor máximo es 1 las dos poblaciones están totalmente separadas genéticamente, solo se entrecruzan individuos de la misma población (Hamilton, 2009).

Índice de heterocigosis (FIT): Mide la variación genética de todas las poblaciones, incorporando la variación genética que existe dentro y entre poblaciones (Hamilton, 2009).

Loci: Se refiere a diferentes localidades de un cromosoma que están compuestos por un arreglo determinado de nucleótidos. Cada localidad se le conoce como locus al arreglo de nucleótidos como alelo. Cada locus puede, o no (alelo neutral), determinar una característica del individuo y esta característica puede variar entre individuos que poseen diferentes alelos para ese locus (Hamilton, 2009).

Loci polimórficos: Medida de variación genética presente en una población y mide la proporción de los locus que tienen más de un alelo. Una población con un polimorfismo de 1 posee una elevada diversidad genética ya que todos los locus analizados tienen más de un alelo. En una población con un polimorfismo de 0 no tiene variación genética ya que todos los locus tienen un solo alelo (Hamilton, 2009).

Locus: Localización exacta de un gen en un cromosoma. Las diferentes formas del gen (alelos) ocupan siempre la misma posición en el cromosoma. Plural: *loci*

Marcador molecular: Cualquier señal o traza molecular que permite estudiar un carácter (fenotipo) o gen (genotipo) asociado a este, y de herencia mendeliana (marcador genético) y detectada como secuencia de ADN o proteínas.

Mutación: Cambio permanente y heredable del material genético. Se aplica comúnmente como un cambio en un solo gen, pero puede usarse también para designar un cambio en el número o disposición de los cromosomas.

Nm: Define el número de alelos que se mueve entre las poblaciones como producto del entrecruzamiento de los individuos de las diferentes poblaciones. Los valores varían entre 0, no existe flujo, un valor mayor de 0 indica el número de nuevos individuos que

ingresan a una población por generación. Las distancias genéticas están relacionadas con el flujo. La distancia genética se relaciona con el flujo génico; entre menor es el flujo mayor es la diferenciación entre las poblaciones, el valor de F_{ST} será mayor, y viceversa. (Hamilton, 2009).

Número efectivo de alelos: Es el inverso del índice de homocigosis. Entre mayor el número de alelos efectivos mayor es la diversidad genética de la población (Hamilton, 2009)

Polimorfismo: Aparición de diferentes formas asociadas con diversos alelos de un gen o con homólogos de un cromosoma.

Selección natural: Es el proceso que limita la tasa reproductora o la eficacia biológica de los seres vivos en relación con características fenotípicas heredables, dando lugar a cambios en las frecuencias de los fenotipos de la población en generaciones futuras (evolución).

Tamaño efectivo de la población (N_e): Este índice mide la cantidad de individuos que contribuyen a aumentar la población (individuos reproductivamente activos) y que son requeridos para que no se presente problemas de deriva génica (pérdida de diversidad genética por eventos aleatorioa) (Hamilton, 2009).

Variación genética: Son las diferencias que existen entre los individuos de una población que se debe a las diferencias en los genotipos.

ANEXOS

Anexo 1.

Especie	Marcador molecular	Sistema de cruza	GST a, FST b, RST c, θ d, Ho, He, e	Síndrome de polinización	Fuerza evolutiva	Referencia
<i>Astrophytum asterias</i>	SSR	Mixto	0.05b	Melitofilia		Terry <i>et al.</i> 2012
<i>Mammillaria crucigera</i>	SSR	?	0.591c	?	Deriva génica, endogamia local	Ibarra 2009
<i>Mammillaria napina</i>	SSR	?	0.09b	?	Deriva génica, endogamia local	Tapia 2011
<i>Mammillaria sphacelata</i>	SSR	Mixto	0.103b	?	Endogamia	Tapia 2011
<i>Carnegiea gigantea</i> ¹	Iso		0.075a			Hamrick <i>et al.</i> 2002
<i>Cephalocereus columna-trajani</i>	RAPD	Autoincompatible	0.287b	Quiropterofilia		Vázquez-Montiel 2005
<i>Cephalocereus totolapensis</i> [*]	RAPD	?	0.144d	Quiropterofili		Palleiro-Dutrenit 2008
<i>Lophocereus schottii</i>	Iso	Autoincompatible	0.130a	Fanelofilia	Flujo génico	Parker & Hamrick 1992,
<i>Lophocereus schottii</i>	Iso	Autoincompatible	0.302	Fanelofilia		Nason <i>et al.</i> 2002
<i>Neobuxbaumia macrocephala</i>	Iso, RAPD	Autoincompatible	0.0173, a 0.2294, b, 0.1064, d	Quiropterofilia		Esparza-Olguin 2005 ; Alejos 2002
<i>Neobuxbaumia mezcalaensis</i>	Iso, RAPD	Autoincompatible	0.0423, a 0.2305, b, 0.0815, d	Quiropterofilia		5 Rivera 2003
<i>Neobuxbaumia tetetzo</i>	Iso	?	0.193a	?		
<i>Pachycereus pringlei</i>	Iso	?	0.076a	?		
<i>Stenocereus eruca</i>	Iso	?	0.092a	Quiropterofilia		
<i>Stenocereus griseus</i>	Iso	?	0.102d	Quiropterofilia	Alto flujo génico	Nassar <i>et al.</i> 2003
<i>Stenocereus gummosus</i>	Iso	Autoincompatible	0.106d	Fanelofilia		Molina-Freaner & Clarck-Tapia 2005
<i>Stenocereus stellatus</i>	SSR	Autoincompatible	0.128a	Quiropterofilia		Cornejo-Romero 2004
<i>Stenocereus thurberi</i>	Iso		0.126a	?		
<i>Cereus repandus</i>	Iso	Autoincompatible	0.349b	Quiropterofilia	Alto flujo génico	Nassar <i>et al.</i> 2003
<i>Melocactus concinnus</i>	Iso	Endocruza, Auto compatible	0.193d	Ornitofilia	Deriva génica, bajo flujo génico, endogamia	Mota-Lambert <i>et al.</i> 2006a
<i>Melocactus glaucescens</i>	Iso	?	0.045b	Ornitofilia	Deriva génica, bajo flujo génico, endogamia	Mota-Lambert <i>et al.</i> 2006b
<i>Melocactus paucispinus</i>	Iso	Mixto, autocompatible	0.504b	Ornitofilia	Deriva génica, bajo flujo génico, endogamia	Mota-Lambert <i>et al.</i> 2006a

<i>Praecereus euchlorus</i>	Iso	?	0.484d	Quiropterofilia	Tamaño poblacional pequeño, endogamia biparental y selección natural contra heterócigos y flujo génico restringido	Moraes <i>et al.</i> 2005
<i>Pilosocereus lanuginosus</i>	Iso	Autoincompatible	0.043a	Quiropterofilia	Alto flujo génico	Nassar <i>et al.</i> 2003
<i>Pilosocereus machrisii</i>	Iso	?	0.281d	?	Tamaño poblacional pequeño, endogamia biparental y selección natural contra heterócigos y flujo génico restringido	Moraes <i>et al.</i> 2005
<i>Pilosocereus tillianus</i>	Iso	Autocompatible	0.028b	Quiropterofilia	Alto flujo génico	Figueredo <i>et al.</i> 2011
<i>Polashia chichipe</i>	SSR		0.009b			Otero-Arnaiz <i>et al.</i> 2005b
<i>Polaskia chende</i>	Iso		0.421, 0.542e			Ruiz-Durán 2006

ANEXO 2

Desierto	Especie	Marcador	NP	P	A	Ho	He	Fis	Fst	Referencia
Sonorense	<i>Carnegiea gigantea</i>	Isoenzimas	16	93.3	2.79	0.110	0.129	0.057	0.075	Hamrick <i>et al.</i> 2002
Sonorense	<i>Lophocereus schottii</i>	Isoenzimas	21	90.3	3.00	0.142	0.214	0.014	0.431	Nason <i>et al.</i> 2002
Sonorense	<i>Pachycereus pringlei</i>	Isoenzimas	19	91.7	3.14	—	0.212	—	0.076	Hamrick <i>et al.</i> 2002
Sonorense	<i>Stenocereus thurberi</i>	Isoenzimas	20	62.4	2.36	0.157	0.169	0.036	0.128	Hamrick <i>et al.</i> 2002
Sonorense	<i>Stenocereus gummosus</i>	Isoenzimas	12	81.8	2.20	0.103	0.290	0.608	0.102	Clark-Tapia y Molina-Freaner 2003
Sonorense	<i>Stenocereus eruca</i>	Isoenzimas	8	46.2	1.48	0.040	0.154	0.739	0.069	Clark-Tapia 2000
Sonorense	<i>Stenocereus eruca</i>	rapd	4	70.6	—	—	0.277	—	0.337	Clark-Tapia <i>et al.</i> 2005
Sonorense	<i>Bursera microphylla</i>	Isoenzimas	14	51.8	1.82	0.112	0.183	0.387	0.178	Hernández 1999
Sonorense	<i>Bursera</i>	Isoenzimas	9	90.9	2.35	0.262	0.297	0.109	0.162	Vargas

Sonorense	<i>hindsiana</i> <i>Olneya tesota</i>	Isoenzimas	14	71.4	—	0.105	0.250	0.570	0.480	2000 A. Domínguez y L. Hernández np
Sonorense	<i>Kallstroemia grandiflora</i>	Isoenzimas	15	71.4	1.92	0.201	0.267	0.242	0.420	Cuevas 2005
Sonorense	<i>Agave cerulata</i>	rapd	5	89.8	—	—	0.237	—	0.098	Navarro- Quesada <i>et al.</i> 2003
Sonorense	<i>Agave deserti</i>	rapd	6	78.1	—	—	0.186	—	0.135	Navarro- Quesada <i>et al.</i> 2003
Sonorense	<i>Agave subsimplex</i>	rapd	3	75.6	—	—	0.144	—	0.084	Navarro- Quesada <i>et al.</i> 2003
Chihuahuense	<i>Agave victoriae-regina</i>	Isoenzimas	10	83.0	2.20	—	0.335	0.055	0.236	Martínez- Palacios <i>et al.</i> 1999
Chihuahuense	<i>Agave lechuguilla</i>	Isoenzimas	11	96.0	2.28	0.351	0.394	0.105	0.083	Silva- Montellano y Eguiarte 2003
Chihuahuense	<i>Larrea tridentata</i>	Isoenzimas	17	95.0	3.89	0.322	0.362	0.124	0.116	Duran <i>et al.</i> 2005
Tehuacán	<i>Escontria chiotilla</i>	Isoenzimas	3	35.9	1.50	0.079	0.134	—	0.075	Tinoco <i>et al.</i> 2005
Tehuacán	<i>Polaskia chichipe</i>	Microsatélites	3	—	5.93	0.631	0.683	0.071	0.009	Otero- Arnaiz <i>et al.</i> 2005b
Tehuacán	<i>Polaskia chichipe</i>	Isoenzimas	—	93.3	3.13	0.498	0.389	—	—	Lucio 2006
Tehuacán	<i>Stenocereus stellatus</i>	Isoenzimas	19	82.9	2.35	0.208	0.265	—	—	Casas <i>et al.</i> 2006
Tehuacán	<i>Polaskia chende</i>	Isoenzimas	—	100	3.40	0.421	0.542	—	—	Ruiz-Durán 2006

NP = número de poblaciones; P = porcentaje de loci o bandas polimórficas; A = número promedio de alelos por locus; Ho = heterocigosidad observada; He = heterocigosidad esperada bajo Hardy-Weinberg; Fis = medida de la

ANEXO 3

Población	Locus	DF	ChiSq	Prob	Signif
CO	MAM2	10	10.501	0.398	ns
CO	MAM8	15	11.000	0.753	ns
CO	MAM9	21	25.667	0.219	ns
CO	MAM11	6	7.443	0.282	ns
CO	PRIMER P50	45	57.750	0.096	ns
CO	PRIMERP44	28	21.728	0.794	ns

CH	MAM2	15	17.889	0.269	ns
CH	MAM8	10	15.360	0.119	ns
CH	MAM9	45	49.778	0.289	ns
CH	MAM11	3	10.571	0.014	*
CH	PRIMER P50	28	22.750	0.745	ns
CH	PRIMERP44	3	2.458	0.483	ns
TE	MAM2	21	19.440	0.557	ns
TE	MAM8	6	2.250	0.895	ns
TE	MAM9	45	39.000	0.723	ns
TE	MAM11	6	8.327	0.215	ns
TE	PRIMER P50	28	31.875	0.280	ns
TE	PRIMERP44	36	33.813	0.573	ns
SM	MAM2	10	14.881	0.136	ns
SM	MAM8	15	10.808	0.766	ns
SM	MAM9	21	18.171	0.638	ns
SM	MAM11	3	11.556	0.009	**
SM	PRIMER P50	55	60.267	0.291	ns
SM	PRIMERP44	45	51.679	0.229	ns
RE	MAM2	15	12.358	0.652	ns
RE	MAM8	10	8.800	0.551	ns
RE	MAM9	15	13.306	0.579	ns
RE	MAM11	6	16.867	0.010	**
RE	PRIMER P50	36	42.222	0.220	ns
RE	PRIMERP44	28	22.857	0.740	ns
NO	MAM2	10	7.906	0.638	ns
NO	MAM8	21	14.850	0.830	ns
NO	MAM9	15	14.314	0.502	ns
NO	MAM11	6	15.586	0.016	*
NO	PRIMER P50	10	15.840	0.104	ns
NO	PRIMERP44	21	26.000	0.206	ns
TC	MAM2	6	2.816	0.832	ns
TC	MAM8	15	16.867	0.327	ns
TC	MAM9	28	28.472	0.440	ns
TC	MAM11	3	10.000	0.019	*
TC	PRIMER P50	36	50.500	0.055	ns
TC	PRIMERP44	6	3.938	0.685	ns
SB	MAM2	15	18.000	0.263	ns
SB	MAM8	10	17.245	0.069	ns
SB	MAM9	45	55.000	0.146	ns
SB	MAM11	3	9.000	0.029	*
SB	PRIMER P50	36	60.500	0.006	**
SB	PRIMERP44	10	20.900	0.022	*
SI	MAM2	6	8.750	0.188	ns
SI	MAM8	10	10.800	0.373	ns
SI	MAM9	15	19.056	0.211	ns

SI	MAM11	6	9.431	0.151	ns
SI	PRIMER P50	15	14.333	0.500	ns
SI	PRIMERP44	6	2.160	0.904	ns
ZA	MAM2	15	12.778	0.619	ns
ZA	MAM8	10	11.250	0.338	ns
ZA	MAM9	45	45.711	0.442	ns
ZA	MAM11	6	15.625	0.016	*
ZA	PRIMER P50	21	18.711	0.604	ns
ZA	PRIMERP44	21	15.741	0.784	ns
FR	MAM2	28	33.680	0.212	ns
FR	MAM8	15	12.480	0.642	ns
FR	MAM9	10	8.762	0.555	ns
FR	MAM11	3	5.156	0.161	ns
FR	PRIMER P50	3	6.041	0.110	ns
FR	PRIMERP44	21	15.111	0.817	ns
SU	MAM2	28	43.333	0.032	*
SU	MAM8	28	27.111	0.512	ns
SU	MAM9	10	8.163	0.613	ns
SU	MAM11	3	10.278	0.016	*
SU	PRIMER P50	21	43.125	0.003	**
SU	PRIMERP44	36	41.975	0.228	ns
EC	MAM2	6	6.542	0.365	ns
EC	MAM8	15	13.469	0.566	ns
EC	MAM9	21	14.259	0.858	ns
EC	MAM11	3	6.369	0.095	ns
EC	PRIMER P50	15	24.139	0.063	ns
EC	PRIMERP44	28	52.556	0.003	**
CC	MAM2	6	6.222	0.399	ns
CC	MAM8	6	7.444	0.282	ns
CC	MAM9	10	8.400	0.590	ns
CC	MAM11	3	3.000	0.392	ns
CC	PRIMER P50	6	9.429	0.151	ns
CC	PRIMERP44	21	45.633	0.001	**
LA	MAM2	10	15.875	0.103	ns
LA	MAM8	15	28.600	0.018	*
LA	MAM9	28	24.444	0.658	ns
LA	MAM11	6	11.500	0.074	ns
LA	PRIMER P50	45	36.906	0.799	ns
LA	PRIMERP44	10	5.457	0.859	ns
AZ	MAM2	6	5.556	0.475	ns
AZ	MAM8	10	19.000	0.040	*
AZ	MAM9	21	13.457	0.892	ns
AZ	MAM11	6	19.286	0.004	**
AZ	PRIMER P50	6	7.500	0.277	ns
AZ	PRIMERP44	10	17.901	0.057	ns

ER	MAM2	21	18.958	0.588	ns
ER	MAM8	6	7.844	0.250	ns
ER	MAM9	28	30.000	0.363	ns
ER	MAM11	3	5.269	0.153	ns
ER	PRIMER P50	6	3.292	0.771	ns
ER	PRIMER P44	10	10.278	0.416	ns
CQ	MAM2	10	12.200	0.272	ns
CQ	MAM8	15	24.000	0.065	ns
CQ	MAM9	21	18.222	0.635	ns
CQ	MAM11	3	5.841	0.120	ns
CQ	PRIMER P50	3	3.618	0.306	ns
CQ	PRIMER P44	21	14.496	0.847	ns

Key: ns=not significant, * P<0.05, ** P<0.01, * P<0.001**