

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



VARIACIÓN Y ESTRUCTURA GENÉTICA INTRAPOBLACIONAL  
DE *Ferocactus histrix* (CACTACEAE) EN EL RAYO ZACATECAS

TRABAJO DE TITULACIÓN EN LA MODALIDAD DE

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

P R E S E N T A

**BRENDA DÍAZ CÁRDENAS**

Las Agujas, Zapopan, Jal., Abril de 2011



**Universidad de Guadalajara**  
**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**  
*Coordinación de Carrera de la Licenciatura en Biología*

COORD-BIO-099/2010.

**C. BRENDA DÍAZ CÁRDENAS**  
**PRESENTE**

Manifestamos a Usted, que con esta fecha, ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** con el título: **"Variación y estructura genética intropoblacional de *Ferocactus histrix* (Cactaceae) en El Rayo, Zacatecas"**, para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como directora de dicho trabajo a Dra. Luz Patricia Castro Félix y como asesora a M. C. Verónica Carolina Rosas Espinoza.


Sin más por el momento, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"BIENSA Y TRABAJA"**

**"2010 Bicentenario de la Independencia y Centenario de la Revolución Mexicana"**  
Las Agujas, Nexipac, Zapopan, Jal., 14 de Septiembre del 2010.



**DRA. TERESA DE JESÚS CUEVAS ESQUIVIAS**  
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**



**M.C. GLORIA PARADA BARRERA**  
**SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

FORMA F

Dra. Teresa de Jesús Aceves Esquivias.  
Presidente del Comité de Titulación.  
Licenciatura en Biología.  
CUCBA.  
Presenta

Nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad TESIS E INFORMES, opción TESIS con el título: "Variación y estructura genética intrapoblacional de *Ferocactus histrix* (Cactaceae) en El Rayo, Zacatecas" que realizó la pasante Brenda Díaz Cárdenas con número de código 302165325 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorizar su impresión.


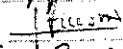
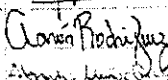
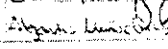
Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

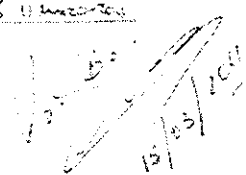
Atentamente

Zapopan, Jalisco a 14 de Marzo de 2011.

  
Dra. Luz Patricia Castro Félix  
Director

  
M. en C. Verónica Carolina Rosas Espinoza  
Asesor

Nombre completo de los Síndicos asignados por el Comité de Titulación	Firma de aprobación	Fecha de aprobación
Dra. Ofelia Vargas Ponce		14/03/2011
Dr. José Luis Navarrete Heredia		14/03/2011
Dr. Aaron Rodríguez Contreras		Marzo 14 2011
Supt. Dr. Alejandro Muñoz Uñas		14 marzo 2011

  
15/03/2011

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biomarcadores Moleculares y Genética Molecular del Departamento de Biología Celular y Molecular de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara; como parte del proyecto “Diversidad y Estructura genética de la población de *Ferocactus histrix* en El Rayo, Zac., México” con financiamiento de PROMEP /103.5/07/2636.

Bajo la dirección de la Dra. Patricia Castro-Félix y la asesoría de la M. en C. Verónica Carolina Rosas-Espinoza.

## AGRADECIMIENTOS

---

A mis padres, por darme la vida y por dejarme elegir como vivirla. A mi padre por todo su apoyo durante el proceso. A mi madre, por no dejarme caer y siempre estar ahí.

A mis abuelas, por transmitirme su sabiduría y tenerme siempre presente. A mis hermanos, primos y tíos por brindarme momentos de felicidad y diversión y por respetar mis ideas y opiniones. A mi tía Susana, por su apoyo incondicional.

A Sergio Ruíz, que en los últimos cuatro años me ha brindado su apoyo y cariño, además de hacer mi vida más feliz y completa.

A la familia Ruíz Santana, por permitirme entrar en su casa y brindarme su apoyo y comprensión.

A la familia González Barreda, que aunque no nos veamos, yo se que siempre están conmigo.

A Delia Aguayo, mi amiga incondicional, que ha estado conmigo tanto en los momentos más difíciles como en los más felices. A mis amigos Bere, Guillermo, Juan Carlos, Felipe (Pollo), Víctor, Mariana, Ezequiel, Mario, Carina y Paco, por agregarle diversión infinita a esta etapa tan importante en mi vida. ¡Muchas gracias por su amistad!

A mis compañeros de laboratorio, por hacer el proceso más ameno y agradable. En especial a Irma Rúan, por sus conocimientos, consejos y jalones de oreja. Gracias Sifaka!

A la Dra. Anne Santerre, por su apoyo y confianza y por permitirme entrar a su laboratorio. A la Dra. Rosario Huizar por su ayuda y consejos en el laboratorio. A la Dra. Isabel Torres, por compartir conmigo sus conocimientos y técnicas. A Pilar Zamora, por su ayuda con los programas de análisis.

A mis sinodales Dra. Ofelia Vargas y Dr. Alejandro Muñoz, por sus correcciones y recomendaciones. Un agradecimiento especial a los Dres. José Luis Navarrete y Aarón Rodríguez, que además de ser mis sinodales, han formado parte importante en mi formación como bióloga, ya que sus conocimientos han fortalecido y enriquecido mi aprendizaje.

A Verónica Rosas, por transmitirme sus conocimientos de ecología y por brindarme su amistad y apoyo. A Verónica Palomera, por sembrar en mí el interés de la genética de poblaciones. Por sus conocimientos, apoyo y amistad. ¡Gracias tutora!

A la Dra. Patricia Castro, que ha sido mi guía y a quien debo esta tesis. A ella agradezco todo el conocimiento que he adquirido en los últimos dos años, que han sido los más fructíferos y reconfortantes de mi formación. Muchas gracias por compartir conmigo su sabiduría y por sus consejos académicos y personales.

## RESUMEN

---

Se describen los resultados de la extracción de ADN en *Ferocactus histrix* con tres protocolos de extracción y los niveles de variación genética intrapoblacional. La población se localiza en El Rayo, Zacatecas, México. Se seleccionaron dos pares de iniciadores ISTR y dos iniciadores ISSR y se obtuvieron los patrones de amplificación de 134 muestras de *F. histrix*. De 67 marcadores amplificados, 11 ISTRs y 16 ISSRs fueron polimórficos. El análisis de variación genética reveló niveles bajos en la población de *F. histrix* ( $P=40.3\%$ ,  $I=0.18$ ,  $He=0.12$ ). La población se subdividió en clases de tamaño y se obtuvieron los parámetros de diversidad genética. La clase de mayor tamaño mostró niveles más altos ( $I=0.18$ ,  $He=0.12$ ) que la de menor tamaño ( $I=0.14$ ,  $He=0.10$ ). El análisis estadístico de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas ( $H=2.805$ ,  $p=0.73$ ). Los valores de  $F_{ST}=0.039$  y  $\theta=0.016$  no revelan una estructuración genética intrapoblacional. Sin embargo, sí se observa una mayor diferenciación entre las clases de mayor y menor tamaño. La disminución progresiva de la variación genética de la población de *F. histrix* puede ser resultado de la deriva génica y la endogamia. La subdivisión de la población en reproductivos y no reproductivos no mostró diferencias en los parámetros de diversidad genética. Es importante conocer los niveles de variación genética de una especie, ya que es la materia prima de los cambios adaptativos de sus poblaciones. Esta información, sumada al análisis de la estructura genética intra e inter poblacional, permite proponer programas y acciones de manejo adecuadas para la conservación.

# CONTENIDO

---

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>ANTECEDENTES</b>	
<i>Ferocactus histrix</i>	2
Extracción de ADN	3
Marcadores moleculares	4
<i>ISTR</i>	5
<i>JSSR</i>	5
Variación, estructura genética y conservación	6
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	9
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	10
<b>HIPÓTESIS</b>	11
<b>OBJETIVOS</b>	12
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
Área de estudio	13
Material vegetal	13
Clases de tamaño e individuos en etapa reproductiva	14
Extracción de ADN	14
Marcadores moleculares	
<i>ISTR</i>	15
<i>JSSR</i>	15
Registro y análisis de datos	16
<b>RESULTADOS</b>	
Clases de tamaño e individuos en etapa reproductiva	18
Extracción de ADN	18
Marcadores moleculares	19

<b>DISCUSIÓN</b>	
Clases de tamaño e individuos en etapa reproductiva	25
Extracción de ADN	26
Marcadores moleculares	27
Variación, estructura genética y conservación	28
<b>CONCLUSIONES</b>	33
<b>REFERENCIAS</b>	34
<b>ANEXO I</b>	
Protocolos de extracción de ADN de Cactáceas	41
<b>ANEXO II</b>	
Amplificación de marcadores moleculares ISTRs e ISSRs por PCR	45
<b>ANEXO III</b>	
Preparación de geles de acrilamida	46



# INTRODUCCIÓN

---

En México se encuentran 669 (48%) de las 1400 especies de cactáceas descritas a nivel mundial, por lo que es considerado un centro de origen y diversificación de este grupo taxonómico (Bravo-Hollis, 1978; CONABIO, 2009). Las cactáceas son uno de los grupos más amenazados en México. 276 especies (41%) se encuentran consideradas en alguna categoría de protección según la NOM-059-2010 (SEMARNAT, 2010). Esto se debe a que sus poblaciones han disminuido por la conversión de terreno con fines agrícolas y/o pecuarios, el sobrepastoreo y la extracción con fines alimenticios y comerciales a nivel nacional e internacional (Hernández y Godínez, 1994). Tal es el caso de *Ferocactus histrix* (DC) Lyndsay, cactácea globosa que en los últimos años ha experimentando una disminución en el tamaño de las poblaciones así como una fragmentación a lo largo de su distribución (Godínez-Álvarez y cols., 2003).

La disminución en el tamaño de las poblaciones de una especie produce un decremento en la variación genética y un incremento en la diferenciación genética (Moraes y cols., 2005). La variación genética es la materia prima para los cambios evolutivos en las poblaciones silvestres, ya que permite la adaptación de los individuos a los cambios ambientales (Frankham, 1996). Las poblaciones pequeñas y fragmentadas presentan una mayor deriva génica, endogamia, y una reducción del flujo génico (Moraes y cols., 2005). En consecuencia, mantener la variación genética es fundamental en la conservación de las poblaciones y las especies (Frankham, 2003).

La variación genética es importante en la conservación. Los marcadores moleculares constituyen una de las herramientas fundamentales de la genética de poblaciones y son necesarios para evaluar la cantidad de variación genética en poblaciones de especies amenazadas. La aplicación de marcadores moleculares en el estudio de *F. histrix* proporcionará el conocimiento básico para el establecimiento de un plan de manejo y conservación de la especie.

## ANTECEDENTES

---

### *Ferocactus histrix* (DC) Lindsay

*Ferocactus histrix* pertenece a la familia Cactaceae, subfamilia Cactoideae, tribu Cacteae (Bravo-Holis y Sánchez Mejorada, 1991). Es una cactácea globosa, conocida comúnmente como biznaga. Las plantas adultas llegan a medir entre 30-45 cm de diámetro y 55-110 cm de altura (del Castillo y Trujillo, 1991). Son de color verde olivo amarillento con espinas amarillas con base de color marrón. La floración ocurre entre marzo a agosto. Las flores son amarillas (Scheinvar, 2004) y la fructificación se presenta entre la primavera y principios del verano. La fructificación alcanza su máximo en el mes de mayo (del Castillo y Trujillo, 1991).

*Ferocactus histrix* se asocia a terrenos cerriles, pedregosos y generalmente escarpados con un clima seco (Scheinvar, 2004). Es una especie endémica a México cuya distribución se concentra en el Altiplano Potosino y Zacatecano incluyendo los estados de Aguascalientes, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Querétaro y Zacatecas (del Castillo, 1983).

Aunque se han estudiado algunos aspectos de la biología, ecología y etnobotánica de *F. histrix* (del Castillo, 1983, 1988, 1994; del Castillo y Trujillo, 1991; Huerta Martínez y Escobar Santos, 1998; Escobar Santos y Huerta-Martínez, 1999, Pérez-Valencia y cols., 2006), se desconocen los niveles de variación y diferenciación genética de sus poblaciones.

*Ferocactus histrix* es una especie que ha sido explotada históricamente. El uso más común de la biznaga es como alimento. Con los frutos se elaboran agua de biznaga y paletas de hielo. Los botones florales (cabuches) son consumidos localmente acompañados con chile rojo o con huevo y se comercializan fuera de las localidades como delicatessen. El tallo es empleado en la elaboración del dulce de biznaga o acitrón y

del queso de biznaga. Esta cactácea también se utiliza como alimento para el ganado; las plantas son escindidas por la mitad y se ofrecen como fuente de agua y carbohidratos para el ganado (del Castillo y Trujillo, 1991).

La comercialización de *F. histrix* como planta de ornato es un factor importante en la extracción de los individuos de menor tamaño (del Castillo y Trujillo, 1991; Godínez y cols., 2003; Pérez-Valencia y cols., 2006). Además, el indumento lanoso (lana de biznaga) localizado en la parte apical de los individuos adultos era comúnmente utilizado por los pobladores para elaborar mantas y chalecos tejidos (del Castillo y Trujillo, 1991).

### **Extracción de ADN**

La extracción de ADN en cactáceas, es un procedimiento difícil. El tejido vegetal contiene una gran cantidad de mucopolisacáridos (mucilagos) y metabolitos secundarios. Estos contaminantes forman complejos insolubles con los ácidos nucleicos durante el proceso de extracción e inhiben la acción de las enzimas de restricción y de la *Taq* polimerasa (De la Cruz y cols., 1997). La viscosidad de los mucilagos dificulta la extracción debido a que parte del ADN se queda atrapado en el mucilago y disminuye considerablemente la eficiencia de la extracción (Primark, 1995).

Se han descrito distintos métodos de extracción de ADN en especies ricas en polisacáridos (De la Cruz y cols., 1997; Keb-Llanes y cols., 2002; Griffith y Porter, 2003; Cota-Sánchez y cols., 2006). Sin embargo, el rendimiento y la calidad del ADN dependen de la especie. La concentración de mucilagos varía entre especies de cactáceas (Nobel y cols., 1992). Además, la mayoría de los protocolos de extracción de ADN de cactáceas requieren de por lo menos un gramo de tejido, lo que representa una gran cantidad para el muestreo de plantas pequeñas sobre todo si las especies presentan cierto grado de amenaza. Se desconoce la eficiencia de los métodos reportados en la extracción de ADN de *F. histrix*. Debido a que la extracción de ADN es el primer paso para desarrollar marcadores moleculares, para llevar a cabo el análisis genético es necesario

contar con un protocolo que produzca ADN de *F. histrix* de buena calidad en cantidades suficientes.

### **Marcadores moleculares**

El análisis de la variación genética, tiene un papel relevante en la biología de la conservación. En particular, el uso de marcadores de ADN de alta resolución puede detallar la historia demográfica, estructura reproductiva, niveles de diversidad, diferenciación genética y conectividad de las poblaciones. Además, son una herramienta que contribuye a la generación del conocimiento necesario para el establecimiento de estrategias para conservación y manejo de especies (Lougheed y cols., 2000). En las últimas décadas, se ha presenciado el desarrollo de nuevas clases de marcadores, el perfeccionamiento de métodos analíticos y de programas de computación más amigables y un incremento en la automatización de la secuenciación. Como resultado, la integración de los marcadores moleculares en estudios de poblaciones silvestres se ha convertido en algo factible y ha sido más difundido (DeYoung y Honeycutt, 2005).

Existen tres tipos de marcadores de ADN. Los primeros se basan en la hibridación de sondas. En el segundo grupo se encuentran los basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Por último, hay métodos que combinan las dos técnicas anteriores. En la actualidad, los marcadores basados en PCR son los más utilizados, ya que pueden proporcionar un mayor número de *loci* polimórficos, no requieren de grandes cantidades de ADN, no necesitan de radioactividad y son menos costosos (Escudero y cols., 2003; Semang y cols., 2006).

Dos marcadores moleculares que se apoyan en la PCR utilizados con éxito en estudios de variación genética de plantas son los ISTRs (Inverse Sequence-Tagged Repeats, por sus siglas en inglés) (Rhode, 1996; Aga y Bryngelsson, 2006; Infante y cols., 2006; Torres-Morán y cols., 2006) y los ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats, por sus siglas en inglés) (Zietkiewics y cols., 1994; Bomet y cols., 2002; Cariaga y cols., 2005; González y cols., 2005; Szczecinska y cols., 2009; Li y cols., 2010). Ambos marcadores son *muti-loci* y dominantes. Los marcadores que involucran una gran

cantidad de *loci* proveen de una evaluación más completa del genoma en comparación con marcadores de un solo *locus* (Takrouni y Boussaid, 2010).

### **ISTR**

Los ISTRs son marcadores moleculares desarrollados a partir de secuencias de retrotransposones de *Drosophila melanogaster*. A los retrotransposones flanqueados por una cadena larga de repeticiones directas se les denomina LTR-retrotransposones (LTRs por sus siglas en inglés). En el genoma de eucariontes se encuentran versiones trunca de un tipo de LTR-retrotransposones denominados elementos *copia*. En la técnica ISTR se utilizan dos iniciadores diseñados en dirección contraria al elemento *copia* para amplificar el fragmento que conecta a dos elementos *Copia* (Rhode, 1996). De esta manera se generan bandas de diferentes pesos moleculares específicas de los oligonucleótidos empleados y el ADN analizado. El perfil de estas bandas representa una huella genómica característica del ADN estudiado (Torres-Morán y cols., 2006).

### **ISSR**

Los ISSRs son marcadores semiarbitrarios amplificados por PCR a partir de la presencia de un oligonucleótido o iniciador complementario a un microsatélite. Los microsatélites consisten en repeticiones en tandem de secuencias simples como  $(CT)_n$  ó  $(CA)_n$ , localizadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucarionte. Es posible agregar un par de nucleótidos extras arbitrarios en el extremo 3' o en el 5' del oligonucleótido complementario al microsatélite. Estos nucleótidos extras funcionan como "anclas" que le confieren una mayor especificidad a la amplificación por PCR y mejoran así la reproducción de la misma (Zietkiewics y cols., 1994).

Cada uno de los fragmentos ISSR amplificados se considera un "*locus*", que representa el segmento de ADN entre dos microsatélites. El patrón característico de los productos de PCR se reconoce como la "huella digital genética" de cada uno de los individuos analizados. Es posible detectar el polimorfismo entre individuos de la misma población, ya que el análisis es sensible a la presencia/ausencia del elemento genómico reconocido por el iniciador y a la longitud de la secuencia intermedia amplificada (González y Aguirre, 2007).

## **Variación, estructura genética y conservación**

A la existencia de cambios heredables en una población, se le conoce como variación genética (Frankham y cols., 2002). La variación genética en una especie consta de 3 componentes: 1) diversidad genética (cantidad de variación genética), 2) estructura genética (diferenciación de la distribución de la variación genética entre o dentro de las poblaciones), y 3) distancias genéticas (cantidad de variación genética entre pares de poblaciones) (Lowe y cols., 2008).

El nivel de variación genética de una especie representa el balance entre migración, mutación, deriva génica y selección natural. La migración y la mutación generan variación mientras que la selección y la deriva génica provocan su erosión (Frankham, 1996).

El acervo genético de una especie puede dividirse en 1) diferencias genéticas entre individuos de una sola población (diversidad genética intrapoblacional) y en 2) diferencias genéticas entre poblaciones diferentes (divergencia genética). Si dentro de una población existe variación genética, cualquier alteración en la presión selectiva debida a cambios ambientales permitirá a un grupo de individuos sobrevivir y reproducirse (Lowe y cols., 2008). Además, la cantidad de variación genética dentro de una población nos brinda una idea de la estructura demográfica y la historia evolutiva de una población. Por ejemplo, la falta de diversidad genética puede indicar que una población ha sufrido recientemente una reducción del tamaño poblacional (Linhart y cols., SA). La divergencia genética entre poblaciones indica la cantidad de intercambio genético que ha ocurrido entre las poblaciones y juega un papel importante en la conservación y el manejo de una especie (Allendorf y Luikart, 2007).

La estructura (distribución) de la diversidad genética se puede dar a diferentes escalas como poblaciones, subpoblaciones, o entre individuos vecinos. Esta estructura es considerada como determinante de la tasa de evolución. Es ampliamente aceptado que la diversidad genética dentro de una población no se distribuye aleatoriamente y que refleja los procesos ecológicos y evolutivos que afectan a las poblaciones vegetales naturales. Conocer cómo se encuentra estructurada genéticamente una población, es de gran

importancia para explorar la evolución y conservación de especies amenazadas (Gao y cols., 2001).

La información genética es una cuestión clave para establecer prioridades de conservación (Delgado y cols., 2008). La genética de la conservación es la disciplina que se enfoca en mantener a las especies como entidades dinámicas capaces de afrontar los cambios ambientales (Frankham y cols., 2002). Uno de sus objetivos es entender la relación que existe entre la diversidad genética y la viabilidad de una población (Beebee y Rowe, 2004).

La disponibilidad de marcadores moleculares ha influido en la comprensión del papel que juega la genética en la conservación. El número y tipos de marcadores moleculares disponibles influyen en la habilidad de enfocar preguntas cruciales en diversos aspectos de la conservación. No existe la “mejor” técnica para estudiar la variación en poblaciones naturales, la técnica más apropiada dependerá de la pregunta que se desee responder (Allendorf y Luikart, 2007). A pesar de que en los últimos años se han desarrollado una serie de marcadores moleculares que facilitan el análisis y la medición de la diversidad genética (Avise, 2004); son muy pocas las especies de cactáceas (Cuadro 1) en las que se cuenta con este tipo información y la mayoría son cactus columnares (Clark Tapia y cols., 2005; Otero-Amaiz y cols., 2005).

Un parámetro para evaluar la viabilidad poblacional es el tamaño de la población. Se sabe que la diversidad genética de una especie está estrechamente relacionada con su tamaño poblacional (Frankham, 1996; Oostermeijer y cols., 2003), mientras más pequeña sea la población es más probable que los eventos azarosos cambien las frecuencias alélicas. A este proceso aleatorio de cambio en las frecuencias alélicas se le conoce como deriva génica. Esto incrementa dramáticamente cuando la población disminuye, entonces el azar domina a la selección con respecto a los alelos que permanecen (Lowe y cols., 2008).

La teoría de la genética de poblaciones predice que poblaciones vegetales pequeñas pueden sufrir de un aumento en la deriva génica y la endogamia y de una disminución en el flujo genético entre poblaciones, lo que resulta en una disminución de

la variación genética intrapoblacional y en un aumento de la diferenciación genética interpoblacional. Mientras que la erosión genética puede afectar la conservación de la población, un incremento en la diferenciación genética entre poblaciones puede dirigimos a una especiación local o al endemismo (Moraes y cols., 2005). Cuando una población se encuentra estructurada en subpoblaciones, se puede afectar la variación genética, a tal grado que, en un largo plazo, se vea perjudicada la adaptación de la especie (Frankel, 1974).

**Cuadro 1. Niveles de heterocigosidad esperada (He) con diferentes marcadores moleculares en especies de cactáceas globosas y columnares.**

ESPECIE	He	MARCADOR MOLECULAR	REFERENCIA	MORFOLOGÍA
<i>Melocactus glaucescens</i>	0.09	E	Lambert y cols., 2006a	G
<i>M. concinnus</i>	0.10	E	Lambert y cols., 2006b	G
<i>M. paucispinus</i>	0.12	E	Lambert y cols., 2006b	G
<i>Escotria chiotilla</i>	0.13	E	Tinoco y cols., 2005	C
<i>Melocactus curvispinus</i>	0.14	E	Nassar y cols., 2001	G
<i>Pachocereus pringlei</i>	0.21	E	Fleming y cols., 1998	C
<i>Pereskia guamacho</i>	0.24	E	Nassar y cols., 2002	A
<i>Stenocereus stellatus</i>	0.25	E	Casas y cols., 2006	C
<i>Pilosocereus auweispinus</i>	0.28	E	Moraes y cols., 2005	C
<i>P. vilaboensis</i>	0.29	E	Moraes y cols., 2005	C
<i>Stenocereus eruca</i>	0.36	RAPD	Clarck-Tapia y cols., 2005	C
<i>Pilosocereus marchisii</i>	0.38	E	Clarck-Tapia y cols., 2005	C
<i>Facheiroa squamosa</i>	0.40	E	Moraes y cols., 2005	C
<i>Pilosocereus euchlorus</i>	0.44	E	Moraes y cols., 2005	C
<i>Polaskia chichipe</i>	0.63	M	Otero-Arnaiz y cols., 2005	C
<i>Stenocereus pruinosus</i>	0.72	M	Parra y cols., 2010	C

E= Enzimas M=Microsatélites G= Globosa C=Columnar A=Arbustiva



## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

*Ferocactus histrix* ha experimentando una disminución en el tamaño poblacional y una fragmentación a lo largo de su distribución (Godínez-Álvarez y cols., 2003). En la última década se ha registrado una marcada disminución en el tamaño poblacional de esta biznaga y un cambio en la estructura de tamaños en una población ubicada en El Rayo, Zacatecas (Pérez-Valencia y cols., 2006). Los cambios demográficos registrados en esta población de *F. histrix*, podrían traducirse en niveles de variación genética bajos y en una estructura genética intrapoblacional.

## JUSTIFICACIÓN

---

El aprovechamiento de *Ferocactus histrix* es una tradición prehispánica. La planta se ha utilizado como planta medicinal, alimento y en la industria textil (del Castillo y Trujillo, 1991). Actualmente, es una de las cactáceas globosas con mayor importancia comercial en México, ya que la industria confitera produce el dulce de biznaga y es comercializada como planta de ornato. Adicionalmente, los campesinos consumen y venden sus frutos y botones florales (cabuches) y la dan como alimento al ganado caprino. La destrucción del hábitat y la sobreexplotación humana han afectado a *F. histrix* (Pérez-Valencia y cols., 2006) de tal manera que en la actualidad se encuentra en la Norma Oficial Mexicana en la categoría de especies con protección especial (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2010). Aunque la especie ha sobrevivido a la explotación humana durante siglos, la sobreexplotación actual sumada a la destrucción del hábitat puede conducirla a la extinción (del Castillo y Trujillo, 1991).

Se desconoce el efecto de la disminución del tamaño de las poblaciones naturales de *F. histrix* en los niveles de variación genética y en la distribución intrapoblacional de la misma. Teóricamente, es importante analizar ambos aspectos en una población pequeña y aislada como la población de *F. histrix* de El Rayo, Zacatecas. Además esta información contribuiría en el establecimiento de medidas de manejo y conservación apropiadas para la especie.

## HIPÓTESIS

---

La población de *Ferocactus histrix* de El Rayo, Zacatecas, tiene niveles bajos de variación genética y una estructura genética intrapoblacional.

# OBJETIVOS

---

## OBJETIVO GENERAL

Determinar la variación genética y la estructura genética intrapoblacional de *Ferocactus histrix* en El Rayo, Zacatecas.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener ADN de *Ferocactus histrix* de buena calidad.
2. Generar marcadores ISTR e ISSR en *Ferocactus histrix*.
3. Obtener el nivel de variación genética de la población.
4. Determinar si existe una estructura genética intrapoblacional por clases de tamaño.
5. Conocer el nivel de variación genética que presenta la población.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### Área de estudio

El estudio se realizó en la localidad de El Rayo (21° 58' N y 101° 38' O, 2190 msnm), que se ubica en la subprovincia fisiográfica de Los Llanos de Ojuelos, municipio de Pinos, Zacatecas. En esta zona predominan el matorral xerófilo y el pastizal. El clima es semiárido, la temperatura media anual varía entre los 16 y 18°C y la precipitación media anual es de 300 a 500 mm. La mayor parte de las lluvias ocurren de junio a septiembre. Los sistemas de toposformas más representados son llanuras con piso rocoso (Pérez-Valencia, y cols., 2006).

### Material vegetal

Con el fin de obtener una muestra de la población de *Ferocactus histrix* en la que estuvieran representados individuos de todos los tamaños, se realizó una exploración del área. Se seleccionó una parcela aislada que presentaba un mejor estado de conservación en relación al resto de la localidad. Se colectó material vegetal de una costilla de cada uno de los individuos de *F. histrix* (n=134) ubicados dentro de la parcela de 30m X 60m. El tejido se colocó en tubos de 15 ml que contenían 5 ml de una solución de CTAB 2X cuidando que se conservara dentro de la solución. Las muestras se mantuvieron en un ambiente fresco hasta su traslado al laboratorio en donde se procedió a retirarles la cutícula y la mayor parte de la corteza de tejido vegetal. El tejido se almacenó a -20°C hasta la extracción de ADN.

### **Clases de tamaño e individuos en etapa reproductiva**

Se registró el diámetro y el tamaño de cada una de las plantas muestreadas. La altura se tomó de la base a la corona de la planta utilizando una cinta métrica, con la misma cinta se midió el diámetro en la parte más ancha de la planta. Se empleó el volumen como una medida total del tamaño de la planta. Debido a la forma que presenta *F. histrix*, se utilizaron los datos de altura y diámetro para calcular el volumen de un cilindro. Los tamaños en volúmenes se convirtieron a datos categóricos. Las plantas se clasificaron en clases de tamaño considerando el logaritmo natural ( $\ln$ ) de cada volumen. El número de clases se calculó utilizando la fórmula de Sturges. Durante el periodo reproductivo, se registró la presencia y el número de botones florales en cada una de las plantas colectadas.

### **Extracción de ADN**

Se evaluaron tres protocolos de extracción para plantas mucilaginosas (Anexo 1). El primero es un micrométodo basado en el uso de bromuro de cetil metil amonio (CTAB) y dodecil sulfato de sodio (SDS) (Keb-Llanes y cols. 2002). El segundo es un micrométodo que utiliza solamente CTAB como detergente (Cota-Sánchez y cols., 2006). Por último, un método similar al micrométodo de Cota-Sánchez y cols. (2006), que emplea volúmenes mayores (Griffith y Porter, 2003). En todos los protocolos de extracción de ADN se utilizaron de 400 a 500 mg de tejido, el cual fue congelado con nitrógeno líquido y pulverizado en un mortero. Al final, se cuantificó la cantidad total de ADN por espectrofotometría. Se determinó la calidad de ADN por la relación  $A_{1260}/A_{230}$  y por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % teñidos con bromuro de etidio.

Se obtuvo el ADN de las 134 muestras de *F. histrix* con el método de Cota-Sánchez y cols. (2006). El ADN de cada muestra se diluyó con agua grado molecular (Milli-Q) a una concentración de 25 ng/ $\mu$ l y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

## **Marcadores Moleculares**

### ***ISTR***

Se evaluaron los patrones de amplificación de 28 combinaciones de iniciadores producidos por 4 iniciadores de avance (F) (F1, F4, F9 y F21) y 7 iniciadores en reversa (B) (B1, B6, B8, B10, B71, B81 y B101). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 18  $\mu$ l, las condiciones de la mezcla de reacción se especifican en el Cuadro 2 del Anexo 2. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (MJ Research, Inc.) y el programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial de 95°C por 3 min, seguida por 40 ciclos de tres pasos: una desnaturalización a 95°C por 30 s, una alineación a 45°C por 1 min, y una extensión a 72°C por 2 min. La amplificación fue terminada con una extensión a 72°C por 10 min.

Los marcadores se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de acrilamida (6%)-urea (7M) (Anexo 3) con un buffer de corrimiento TBE 1X a 220 V durante aproximadamente 5 horas. Los geles se tiñeron con nitrato de plata (Anexo 3) y se digitalizaron con una cámara fotográfica. Con base a la calidad de los patrones de amplificación, se seleccionaron las combinaciones F1/B1 y F1/B10 para amplificar el total de las muestras de ADN de *F. histrix*. Con el fin de probar la reproducibilidad de los marcadores, se realizaron amplificaciones por duplicado de 10 muestras con las dos combinaciones de iniciadores seleccionadas.

### ***ISSR***

Se obtuvieron los patrones de amplificación por PCR de 32 iniciadores ISSRs. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ l. Las condiciones de las reacciones de amplificación se especifican en el Cuadro 3 del Anexo 2. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (MJ Research, Inc.) y el programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, seguida por 40 ciclos de tres pasos: un paso de desnaturalización a 95°C por 45 s, seguido por el de alineación a una temperatura específica para cada primer por 45 s y finalmente el paso de extensión a 72°C por 2 min. La amplificación fue terminada con una extensión a 72°C por 10 min.

Con base a los patrones de amplificación (número e intensidad de los marcadores ISSRs) se seleccionaron los iniciadores 857 y 841 para amplificar el genoma de todas las muestras de *F. histrix*.

Los marcadores se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de acrilamida (6%)-urea (3M) (Anexo 3) con amortiguador de corrimiento TBE IX se aplicaron 220 V durante aproximadamente 5 horas. Los geles se tiñeron con nitrato de plata (Anexo 3) y se digitalizaron con una cámara fotográfica. Con el fin de probar la reproducibilidad de los patrones de amplificación de los iniciadores seleccionados, se realizaron PCRs por duplicado de 10 muestras seleccionadas aleatoriamente.

### **Registro y análisis de datos**

Para el análisis, se seleccionaron las bandas con base en la intensidad, separación y reproducibilidad. Cada banda se considera un *locus*. No se consideraron *loci* con una intensidad débil, o que presentaran problemas de resolución y/o reproducción. Dada la característica dominante de los ISSRs y los ISTRs, el registro se realizó como presencia o ausencia de cada marcador. Los geles se analizaron visualmente por dos personas. Para facilitar el análisis se empleó una fuente de luz visible y el apoyo del sistema de fotodocumentación Kodak 1D versión 3.5. Se determinó el tamaño de cada *locus* con base al tamaño de los fragmentos generados por el marcador de 100 pb. Se generaron matrices binarias por iniciador, en las que la presencia se representó con el número 1 y la ausencia con el 0. Las matrices se analizaron y se estimaron los siguientes índices de diversidad genética: Porcentaje de *loci* polimórficos (P), Índice de Shannon (I) y Heterocigocidad esperada (He). Un *locus* se considera polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común es menor a 0.95 (Allendorf y Luikart, 2007).

Debido a la dominancia de los marcadores, las frecuencias alélicas utilizadas en el cálculo de He, se obtienen de manera indirecta a partir de la frecuencia de los homocigotos recesivos ( $q^2$ ), bajo el supuesto de que la población se encuentra bajo el equilibrio Hardy-Weinberg (H-W). El índice de Shannon evita este sesgo debido a que



no asume equilibrio H-W, sino que estima la frecuencia fenotípica de las bandas (ausencia/presencia) generando una aproximación de la diversidad genética.

El índice de heterocigocidad esperada ( $H_e$ ) (Nei, 1978) considera la frecuencia esperada de heterocigotos con base en la estimación las frecuencias alélicas. Para marcadores dominantes, Lynch y Milligan (1994) generaron una corrección de este parámetro, en el cual incorporan la varianza de muestreo de la frecuencia de homocigotos nulos al momento de calcular las frecuencias alélicas. Para evaluar la diferenciación genética entre clases de tamaño, se estimó el valor de  $F_{ST}$  de Wright (1951) y el valor de  $F_{ST}$  de Weir y Cockerham (1984) también conocido como  $\theta$ .

Los valores de  $P$ ,  $I$  y  $F_{ST}$  se estimaron con el programa POPGEN (Yeh y Boyle, 1997). Para disminuir el sesgo generado por la frecuencia de los homocigotos nulos,  $H_e$  se estimó con el programa TPGA (Miller, 2000) que aplica la corrección de Lynch y Milligan (1994); el valor de  $\theta$  se calculó con este último programa. Todos los índices se calcularon en la población total, por clase de tamaño y por estado reproductivo (no reproductivo ó reproductivo). Con el fin conocer si los niveles de variación genética observados en las clases de tamaño son significativamente diferentes, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ( $H$ ).

## RESULTADOS

### Clases de tamaño e individuos en etapa reproductiva

Se establecieron seis clases de tamaño en la población de *Ferocactus histrix* de El Rayo, Zac. El intervalo del ln del volumen entre las clases fue de 1. El número de individuos varió entre las clases de tamaño y se observaron menos individuos en las clases I y VI (Cuadro 4).

De los 134 individuos muestreados, 48 se encontraban en etapa reproductiva. A partir de la clase III se observan individuos reproductivos (Cuadro 4). La frecuencia de reproductivos se incrementó en las clases de mayor tamaño, la mayor frecuencia se observó en la clase V.

**Cuadro 4. Clases de tamaño e individuos reproductivos por clase de *Ferocactus histrix* en la población de El Rayo, Zacatecas.**

Clase	N	ln del volumen	Frecuencia de reproductivos (%)
I	8	5.53-6.53	0
II	20	6.54-7.53	0
III	28	7.54-8.53	3.6
IV	37	8.54-9.53	56.6
V	26	9.54-10.53	65.4
VI	15	10.54-11.53	60

N= Número de individuos      ln= Logaritmo natural

### Extracción de ADN

La comparación de los métodos de extracción de ADN en *F. histrix* mostró que el protocolo de Griffith y Porter (2003) presenta la mayor eficiencia (Cuadro 5). Sin embargo, este protocolo fue descartado para la extracción del ADN del total de las muestras debido a que requiere una mayor cantidad de reactivos que los micrométodos.

Los micrométodos de extracción de Keb-Llanes y cols. (2002) y Cota-Sánchez y cols. (2006) fueron ligeramente modificados durante su estandarización (Apéndice 1). El método de Keb-Llanes y cols. (2002) produjo ADN de alta calidad en concentraciones bajas y el de Cota-Sánchez y cols. (2006) ADN de buena calidad (Fig. 1) en concentraciones moderadas (Cuadro 5).

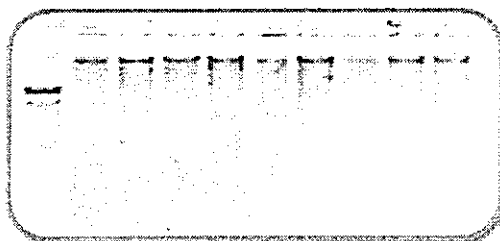


Figura 1. Cantidad de ADN de muestras de *Ferocactus histrix* obtenido con el protocolo de Cota-Sánchez *et al.* (2006) modificado.

Cuadro 5. Promedios de las eficiencias y relaciones  $A_{260}/A_{280}$  de los métodos utilizados en la extracción de ADN de *Ferocactus histrix*.

Protocolo	N	Eficiencia ( $\mu\text{g}$ )	Relación $A_{260}/A_{280}$
Cota-Sánchez <i>et al.</i> (2006)	29	6.2	1.77
Keb-Llanes y cols. (2002)	19	3.4	1.86
Griffith y Porter (2003)	17	11	1.76

N=Número de muestras

### Marcadores moleculares

Se generaron 67 bandas con los iniciadores ISTRs e ISSRs (Fig 5, Fig 6). Treinta y nueve bandas corresponden a marcadores ISTR, solamente 11 resultaron polimórficos. La combinación de iniciadores F1/B1 generó 12 bandas (3 polimórficas) y la combinación F1/B10, 27 bandas (8 polimórficas) (Cuadro 6). Los fragmentos amplificados con las combinaciones F1/B1 y F1/B10 presentaron un tamaño de 1300 a

190 pb y de 1140 a 170 pb, respectivamente. Los iniciadores ISSRs generaron 28 bandas, 16 de las cuales fueron polimórficas. El iniciador 841 produjo 16 marcadores (10 polimórficos) y el 857 generó 12 (6 polimórficos) (Cuadro 6). Los fragmentos amplificados con los iniciadores 841 y 857 presentaron un tamaño de 884 a 140 pb y de 1530 a 290 pb respectivamente (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Secuencias de los iniciadores, número y características de los marcadores ISTR e ISSR en *Ferocactus histrix*.**

Marcador	Iniciadores	Secuencia 5'-3'	No. de loci	Tamaño (pb)	Loci polimórficos
<b>ISTR</b>					
	F1/B1	F1=GCACTCCACCAAGAATACC B1=ATCAGGAAGGTCTGTAAAGC	12	190-1300	3
	F1/B10	F1=GCACTCCACCAAGAATACC B10=ACTGACCCTTTTGAAGACAC	27	170-1140	8
	<b>Total</b>		<b>39</b>		<b>11</b>
<b>ISSR</b>					
	841	(GA) <sub>8</sub> YC	16	140-884	10
	857	(AC) <sub>8</sub> YG	12	290-1530	6
	<b>Total</b>		<b>28</b>		<b>16</b>

Y= C ó T

El porcentaje de loci polimórficos (P) para toda la población con ambos marcadores fue de 40.3%. Los ISSRs fueron más polimórficos que los ISTR. Su valor es de P=57.14% (Cuadro 7). El valor de heterocigocidad esperada (He) en la población fue 0.120 (ambos programas produjeron el mismo resultado). El estimado de He con los marcadores ISSR fue mayor (He=0.181) que el de los marcadores ISTR (Cuadro 7). El estimado poblacional del índice de Shannon (I) fue de 0.184. Los marcadores ISSR produjeron un valor mayor de I (I=0.272) que el de los marcadores ISTR (Cuadro 7).

**Cuadro 7. Índices de diversidad y diferenciación genética de *Ferocactus histrix* estimados por marcador molecular y con ambos marcadores.**

Marcador	P (%)	He	I	F <sub>ST</sub>	θ
ISTRs	28.21	0.077	0.121	0.039	0.020
ISSRs	57.14	0.181	0.272	0.039	0.012
ISSRs e	40.3	0.120	0.184	0.039	0.016
ISTRs					

P= Polimorfismo promedio He=Heterocigocidad esperada I=Índice de Shannon

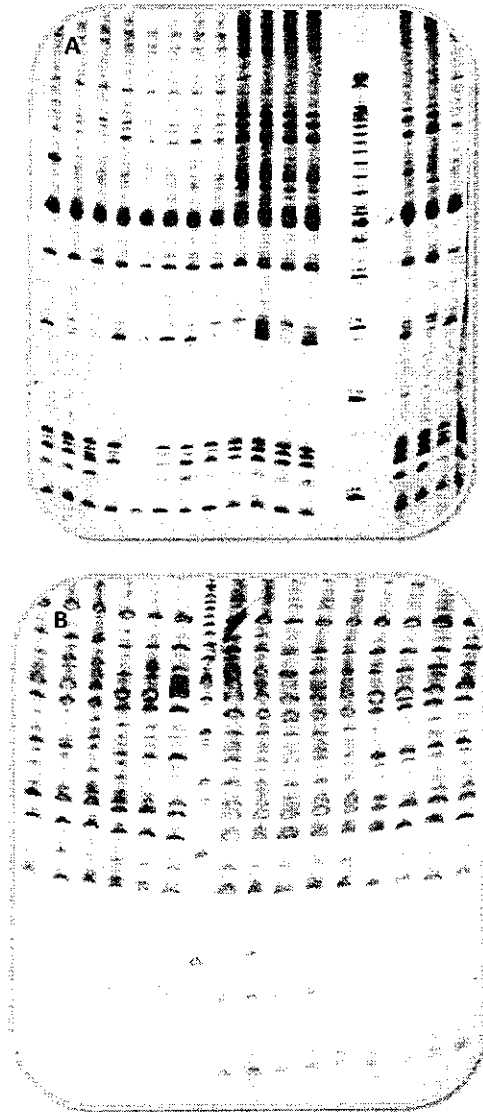


Figura 5. Marcadores ISTRs en *Ferocactus histrix*. A. Iniciadores F1/B1. B. Iniciadores F1/B10.

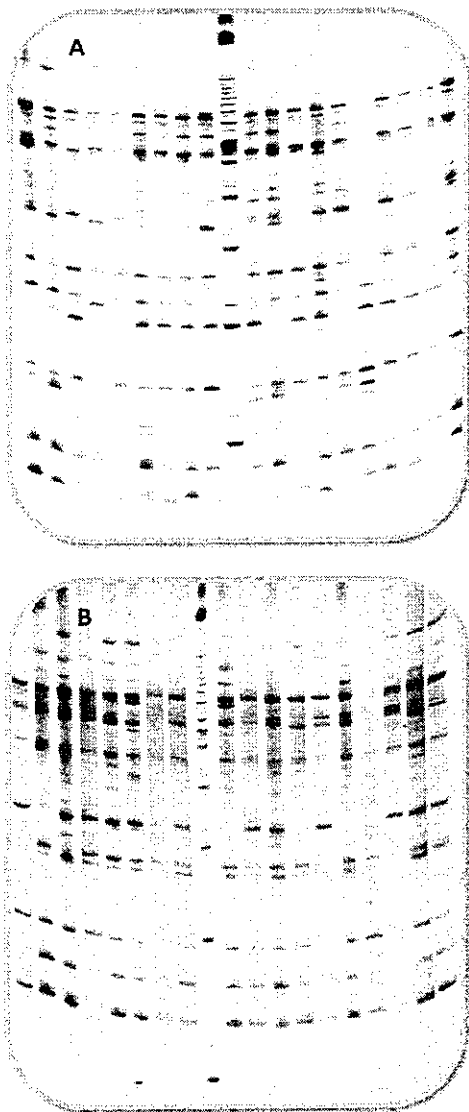


Figura 6. Marcadores ISSRs en *Ferocactus histrix*. A) Iniciador 841. B) Iniciador 857.

Las diferencias observadas entre las clases de tamaño, no son estadísticamente significativas ( $H=2.805$ ,  $p=0.73$ ) (Cuadro 8). Se obtuvieron valores bajos de diferenciación genética ( $F_{ST}=0.039$  y  $\theta=0.016$ ) entre clases de tamaño, lo que indica que la población no se encuentra genéticamente diferenciada o estructurada.

**Cuadro 8. Índices de diversidad genética estimados con marcadores ISTRs e ISTRs por cada clase de tamaño de *Ferocactus histrix*.**

Clase	N	ISTR		ISSR		ISTRs e ISTRSs	
		I	He	I	He	I	He
I	8	0.092	0.063	0.210	0.153	0.142	0.100
II	20	0.110	0.070	0.227	0.155	0.159	0.106
III	28	0.089	0.057	0.260	0.182	0.161	0.107
IV	37	0.117	0.077	0.246	0.169	0.171	0.114
V	26	0.126	0.083	0.266	0.183	0.185	0.126
VI	15	0.114	0.077	0.286	0.210	0.186	0.128

N= Número de individuos I= Índice de Shannon He=Heterocigicidad esperada

Los análisis mostraron que no existen diferencias genéticas entre los individuos reproductivos y los no reproductivos. El valor de  $F_{ST}$  fue de 0.0127 y el de  $\theta$  de 0.0134. Los índices de diversidad genética fueron muy similares entre sí. Los individuos reproductivos mostraron valores de  $P=40.3$ ,  $I=0.19$  y  $He=0.12$ ; mientras que los valores de los individuos no reproductivos fueron de  $P=35.8$ ,  $I=0.17$  y  $He=0.11$ .

En el Cuadro 10, se muestran los *loci* polimórficos observados en *F. histrix* por clase de tamaño. Para cada locus se registran tanto I como He. Se observa la fijación de los alelos F1/B10-700 a partir de la clase III, y de los alelos 857-370 y 857-360 a partir de las clases II y V respectivamente. Los alelos F1/B1-900, 857-365, 841-175 y 841-167 aparecen fijos solamente en la clase I.

**Cuadro 10. Índices de diversidad genética por clase de los loci ISTR e ISSR polimórficos y fijación de alelos (en negritas) en *Ferocactus histrix*.**

Marcador	Clase I		Clase II		Clase III		Clase IV		Clase V		Clase VI	
	I	He	I	He	I	He	I	He	I	He	I	He
F1B1-900	0.000	0.000	0.393	0.235	0.213	0.105	0.415	0.250	0.372	0.217	0.337	0.192
F1B1-680	0.000	0.000	0.531	0.388	0.000	0.000	0.000	0.000	0.495	0.353	0.000	0.000
F1B1-380	0.604	0.431	0.633	0.449	0.644	0.457	0.692	0.505	0.692	0.509	0.624	0.442
F1B10-750	0.693	0.532	0.667	0.492	0.632	0.456	0.633	0.453	0.685	0.504	0.656	0.490
F1B10-715	0.693	0.532	0.633	0.449	0.592	0.407	0.642	0.454	0.664	0.478	0.692	0.515
<b>F1B10-700</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.446</b>	<b>0.308</b>	<b>0.590</b>	<b>0.423</b>	<b>0.571</b>	<b>0.428</b>
F1B10-620	0.239	0.125	0.274	0.145	0.090	0.035	0.290	0.156	0.225	0.113	0.337	0.192
F1B10-390	0.513	0.343	0.274	0.145	0.264	0.138	0.324	0.180	0.095	0.038	0.411	0.250
F1B10-380	0.239	0.125	0.274	0.145	0.465	0.293	0.468	0.294	0.521	0.342	0.337	0.192
F1B10-365	0.239	0.125	0.274	0.145	0.090	0.035	0.214	0.108	0.225	0.113	0.337	0.192
F1B10-210	0.393	0.240	0.337	0.191	0.497	0.321	0.442	0.273	0.372	0.217	0.148	0.066
857-770	0.513	0.343	0.337	0.191	0.264	0.138	0.290	0.156	0.372	0.217	0.476	0.305
857-675	0.667	0.498	0.533	0.354	0.393	0.234	0.558	0.374	0.521	0.342	0.476	0.305
857-415	0.649	0.510	0.624	0.457	0.632	0.456	0.674	0.490	0.590	0.423	0.571	0.428
<b>857-370</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.580</b>	<b>0.413</b>	<b>0.446</b>	<b>0.308</b>	<b>0.645</b>	<b>0.470</b>	<b>0.571</b>	<b>0.428</b>
857-365	0.000	0.000	0.202	0.098	0.213	0.105	0.125	0.053	0.414	0.250	0.411	0.250
<b>857-360</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.656</b>	<b>0.490</b>
841-750	0.393	0.240	0.393	0.235	0.509	0.331	0.537	0.355	0.521	0.342	0.533	0.356
841-444	0.667	0.498	0.657	0.473	0.693	0.508	0.684	0.499	0.684	0.499	0.687	0.514
841-375	0.393	0.240	0.460	0.290	0.441	0.273	0.301	0.164	0.521	0.342	0.411	0.250
841-327	0.649	0.510	0.531	0.388	0.585	0.418	0.542	0.377	0.495	0.353	0.571	0.428
841-300	0.693	0.532	0.676	0.492	0.669	0.483	0.693	0.506	0.692	0.508	0.692	0.515
841-240	0.000	0.000	0.000	0.000	0.219	0.108	0.072	0.027	0.000	0.000	0.000	0.000
841-175	0.000	0.000	0.630	0.463	0.585	0.418	0.542	0.377	0.590	0.423	0.656	0.490
841-170	0.604	0.431	0.667	0.492	0.691	0.508	0.666	0.478	0.692	0.509	0.687	0.514
841-167	0.000	0.000	0.118	0.050	0.219	0.108	0.128	0.055	0.165	0.076	0.148	0.066
841-140	0.667	0.498	0.533	0.354	0.654	0.468	0.642	0.454	0.551	0.369	0.476	0.205
<b>Total</b>	<b>0.142</b>	<b>0.100</b>	<b>0.159</b>	<b>0.106</b>	<b>0.161</b>	<b>0.107</b>	<b>0.171</b>	<b>0.114</b>	<b>0.185</b>	<b>0.126</b>	<b>0.186</b>	<b>0.128</b>

I= Índice de Shannon He= Heterocigosidad esperada



## DISCUSIÓN

---

### Clases de tamaño e individuos en etapa reproductiva

Analizar la estructura de edades en una población puede ser clave para entender los mecanismos que mantienen la diversidad genética durante el desarrollo individual y la evolución de las poblaciones. Aún de mayor importancia es estudiar esta estructura en especies endémicas, raras o con cierto grado de amenaza, ya que esta información puede dar la pauta para comprender los cambios en los niveles de variación genética. En poblaciones pequeñas y aisladas de estas especies, el balance normal entre la endogamia y la exogamia puede perturbarse debido a cambios en la estructura demográfica, a un incremento en la autopolinización o a cruces entre individuos emparentados, especialmente en años caracterizados por condiciones climáticas adversas (Korshikov y Mudrik, 2006).

Debido a que el crecimiento en altura de algunas cactáceas es indefinido, la altura de la planta está relacionada con la edad; por lo que, generalmente se utiliza la altura como referencia para estimar la estructura de edades de una población (McIntosh, 2002). En el caso de *Ferocactus histrix*, se observó que un porcentaje importante de la población presenta un mayor crecimiento en altura que en diámetro, por lo que se seleccionó el volumen de un cilindro como la medida más adecuada para representar la edad de la planta. Debido a que en las cactáceas globosas la biomasa se encuentra sobre el suelo, McIntosh (2002) utiliza el volumen para determinar la estructura de edad en dos especies de *Ferocactus* (*F. cylindraceus* y *F. wislizeni*). El que los individuos reproductivos de la población de *F. histrix* estudiada se encuentren en las últimas tres clases de tamaño, muestra que el volumen de la planta es un buen indicador de la edad.

## Extracción de ADN

A pesar de que se han publicado varios protocolos para extraer ADN de plantas mucilaginosas (Cota y cols., 2006; Griffith, 2003; Keb-Llanes y cols., 2002; Mondragon y cols., 2000; de la Cruz, 1997), en cactáceas es particularmente difícil obtener ADN de buena calidad en concentraciones altas. Las cactáceas contienen una gran cantidad de mucilago (polisacáridos complejos) que en contacto con el agua forman una solución viscosa que atrapa y dificulta el manejo del ADN durante el proceso de extracción. Algunos de los protocolos reportados requieren de mililitros de reactivos (Griffith, 2003; Mondragon y cols., 2000; de la Cruz, 1997), y generalmente de gramos de tejido (Mondragon y cols., 2000; de la Cruz, 1997).

Los métodos documentados para extraer ADN de plantas mucilaginosas (Cota y cols., 2006; Griffith, 2003; Keb-Llanes y cols., 2002; Mondragon y cols., 2000; de la Cruz, 1997) reportan diferencias entre las especies estudiadas. Estas diferencias resultan de la edad de los individuos y de la concentración de mucilago de cada especie (Mondragon y cols., 2000). Se han reportado diferencias en la concentración de mucilago de varias especies de cactáceas (Nobel y cols., 1992). Sin embargo se desconoce el contenido de estos compuestos en *F. histrix*.

Debido al tamaño que presentan las plantas pequeñas de *F. histrix*, para la realización de este trabajo era fundamental contar con un protocolo de extracción que produjera ADN de buena calidad a partir de miligramos de tejido. Los tres métodos de extracción utilizados comparten la característica de emplear cantidades mínimas de tejido. El protocolo de Griffith (2003) produjo los mejores resultados ( $cc=11\mu g$ ,  $A_{260}/A_{230}=1.76$ ). Sin embargo, el protocolo de Cota-Sánchez y cols. (2006), con las modificaciones realizadas, produjo suficiente ADN ( $6.2\mu g$ ) con una calidad similar al de Griffith (1.77) con la ventaja de ser un micrométodo. El protocolo de Keb-Llanes y cols. (2002), con las modificaciones señaladas, produjo el ADN de mayor calidad (1.82) pero a concentraciones bajas ( $3.4\mu g$ ).

## Marcadores moleculares

Los marcadores dominantes, como los ISTRs y los ISSRs entre otros (AFLPs, RAPDs), son de especial utilidad en estudios de genética de poblaciones por su naturaleza hipervariable y la gran cantidad de *loci* que pueden ser examinados (Culley, SA). Debido a que las técnicas de ISSR e ISTR se basan en PCR, utilizan poca cantidad de ADN (Lynch y Milligan, 1994). Particularmente, cuando se estudian poblaciones pequeñas o con cierto grado de amenaza, como es el caso de la población estudiada de *F. histrix*, es importante coleccionar la menor cantidad de tejido posible para la extracción de ADN, con el fin de causar el menor daño en los individuos de la población.

De acuerdo a los resultados de este estudio, los marcadores ISSR fueron más informativos que los ISTRs en el análisis de la diversidad genética de *F. histrix*. El número de *loci* ISTR amplificadas (39) fue considerablemente mayor que el de los ISSR (28). Esto contrasta con lo señalado en otras publicaciones que reportan niveles de altos de polimorfismo de los ISTR comparables con los revelados por AFLPs (Infante *et al.*, 2006; Osorio Zambrano *et al.*, 2006; Torres-Morán *et al.*, 2008). En la población de *F. histrix* de El Rayo, Zac. el porcentaje de ISTRs polimórficos fue bajo (28.2%), este resultado es similar al obtenido por Aga y Bryngelsson (2006) en poblaciones silvestres de *Coffea arabica* (P=25%). Los ISSRs mostraron una mayor cantidad de *loci* polimórficos (57%) que los ISTRs.

Se observaron diferencias en los estimados de I y He de ambos marcadores. Los valores fueron más altos con ISSRs (I=0.27, He=0.18) que con ISTRs (I=0.12, He=0.08). A pesar de que el programa TFPGA realiza la corrección de Lynch y Milligan (1994) recomendada para marcadores dominantes los valores de He obtenidos con este programa (He=0.120) y con Popgen (He=0.119) fueron similares.

### Variación, estructura genética y conservación

En este estudio la población de *F. histrix* de El Rayo, Zac. mostró niveles bajos de heterocigocidad con marcadores ISTR ( $I=0.121$ ,  $He=0.077$ ), y moderados con ISSR ( $I=0.272$ ,  $He=0.181$ ). El enfoque tradicional para estimar la diversidad genética utilizando marcadores dominantes, tiende a estar notablemente sesgado (Lynch y Milligan 1994; Zhivotovsky 1999). Sin embargo, Krauss (2000) demostró que se pueden obtener estimaciones de los parámetros genéticos más precisas con marcadores dominantes, utilizando un mayor número de *loci* polimórficos. El número de *loci* polimórficos aumenta a 27 cuando el análisis de la población de *F. histrix* se lleva cabo con ambos tipos de marcadores, los resultados muestran valores de  $P=40.3\%$ ,  $I=0.184$  y  $He=0.120$  (Cuadro 7).

El nivel de variación genética es uno de los criterios recomendados por la NOM-059-SEMARNAT-2010 para evaluar la vulnerabilidad biológica de una especie. De acuerdo a esta norma valores de  $He \leq 0.10$  se consideran niveles bajos de variación genética. Sin embargo, esta medida se estimó con base en estudios realizados con isoenzimas: marcadores que presentan menos polimorfismo que los ISSRs e ISTRs. La norma recomienda que para evaluar el nivel de variación genética con datos generados con otros marcadores moleculares (dominantes), se utilicen estimados comparables en *taxa* cercanos.

Los parámetros de variación genética observados en *F. histrix* se encuentran por debajo de los niveles reportados para otras cactáceas (Cuadro 1). A pesar del alto número de cactáceas (276 especies) que se encuentran con algún grado de amenaza en la NOM-059-SEMARNAT-2010, en muy pocas especies se han realizado estudios de diversidad genética y la mayoría corresponden a especies columnares (Cuadro 1).

La población de *F. histrix* presenta niveles de variación genética dentro del rango reportado para especies del género *Melocactus* (*M. glaucescens*,  $He=0.09$ ; *M. curvispinus*,  $He=0.14$ ). Las especies de este género son cactáceas globosas, con condiciones de crecimiento similares a las de *F. histrix*, pero que a diferencia de ésta, pueden reproducirse sexual y vegetativamente. Los bajos niveles de diversidad genética

reportados en especies de *Melocactus* y aquellos observados en la población de *F. histrix* pueden estar asociados al hecho de que las poblaciones estudiadas se encuentran en áreas perturbadas, generalmente cerca de carreteras o en zonas agrícolas (del Castillo y Trujillo, 1991; Nassar y cols., 2001; Lambert y cols., 2006a, b).

El establecimiento y la germinación de las semillas de *F. histrix* requiere de microhábitats restringidos (del Castillo, 1986). Esto explica la fragmentación y la distribución disjunta de las poblaciones (del Castillo, 1983; Godínez y cols., 2003). Las plantas de *F. histrix* se desarrollan en un hábitat no apto para la agricultura, el suelo es rocoso, con una capa de suelo delgada o ausente y el clima es extremo. Los pobladores utilizan el territorio con fines pecuarios; particularmente, lo destinan al pastoreo de cabras y borregos (Huerta-Martínez y Escobar Santos, 1998). Lo anterior representa implicaciones dañinas para la especie, ya que, aún si la semilla logra establecerse, el sobrepastoreo impedirá su germinación. Además, las plantas de *F. histrix* son afectadas por su extracción para la elaboración del dulce de biznaga, su comercialización como planta de ornato, y su empleo como fuente de agua y alimento para el ganado. Todos estos aspectos aunados, explican la disminución de tamaño que presentan las poblaciones de *F. histrix* (del Castillo, 1983; Huerta-Martínez y Escobar Santos, 1998).

En los estudios de genética de la conservación el número total de individuos de la población ( $N$ ) no es en sí de mayor relevancia. Esto se debe a que el tamaño de la población reproductiva no equivale al tamaño total de la población. Un parámetro más útil es el tamaño efectivo de la población ( $N_e$ ). Éste representa el tamaño de una población ideal, en la que todos los individuos contribuyen de igual manera al acervo genético y presentan la misma variación en frecuencias alélicas y niveles de endogamia que la población observada (Barret y Kohn, 1991).

Es frecuente que el tamaño efectivo de una población, se encuentre disminuido por factores tales como: desviaciones en la relación de sexos, traslape de generaciones, variación en la producción de progenie y fluctuaciones en el tamaño de la población. Poblaciones que continuamente presentan  $N_e$  pequeño, serán más susceptibles a la pérdida y reorganización de la variación genética por deriva génica. Sin embargo, cualquier población que experimente fluctuaciones ocasionales que disminuyan su

tamaño, puede sufrir la pérdida de variación genética al azar. Dichas fluctuaciones pueden consistir en cuellos de botella o efecto fundador (Ellstrand y Ellam, 1993).

Los resultados del análisis de variación genética de la población de *F. histrix* subdividida en clases de tamaño, muestran una disminución progresiva en los niveles de variación genética (Cuadro 8); las clases de menor tamaño presentan los niveles más bajos. El análisis de las frecuencias alélicas de todos los marcadores por clases de tamaño mostró la fijación de al menos 3 alelos en las clases más pequeñas. Estos resultados pueden explicarse como efecto de la endogamia y la deriva génica.

Es conocido que la deriva génica (azar) y la endogamia son las principales consecuencias de la disminución en el tamaño poblacional (Ellstrand y Elam, 1993; Frankham y cols., 2002). Ambos aspectos afectan a la variación genética (pérdida de heterocigocidad y fijación de alelos). Además, la endogamia puede conducir a una reducción en la adecuación (Frankham y cols., 2001). La fijación de alelos apoya la hipótesis de que la población de *F. histrix* sufrió uno o varios cuellos de botella, ya que los cuellos de botella más que una reducción en los niveles de variación genética, favorecen la pérdida de alelos (Barret y Kohn, 1991).

La población de *F. histrix* no presentó una estructura genética por clases de tamaño; los valores de  $F_{ST}$  y  $\theta$  son muy bajos. Además, el análisis de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas entre los niveles de variación genética de las clases de tamaño. Sin embargo, la población podría estar en un proceso de estructuración ya que los niveles de diferenciación fueron más altos entre las clases de tamaño I y VI.

En cuanto a las diferencias entre individuos en estado reproductivo y no reproductivo, los análisis mostraron que no existen diferencias entre ambos grupos. Esto indica que probablemente no hay alelos que presenten presión selectiva, lo que concuerda con lo mencionado por Frankham y cols. (2002), quienes afirman que en una población pequeña, predominan las variaciones debidas azar, y por el contrario, los efectos de la selección natural disminuyen.

La densidad de las poblaciones perturbadas de *F. histrix* ha disminuido hasta en un tercio comparada con las poblaciones más conservadas (del Castillo, 1987). La

especie aparece en la NOM-059-SEMARNAT-2010 en la categoría de protección especial (Pr) y en el apéndice II de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES de sus siglas en inglés). Las actividades antropogénicas, además de las características biológicas de la especie: exclusivamente reproducción sexual, establecimiento y germinación en microhabitat, crecimiento lento y nodrizaje; disminuyen las posibilidades de recuperación de la especie (del Castillo y Trujillo, 1991).

El manejo genético en poblaciones silvestres implica, entre otros aspectos, el incremento en el tamaño de la población y la recuperación de poblaciones pequeñas endogámicas. Para incrementar el tamaño de la población estudiada de *F. histrix*, sería necesario proteger la zona del ganado caprino, además de generar estrategias de conservación comunitaria para que la población beneficiada con esta cactácea controle su explotación.

Para implementar un plan de manejo *in situ* de la población de *F. histrix* de El Rayo, Zac., se recomienda seleccionar germoplasma de individuos de las clases V y VI, ya que fueron las clases que presentaron los niveles de variación genética más altos. Se aconseja seguir esta estrategia cuando el hábitat de una especie, como la localidad de El Rayo, Zacatecas en *F. histrix*, se encuentra en peligro (Barret y Kohn, 1991). De esta manera, las semillas pueden emplearse para la recuperación de la población y para el establecimiento de nuevas poblaciones.

El establecimiento de un programa adecuado de manejo y conservación de *F. histrix*, requiere de conocer los niveles de variación y diferenciación genética de otras poblaciones de la especie. Si las poblaciones de *F. histrix* muestran diferenciación en características adaptativas a diferentes hábitats, o una diferenciación genética significativa; entonces deberán manejarse como linajes evolutivos diferentes. Estas poblaciones son conocidas como unidades evolutivamente significativas (ESU por sus siglas en inglés) y deberán manejarse por separado (Frankham y cols.; 2002).

Es inevitable el uso de *F. histrix* por el hombre. Sin embargo, estrategias como el mantenimiento de material genético en bancos de germoplasma, la creación de reservas

protegidas, además del manejo sustentable y el restablecimiento de poblaciones altamente perturbadas, pueden conducir gradualmente a la recuperación de esta especie.



## CONCLUSIONES

---

Con el método de extracción de ADN de Cota-Sánchez y cols. (2006) se obtuvo ADN de *Ferocactus histrix* de buena calidad y en cantidades considerables.

Los marcadores ISSR presentaron un mayor número de *loci* polimórficos que los marcadores ISTR.

La población de *F. histrix* de El Rayo, Zacatecas presentó niveles de variación genética bajos, en relación a lo reportado en otras cactáceas.

A pesar de que el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre las clases de tamaño, se observa una disminución progresiva en los niveles de variación genética. La clase de mayor tamaño presentó los niveles de variación más altos y la de menor tamaño los más bajos.

No se encontró una estructura genética por clases de tamaño en la población de *F. histrix* de El Rayo, Zacatecas. No se observaron diferencias genéticas entre las plantas reproductivas y las no reproductivas.

Es necesario analizar los niveles de variación y diferenciación genética de otras poblaciones de *F. histrix* para proponer un plan de manejo y conservación adecuado que favorezca el restablecimiento de la especie.

## REFERENCIAS

---

Aga, E. y T. Bryngelsson (2006). "Inverse sequence- tagged repeat (ISTR) analysis of genetic variability in fores coffee (*Coffea Arabica* L.) from Ethiopia", *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53, 721-728.

Allendorf, F. W. y G. Luikart (2007), *Conservation and the genetics of populations*, U.K., Blackwell Publishing.

Avise, J. C. (2004), *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. E. U. A., Sinauer Associates, Inc.

Barret, S. C. H. y J. R. Kohn (1991). "Genetic and evolutionary consequences of small population size", en D. A. Falk y K. E. Holsinger (comps.), *Genetics and Conservation of Rare Plants*, New York, Oxford University Press, pp. 3-30.

Beebee, T. y G. Rowe (2004), *An introduction to molecular ecology*. New York, M Oxford University Press.

Bornet, B., F. Goraguer. G. Joly y M. Branchard (2002), "Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs)", *Genome*, 45, 481-484.

Bravo-Holis, H. (1978), *Las Cactáceas de México*, Vol. 1, México, Universidad Nacional Autónoma de México.

Bravo-Holis, H. y R. Sánchez Mejorada (1991) *Las Cactáceas de México*, Vol. 2, México, Universidad Nacional Autónoma de México.

Cariaga, K. A., C. E. Lewis, J. Maschinski, S. J. Wright y J. Francisco-Ortega (2005), "Patterns of Genetic Diversity in the Critically Endangered Florida Key Endemic *Consolea corallicola* Small (Cactaceae): Evidence from Inter-Simple Sequence Repeat (ISSRs) DNA Polymorphisms", *Caribbean Journal of Science*, 41, 225-233.

Casas, A., J. Cruse-Sanders, E. Morales, A. Otero-Arnaiz y A. Valiente Banuet (2006). "Maintenance of phenotypic and genotypic diversity in managed populations of *Senecereis stellatus* (Cactaceae) by indigenous peoples in Central Mexico". *Biodiversity and Conservation*. 15, 879-898.

Clark-Tapia, R., C. Alfonso-Corrado, L. E. Eguiarte y F. Molina-Freaner (2005), "Clonal Diversity and Distribution in *Stenocereus erica* (Cactaceae), a narrow Endemic Cactus of the Sonoran Desert", *American Journal of Botany*, 92, 272-278.

CONABIO (2009), *Cactus y Biznagas (Cactaceae)*, en [www.biodiversidad.gob.mx](http://www.biodiversidad.gob.mx), accesado el 1º Mayo 2010.

Cota-Sánchez, J. H., K. Remrchuk y K. Ubayasena (2006), "Ready to use DNA extracted with CTAB method adapted for Herbarium specimens and mucilaginous plant tissue", *Plant Molecular Biology Reporter*, 24, 161-167.

Culley, T. M. (SA), "Population Genetic Analysis of ISSR data".

de la Cruz, M., Ramírez, F. y H. Hernández (1997), "DNA Isolation and Amplification from cacti", *Plant Molecular Biology Reporter*, 15, 319-325.

de Young, R. W. y R. L. Honeycutt (2005), "The Molecular Toolbox: Genetic Techniques in Wildlife Ecology and Management", *Journal of Wildlife Management*, 69, 1362-1384.

del Castillo, R. F. (1983), "*Ferocactus histrix*: distribución geográfica y hábitat", *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 28, 3-12.

del Castillo, R. F. (1986), "Semillas, germinación y establecimiento de *Ferocactus histrix*", *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 31, 5-11.

del Castillo, R. F. (1987), "Efectos del disturbio y la orientación de ladera en *Ferocactus histrix*", *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 32, 8-16.

del Castillo, R. F. (1988), "Fenología y Remoción de semillas en *Ferocactus histrix*", *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 33, 5-14.

del Castillo, R. F. (1994), "Polinización y otros aspectos de la biología floral de *Ferocactus histrix*", *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 34, 36-48.

del Castillo, R. F. y S. Trujillo (1991), "Ethnobotany of *Ferocactus histrix* and *Echinocactus platyacanthus* (Cactaceae) in the Semiarid Central Mexico: Past, Present and Future", *Economic Botany*, 45, 495-502.

Delgado, P., L. E. Eguiarte, F. Molina-Freaner, E. R. Alvarez-Buylla y D. Piñero (2008), "Using phylogenetic, genetic and demographic evidence for setting conservation priorities for Mexican rare pines", *Biodiversity Conservation*, 17, 121-137.

Eguiarte, L. E. y D. Piñero (1990), "Genética de la conservación: Leones vemos, genes no sabemos", *Ciencias*, Número especial 4, Ecología y conservación en México, 34 -47.

- Ellstrand, N. C. y D. R. Ellam (1993), "Population Genetic Consequences of Small Population Size: Implications for Plant Conservation", *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24, 217-242.
- Escobar Santos, V. E. y F. M. Huerta-Martínez (1999), "Relaciones Ecológicas de *Ferocactus histrix* (DC.) Lindsay en los Llanos de Ojuelos, Jalisco-Zacatecas", *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 44, 40-48.
- Escudero, A., J. M. Iriondo y M. E. Torres (2003), "Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation", *Biological Conservation*, 113, 351-365.
- Fleming, T. H., S. Maurice y J. L. Hamrick (1998), "Geographic variation in the breeding system and the evolutionary stability of trioecy in *Pachycereus pringlei* (Cactaceae)", *Evolutionary Ecology*, 12, 279-289.
- Frankham, R. (1996). "Relationship of Genetic Variation to Population Size in Wildlife", *Conservation Biology*, 10, 1500-1508.
- Frankham, R. (2003). "Genetics and conservation biology", *C. R. Biologies*, 326. S22-S29.
- Frankham, R., D. M. Gilligan, D. Morris y D. A. Briscoe (2001), "Inbreeding and extinction: Effects of purging", *Conservation Genetics*, 2, 279-285.
- Frankham, R., J. D. Ballou y D. A. Briscoe (2002), *Introduction to Conservation Genetics*, New York, Cambridge University Press.
- Frankel, O. H. (1974), "Genetic Conservation: Our Evolutionary Responsibility", *Genetics*, 78, 53-65.
- Gao, L., C. Wei, Q. Yang, D. Hong y S. Ge (2001), "Intra-Population genetic structure of *Oryza rufipogon* Griff. In Yunnan, China", *Journal of Plant Resources*, 114, 107-113.
- Godínez-Álvarez, H., T. Valverde y P. Ortega-Baés (2003), "Demographic trends in the Cactaceae", *The Botanical Reporter*, 69, 173-203.
- González, A., A. Wong, A. Delgado-Salinas, R. Papa y P. Gepts (2005), "Assessment of Inter Simple Sequence Repeat Markers to Differentiate Sympatric Wild and Domesticated Populations of Common Bean", *Crop Science*, 45, 606-615.
- González, A. y X. Aguirre (2007), "Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs)". en L. E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre (comps.), *Ecología Molecular*, México, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), Instituto de Ecología UNAM, pp. 567-571.

Griffith P.M. y J.M. Porter (2003), "Back to the basics: a simple method of DNA extraction for mucilaginous cacti", *Bradleya*, 21, 126-128.

Hernández, H. M. y H. Godínez A. (1994), "Contribución al Conocimiento de las Cactáceas Mexicanas Amenazadas", *Acta Botánica Mexicana*, 26, 33-52.

Huerta-Martínez, F. M. y V. E. Escobar Santos (1998), "Estatus ecológico actual de *Ferocactus histrix* (DC) Lindsay en los llanos de Ojuelos, Jalisco-Zacatecas", *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 43, 57-64.

Infante, D., S. Molina. J.R. Demey y E. Gamez (2006), "Asexual genetic variability in Agavaceae determined with inverse sequence-tagged repeats and amplification fragment length polymorphism analysis", *Plant Molecular Biology Reporter*, 24, 205-217.

Keb-Llanes, M., G. Gonzalez, B. Chi-Manzanero y D. Infante (2002), "A rapid and simple method for small scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants", *Plant Molecular Biology Reporter*, 20, 299a-299e.

Korshikov, I. I. y E. A. Mudrik (2006), "Age dynamics of genetic variation in an isolated population of chalk pine *Pinus sylvestris* var. *cretaceae* Kalenicz. Ex Kom. From Donbass", *Russian Journal of Genetics*, 42, 532-538.

Krauss, S. L. (2000), "Accurate gene diversity estimates from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers", *Molecular Ecology*, 9, 1241-1245.

Lambert, S. M., E. L. Borba y M. C. Machado (2006a) "Allozyme diversity and morphometrics of the endangered *Melocactus glaucescens* (Cactaceae), and investigation of the putative hybrid origin of *Melocactus x albicephalus* (*Melocactus ernestii* x *M. glaucescens*) in north-eastern Brazil", *Plant Species Biology*, 21, 93-108.

Lambert, S. M., E. L. Borba, M. C. Machado y S. C. da Silva Andrade (2006b), "Allozyme diversity and morphometrics of *Melocactus paucispinus* (Cactaceae) and Evidence for Hybridization with *M. concinnus* in the Chapada Diamantina, north-eastern Brazil", *Annals of Botany*, 97, 389-403.

Li, H., C.J. Ruan, da Silva, J. A. T. (2010), "Identification and genetic relationship based on ISSR analysis in a germplasm collection of sea buckthorn from China and other countries", *Scientia Horticulturae*, 123, 263-271.

Linhaer, Y. B., J. B. Mitton, K. B. Sturgeon y M. L. Davis (SA). "An analysis of genetic architecture in populations of ponderosa pine".

Lougheed, S.C., H. L. Gibbs, K. A. Prior y P. J. Weathehead (2000), "A comparison of RAPD versus Microsatellite DNA markers in population studies of the Massasauga Rattlesnake", *The American Genetic Association*, 91, 458-463.

- Lowe, A., S. Harris y P. Ashton (2008), *Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application*, U. K., Blackwell Publishing.
- Lynch, M. y B. G. Milligan (1994), "Analysis of population genetic structure with RAPD markers", *Molecular Ecology*, 3, 91-99.
- McIntosh, M. E. (2002), "Plant size, breeding system, and limits to reproductive success in two sister species of *Ferocactus* (Cactaceae)", *Plant Ecology*, 162, 273-288.
- Miller, M. P. (2000), *Tools for population genetics analysis (TFPGA). Ver 1.3*, Arizona, E. U. A., Northern Arizona University.
- Mondragon-Jacobo, C., N. Doudareva y B. P. Bordelon (2000), "DNA extraction from several cacti", *HortScience*, 35, 1124-1126.
- Moraes, E. M., A. G. Abreu, S. C.S. Andrade, F. M. Sene y V. N. Solferini (2005), "Population genetic structure of two columnar cacti with a patchy distribution in eastern Brazil", *Genetica*, 125, 311-323.
- Nassar, J. M., J. L. Hamrick y T. H. Fleming (2001), "Genetic variation and population structure of the mixed-mating cactus, *Melocactus curvispinus* (Cactaceae)", *Heredity*, 87, 69-79.
- Nassar, J. M., J. L. Hamrick y T. H. Fleming (2002), "Allozyme diversity and genetic structure of the leafy cactus (*Pereskia guamacho* [Cactaceae])" *Journal of Heredity*, 93, 193-200.
- Nei, M. (1978), "Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals", *Genetics*, 89, 583-590.
- Nobel, P. S., J. Cavellier y J. L. Andrade (1992), "Mucilage in Cacti: Its apoplastic capacitance, associated solutes, and influence on tissue water relations", *Journal of Experimental Botany*, 43, 641-648.
- Oostermeijer, J.G.B., S.H. Luitjen y J.C.M. den Nijs (2003), "Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation", *Biological Conservation*, 113, 389-398.
- Ortero-Arnaiz, A., A. Casas, J. L. Hamrick y J. Cruse-Sanders (2005), "Genetic variation and evolution of *Polaskia chichipe* (Cactaceae) under domestication in the Tehuacán Valley, central Mexico", *Molecular Ecology*, 14, 1603-1611.
- Osorio-Zambrano, M. A., D. Infante y S. Molina Moret (2006), "Estudio de la variabilidad genética asexual en *Agave cocui* Trelease mediante el uso de marcadores moleculares", *Boletín Nakari*, 17, 1-7.
- Parra, F., A. Casas, J. M. Peñalosa-Ramírez, A. C. Cortés-Palomec, V. Rocha-Ramírez y A. González-Rodríguez (2010), "Evolution under domestication: ongoing artificial

selection and divergence of wild and managed *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) populations in the Tehuacán Valley, Mexico”, *Annals of Botany*, 106, 483-496.

Pérez-Valencia, L. I., V. C. Rosas-Espinoza, F. M. Huerta-Martínez y A. Muñoz-Urías (2006), “Estado de conservación de una población de *Ferocactus histrix* en los llanos de Ojuelos, Zacatecas. México”, *Avances en la Investigación Científica en el CUCBA*, 532-537.

Primark, R. (1995), *A primer of Conservation Biology*. Arizona, E. U. A., Sinauer-Sunderland.

Rhode, W. (1996), “Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) analysis, a novel and universal PCR-based technique for genome analysis in the plant and animal kingdom”, *Journal of Genetics Breed*, 50, 249-261.

Scheinvar, L. (2004), *Flora Cactológica del Estado de Querétaro: Diversidad y Riqueza*, México, Fondo de cultura Económica.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2010), Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010-Protección Ambiental-Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres-Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Excusión o Cambio-Lista de especies en Riesgo. Diario Oficial de la Federación.

Semang, K., Å. Bjørnstad y M. N. Ndjiondjop (2006), “An overview of molecular marker methods for plants”, *African Journal of Biotechnology*, 5, 2540-2568.

Szczecinska, M., J. Sawicki, K. Wasowicz y C. Holdnski (2009), “Genetic variation of the relict and endangered population of *Chamaedaphne calyculata* (Ericaceae) in Poland”, *Dendrobiology*, 62, 23-33.

Takrouni, M. M. y M. Boussaid (2010), “Genetic diversity and population’s structure in Tunisian strawberry tree (*Arbutus unedo* L.)”, *Scientia Horticulturae*, 126, 330-337.

Tinoco, A., A. Casas, R. Luna y K. Oyama (2005), “Population genetics of *Escontria chiotilla* in wild and silvicultural managed populations in the Tehuacán Valley, Central Mexico”, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52, 525-538.

Torres-Morán, M. I., M. M. Morales-Rivera y A. Rodríguez-García (2006), “Identificación Molecular de tres géneros de Agave utilizando marcadores ISTR”, *Avances en la Investigación Científica en el CUCBA*, 199-200.

Torres-Morán, M. I., N. Almaraz-Abarca, A. P. Velasco-Ramírez, V. Hernández-Vargas, G. Orea-Lara, A. Cifuentes-Díaz de León y C. Oliver-Salvador (2008), “Taxonomic Significance of ISTR to discriminate species in Agavaceae”, *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 3, 661-665.

Weir, B. S. y C. C. Cockerham (1984), "F-Statistics for the Analysis of Population Structure", *Evolution*, 38, 1358-1370.

Wright, S. (1951), "The genetical structure of populations", *Annals of Eugenics*, 15, 323-354.

Yeh, F.C. y T. J. B. Boyle (1997), "Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits", *Belgian Journal of Botany*, 129, 157.

Zhivotovsky, L. A. (1999), "Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers", *Molecular Ecology*, 8, 907-913.

Zietkiewicz E., A. Rafalski y D. Labuda (1994), "Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification", *Genomics*, 20, 176-83.



# ANEXO I

---

## PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN DE ADN DE CACTÁCEAS

Cota-Sánchez y cols. (2006)

### *Reactivos:*

- Adobe Acrobat 7.0 Professional.Ink    Amortiguador CTAB 2X (Tris HCl 100mM pH8, EDTA 20mM, NaCl 1.4M, PVP40 1%)
- 2-β mercaptoetanol
- Cloroformo- alcohol isoamílico 24:1
- Isopropanol frío
- Amortiguador TE (Tris 10mM, EDTA 1mM pH 8)
- Acetato de Sodio (NaOAc) 3M pH 5.2
- Etanol al 70% y absoluto
- Nitrógeno líquido

### *Protocolo:*

1. Colocar el tejido vegetal en un mortero y pulverizar con ayuda de nitrógeno líquido.
2. Añadir 750 µl de amortiguador CTAB 2X y 3 µl de 2-β mercaptoetanol a un tubo eppendorf.
3. Agitar vigorosamente la solución y el tejido vegetal. Incubar a baño maría a 65°C por 1 h. mezclar cada 15 minutos.
4. Añadir 700 µl de cloroformo:isoamílico y agitar vigorosamente. Centrifugar a 8000 g por 45 minutos a 4°C. Transferir la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo.
5. Añadir 350 µl de isopropanol a -20°C y refrigerar a -20°C al menos una hora.
6. Centrifugar a 8000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Descartar el sobrenadante sin perder la pastilla.
7. Resuspender la pastilla en 400 µl de TE e incubar a 37°C por 15 min.

8. Añadir 34  $\mu$ l de NaOAc 3M y 1ml de etanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  al 95%. Enfriar a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora, centrifugar a 8000 g durante 5 minutos y descartar el sobrenadante.
9. Lavar la pastilla con 1 ml de etanol al 70%. Centrifugar por 5 minutos y dejar secar.
10. Resuspender la pastilla en 100  $\mu$ l de TE y almacenar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **Keb Llanes y cols. (2002)**

#### **Reactivos:**

- Amortiguador de extracción A: (CTAB 2X: Tris HCl 100mM pH8, EDTA 20mM, NaCl 1.4M, PVP40 4%, ácido ascórbico 0.1% y 2  $\beta$ -mercaptoetanol 10mM).
- Amortiguador de extracción B: (Tris-HCl 100mM pH 8, EDTA 50mM, NaCl 100mM , 2  $\beta$ -mercaptoetanol 10mM).
- Amortiguador TE: Tris 10mM, EDTA 1mM.
- SDS 20%.
- Acetato de potasio 5M ( $-20^{\circ}\text{C}$ ).
- Acetato de sodio 3M pH5.2.
- Etanol 70% ( $-20^{\circ}\text{C}$ ).
- Isopropanol absoluto ( $-20^{\circ}\text{C}$ ).
- Nitrógeno líquido

#### **Protocolo:**

1. Colocar el tejido vegetal en un mortero y pulverizar con ayuda de nitrógeno líquido. Transferir a un tubo eppendorf. Añadir 300  $\mu$ l de amortiguador A. 900  $\mu$ l de amortiguador B y 100  $\mu$ l de SDS.
2. Agitar e incubar en baño maría a  $65^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos.
3. Añadir 410  $\mu$ l de acetato de potasio frío, agitar vigorosamente. Centrifugar a 8000 g durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .
4. Transferir 1ml de sobrenadante a un tubo eppendorf limpio. Añadir 800-900  $\mu$ l de Isopropanol frío. Incubar a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 20 min.
5. Centrifugar a 6 000 g por 10 minutos. Descartar el sobrenadante, lavar la pastilla con 500  $\mu$ l de etanol al 75% y dejar secar.

6. Resuspender la pastilla en 800  $\mu$ l de amortiguador TE. Incubar a 37°C durante 15 minutos.
7. Añadir 800  $\mu$ l de cloroformo:isoamílico (24:1) y agitar vigorosamente.
8. Centrifugar a 6000 g por 10 minutos a 4°C.
9. Recuperar el sobrenadante y añadir 70  $\mu$ l de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 500  $\mu$ l de isopropanol frío. Incubar a -20°C por 1 hora.
10. Centrifugar a 6000 g por 10 minutos.
11. Lavar la pastilla con 1 ml de etanol al 75% y dejar secar.
12. Disolver en 100  $\mu$ l de TE.

### **Griffith y Porter, 2003**

#### ***Reactivos***

- CTAB 2X (CTAB 2%, Tris-HCl 100 mM, NaCl 1.5M, EDTA 20 mM) agregar poco antes de realizar la extracción 100  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol por cada 100 ml de CTAB y PVP-10 ó PVP 40 al 1%.
- Cloroformo-alcohol isoamílico 24:1
- Isopropanol frío
- Nitrógeno líquido

#### ***Protocolo***

1. Calentar a 65°C a baño María el CTAB previamente preparado con  $\beta$ -mercaptoetanol.
2. Colocar el tejido vegetal (30-50 mg) en un mortero y pulverizar con ayuda de Nitrógeno líquido.
3. Colocar el tejido pulverizado en un tubo de polipropileno de 15 ml y añadir 7 ml del CTAB previamente calentado.
4. Incubar los tubos (con la tapa floja) a 65°C durante 1 o 2 horas o toda la noche.
5. Añadir 5 ml de Cloroformo:isoamílico a cada tubo y mezclar mediante inversión.
6. Centrifugar a 4000 rpm a temperatura ambiente durante 30 minutos.
7. Transferir el sobrenadante a tubos de polipropileno de 15 ml nuevos.
8. Repetir pasos del 5 al 7.
9. Transferir el sobrenadante a un tubo de polipropileno de 15 ml.

10. Añadir 5 ml de Isopropanol frío, cubrir con parafilm y agitar suavemente hasta que se precipite el ADN.
11. Refrigerar a  $-20^{\circ}\text{C}$  al menos por una hora o durante toda la noche.
12. Remover el parafilm y centrifugar a 4000 rpm durante 30 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .
13. Descartar el sobrenadante e invertir el tubo para eliminar la mayor cantidad de líquido.
14. Lavar el ADN con 3 ml de etanol al 70%, centrifugar por 10 minutos a 4000 rpm.
15. Invertir los tubos cuidando no perder el pellet y dejar secar por 1 hora.
16. Resuspender el ADN en 750  $\mu\text{l}$  de TE, disolver a  $4^{\circ}\text{C}$  y añadir 40  $\mu\text{l}$  de NaCl 5M.
17. Añadir 270  $\mu\text{l}$  de etanol al 100%, mezclar por inversión y refrigerar a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos, centrifugar por 30 minutos a 4000 rpm.
18. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf de 2 ml.
19. Añadir 800  $\mu\text{l}$  de Isopropanol, mezclar y almacenar al menos por 1 hora a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
20. Centrifugar por 10 minutos, lavar el pellet con etanol al 70% y centrifugar a 8000 rpm.
21. Secar y disolver en TE.

## ANEXO II

### AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES ISTRs E ISTRs POR REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Cuadro 2. Condiciones de amplificación de los marcadores ISTRs

Reactivo	Vol. por reacción (µl)	cc final
Amortiguador 10 X	1.8	1X
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1.08	3 mM
dNTPs 10 mM	0.45	0.25 mM
Iniciador 10 pM/µl	0.55	0.3 µM
<i>Taq</i> polimerasa 5U/µl	0.1	1U
ADN 25 ng/µl	2 µl	50 ng

Cuadro 3. Condiciones de amplificación de los marcadores ISSRs

Reactivo	Vol. por reacción (µl)	cc final
Amortiguador 10 X	2	1X
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	1	2.5 mM
dNTPs 10 mM	0.4	0.3 mM
Iniciador 25 pM/µl		
841	0.4	0.5 µM
857	0.8	1 µM
<i>Taq</i> polimerasa 5U/µl	0.08	0.4 U
ADN 25 ng/µl	1.7	50 ng

## ANEXO III

---

### PREPARACIÓN DE GELES DE ACRILAMIDA

#### Lavado de vidrios

1. Lavar los vidrios con jabón.
2. Enjuagar con agua bidestilada.
3. Enjuagar con etanol al 70%.
4. Secar con un papel cuidando que no queden residuos de éste en los vidrios.
5. Después de varios usos, limpiar los vidrios con una solución de KOH al 10% p/v en Metanol.

#### Preparación de solución base de acrilamida (19:1) 40%

- Acrilamida 38g
- Bisacrilamida 2g
- Agua bidestilada 50ml

Disolver y aforar a 100 ml

#### Preparación de solución de poliacrilamida 6% / Urea

	7M	3M
• Agua Bidestilada	30ml	35ml
• Urea	42g	18g
• TBE 10X	10ml	10ml
• Solución base Acrilamida 40%	15ml	15ml

#### Procedimiento

1. Disolver la Urea en agua bidestilada a una temperatura de aproximadamente 25°C (aplicar la Urea en 3 partes para facilitar su disolución).
2. Ya disuelta la Urea, aumentar la temperatura a 40°C y agregar el TBE 10X y agitar aproximadamente durante 30 minutos.
3. Retirar la solución del calor y dejar reposar por 30 minutos.
4. Agregar la solución base de Acrilamida y agitar sin calor durante 30 minutos.
5. Aforar a 100 ml.

#### Polimerización de geles de acrilamida

- Poliacrilamida 6% 100ml

- Persulfato de amonio (APS) 500  $\mu$ l
- TEMED 100  $\mu$ l

### **Tinción con nitrato de plata (Sanguinetti, 1994)**

#### Solución fijadora

- Etanol 70% 50ml
- Ácido acético glacial 2.5ml
- Agua bidestilada Aforar a 500ml

#### Solución de nitrato de plata

- Nitrato de plata 0.2g
- Solución fijadora 100ml

#### Solución reveladora

- Hidróxido de Sodio 3.75g
- Formaldehído 37% 0.7ml
- Agua bidestilada Aforar a 125 ml

### ***Procedimiento***

1. Colocar el gel en la solución fijadora y agitar continuamente durante 10 minutos.
2. Decantar sin enjuagar.
3. Agregar la solución de nitrato de plata y agitar continuamente durante 5 minutos.
4. Decantar sin desechar en el drenaje.
5. Enjuagar con agua bidestilada durante 1 minuto.
6. Agregar la solución reveladora con una temperatura de 55°C y agitar continuamente hasta que aparezcan las bandas.
7. Decantar y enjuagar con solución fijadora durante 2 minutos.
8. Decantar y enjuagar con agua bidestilada.