

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA PITAYA AGRÍA, *Stenocereus gummosus* (Engelm.)

Gibson & Horak, UNA CACTÁCEA DEL DESIERTO SONORENSE, UTILIZANDO
MARCADORES ISSR



CARLOS EMILIANO MORA CARRERA

Hermosillo, Sonora

Junio de 2014

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis de Carlos Emiliano Mora Carrera la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de Licenciado en Biología con Opción en Biotecnología.

Dr. Francisco E. Molina Freaner
Director de Tesis

Dr. Alejandro Varela Romero
Sinodal Secretario

Dra. Reyna Amanda Castillo Gámez
Sinodal

Dra. Angela Corina Hayano Kanashiro
Suplente

DEDICATORIA

*A mis padres: **María Elena** y **Juan Jesús**,
las personas a quienes más admiro en este mundo.
Por darme siempre amor y apoyarme todas en mis aventuras.
Los amo con todo mi corazón.*

*“La investigación científica es una de las ocupaciones más emocionantes y remuneradoras.
Es como un viaje al descubrimiento hacia tierras desconocidas, buscando no nuevos
territorios sino nuevo conocimiento. Atrae a aquellos con buen sentido de la aventura.”*

Frederick Sanger.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora por mi formación y las oportunidades que me ofreció durante este periodo como Búho; por permitirme conocer personas y lugares que jamás hubiera imaginado. Al personal docente de la Licenciatura en Biología, cada uno dejó una enseñanza más allá del conocimiento científico que me transmitieron.

Al Laboratorio de Ecología Molecular y Funcional de Instituto de Ecología de la UNAM por ser como mi segunda casa de estudios y la oportunidad de realizar este trabajo.

A mi director de tesis, el **Dr. Francisco Molina Frenner**, por darte la oportunidad de ser su alumno y aprender de él. Por transmitir esa pasión por la ciencia y el conocimiento biológico. Por la paciencia y apoyo brindado para esta tesis. Por ser siempre tan accesible y sacarme de dudas siempre que necesitaba (muy seguido).

A los miembros del comité de tesis, **Dr. Alejandro Varela Romero**, **Dra. Reyna Castillo Gamez** y **Dra. Corina Hayano**, por su apoyo y comprensión durante todo este proceso. Por sus críticas positivas y buenos consejos.

A **José Fulgencio Martínez Rodríguez**, técnico académico del Laboratorio de Ecología Molecular y Funcional del Instituto de Ecología de la UNAM, por su gran apoyo y disposición durante el trabajo de laboratorio.

A mi mamá **María Elena Carrera Lugo** por darme la vida y criarme con amor, por enseñarme que todo aquello que queramos lograr en la vida se hace con disciplina, esfuerzo y cariño. Por ampliar mis horizontes y traerme a conocer el hermoso Desierto Sonorense donde he sido muy feliz. Y por darme las mitocondrias que me dan la energía para el día a día. A **Juan Jesús Mora Mora** por siempre apoyarme a pesar de la distancia y por enseñarme que todo tiene solución y que hay que Ser Feliz en todo momento haciendo aquello que nos apasiona. A mi querida hermana **Luz Elena Mora Carrera** por estar conmigo en las buenas y en las malas, echándome la mano cuando lo necesitaba.

A **Astrid Ortega Velderrain** por ser siempre mi mano derecha y confidente. Por apoyarme y ayudarme incondicionalmente. Por comprender mi locura hacia la biología y mostrar interés genuino en lo que hago, por aventurarse conmigo a ir al campo. Sin ti muchas cosas que he logrado no habrían sido posibles, gracias. TE AMO.

A mis compañeros del Z15 por los buenos momentos en clase y salidas a campo. Al equipo “Súper Wow”: **Diana Gallego**, **Alejandra Castanedo** y **Thelma Rodríguez** por la excelente compañía durante laboratorios y viajes de campo. A mi antimateria, **Luis Ignacio Machado**, por ofrecerme su amistad durante toda la carrera y ser el contrapeso de mí conciencia.

A mis amigos **Omar, Salas, Reyes, Raúl, Montaña, Camou, Mariano, Dinorah, Sarai y Natalia** por ayudarme a relajarme y olvidarme de la biología en los momentos en que lo necesitaba.

A la gente del laboratorio, **Andrea, Ruth, Thelma y Laura** por sus buenos consejos y buena plática durante la realización de esta tesis. “La tesis no se crea ni se destruye, solo se pospone”

A mi familia, tíos, primos y abuelos (que me apoyan desde lejos). Quienes estuvieron al pendiente de mi formación y se alegraban con mis logros.

A la familia **Ortega Velderrain** por adoptarme y tratarme como uno de su familia. Por el apoyo en los buenos momentos y en los difíciles.

A la **Dra. Reyna Castro** y **Dr. Manuel Grijalva Chon** por darme mi primera oportunidad de trabajar en un laboratorio y mostrarme lo que es la investigación científica.

Al **Dr. Alf Meling** por retarme y darme un empujón (sin saberlo) a estudiar la biología.

A la **Dra. Enriquena Bustamante** del Instituto de Ecología, por su ayuda en la creación de las bases de datos para los análisis de diversidad genética.

Al **Dr. Fernando Enríquez**, coordinador de la Licenciatura en Biología, por su apoyo para que esta tesis fuera presentada.

CONTENIDO

FORMATO DE APROBACIÓN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
CONTENIDO	v
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
II. 1. La Diversidad Genética como Componente de la Diversidad Biológica	4
II.1.1. Genética de poblaciones	5
II.1.2. Los marcadores moleculares	6
II.1.3. Inter regiones de secuencias repetitivas (ISSR)	8
II.1.4. Patrones de diversidad genética de plantas	9
II.1.5. Estudios de diversidad genética del Desierto Sonorense	11
II. 2. La Pitaya Agria <i>Stenocereus gummosus</i>	13
II. 4.1. Evolución de <i>Stenocereus gummosus</i>	15
II .4.2. Biología de <i>Stenocereus gummosus</i>	16
II .4.3. Distribución actual de <i>Stenocereus gummosus</i>	17
III. JUSTIFICACIÓN	19
IV. HIPÓTESIS	20
V. OBJETIVOS	21
V.1. Objetivo General	21
V.2. Objetivos Específicos	21
VI. METODOLOGÍA	22
VI.1. Obtención de las Muestras	22
VI.2. Extracción de ADN	24

VI.3. Amplificación de ISSR	24
VI.4. Análisis de Diversidad Genética	26
VI.5. Análisis de Estructura Genética	27
VI.6. Distancias Genéticas	27
VII. RESULTADOS	29
VII.1. Amplificación de ISSR	29
VII.2. Análisis de Diversidad Genética	30
VII.3. Análisis de Estructura Genética	31
VII.4. Distancias Genéticas	32
VIII. DISCUSIÓN	34
VIII.1. Diversidad Genética	34
VIII.2. Estructura Genética	37
VIII.3. Distancias Genéticas	38
IX. CONCLUSIONES	40
X. LITERATURA CITADA	41
Apéndice 1	46
Apéndice 2	47
Apéndice 3	49
Apéndice 4	50

LISTA DE TABLAS

Tabla I	Oligonucleótidos empleados en las pruebas preliminares de amplificación de ISSR en <i>Stenocereus gummosus</i> . G = guanina, A = adenina, C = citosina, T = timina, Y = timina o citosina, R = guanina o adenina.	25
Tabla II	Número de loci generados con diferentes oligonucleótidos de ISSR en pruebas preliminares a partir de la amplificación de 7 individuos de <i>Stenocereus gummosus</i> .	29
Tabla III	Variabilidad genética dentro de las poblaciones de <i>Stenocereus gummosus</i> a partir del análisis de primer UBC-841. N = tamaño de la muestra, P = porcentaje de loci polimórficos, H_p = heterocigosis esperada en las poblaciones, I = índice de Shannon-Wiener.	30
Tabla IV	Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para 7 poblaciones a lo largo de toda la distribución de <i>Stenocereus gummosus</i> .	32
Tabla V	Valores de diversidad genética y diferenciación entre poblaciones para plantas en general y cactáceas columnares del Desierto Sonorense estimados con diferentes marcadores moleculares. H_p = diversidad promedio en las poblaciones, H_t = diversidad total de la especie; G_{st} , F_{st} , θ_{st} = estimadores de diferenciación genética entre poblaciones; Iso = isoenzimas.	37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 a) Botón cerrado de flor de *S. gummosus* b) Flor abierta de *S. gummosus* c) Fruto inmaduro de *S. gummosus* d) Fruto de *S. gummosus* en la Isla Tiburón, Golfo de California e) Población de *S. gummosus* en El Arco, Baja California. 14
- Figura 2 Polinización de *Stenocereus gummosus* por un esfingido en una población de Sonora. 16
- Figura 3 Distribución actual de *Stenocereus gummosus* en el Desierto de Sonora. Modificado de Turner et al. (1995). 18
- Figura 4 Localización de las poblaciones muestreadas para el análisis de diversidad genética de *Stenocereus gummosus*. Ejido Francisco Villa (A) y Bahía de los Ángeles (B) en Baja California; El Abulón (C), San Carlos (D) y San Bartolo (E) en Baja California Sur; la isla Tiburón (F) en el Golfo de California; y Punta Onah (G) en la costa de Sonora. Modificado de Clark-Tapia y Molina-Freaner (2003). 23
- Figura 5 Dendograma UPGMA basado en las distancias genéticas de Nei (1972) a partir del análisis de 20 loci de ISSR en 7 poblaciones de *Stenocereus gummosus*. BC = Baja California, BCS = Baja California Sur, I = isla, S = Sonora. 33

RESUMEN

Stenocereus gummosus es una cactácea columnar que se distribuye a lo largo de la Península de Baja California, en las islas del Golfo de California y en una pequeña porción de la costa de Sonora. Se ha propuesto que las poblaciones ancestrales de la península dieron origen a las poblaciones sonorenses por un proceso de dispersión a través de las islas del Golfo de California. Así mismo, se ha propuesto que las glaciaciones del Pleistoceno ocasionaron cuellos de botella que moldearon la distribución actual de *S. gummosus*, lo que pudo dejar huella en la distribución de la diversidad genética en sus poblaciones. En este trabajo se analizó la diversidad genética de *S. gummosus* con marcadores ISSR en siete poblaciones a lo largo de toda su distribución. El valor de diversidad genética total de la especie fue relativamente alta ($H_t = 0.2075 \pm 0.016$) y el valor global de polimorfismos fue muy alto ($P = 95 \%$), mientras que la diversidad genética promedio por población fue $H_p = 0.1647 \pm 0.0544$. El nivel de diversidad genética en la población sonorense de Punta Onah, en Sonora, fue menor a la observada en poblaciones de latitudes similares de la península, apoyando parcialmente la hipótesis de la migración desde Baja California. Los resultados sobre la distribución de la diversidad genética indican que no existe un patrón de disminución de diversidad con el aumento en la latitud, sugiriendo que el refugio de *S. gummosus* durante las glaciaciones pudo haberse localizado en el centro de la península. No se encontró un patrón de aislamiento por distancia, lo que puede indicar que hay eventos de migración a larga distancia o que áreas distantes han sido colonizadas recientemente. Los resultados de este trabajo se compararon con otros estudios de la diversidad genética de cactáceas del Desierto Sonorense.

I. INTRODUCCIÓN

La diversidad genética es uno de los niveles que componen a la diversidad biológica, y se refiere a aquellas variaciones heredables que ocurren entre los organismos dentro y entre poblaciones de la misma especie. Es en este nivel donde se encuentra la variación que permitirá a las poblaciones adaptarse a las condiciones del entorno y los cuales podrían derivar en la formación de nuevas especies (Piñero, 2008).

La disciplina encargada de estudiar los patrones generales de la diversidad genética y los procesos asociados a ella ha sido la genética de poblaciones. Los estudios de genética de poblaciones pueden tener diferentes objetivos como: evaluar procesos micro-evolutivos en las especies, la conservación de la riqueza genética de las especies, así como poner a prueba hipótesis evolutivas a partir de las relaciones entre especies diversas (Hartl y Clark, 2007).

El estudio de la variación genética en poblaciones naturales y domesticadas se ha evaluado de diferentes formas, desde caracteres morfológicos hasta marcadores moleculares basados en la variación del ácido desoxirribonucleico (ADN). Estos métodos han evolucionado a través de los años y permiten evaluar diferentes aspectos sobre los procesos que afectan la diversidad genética de las especies. En los últimos años, se ha logrado evaluar la variabilidad de regiones específicas del ADN, gracias a la invención de los métodos de secuenciación. Además, se ha podido evaluar la variación en diferentes genomas como el nuclear, mitocondrial y del cloroplasto, con el fin de contestar diferentes preguntas a nivel biológico (Freeland et al., 2011; Hartl y Clark, 2007; Hedrick, 2005). La variedad de marcadores moleculares que se han desarrollado, ha permitido evaluar la diversidad genética en una amplia variedad de especies, pertenecientes a gran número de grupos taxonómicos, como son los mamíferos, peces, invertebrados marinos y terrestres, además de muchas familias de plantas (Hamrick, 1996).

Algunos grupos de plantas han sido particularmente más estudiados en sus niveles de diversidad y estructura genética debido a la importancia económica o ecológica. Un ejemplo de ello son las cactáceas, la cual es una de las familias más importantes y representativas de las zonas áridas de México, ya que sirven de alimento y refugio para gran variedad de especies (Hamrick, 2002). La familia Cactaceae es un grupo de plantas con flor que tuvo una gran radiación evolutiva durante el Cenozoico; son distintivas de zonas áridas y semiáridas, y juegan un papel ecológico fundamental en este tipo de ecosistemas. Además son un grupo muy carismático al presentar una gran diversidad de formas de vida y crecimiento por lo que son comercializadas en todo el mundo; asimismo, algunas especies tienen importancia económica como fuente de alimento (Nobel, 2002). Este grupo es casi endémico de América y se cree que México es el centro de diversificación de algunas subfamilias como la Cactoideae, el cual es el grupo con más géneros y especies (Hernandez-Hernandez et al., 2011). Hasta la fecha se han descrito cerca de 2000 especies de cactáceas, de las cuales aproximadamente 28 cuentan con estudios de diversidad genética, 17 de cuales se han realizado en México (principalmente en el Desierto Sonorense y el Valle de Tehuacán). La subfamilia Cactoideae, además de ser la más diversa en especies, es la más estudiada en sus atributos de diversidad genética con un sesgo hacia las cactáceas columnares con trabajos en 19 especies, hechos en su mayoría con isoenzimas, pero también con otros marcadores moleculares como los microsatélites y la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD, por sus siglas en inglés) (Cornejo-Romero et al., 2013).

Las inter-regiones de secuencias simples repetitivas (ISSR, por sus siglas en inglés) son marcadores moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Este tipo de marcador molecular ha sido usado con diferentes objetivos, como: evaluar las consecuencias de la introducción de especies no nativas, el mejoramiento vegetal de especies de importancia económica y conocer procesos de hibridación en las especies; además, han sido muy utilizados para estudios de conservación (Gupta et al., 1994; Tsumura et al., 1996; Wolfe, 2005; Zietkiewicz et al., 1994). Este marcador tiene ventajas sobre otros ya que muestra gran variación, es menos costoso y tiene ventajas técnicas (Reedy et al, 2002). Sin embargo son pocos los trabajos de diversidad genética en el Desierto Sonorense utilizando ISSRs.

En el presente trabajo se describe la diversidad y estructura genética de *Stenocereus gummosus* a lo largo de toda su distribución en el Desierto Sonorense utilizando el marcador dominante ISSR, y se evalúa si existe un patrón en la distribución de la diversidad genética de esta especie, similar a lo que se ha observado en otras especies de plantas y cactáceas de la región.

II. ANTECEDENTES

II.1. La Diversidad Genética como Componente de la Diversidad Biológica

La diversidad genética es uno de los niveles en que puede entenderse la diversidad biológica. Este nivel se refiere a aquellas variaciones heredables que ocurren entre los organismos, dentro y entre poblaciones de la misma especie (Piñero, 2008). Esta variabilidad tiene un impacto directo en la diversidad de especies ya que a este nivel operan los procesos que permitirán a las poblaciones evolucionar y adaptarse a su entorno y que derivarán en la formación de nuevas especies (Molina-Freaner et al., 2010). Algunos estudios han enfatizado la importancia de la relación entre la diversidad genética y algunos componentes de la adecuación de la especie, aunque esta relación no ha sido generalizada (Booy, 2000).

La diversidad de especies y ecosistemas son los niveles restantes de la diversidad biológica, aunque algunos autores también consideran a la diversidad funcional. La diversidad de especies comprende a la gran variedad de formas de vida que existe en el planeta, este nivel a su vez forma parte importante del funcionamiento a nivel ecosistémico. Diversos estudios ecológicos han demostrado que el correcto funcionamiento de los ecosistemas depende de las diferencias en la composición y la diversidad de las especies que ahí habitan (Booy, 2000).

México, junto con Colombia, Brasil, China e Indonesia, es considerado un país mega diverso, al presentar una gran variedad de especies de diferentes grupos taxonómicos y ecosistemas (Llorente-Bousquets y Ocegueda, 2008). En México, a pesar de ser considerado como centro de origen y diversificación de algunos grupos de plantas como son los agaves y las cactáceas, solo se han realizado estudios sobre variabilidad genética en aproximadamente 200 especies que incluyen una gran gama de organismos (Piñero, 2008).

II.1.1. Genética de poblaciones

La genética de poblaciones es la disciplina que se encarga de estudiar los principios genéticos aplicables a nivel poblacional. Esta disciplina estudia los factores que tienen un efecto sobre la diversidad y la composición genética de las poblaciones que resultan en cambios evolutivos a través del tiempo (Hartl y Clark, 2007).

Utiliza enfoques empíricos, experimentales y teóricos para explorar como los diferentes factores afectan a la diversidad genética de las especies. Por un lado, el enfoque empírico intenta evaluar si existe una relación entre los atributos de la diversidad genética y los factores medio-ambientales donde las especies habitan; por otro, lado el enfoque experimental trata de evaluar el efecto de condiciones particulares en la diversidad genética. Finalmente la genética de poblaciones usa modelos basados en la evidencia empírica y experimental para generar predicciones e hipótesis que pueden ser evaluadas utilizando los dos primeros enfoques. Esta interacción entre los tres enfoques propondrá posibles explicaciones a los patrones generales de diversidad genética de las especies (Hedrick, 2005). Con estos modelos se pretende explicar qué mecanismos son los responsables de la distribución de la diversidad genética dentro y entre poblaciones de una especie (Eguiarte et al., 2013).

Las principales fuerzas evolutivas que tiene influencia sobre la estructura y la diversidad genética de las especies son: la selección, la deriva genética, el apareamiento no aleatorio, el flujo génico y la mutación. El enfoque principal de la genética de poblaciones es asumir que la composición genética de una población se encuentra bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg, en donde no actúa ninguna fuerza evolutiva y por tanto no existen cambios en las frecuencias alélicas ni en la diversidad genética a través del tiempo (Roughgarden, 1979).

Cada fuerza evolutiva tendrá un efecto diferente sobre la composición genética de la población, alterando el equilibrio de Hardy-Weinberg. La deriva genética y la endogamia podrían disminuir la variabilidad genética, mientras que la mutación tendría un efecto

contrario al aumentarla. Por otro lado, la selección natural y el flujo genético pueden aumentar, mantener o disminuir la cantidad de variación genética según la situación particular en la que se encuentre una especie (Hedrick, 2005). Estas fuerzas evolutivas pueden actuar de manera simultánea dentro de las poblaciones e incluso sobre más de un gen (Hedrick, 2005).

Otro factor importante que puede afectar la diversidad genética son aquellas causadas por la actividad antropogénica, como son la perturbación y la fragmentación de hábitats, originado por el crecimiento de poblaciones urbanas. Por otro lado, actividades de importancia económica como la acuicultura y la agricultura, ocasionan cambios en la estructura y composición genética de las especies nativas al introducir nuevas especies de valor comercial (Laikre, 2010). Otros efectos propios de la agricultura como la selección artificial y de domesticación afectan la diversidad genética de especies de importancia económica (Tinoco et al., 2005). La genética de poblaciones provee herramientas que pueden ayudar a monitorear las consecuencias de estas actividades humanas favoreciendo el uso sustentable de organismos vivos.

II.1.2. Marcadores moleculares

Medir la variación dentro y entre poblaciones se volvió una línea de investigación muy importante durante el siglo XX. Los primeros esfuerzos midieron la variación fenotípica en base a caracteres morfológicos como son: el patrón de articulaciones en las alas de moscas, variaciones cromosómicas, diferencias en la coloración de flores, insectos o caracoles, etc. Sin embargo, existen dificultades para determinar la diversidad genética a partir de caracteres fenotípicos, ya que a pesar de tener un componente genético, también se ven afectados por condiciones medio-ambientales. Por otro lado, este tipo de caracteres fenotípicos sólo permiten analizar una pequeña porción de la variabilidad presente en todo un individuo o población a nivel genotípico (Freeland et al., 2011; Hedrick, 2005).

A mediados de la década de 1960, Lewontin y Hubby (1966) encontraron una forma de estimar la variabilidad genética a partir de la variación en diferentes enzimas de un individuo. Esta técnica llamada alozimas podía identificar variantes de un gen (alelos) por medio de diferencias en su movilidad relativa, según su composición de aminoácidos, utilizando la electroforesis en gel. Esta técnica demostró ser bastante útil y por ello fue muy utilizada durante 30 años, en los que permitió el análisis de la diversidad genética en una gran variedad de especies, además de favorecer el estudio de más porciones del genoma. Sin embargo, la variación a nivel genético no siempre se veía reflejada a nivel proteína ya que algunas mutaciones no generan un cambio en la composición de aminoácidos de una enzima. Esto, aunado a algunas limitaciones de muestreo, han hecho que este tipo de técnicas sean cada vez menos usadas (Freeland et al., 2011; Hedrick, 2005; Schlotterer, 2004).

Después de las proteínas se utilizaron técnicas basadas en la variación directa del ADN. Uno de ellos fueron los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés), que permiten observar patrones de bandeo según la digestión del material genético por medio de enzimas de restricción. La variabilidad en este marcador se da a partir de substituciones en los sitios de reconocimiento de enzimas. Esta técnica es relativamente barata, sin embargo presenta algunos problemas técnicos (Schlotterer, 2004).

La invención de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), la cual permite la amplificación de regiones específicas del ADN, fue una innovación importante que permitió el análisis del material genético a diferentes niveles. Los marcadores moleculares más importantes que se basan en el PCR para estimar la diversidad genética son la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), las inter-regiones de secuencias simples repetitivas (ISSR) y microsatélites. En este caso, la amplificación diferencial de regiones del genoma, según el marcador, permite estimar la variabilidad dentro y entre poblaciones al registrar los patrones de bandeo de un individuo, y variantes dentro y entre poblaciones. Estas técnicas tienen la ventaja de no necesitar información previa sobre regiones de anclaje de los primers. Sin embargo, el uso de algunos de éstos marcadores como los RAPDs y AFLPs es limitado debido a la baja reproducibilidad que tienen, además de las dificultades para leerlos (Schlotterer, 2004; Eguiarte et al., 2013).

Un marcador que ha sido ampliamente utilizado en los últimos años son los microsatélites o repeticiones de secuencias simples (SSR por sus siglas en inglés), que se basan en la amplificación de repeticiones en tándem de 2 a 6 nucleótidos. Estos microsatélites se encuentran dispersos en el genoma, pueden variar de tamaño entre 5 hasta 40 repeticiones, y suelen ser muy variables debido a que son sujetos a problemas durante la replicación del genoma. Los microsatélites están flanqueados por regiones muy conservadas, lo que favorece el diseño de oligonucleótidos que amplifican loci específicos. Debido a su gran uso se conocen aspectos importantes sobre su función, evolución y distribución, y pueden generar información genética importante. Sin embargo, estos microsatélites generalmente tienen que ser específicos a nivel especie y su diseño, aunque cada vez es más accesible, puede ser costoso y laborioso. Además, se carece de un modelo mutacional apropiado que pueda ser tomado en cuenta para algunos estimadores estadísticos de la diversidad genética. Por otro lado se pueden tener problemas técnicos al momento de la amplificación, aunque algunos grupos son más susceptibles a tener errores de este tipo (Selkoe y Toonen, 2006).

Otras técnicas que han tenido un gran auge en los últimos años han sido la secuenciación de fragmentos de ADN y de genomas completos. El análisis de secuencias de regiones de ADN presenta un gran nivel de resolución, además de permitir comparaciones entre especies. La tecnología se ha vuelto cada vez más barata aunque sigue siendo costosa y requiere tiempo, además es necesario un conocimiento previo del genoma del sistema de estudio (Freeland et al., 2011).

II.1.3. Inter regiones de secuencias repetitivas (ISSR)

Los ISSR son un marcador molecular dominante basado en la técnica del PCR. Los ISSRs son generados a partir de la amplificación de la región comprendida entre repeticiones de secuencia simple (SSR) o microsatélites; estos amplificados varían en tamaño entre 200 a 2000 pares de bases (Zietkiewicz et al., 1994). Se sabe que en promedio un SSR puede ser

encontrado cada 10kb en el genoma humano. Para amplificar estas regiones se utilizan oligonucleótidos complementarios a SSRs los cuales podrán amplificar su región intermedia cuando se encuentren de manera invertida y a una distancia amplificable. Al encontrarse de manera aleatoria en el genoma el producto de la amplificación de regiones entre SSRs generarán un patrón de bandeo que puede ser detectable en una electroforesis de poliacrilamida o agarosa (Reedy et al., 2002).

Las fuentes principales de variación en los ISSRs son mutaciones en la región de anclaje del oligonucleótido que impedirían la amplificación de esa región; inserciones o deleciones que cambien el tamaño o impidan la amplificación (Reddy et al., 2002).

Este marcador de naturaleza hipervariable puede ayudar a resolver problemas que tienen otros marcadores moleculares como es la poca variabilidad en secuencias del cloroplasto, la baja repetibilidad en RAPDs, además de ser un medio no tan caro para realizar análisis de diversidad genética y de fácil estandarización (Scheinvar-Gottdiener, 2008).

Los ISSRs fueron desarrollados inicialmente como huella digital para la identificación de organismos de diferentes especies. Este marcador ha sido utilizado particularmente en plantas, debido a su naturaleza hipervariable, en estudios de diversidad genética en especies cultivadas así como en poblaciones naturales, el monitoreo de especies invasoras y especies en peligro de extinción, aunque también se han utilizado en estudios filogenéticos relacionados con la hibridización (Gupta et al., 1994; Tsumura et al., 1996; Wolfe, 2005; Zietkiewicz et al., 1994).

II.1.4. Patrones de diversidad genética en plantas

En las plantas con semillas se ha observado que los sistemas reproductivos, las características de historia de vida, la distribución y los mecanismos de dispersión juegan un papel importante en la distribución de la diversidad genética dentro y entre poblaciones de especies (Hamrick y

Godt, 1996). La diversidad genética también puede verse afectada por procesos ecológicos, demográficos y evolutivos (Piñero, 2008).

Aquellas especies que tienen un amplio rango de distribución, un ciclo de vida largo y presentan reproducción cruzada mediada por el viento, tienen una variación genética intrapoblacional mayor que otras especies con diferentes características (Hamrick, 1982). Se sabe que, especies con distribución amplia poseen también una mayor diversidad genética a nivel especie que aquellas especies con distribución restringida. Por otro lado, factores como los sistemas reproductivos que favorecen la endogamia o la reproducción clonal, así como sistemas de dispersión de polen y semillas de movilidad limitada favorecerán altos niveles de diferenciación entre poblaciones asociados a bajos niveles de diversidad genética dentro de las poblaciones. Aquellas plantas polinizadas por el viento mantienen una mayor diversidad dentro de las poblaciones que entre poblaciones en comparación con especies polinizadas por insectos y que presentaban autopolinización (Hamrick, 1979). Mientras que aquellas especies que evitan las cruas consanguíneas y que además tienen un flujo genético más restringido entre poblaciones, es decir no hay intercambio genético entre poblaciones, presentarán altos niveles de diferenciación (Hamrick, 1979).

A partir de trabajos realizados principalmente con isoenzimas se han podido establecer algunas tendencias dentro de familias de plantas; por ejemplo, en aquellas que presentan una mayor riqueza de especies de herbáceas poseen una menor diversidad genética así como una mayor diferenciación que aquellas familias que presentan plantas perennes de ciclo de vida más largo (Hamrick y Godt, 1996).

El flujo génico es una fuerza homogenizadora entre poblaciones; este flujo se da en plantas por medio de la dispersión de semillas y/o polen. En 1979 Hamrick et al. demostraron que aquellas plantas polinizadas por el viento mantienen una mayor diversidad dentro de las poblaciones que entre poblaciones, en comparación con especies polinizadas por insectos y que presentaban autopolinización. Este aspecto de la polinización y su efecto en la diversidad genética también puede verse afectado por condiciones cambiantes entre años, como la dirección del viento o la abundancia de polinizadores (Hamrick y Godt, 1996).

El aislamiento por distancia es un patrón de organización de la diversidad genética que se relaciona con el flujo génico entre las poblaciones, y que se genera cuando la migración ocurre principalmente entre poblaciones cercanas. En teoría, cuando el flujo genético es limitado, aquellas poblaciones más cercanas geográficamente serán más similares genéticamente que aquellas poblaciones más distantes. Cuando las distancias genéticas y las distancias geográficas entre poblaciones están correlacionadas, se genera un patrón de aislamiento por distancia. La ausencia de aislamiento por distancia puede indicar que poblaciones distantes pudieron ser colonizadas recientemente o que la migración y la deriva genética no han llegado a un equilibrio en las poblaciones (Slatkin, 1993). La detección de aislamiento por distancia indica que la migración entre poblaciones es restringida y que la migración y deriva han llegado a un equilibrio (Slatkin 1993).

En particular para cactáceas columnares, aquellas especies polinizadas por murciélagos presentan altos niveles de diversidad genética a nivel especie pero menor diferenciación entre poblaciones. En cambio, en cactáceas que presentan distribución agregada y sistemas de entrecruzamiento mixto y polinizados por insectos, la endogamia y la deriva genética tienen un efecto importante en la estructura genética y los procesos de especiación (Cornejo-Romero, 2014).

II.1.5. Estudios de diversidad genética del Desierto Sonorense

En el Desierto Sonorense se tiene reporte de al menos 20 especies a las que se les ha estudiado diferentes aspectos de la diversidad genética; las familias de plantas más estudiadas son Cactaceae y Agavaceae (Molina-Freaner et al., 2010). Estos estudios se han realizado principalmente con aloenzimas y se han determinado algunos patrones de diversidad genética para algunas especies.

Uno de los patrones de distribución de la diversidad genética en plantas de la región es aquella causada por los procesos de contracción y expansión provocados por las glaciaciones

del Pleistoceno (Hewitt, 2000). Estos procesos dejaron una huella en la estructura y diversidad genética de algunas especies en el Desierto Sonorense. Este patrón se ve reflejado en una correlación negativa de la diversidad genética con el aumento en la latitud. Este fenómeno latitudinal se ha asociado con refugios localizados en las planicies de Sonora y sur de Baja California donde se encuentra una mayor diversidad genética que en las poblaciones distribuidas más al norte. Este patrón se ha observado en la cenita *Lophocereus schottii* (Cactaceae), donde Nason et al. (2002) detectaron que la heterocigosis esperada y el promedio de alelos por locus disminuyeron con la latitud a lo largo de la península de Baja California. Patrones similares al de *L. schottii* se han observado en la diversidad genética de otra cactácea columnar, *Stenocereus gummosus*, en la rama blanca, *Encelia farinosa* (Asteraceae) y la candelilla *Euphorbia lomelii* (Euphorbiaceae) (Clark-Tapia y Molina-Freaner, 2003; Fehlberg y Ranker, 2009; Garrick et al., 2009).

Otros procesos geológicos que han afectado la composición genética de poblaciones de plantas son: la formación del Golfo de California, el movimiento de la Península de Baja California hacia el norte, la formación del Istmo de La Paz y la introgresión marina ocurrida durante el Pleistoceno que separó a la península en dos (Clark-Tapia y Molina-Freaner, 2003; Nason et al., 2002; Vargas-García, 2000). Sin embargo, los mismos procesos geológicos pueden influenciar de manera diferente a las especies de acuerdo a las características de historia de vida (Garrick et al., 2009). Algunas especies de plantas del Desierto Sonorense se distribuyen principalmente a lo largo de toda la península de Baja California, en algunas islas del Golfo y marginalmente en la costa central de Sonora (Turner et al. 1995). Cody et al. (2002) propusieron que este patrón de distribución pudo haber sido generado por la migración de estas especies de Baja California a Sonora, a través de las islas de la parte media del Golfo. Los estudios sobre la diversidad genética de las cactáceas columnares *Lophocereus schottii*, *Pachycereus pringlei* y *Stenocereus thurberi* muestran menor variación en Sonora que en la península y este hecho ha sido interpretado como evidencia que apoya la hipótesis de Cody et al. (2002) sobre la migración a través del golfo. La menor diversidad genética en poblaciones sonorenses de *L. schottii*, *P. pringlei* y *S. thurberi* comparadas con la diversidad genética de poblaciones de la península apoya parcialmente la hipótesis de Cody et al. (2002) sobre el origen de las poblaciones sonorenses de plantas (Hamrick et al., 2002).

Uno de los estudios previos sobre la diversidad genética del complejo de especies del maguey *Agave deserti* del Desierto Sonorense, detectó evidencia de aislamiento por distancia (Navarro-Quezada et al. 2003). Sin embargo, se desconoce qué tan general es este patrón de organización de la diversidad genética en plantas de la región.

II. 2. La Pitaya Agria *Stenocereus gummosus*

Stenocereus gummosus es una cactácea columnar semi-erecta endémica del Desierto Sonorense. Crece generalmente entre 1 - 1.5 metros de altura (aunque puede alcanzar 3 - 5 metros) y pueden llegar a tener 10 metros de diámetro. Cuenta con 8 - 12 costillas en el tallo, cuyo diámetro varía entre 5 - 8cm. El color de la flor es rosa en su parte externa y blanca en la parte interna, y mide entre 10 - 15 cm de largo y 6 a 8 cm de ancho (Turner et al., 1995).



Figura 1. Fotos de a) Botón cerrado de flor de *S. gummosus* b) Flor abierta de *S. gummosus* c) Fruto inmaduro de *S. gummosus* d) Fruto de *S. gummosus* en la Isla Tiburón, Golfo de California e) Población de *S. gummosus* en El Arco, Baja California.

Produce un fruto espinoso y globoso, llamado pitaya agria, de color rojo que pierde las areolas y espinas en la madurez. Este fruto es comestible y tiene importancia económica. Esta última característica es gracias a que tiene una pulpa dulce y jugosa que también sirve para hacer mermeladas, bebidas refrescantes y puede ser fermentado para producir bebidas alcohólicas; el abundante número de semillas también pueden ser aprovechado como alimento (Bravo Hollis, 1991).

Los tallos secos son pulverizados y cocidos con aceites de origen animal por la etnia Seri para introducirlos entre las tablas de las embarcaciones con el fin de evitar la entrada de

agua. También los tallos sin espinas, se calientan y son envueltos en tela para curar el dolor en partes del cuerpo (Artschwager, 1996). Otro uso de los tallos es su utilización para la pesca, al ser arrojados a lagunas para envenenar a los peces y así facilitar su recolección. Los haces del sistema vascular son utilizados para la construcción de viviendas y corrales debido a son huecos, resistentes y ligeros (Bravo Holis, 1991).

II. 2.1. Evolución de *Stenocereus gummosus*

Stenocereus gummosus fue inicialmente descrita como *Cereus gummosus* por Engelman en 1889. En 1920 fue clasificada por Britton y Rose dentro del género *Machaerocereus* junto con *Cereus eruca* debido principalmente a características de su flor y espina central. Se ha propuesto que *Stenocereus stellatus* (Pfeiff), el cual es más erecto y se encuentra distribuido al sur de México y *S. gummosus* pueden ser taxones hermanos. Esto tomando en cuenta su parecido en la composición y estructura de la corteza, además del parecido de sus semillas, la espina central apuntando hacia abajo y la presencia de espinas en la parte inferior del tubo floral. El origen de la separación de *S. gummosus* y *S. stellatus* se pudo haber dado de dos maneras, la primera fue que *S. gummosus* especió a partir de poblaciones ancestrales continentales de *S. stellatus* durante la formación de la Península de Baja California; la segunda hipótesis es que *S. gummosus* evolucionó como una especie con distribución más al norte y que ya habitaba esa región antes de la formación de la península (Gibson, 1989). Se ha propuesto que *Stenocereus eruca*, la cual sólo tiene una distribución restringida en Baja California Sur, es un descendiente de *S. gummosus*, esto con base en características reproductivas y genéticas (Gibson, 1989; Molina-Freaner y Clark-Tapia, 2005).

II.2.2. Biología de *Stenocereus gummosus*

Stenocereus gummosus es polinizada principalmente por esfingidos y ha mostrado ser auto incompatible al menos en una población de Sonora (Clark-Tapia y Molina-Freaner, 2003) (Figura 2). La etapa de floración es entre Septiembre y termina a principios de Octubre (Gibson, 1989). La polinización es nocturna, la flor comienzan a abrir ente las 20-21 horas, su apertura es completa entre 23-24 horas y cierran completamente entre 7-8 de la mañana siguiente. Se ha encontrado una mayor diversidad genética en las poblaciones sonorenses comparadas con las de la Península utilizando isoenzimas (Clark-Tapia y Molina-Freaner, 2003).



Figura 2. Polinización de *Stenocereus gummosus* por un esfingido (*Hyles spp.*) en poblaciones de Sonora.

II.2.3. Distribución actual de *Stenocereus gummosus*

S. gummosus se encuentra distribuída a lo largo de la Península de Baja California entre los 23-31.9 grados latitud norte; en las islas San Esteban, San Lorenzo y Tiburón localizadas en el Golfo de California; y restringido a una pequeña región en la costa de Sonora cercana a las islas donde habita la etnia Seri (Figura 3). Ha sido observada hasta en 1000 msnm.



Figura 3. Distribución actual de *Stenocereus gummosus* (en gris) en el Desierto de Sonora. Modificado de Turner et al. (1995).

III. JUSTIFICACIÓN

La pitaya agria (*Stenocereus gummosus*) es una cactácea endémica del Desierto Sonorense, la cual ha sido ampliamente utilizada por grupos indígenas de la región con diferentes fines. Los estudios sobre la diversidad genética nos pueden ayudar a evaluar qué factores ambientales afectan la organización de la variación genética de las especies. Existen pocos estudios sobre la diversidad genética de plantas del Desierto Sonorense, los cuales se han basado principalmente en isoenzimas como marcador molecular y solo algunos estudios han empleado marcadores a base de ADN. Los marcadores tipo ISSR han mostrado ser muy útiles debido a que son hipervariables, de fácil estandarización y relativamente baratos. En este trabajo se analiza la diversidad genética de *S. gummosus* con marcadores ISSR.

IV. HIPÓTESIS

Se ha propuesto que las poblaciones sonorenses de *S. gummosus* se originaron por dispersión a partir de poblaciones ancestrales de la península de Baja California. Si este proceso de migración estuvo asociado a eventos de cuello de botella, se espera encontrar menor diversidad genética en las poblaciones de Sonora que en las poblaciones de la Península. Por otro lado se ha reportado que las glaciaciones ocurridas en el Pleistoceno pudieron tener un efecto en la distribución de la diversidad genética en especies de plantas de la región. Bajo este escenario se espera encontrar una mayor diversidad genética en el sur de la distribución de *S. gummosus* y una menor diversidad en el norte de la distribución en el Desierto Sonorense.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo General

Analizar la diversidad genética de la Pitaya agria, *Stenocereus gummosus*, utilizando marcadores ISSR

V.2. Objetivos Específicos

Cuantificar los niveles de diversidad genética dentro y entre poblaciones de *S. gummosus*.

Describir los patrones de distribución de la diversidad genética en poblaciones de *S. gummosus* a lo largo de su distribución.

Determinar los niveles de diferenciación entre poblaciones de *S. gummosus*.

VI. METODOLOGÍA

VI.1. Obtención de las Muestras

Se colectaron muestras de tejido del clorénquima de *Stenocereus gummosus* en poblaciones de la Península de Baja California, Islas del Golfo de California y costa de Sonora como parte del trabajo de Clark-Tapia y Molina-Freaner (2003).

Se seleccionaron 15 individuos de cada una de las poblaciones de Ejido Francisco Villa (A) y Bahía de los Ángeles (B) en Baja California; El Abulón (C), San Carlos (D) y San Bartolo (E) en Baja California Sur; la isla Tiburón (F) en el Golfo de California; y Punta Onah (G) en la costa de Sonora (Figura 4). Siendo un total de 105 individuos en 7 poblaciones a lo largo de toda la distribución de *S. gummosus*.

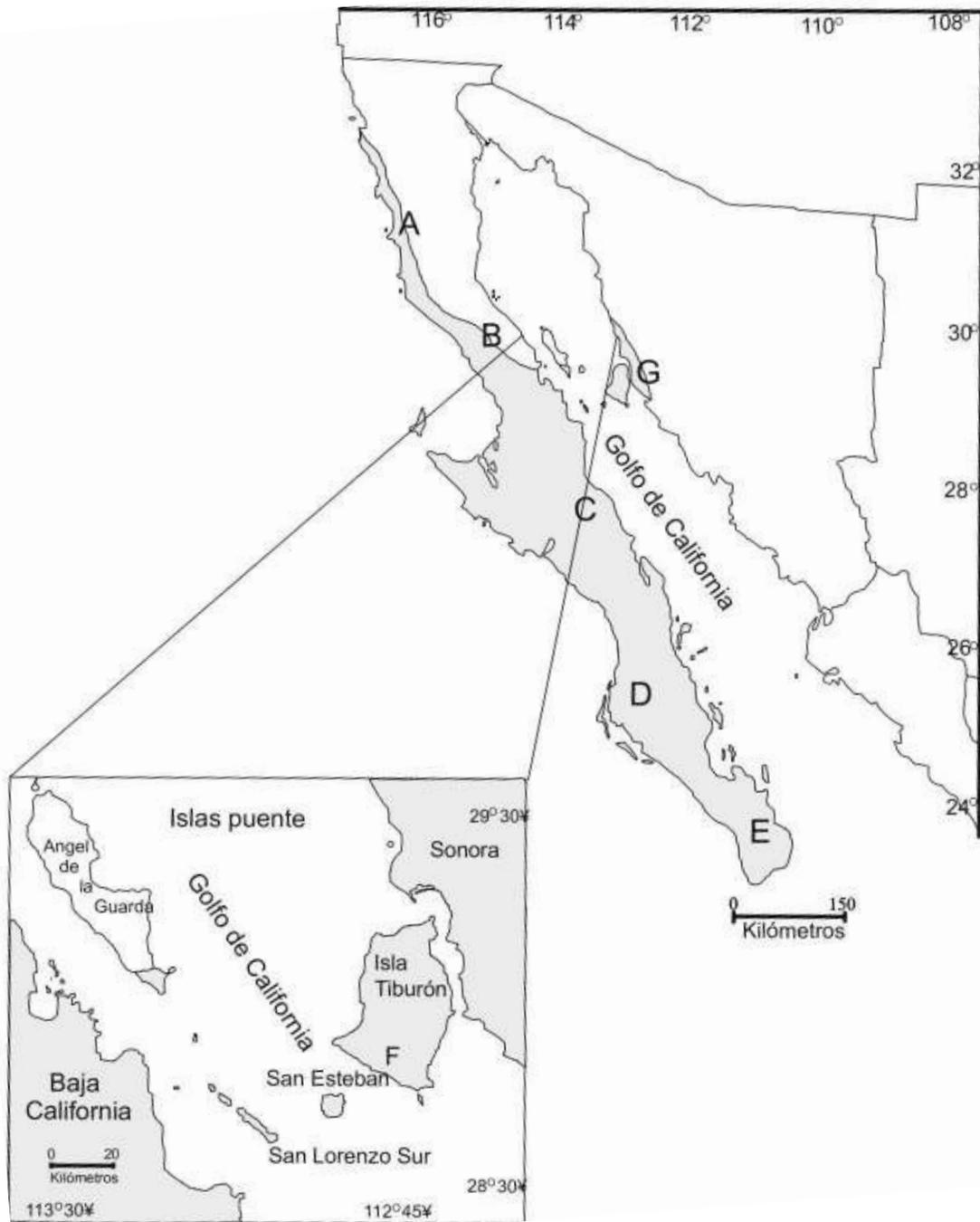


Figura 4. Localización de las poblaciones muestreadas para el análisis de la diversidad genética de *Stenocereus gummosus*. Ejido Francisco Villa (A) y Bahía de los Ángeles (B) en Baja California; El Abulón (C), San Carlos (D) y San Bartolo (E) en Baja California Sur; la isla Tiburón (F) en el Golfo de California; y Punta Onah (G) en la costa de Sonora. Modificado de Clark-Tapia y Molina-Freaner (2003).

VI.2. Extracción de ADN

El ADN de 105 individuos de *S. gummosus* se extrajo siguiendo el protocolo propuesto por Doyle y Doyle (1987) y modificado por Gutiérrez-Ozuna (2006) (Apéndice 1), haciendo un doble lavado con cloroformo:octanol (paso 10) para eliminar la gran cantidad de polisacáridos. Para este proceso se utilizaron los buffers de extracción de Scheinvar-Gottdiener (2008) (Apéndice 2).

VI.3. Amplificación de ISSRs

Se realizaron pruebas preliminares para determinar el primer de ISSR que se utilizaría para el estudio. Se probaron los siguientes primers pertenecientes al set UBC # 9 (University of British Columbia, Vancouver, Canadá): 810, 817, 827, 840, 841, 842, 845, 850 y 901 amplificando un individuo del sur, centro y norte de la península para determinar cuál oligonucleótido amplificaba de manera repetible, consistente y que producía un mayor número de bandas amplificadas (loci).

Para la reacción de amplificación se modificó el protocolo de Scheinvar-Gottdiener (2008). Se agregaron a cada tubo: 2.5 µL de ADN extraído, 2.5 µL de buffer PCR 10X, 1.5 µL de MgCl₂ (2 mM), 2.5 µL del primer ISSR (2 mM), 0.2 µL de solución de mezcla de dNTPs Invitrogen (0.1 mM), 9.5 µL de agua ultra pura y 0.3 µL de Taq polimerasa (Invitrogen 1U) para una reacción total de 20 µL.

Tabla I. Oligonucleótidos empleados en las pruebas preliminares de amplificación de ISSR en *Stenocereus gummosus*. G = guanina, A = adenina, C = citosina, T = timina, Y = timina o citosina, R = guanina o adenina.

Primer ISSR	Secuencia
UBC-810	(GA)8-T
UBC-817	(CA)8-A
UBC-827	(CA)8-CG
UBC-840	(GA)8-YT
UBC-841	(GA)8-YC
UBC-842	(GA)8-YG
UBC-845	(CT)8-RG
UBC-850	(GT)8-YC
UBC-901	(GT)6-YR

Para el PCR se utilizó un termociclador Techne Unit Genius. El programa de amplificación fue el siguiente: 94°C por 90 segundos para la desnaturalización inicial, 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos de desnaturalización, 52.5°C por 45 segundos de alineación y 72°C por 90 segundos para elongación; y una extensión final de 72°C por 7 minutos.

Para comprobar la amplificación de bandas de ADN se hicieron electroforesis en gel de agarosa al 1 % (3 g de agarosa/300 mL de buffer TAE 1X) al cual se le agregó Bromuro de Etidio para visualizar los fragmentos de ADN. Se agregó a cada pozo del gel 3 µL de buffer de carga y 20 µL del amplificado. Para determinar el tamaño de las bandas se agregaron 3 µL de buffer de carga y 3 µL de Low Mass DNA Ladder con bandas de tamaño conocido, en uno de los pozos del gel.

Los geles de electroforesis fueron corridos en una cámara electroforética (Pharmacia Biotech) durante 90 minutos a 120 volts, se dejaron enfriar por 5 minutos y después fueron observados con un transiluminador UV (UVP).

Se registró el patrón de bandeo de cada individuo y se generó una matriz de presencia/ausencia de cada banda. Los ISSR son un marcador dominante por lo que la presencia de banda se interpretó como homócigo dominante o heterócigo mientras que la ausencia se interpretó como homócigo recesivo.

VI.4. Análisis de Diversidad Genética

La matriz de presencia/ausencia de bandas fue analizada con el programa POPGENE v1.31 (Yeh y Boyle, 1997) para estimar el porcentaje de loci polimórficos ($P\%$):

$$P\% = \frac{n_{pj}}{n_{total}} \times 100$$

donde n_{pj} es el número de loci polimórficos y n_{total} el número total de loci analizados. Esto para estimar qué porcentaje de los loci tuvieron variación dentro de las poblaciones.

La diversidad genética (H), estimada como la heterocigosis esperada para la especie (H_T) así como para cada una de las poblaciones H_P , se calculó siguiendo a Nei (1978) con la fórmula:

$$H = 1 - \sum_{i=1}^m x_i^2$$

donde m es el número de loci y x_i^2 la frecuencia de un locus específico en la población.

También se usó otro estimador de la diversidad genética, para la especie y cada una de las poblaciones, basado en el índice de Shannon-Wiener (I) para cada uno de las poblaciones como fue propuesto por (Lewontin, 1972) con la fórmula:

$$I = -\sum p_i \log_2 p_i$$

en donde p_i es la frecuencia de un locus específico en la población.

Además, se realizó una prueba de correlación lineal para explorar si existe una relación significativa entre los valores de H_p y P %, y la latitud con ayuda del programa Sigma Plot.

VI.5. Análisis de Estructura Genética

Para determinar cómo se distribuye la diversidad genética entre y dentro de las poblaciones se realizó un Análisis de varianza molecular (AMOVA, por sus siglas en inglés) con ayuda del programa Arlequin 3.1. También se hizo el cálculo de los coeficientes de diferenciación genética (G_{ST}) con el Programa POPGENE, según Nei (1978), con la fórmula:

$$G_{ST} = \frac{D_{ST}}{H_T}$$

En donde D_{ST} es el promedio de la diversidad genética entre subpoblaciones y H_T la diversidad total de la especie.

VI.6. Distancias Genéticas

Se estimaron los valores de distancias genética (D) entre pares de poblaciones siguiendo el método de Nei (1972) con la fórmula:

$$D = -\log_e I$$

Donde I es la identidad entre dos poblaciones, es decir, la probabilidad de encontrar la misma frecuencia de un locus específico en dos poblaciones. Este valor es normalizado y es el promedio de identidad de todos los loci entre pares de poblaciones.

Estos datos sirvieron para crear un dendrograma con el método de agrupamiento de pares con media aritmética (UPGMA, por sus siglas en inglés) que permitió visualizar las relaciones entre las poblaciones, usando el programa Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA, por sus siglas en inglés) (Miller, 1997).

Se calculó el flujo génico (Nm) entre poblaciones con la siguiente fórmula (Slatkin y Barton, 1989):

$$Nm = \frac{(1 - G_{st})}{4 G_{st}}$$

Para evaluar si existe un patrón de asilamiento por distancia en *S. gummosus*, se correlacionaron los datos de distancia genética y distancia geográfica (separación espacial en km) entre poblaciones por medio de la prueba de Mantel con el programa TFPGA.

VII. RESULTADOS

VII.1. Amplificación de ISSR

De los primers que se probaron (Tabla I), solo UBC-810, 841 y 842 produjeron amplificadores claros, repetibles y consistentes; además presentaron un número razonable de loci polimórficos en las muestras de individuos de *Stenocereus gummosus* del sur, centro y norte de la Península de Baja California. Para determinar cuál de estos tres primers se utilizaría en el análisis de diversidad se probaron estos primers en un individuo de cada una de las siete poblaciones de *S. gummosus* (siete individuos en total) para determinar qué oligonucleótido generaba el mayor número de loci. Estas pruebas se hicieron por duplicado, usando los mismos individuos para estimar la repetibilidad del proceso de amplificación.

Al analizar los siete individuos de toda la distribución de las poblaciones de *S. gummosus*, el primer UBC-841 reveló 12 loci informativos, mientras que los primers UBC-810 y 842 solo mostraron 8 y 7 loci, respectivamente (Tabla II).

Tabla II. Número de loci generados con diferentes oligonucleótidos de ISSR en pruebas preliminares a partir de la amplificación de 7 individuos de *Stenocereus gummosus*.

Primer	Secuencia	#de loci
UBC-810	(GA)8-T	8
UBC-841	(GA)8-YC	12
UBC-842	(GA)-YT	7

Las pruebas de reproducibilidad determinaron que el 100% de las bandas fueron repetibles.

El primer UBC-841 fue amplificado adecuadamente en 96 individuos de 7 poblaciones que abarcan toda la distribución de *Stenocereus gummosus*.

VII.2. Análisis de Diversidad Genética

Cuando se analizaron los 97 individuos de *S. gummosus* en toda su distribución el oligonucleótido UBC-841 generó 20 loci en total. El tamaño de los fragmentos varió desde 350 hasta 1840 pares de bases (Apéndice 3). El porcentaje de loci polimórficos (P%) fue en promedio 48.57% entre las poblaciones, variando desde 30 % en Ejido Francisco Villa y Punta Onah (Sonora), mientras que el valor más alto se dio en El Abulón (Baja California Sur) con 70 % (Tabla III).

Tabla III. Variabilidad genética dentro de las poblaciones de *Stenocereus gummosus* a partir del análisis de primer UBC-841. N = tamaño de la muestra, P = porcentaje de loci polimórficos, *Hp* = heterocigosis esperada en las poblaciones, *I* = índice de Shannon-Wiener.

Población	N	P (%)	<i>Hp</i>	<i>I</i>
Ejido Fco. Villa (BC)	15	30	0.0825	0.1258
Bahía de los Ángeles (BC)	15	55	0.2118	0.3081
El Abulón (BCS)	13	70	0.2386	0.3576
San Carlos (BCS)	14	60	0.2130	0.3141
San Bartolo (BCS)	15	50	0.1548	0.2290
Isla Tiburón (Is)	10	45	0.1467	0.2230
Punta Onah (S)	15	30	0.1056	0.1564
Promedio ± d.e.	13.8	48.57 ±13.81	0.1647 ±0.0544	0.2449 ±0.0795

El nivel de diversidad genética total y el porcentaje de loci polimórficos global de la especie fue relativamente alto ($H_t = 0.2075 \pm 0.016$ y $P = 95 \%$, respectivamente). El promedio de la diversidad genética en las poblaciones fue $0.1647 (\pm 0.0544)$, siendo Ejido Fco. Villa el que presenta el nivel más bajo de diversidad genética ($H_p = 0.0825$), mientras que el valor más alto fue encontrado en El Abulón ($H_p = 0.2386$). Por otro lado el valor promedio de diversidad genética calculado con el índice de Shannon-Wiener (I) fue 0.2449 ± 0.0795 , lo que es ligeramente mayor a los encontrados para los valores promedio de H_p ; el valor más alto y más bajo corresponden también a Ejido Fco. Villa y El Abulón (0.1258 y 0.3576 respectivamente) (Tabla III).

No se observó una relación estadísticamente significativa entre la diversidad genética y la latitud. El análisis estadístico mostró que tanto para la heterocigosis (H_p) como para el porcentaje de loci polimórficos (P), los valores de p no fueron significativos ($p = 0.322$ y 0.233).

VII.3. Análisis de Estructura Genética

El análisis de AMOVA reveló que el 13.98% de la variación genética se distribuye entre las poblaciones, mientras que el 86.02% se encuentra dentro de las poblaciones. Es decir, la diferenciación entre poblaciones fue 0.13976 . Por otra parte el valor de diferenciación genética (G_{st}) calculado a partir de la diversidad total fue 0.2061 , valor ligeramente mayor al calculado mediante el método AMOVA.

Tabla IV. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para 7 poblaciones a lo largo de toda la distribución de *Stenocereus gummosus* .

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	6	27.973	0.23339	13.97644
Dentro de las poblaciones	90	129.284	1.43649	86.02356
Total	96	150.763	1.60040	

Fst = 0.13746

El valor de flujo génico (Nm), producto de la migración (m) y el tamaño efectivo de las poblaciones (N), calculado a partir del valor de G_{st} , se estimó en 0.9630 individuos por generación entre las poblaciones.

VII.4. Distancias Genéticas

El dendrograma UPGMA, basado en las distancias genéticas (D) entre poblaciones (Apéndice 3), agrupó a las poblaciones en dos grupos: uno formado por las poblaciones de Ejido Francisco Villa y San Bartolo en la península de Baja California, relacionadas con la Isla Tiburón y Punta Onah (Sonora); y a las poblaciones El Abulón y San Carlos (Baja California Sur) y Bahía de los Ángeles (Baja California).

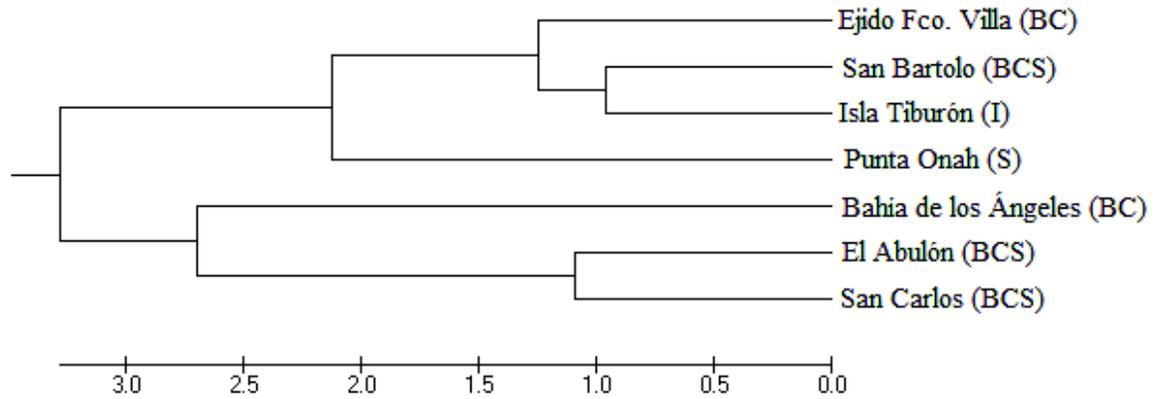


Figura 5. Dendrograma UPGMA basado en las distancias genéticas de Nei (1972) a partir del análisis de 20 loci de ISSR en 7 poblaciones de *Stenocereus gummosus*. BC = Baja California, BCS = Baja California Sur, I = isla, S = Sonora.

La prueba de Mantel dió como resultado que no existe un patrón de aislamiento por distancia entre las poblaciones de *S. gummosus* ($p = 0.5880$).

VIII. DISCUSIÓN

VIII.1. Diversidad Genética

Este trabajo reporta los resultados de un estudio sobre la diversidad genética de una cactácea del Desierto Sonorense usando marcadores ISSR. La diversidad genética de la especie fue relativamente alta comparada con la de otras plantas en general. Por otro lado la diferenciación entre poblaciones fue moderada, asociada a una mayor diversidad genética dentro que entre las poblaciones. Este trabajo representa el tercer estudio sobre la diversidad genética de cactáceas en general con los marcadores ISSR (Bustamante, 2012; Castro-Félix et al., 2013).

El valor de diversidad genética total de *Stenocereus gummosus* obtenido en este trabajo con ISSR (0.207) es un poco menor al promedio reportado para todas las especies de plantas (0.224) y plantas leñosas de ciclo de vida largo (0.253), pero se encuentra dentro del rango de variación reportado para las cactáceas columnares del Desierto Sonorense (0.139-0.239) calculados con isoenzimas (Cornejo-Romero et al., 2013; Hamrick et al. 2002, Nason et al., 2002).

Por otra parte, el valor promedio de diversidad genética dentro de las poblaciones observado en *S. gummosus* (0.1647) es ligeramente menor al promedio de variación genética reportado para plantas en general usando RAPD e ISSR como marcador molecular (0.220 en ambos) (Nybom, 2004).

En algunas especies de plantas del Desierto Sonorense se ha observado un patrón de disminución de la diversidad genética con respecto al incremento de la latitud. Este fenómeno se ha asociado a procesos de cuellos de botella ocasionados por las glaciaciones del Pleistoceno, donde regiones del sur de la península sirvieron como refugio para las especies de plantas durante estos periodos glaciales. En *Lophocereus schotti* se encontró que la

heterocigosis esperada y el porcentaje de loci polimórficos tuvieron una correlación negativa con respecto a la latitud (Nason et al., 2002). Los datos de *S. gummosus* encontrados en este trabajo no parecen apoyar la hipótesis de que las glaciaciones dejaron una huella en la diversidad genética actual como en otras especies estudiadas. Los resultados indican que la diversidad genética es mayor en el centro de la península y disminuye hacia el sur y hacia el norte. Este patrón parecería indicar que si *S. gummosus* tuvo contracciones y expansiones durante el cuaternario, los refugios ocurrieron en el centro de la península. También se ha propuesto que el patrón latitudinal de disminución de la diversidad genética puede verse afectado por el estimador que se utiliza (Widmer y Lexer, 2001). Estos autores proponen que los refugios de especies durante los periodos glaciales fueron protectores de diversidad alélica y no de diversidad genética, y que por lo tanto los efectos de cuello de botella en la diversidad genética se verían reflejados en la riqueza alélica de las poblaciones. De manera análoga, al analizar la diversidad genotípica en vez de la diversidad genética a lo largo de la península podría dar como resultado que aquellas poblaciones al sur de la distribución tendrían una mayor riqueza genotípica con respecto a las poblaciones más norteñas.

En algunas cactáceas columnares del Desierto Sonorense, como *Lophocereus schotti*, *Stenocereus thurberi* y *Pachycereus pringlei* se ha observado que los valores de diversidad genética disminuyen en poblaciones de Sonora con respecto a poblaciones de la Península de Baja California, debido a posibles migraciones desde la península hacia el continente a través de las islas (Hamrick et al., 2002). En este trabajo se detectó un patrón similar ya que los niveles de diversidad en la isla Tiburón (0.1467) y Punta Onah (0.1056), en Sonora fueron menores que en las poblaciones peninsulares más cercanas de *S. gummosus* (0.213-0.2386). Este patrón no fue detectado en *S. gummosus* usando isoenzimas como marcador molecular (Clark-Tapia y Molina-Freaner, 2003). Para resolver de manera adecuada y evaluar críticamente esta hipótesis, es necesario utilizar marcadores moleculares de mayor poder de resolución como las secuencias de ADN del cloroplasto o de algunas regiones del núcleo.

En el Desierto Sonorense sólo se tiene reporte de dos trabajos donde se analiza la diversidad genética con ISSR. El primero con zacate Buffel (*Penisetum ciliare*) (Gutiérrez-Ozuna et al. 2009) y el segundo en una cactácea columnar (*Stenocereus thurberi*) (Bustamante, 2012). Los valores de diversidad genética total de *S. gummosus* y *S. thurberi* son

muy similares (0.207 en ambos), mientras que los valores de diversidad genética intrapoblacional fueron de 0.1647 para *S. gummosus* y 0.175 para *S. thurberi*. En *S. thurberi* también se observó un valor de diversidad menor al calculado con isoenzimas, aunque para ese trabajo se analizaron diferentes poblaciones a las estudiadas con isoenzimas (Tabla V).

La comparación de la diversidad de *S. gummosus* usando diferentes marcadores muestra algunas diferencias. La diversidad genética fue menor cuando se usaron marcadores ISSR en comparación con isoenzimas, a pesar de haberse analizado las mismas poblaciones. Esto puede deberse a las diferencias en el tamaño de muestra usado en la estimación. En el presente trabajo se emplearon 97 individuos mientras que en el trabajo de Clark-Tapia y Molina-Freaner (2003) se usaron cerca de 600 individuos. A pesar de esto, los valores de diversidad intrapoblacional calculados con ISSR fueron muy similares a los reportados para isoenzimas, como en el caso de Bahía de los Ángeles, El Abulón y San Carlos en la península (Clark-Tapia y Molina-Freaner, 2003). En general son pocos los estudios que han comparado la diversidad de las mismas poblaciones usando diferentes marcadores. En el caso de *Viola pubescens*, las estimaciones de diversidad e incluso los fenogramas construídos fueron muy similares cuando se estudiaron con aloenzimas e ISSR. Sin embargo para otras especies se ha reportado valores de diversidad ligeramente mayores cuando se analizan con ISSR (Culley y Wolfe, 2001).

Tabla V.- Valores de diversidad genética y diferenciación entre poblaciones para plantas en general y cactáceas columnares del Desierto Sonorense estimados con diferentes marcadores moleculares. H_p = diversidad promedio en las poblaciones, H_t = diversidad total de la especie; G_{ST} , F_{ST} , θ_{ST} = estimadores de diferenciación genética entre poblaciones; Iso = isoenzimas.

Especie	H_p	H_t	$G_{ST}^a / F_{ST}^b / \theta_{ST}^c$	Marcador.	Ref.
Todas las especies de plantas	0.15	0.224	0.228 ^a	Iso	1
	0.22	-	0.270 ^a	RADP	2
	0.22	-	0.340 ^a	ISSR	2
Plantas leñosas de larga vida	0.177	0.253	0.228 ^a	Iso	1
	0.250	-	0.190 ^a	RADP	2
Cactáceas columnares	0.211	0.222	0.120 ^a	Iso	3
<i>Carnegiea gigantea</i>	0.129	0.139	0.075 ^a	Iso	3
<i>Lophocereus schottii</i>	0.214	0.237	0.242 ^a	Iso	3
	0.151	0.226	0.431 ^c	Iso	4
<i>Pachycereus pringleii</i>	0.212	0.231	0.076 ^a	Iso	3
<i>Stenocereus eruca</i>	0.154	-	0.337 ^c	Iso	5
<i>Stenocereus gummosus</i>	0.261	-	0.100 ^c	Iso	6
	0.1647	0.2075	0.2061 ^a	ISSR	Este trabajo
<i>Stenocereus thurberi</i>	0.201	0.239	0.128 ^a	Iso	3
	0.175	0.207	0.1951 ^c	ISSR	7

(1) Hamrick et al., 1992; (2) Nybom, 2004; (3) Hamrick et al., 2002; (4) Nason et al., (2002); (5) Clark-Tapia et al., 2005; (6) Clark-Tapia y Molina-Freaner, 2003; (7) Bustamante, 2012.

VIII.2. Estructura Genética

En cuanto a la estructura genética, los valores de diferenciación entre poblaciones de *S. gummosus* calculados con ISSR (0.2061) son ligeramente menores a los calculados para plantas en general calculados con isoenzimas e inferior al calculado con ISSR (0.340) (Nybom, 2004). Sin embargo, el valor es superior al encontrado en cactáceas columnares con isoenzimas (0.120) (Hamrick et al., 2002).

En plantas se ha predicho que aquellas especies polinizadas por vectores de poca movilidad, tendrán menor flujo génico y mayor diferenciación entre poblaciones que aquellas especies con vectores de mayor movilidad (Ouborg et al, 1999). En algunos estudios de diversidad de cactáceas columnares de la región, se ha encontrado que los valores de diferenciación (*Gst*) de *Carnegiea gigantea* y *Pachycereus pringleii* son relativamente bajos (0.075 y 0.076 respectivamente). Se cree que esto puede estar asociado al síndrome de polinización quiropterófilo de ambas especies, en el cual los murciélagos tienen una gran movilidad entre las poblaciones y promueven el flujo génico entre las mismas. Por otro lado, *Lophocereus schottii*, que es polinizado por una polilla de baja movilidad (*Upiga virecens*) (Parker y Hamrick, 1992), presenta un nivel de diferenciación genética más alta entre poblaciones (0.242). En este trabajo se determinó que el nivel de diferenciación genética entre poblaciones de *S. gummosus* (0.2061) es similar al de *L. schottii*; esto puede deberse a que el polinizador de *S. gummosus*, el cual es un esfíngido (Clark-Tapia y Molina-Freaner, 2003), también tiene poca habilidad para la dispersión de polen a larga distancia al igual que el polinizador de *L. schottii* (Holland, 1999). Por otra parte *Stenocereus eruca*, la cual es especie hermana de *S. gummosus*, tiene también una alta diferenciación entre poblaciones, debido a que se reproduce principalmente de manera clonal y a que existen problemas de limitación de movilidad de polen entre poblaciones (Clark-Tapia et al., 2006).

VIII.3. Distancias genéticas

El aislamiento por distancia es un patrón en el que las poblaciones cercanas son genéticamente más similares que las poblaciones distantes. Este patrón se ha reportado en *Agave deserti* en el Desierto Sonorense (Navarro-Quezada et al., 2006), pero no se ha reportado para cactáceas columnares de la región. Similar a lo reportado por Clark-Tapia y Molina-Freaner (2003), no se encontró un patrón de aislamiento por distancia entre las poblaciones *S. gummosus*. Esto sugiere que esta especie pudo haber colonizado recientemente nuevas localidades, que puede haber eventos de migración a grandes distancias o que la dispersión a través del polen o

semillas no ha sido bien estudiada (Slatkin, 1993). Aunque se conoce quién es el polinizador, no se ha documentado quién dispersa las semillas de esta especie.

Por otro lado, se sabe que el flujo genético previene la diferenciación entre poblaciones causados por la deriva genética y las adaptaciones locales. En general los valores encontrados de flujo génico (Nm) son 0.124 para especies auto compatibles, 0.90 para especies con sistemas reproductivos mixtos y 1.43 para especies que favorecen el entrecruzamiento (Riesenberg y Burke, 2001). En este trabajo el valor de obtenido de Nm fue 0.9630 en *S. gummosus*, lo que sugiere que el flujo génico entre poblaciones es relativamente bajo y es similar al valor observado para especies con sistemas reproductivos mixtos. Esto contrasta con lo obtenido en este trabajo con *S. gummosus*, ya que esta especie autoincompatible y favorece el entrecruzamiento (Clark-Tapia y Molina-Freaner, 2006).

Las distancias genéticas entre pares de poblaciones pueden ayudar a explicar cómo se relaciona la diversidad genética entre las poblaciones. Los valores de distancias genéticas en las poblaciones de *S. gummosus* variaron entre 0.0269 – 0.1243, lo cual fue mayor a lo calculado por Clark-Tapia y Molina-Freaner (2003) con isoenzimas. El fenograma de *S. gummosus* construido a partir de estas distancias genéticas obtenida con ISSR muestra a la población de Sonora y la Isla del Tiburón anidada con las poblaciones del centro y sur de la península de Baja California. Este agrupamiento de las poblaciones parece apoyar la hipótesis de Cody et al (2002) de que *S. gummosus* migró de Baja California a Sonora a través de las islas del Golfo de California. Sin embargo, la evaluación crítica de esta hipótesis requiere de datos de secuencias de ADN, las cuales tienen mayor poder de resolución para este tipo de problemas.

IX. CONCLUSIONES

En este trabajo se evaluaron los niveles de diversidad genética dentro y entre las poblaciones de *Stenocereus gummosus*. A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que la diversidad genética total de *S. gummosus* es relativamente alta.

La mayor diversidad se encuentra dentro de las poblaciones y existe una diferenciación moderada entre poblaciones. No se encontró un patrón de disminución de la diversidad genética con el incremento en la latitud, reportado en otros trabajos de plantas de la región, aunque los datos sugieren que el refugio para esta especie durante las glaciaciones del Pleistoceno fue el centro de la península. Se reporta la disminución de la diversidad genética en poblaciones de Sonora con respecto a poblaciones de la península, lo que concuerda con la hipótesis de origen de dispersión a partir de poblaciones ancestrales de la península.

X. LITERATURA CITADA

- Artschwager, M. 1996. Healing with plants in the american and mexican west. The University of Arizona Press. Tucson, Estados Unidos de América.
- Booy, G. 2000. Genetic Diversity and the Survival of Populations. *Plant Biology* 2: 379-395.
- Bravo-Hollis, H. 1991. Las cactáceas de México (Vol. III). Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México.
- Bustamante, E. 2012. Efectos de escala en la biología reproductiva, dinámica poblacional y estructura genética de *Stenocereus thurberi* (Engelm.) Buxb. (Cactaceae). Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México.
- Castro-Félix, P., V. Rosas-Espinoza, B. Díaz-Cárdenas, L. Pérez-Valencia, F. Huerta-Martínez, A. Santerre. 2013. Genetic diversity within a declining natural population of *Ferocactus histrix* (DC) Lindsay. *Plant Species Biology* doi: 10.1111/1442-1984.12028.
- Clark-Tapia, R., y F. Molina-Freaner. 2003. The genetic structure of a columnar cactus with a disjunct distribution: *Stenocereus gummosus* in the Sonoran desert. *Heredity* 90: 443-450.
- Clark-Tapia, R., C. Alfonso-Corrado, L. E. Eguiarte y F. Molina-Freaner. 2005. Clonal diversity and distribution in *Stenocereus eruca* (Cactaceae), a narrow endemic cactus of the Sonoran Desert. *American Journal of Botany* 92: 272-278.
- Clark-Tapia, R., C. Alfonso-Corrado, M. C. Mandujano y F. Molina-Freaner. 2006. Reproductive consequences of clonal growth in *Stenocereus eruca*, a rare clonal cactus of the Sonoran desert. *Evolutionary Ecology* 20: 131-142.
- Cody, M. L., J. Rebman, R. Moran y H.J. Thompson. 2002. Plants. En Case, T. J., Cody M. L. y E. Ezcurra (Eds.), *A new Island Biogeography of the Sea of Cortés*. Oxford University Press. California, Estados Unidos de América.
- Cornejo-Romero, A., C. F. Vargas-Mendoza, P. L. Valverde y B. Rendón-Aguilar. 2013. Estructura y filogeografía en cactáceas. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 58: 4-28.

- Culley, T. M., y A. D. Wolfe. 2001. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity* 86: 545-556.
- Doyle, J. L., y J. J. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Eguiarte, L., J. Aguirre, L. Jardón, E. Aguirre y V. Souza. 2013. Genómica de poblaciones: nada en evolución va a tener sentido si no es a luz de la genómica, nada en genómica tiene sentido si no es a la luz de la evolución. *Revista Especializada de Ciencias Químico-Biológicas* 16: 42-56.
- Fehlberg, S. D. y T. A. Ranker. 2009. Evolutionary history and phylogeography of *Encelia farinosa* (Asteraceae) from the Sonoran, Mojave, and Peninsular Deserts. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50: 326-335.
- Freeland, J. R., S. Petersen, y H. Kirk. 2011. *Molecular Ecology*. John Wiley y Sons, Ltd. Canadá.
- Garrick, R. C., J. D. Nason, C. A. Meadows, y R. J. Dyer. 2009. Not just vicariance: phylogeography of a Sonoran Desert euphorb indicates a major role of range expansion along the Baja peninsula. *Molecular Ecology* 18: 1916-1931.
- Gibson, A. C. 1989. The systematics and evolution of subtribe Stenocereinae. 7. The Machaerocerei of *Stenocereus*. *Cactus and Succulent Journal* 61: 104-112.
- Gupta, M., Y. S. Chyi, J. Romeroseverson, y J. L. Owen. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 998-1006.
- Gutiérrez-Ozuna, R. 2006. Estructura clonal del zacate buffel (*Pennisetum ciliare* L. Link) en el noroeste de México. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México.
- Gutiérrez-Ozuna, R., L. E. Equiarte y F. Molina-Freaner. 2009. Genotypic diversity among pasture and roadside populations of the invasive buffelgrass (*Pennisetum ciliare* L. Link) in north-western Mexico. *Journal of Arid Environments* 73: 26-32.
- Hamrick, J. L., Y. Linhart y J. B. Mitton. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 10: 173-200.
- Hamrick, J. L. 1982. Plant-population genetics and evolution. *American Journal of Botany* 69: 1685-1693.

- Hamrick, J. L., M. J. Godt y S. L. Sherman-Broyles. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest* 6: 95-142.
- Hamrick, J. L., y M. J. W. Godt. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series Biological Sciences* 351: 1291-1298.
- Hamrick, J. L., J. D. Nason y T. H. Fleming. 2002. Genetic diversity in columnar cacti. En: Fleming T. y A. Valiente-Banuet. (Eds.), *Evolution, ecology and conservation of columnar cacti and their mutualists* (pp. 122-133). Arizona University Press. Tucson, Estados Unidos de América.
- Hartl, D., y A. Clark. 2007. *Principles of population genetics*. Sinauer. Massachusetts, Estados Unidos de América.
- Hedrick, P. 2005. *Genetics of populations*. Jones and Bartlett. Estados Unidos de América.
- Hernández-Hernández, T., H. M. Hernández, J. A. De-Nova, R. Puente, L. E. Eguiarte, y S. Magallón. 2011. Phylogenetic relationships and evolution of growth in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). *American Journal of Botany* 98: 44-61.
- Hewitt, G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.
- Holland, J. N. 1999. Mutualistic interaction between *Upiga virescens* (Pyralidae), a pollinating seed-consumer, and *Lophocereus schotti* (Cactaceae). *Ecology* 80: 2074-2084.
- Laikre L., M. K. Schwartz, R. Waples, N. Ryman y The GeM Working Group. 2013. Compromising genetic diversity in the wild: unmonitored large-scale release of plants and animals. *Trends in Ecology and Evolution* 25: 520-529.
- Lewontin, R. 1972. Appointment of human diversity. *Evolutionary Biology* 6: 381-398.
- Lewontin, R. y J. L. Hubby. 1966. A molecular approach to study of genetic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54: 595-609.
- Llorente-Bousquets, J. y S. Ocegueda. (2008). Estado del conocimiento de la biota, en Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. En Conabio (Ed.), *Capital Natural de México*. Distrito Federal, México.
- Miller, M. 1997. *Tools for population genetic analysis (TFPGA)*. Arizona, Estados Unidos de América.
- Molina-Freaner, F., y R. Clark-Tapia. 2005. Clonal diversity and allelic relationships between two closely related species of columnar cacti from the Sonoran Desert: *Stenocereus eruca* and *Stenocereus gummosus*. *International Journal of Plant Sciences* 166: 257-264.

- Molina-Freaner, F., Markow, T. A., Pfeiler, E. J., Rojas-Soto, O. R., Varela-Romero, A., Quijada-Mascareñas, Quijada-Mascareñas, Esqueda, M. y Yépiz-Plascencia, G. 2010. Diversidad genética de la biota. En Molina-Freaner F. y T. R. Van Devender (Eds.), *Diversidad Biológica del estado de Sonora* (pp. 97-129). Universidad Nacional Autónoma de México. Hermosillo, Sonora, México.
- Nason, J. D., J. L. Hamrick, y T. H. Fleming. 2002. Historical vicariance and postglacial colonization effects on the evolution of genetic structure in *Lophocereus*, a Sonoran Desert columnar cactus. *Evolution* 56: 2214-2226.
- Navarro-Quezada, A., R. González-Chauvet, F. Molina-Freaner, L. E. Eguiarte. 2003. Genetic differentiation in the *Agave deserti* (Agavaceae) complex in the Sonoran desert. *Heredity* 90: 220-227.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist* 106: 283-295
- Nei, M. 1978. *Molecular evolutionary ecology*. Columbia University Press. Nueva York, Estados Unidos de América.
- Nobel, P. S. 2002. *Cacti: biology and uses*. University of California Press. Berkeley, Estados Unidos de América.
- Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13: 1143-1155.
- Ouborg, N. J., Y. Piquot y J. M. van Groenendael. 1999. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology* 8: 551-568.
- Parker, K. C., y J. L. Hamrick. 1992. Genetic diversity and clonal structure in a columnar cactus, *Lophocereus-schottii*. *American Journal of Botany* 79: 86-96.
- Piñero, D. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México *Capital natural de México* (Vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad, (pp. 437-494). México: CONABIO.
- Reddy, M. P., N. Sarla, y E. A. Siddiq. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.
- Riesenberg, H. L. y J. M. Burke. 2001. The biological reality of species: gene flow, selection, and collective evolution. *Taxon* 50: 47-67.
- Roughgarden, J. 1979. *Theory of Populations Genetics and Evolutionary Ecology: An Introduction*. Macmillan Publishing. Estados Unidos de América.

- Scheinvar-Gottdiener, E. 2008. Genética de poblaciones silvestres y cultivadas de dos especies mezcaleras: *Agave cupreata* y *Agave potatorum*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México.
- Schlotterer, C. 2004. The evolution of molecular markers just a matter of fashion?. *Nature Reviews Genetics* 5: 63-69.
- Selkoe, K. A., y R. J. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellites markers. *Ecology Letters* 9: 615-629.
- Slatkin, M. y N. H. Barton. 1989. A comparison of three different methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43: 1349-1368.
- Slatkin, M. 1993. Isolation by Distance in Equilibrium and Non-Equilibrium Populations. *Evolution* 47: 264-279.
- Tinoco, A., A. Casas, R. Luna y K. Oyama. 2005. Population genetics of *Escontria chiotilla* in wild and silvicultural managed populations in the Tehuacan Valley, Central Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52: 525-538.
- Tsumura, Y., K. Ohba, y S. H. Strauss. 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theoretical and Applied Genetics* 92: 40-45.
- Turner, R. M., J. E. Bowers y T. L. Burgess. 1995. Sonoran Desert plants: An ecological atlas. *Sonoran Desert plants: An ecological atlas*. University of Arizona Press. Arizona, Estados Unidos de América.
- Vargas-García, J. 2000. Impacto de la formación de la Península de Baja California sobre la estructura genética de *Bursera hindsiana*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México.
- Widmer, A. y C. Lexer. 2001. Glacial refugia: sanctuaries for allelic richness, but not for gene diversity. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 267-269.
- Wolfe, A. D. 2005. ISSR techniques for evolutionary biology. *Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data* 395: 134-144.
- Yeh, F. C., y T. J. Boyle. 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany* 129: 157.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski y D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain-reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

Apéndice 1

Protocolo de extracción propuesto de Doyle y Doyle (1987) y modificado por Gutiérrez-Ozuna (2006).

- 1.- Se molió en un mortero de porcelana, previamente esterilizado y lavado con alcohol al 71%, alrededor de 0.5 g de tejido congelado hasta obtener un polvo fino.
- 2.- Se agregaron 260 μ l de buffer de extracción CTAB y 975 μ l de buffer STE, mientras se sigue moliendo hasta eliminar grumos. Recuperar este líquido en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.
- 3.- Se centrifugaron las muestras a 12,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 8 minutos.
- 4.- Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la muestra con ayuda de vortex con 250 μ l de CTAB y 750 μ l de STE, de nuevo se usó el vortex para homogeneizar la muestra.
- 5.- Se centrifugaron las muestras de nuevo a 12,000 rpm por 8 minutos.
- 6.- Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la muestra con 600 μ l de CTAB 2X.
- 7.- Se agregaron 4 μ l de RNasa (a una concentración de 7000 Unidades/ml) y se incubaron a 37°C por 20 minutos.
- 8.- Se agregó 25 μ l de proteinasa-K (20mg/ml) a cada muestra y se incubaron a 65 °C durante 30 minutos.
- 9.- Se incubaron las muestras en hielo durante 15 minutos.
- 10.- A cada muestra se le agregó 600 μ l de cloroformo:octanol 24:1, y se agitaron hasta homogeneizar.
- 11.- Se centrifugaron las muestras a 9,000 rpm durante 12 minutos.
- 12.- Se trasladó el sobrenadante a otro tubo Eppendorf de 1.5 ml con ayuda de una micropipeta de 100 μ l procurando no tocar la capa que separaba las fases.
- 13.- Se precipitó el ADN con 600 μ l de isopropanol frío.
- 14.- Se dejaron reposar las muestras durante 24 horas en un congelador a -4 °C.
- 15.- Se centrifugaron las muestras a 12,500 rpm durante 7 minutos y se eliminó el sobrenadante.
- 16.- Se limpió el ADN al agregar 1 ml de alcohol al 70% agitando suavemente durante 5 minutos.
- 17.- Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente. Se resuspendió el pellet con 100 μ l de agua ultrapura fría.

Apéndice 2

Preparación de buffers de extracción CTAB2X, CTAB y STE.

BUFFER DE EXTRACCIÓN CTAB2X

- Tris-HCl 100mM pH8
- NaCl 1.4 M
- EDTA 20mM pH8
- CTAB 2%
- Opcional: PVP40 4% p/v (remueve compuestos. fenólicos, alcaloides y estabiliza enzimas)
- Opcional: Ac. Ascórbico 0.1% p/v
- Opcional: DIECA 0.1% p/v
- Opcional: Polietilen Glicol 4% p/v (captura azúcares de alto p.m. Si se utiliza es necesario un lavado posterior con CTAB2X sin PEG)
- β -mercaptoetanol 0.3% (agregar hasta el momento de usar el buffer)

1. Preparar solución 0.5 M de Tris (la cantidad a preparar se calcula en el paso 4) y ajustar pH a 8 con HCL
2. Preparar solución 3.0 M de NaCl (la cantidad a preparar se calcula en el paso 4)
3. Preparar solución 0.5M de EDTA (la cantidad a preparar se calcula en el paso 4) y ajustar pH a 8 con NaOH
4. Preparar solución de Tris-HCl 100mM, NaCl 1.4M y EDTA 20mM
5. Agregar (en gramos) 2% del volumen total de CTAB y de compuestos opcionales
6. Aforar con agua destilada al volumen final
7. Al momento de utilizar, agregar 0.3% de β -mercaptoetanol
8. Guardar en frasco ámbar.

BUFFER DE EXTRACCIÓN CTAB

- Tris-HCL 100mM pH8

- NaCl 1.5M
- EDTA 20mM pH8
- CTAB 4%
- PVP40 4%
- Ácido Ascórbico 0.1%
- DIECA 0.1%
- β -mercaptoetanol 0.3 % (agregar hasta el momento de usar el buffer)

- 1.- Preparar solución 0.5 M de Tris (la cantidad a preparar se calcula en el paso 4) y ajustar pH a 8 con HCL
- 2.- Preparar solución 3.0 M de NaCl (la cantidad a preparar se calcula en el paso 4)
- 3.- Preparar solución 0.5M de EDTA (la cantidad a preparar se calcula en el paso 4) y ajustar pH a 8 con NaOH
- 4.- Preparar solución de Tris-HCl 100mM, NaCl 1.5M y EDTA 20mM
- 5.- Agregar (en gramos) 4% del volumen total de CTAB, 4% de PVP40, .01% de Ac. Ascórbico y 0.1% de DIECA
- 6.- Aforar con agua destilada al volumen final
- 7.- Al momento de utilizar, agregar 0.3% de β -mercaptoetanol

BUFFER DE EXTRACCION STE

- Tris-HCl 100mM pH8
- EDTA 50 mM pH8
- NaCl 100mM
- β -mercaptoetanol 0.3% (agregar hasta el momento de usar el buffer)

- 1.- Preparar solución 0.5 M de Tris (la cantidad a preparar se calcula en el paso 4) y ajustar pH a 8 con HCL
- 2.- Preparar solución 3.0 M de NaCl (la cantidad a preparar se calcula en el paso 4)
- 3.- Preparar solución 0.5M de EDTA (la cantidad a preparar se calcula en el paso 4) y ajustar pH a 8 con NaOH
- 4.- Preparar solución de Tris-HCl 100mM, NaCl 100mM y EDTA 50mM

6.- Aforar con agua destilada al volumen final

7.- Al momento de utilizar, agregar 0.3% de β -mercaptoetanol

Apéndice 3

Apéndice 3. Tamaño de las fragmentos amplificados por el primer UBC-841 en 97 individuos de *Stenocereus gummosus*.

#	Locus	Tamaño aproximado (pb)
1	A	1840
2	B	1702
3	C	1565
4	D	1451
5	D.1	1337
6	E	1200
7	F	1136
8	G.1	1056
9	G.2	992
10	H	930
11	I	912
12	I.1	848
13	J	800
14	K	680
15	K.1	640
16	L	610
17	L.1	530
18	M	510
19	M.1	470
20	N	400

Apéndice 4

Matriz de distancias genéticas (D) calculado basado en Nei (1973).

	1	2	3	4	5	6	7
Ejido Fco. Villa	****						
Bahía de los Ángeles	0.074	****					
El Abulón	0.1243	0.0473	****				
San Carlos	0.0931	0.0813	0.0332	****			
San Bartolo	0.0273	0.0594	0.0628	0.0338	****		
Isla Tiburón	0.0334	0.0452	0.0579	0.071	0.0269	****	
Punta Onah	0.0574	0.071	0.0993	0.0934	0.0344	0.0509	****