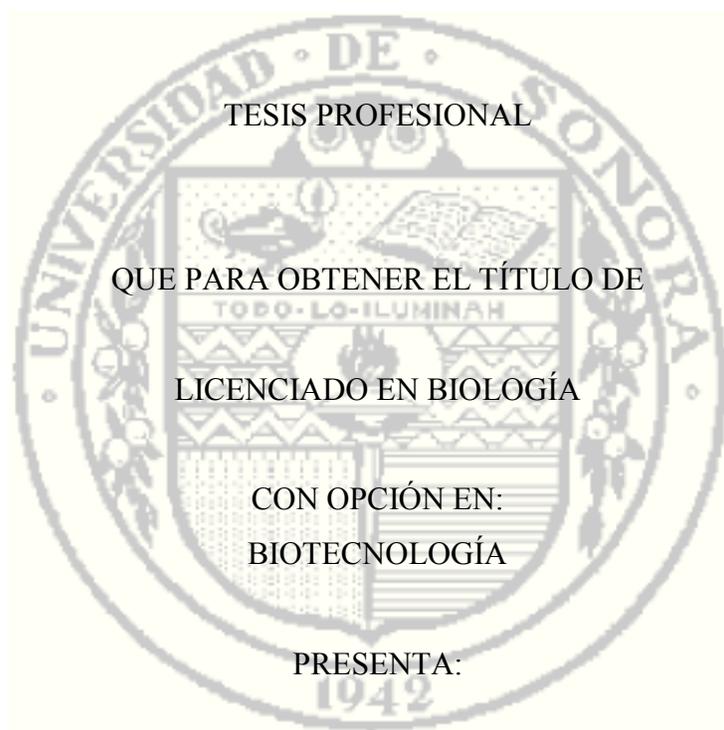


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

DIVERSIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES DE *Echinocereus leucanthus* N.P.
Taylor, UNA CACTÁCEA EN LA NOM-ECOL-059, EN EL ESTADO DE SONORA,
USANDO MARCADORES MOLECULARES ISSR



RUTH VERÓNICA RIVERA AGUIRRE

Hermosillo, Sonora

Febrero de 2015

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 Ruth Verónica Rivera Aguirre 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



Dra. Ángela Corina Hayano Kanashiro

Sinodal Secretario



Dra. María Cristina Peñalba Garmendia

Sinodal



Dra. Gloria Irma Ayala Astorga

Suplente

DEDICATORIA

Con cariño a mi familia:

Especialmente a mi madre, quien me ha dado todo su tiempo, cariño y apoyo incondicional durante toda mi vida y quien se ha esforzado arduamente para poder terminar mis estudios, por eso es la persona que más admiro y amo con todo mi corazón. Muchas gracias mamá, sin ti nunca lo habría logrado. Te amo.

"Lo admirable no es que existan las estrellas sino que el hombre haya podido dar cuenta de su existencia."

Anatole France

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora por mi formación profesional, por brindarme la oportunidad de pertenecer a esta institución, por las oportunidades y facilidades que ésta provee a sus alumnos y por permitirme el conocer a grandes amigos. A todo el personal docente de la Licenciatura en Biología que participo directamente en mi formación académica.

Al laboratorio de Ecología Molecular y Funcional de la Unidad Regional Noroeste de la Universidad Nacional Autónoma de México por acogerme para llevar a cabo mi tesis profesional.

A mi director de tesis, el **Dr. Francisco E. Molina Frenaner** por confiar en mí y darme la oportunidad de trabajar con él. Por su conocimiento, paciencia, apoyo y tiempo brindado durante la realización de mi tesis. Fue un gran honor trabajar con usted, aprendí muchas cosas que me servirán en mi vida profesional.

A mi comité de tesis; La **Dra. Maria Cristina Peñalba Garmendia**, la **Dra. Ángela Corina Hayano** y la **Dra. Gloria Irma Ayala Astorga** por su tiempo, sus consejos y valiosos aportes durante el desarrollo de este trabajo.

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

A **Anabel Margarita Díaz Martínez** del Instituto de Ecología de la UNAM por su valiosa ayuda en la tesis.

A mi familia por apoyarme y darme la oportunidad de concluir mis estudios de licenciatura.

A mis compañeros del Z15, donde conocí a grandes y queridos amigos, muchas gracias por brindarme su amistad, tiempo y valiosos consejos durante estos últimos 5 años.

A mis amigos que me apoyaron desde el inicio de este proyecto, muchas gracias por su infinita amistad, paciencia y apoyo.

A mis compañeros del laboratorio, por su valiosa ayuda durante mi trabajo experimental y por sus valiosos consejos.

CONTENIDO

	Página
FORMATO DE APROBACIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
CONTENIDO	v
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS	viii
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
II.1. Variabilidad Genética	4
II.1.1. Marcadores moleculares	5
II.1.1.1 Marcadores moleculares ISSR	6
II.1.2 Genética de la conservación	7
II.1.2.1 Estudios de conservación con ISSR	8
II.1.3. Diversidad Genética de Plantas en México	9
II.1.3.1 Diversidad genética de plantas sonorenses	10
II.2 Generalidades de Cactáceas	11
II.3 Amenazas a las Cactáceas	12
II.3.1 La Norma Oficial Mexicana NOM-059 SEMARNAT 2010	14
II.3.1.1 Las cactáceas en la NOM-ECOL-059	15
II.4 Género Echinocereus	15
II.4.1 Ecología y descripción de <i>Echinocereus leucanthus</i>	16
III. JUSTIFICACIÓN	20
IV. HIPÓTESIS	21
V. OBJETIVOS	22

V.1 Objetivo General	22
V.2 Objetivos Específicos	22
VI. METODOLOGÍA	23
VI.1 Sitios de Muestreo	23
VI.2 Colecta de Muestras	28
VI.3. Extracción de ADN	29
VI.3.1 Análisis preliminar de secuencias del ADN del cloroplasto	29
VI.4. Amplificación de ISSR	30
VI.5. Lectura de Geles	33
VI.6. Análisis de Datos	33
VII. RESULTADOS	35
VII.1. Secuencias del Cloroplasto	35
VII.2. ISSR	35
VII.3. Diversidad Genética de las Poblaciones	37
VIII. DISCUSIÓN	43
VIII.1. Diversidad Genética	43
VIII.2. Diferenciación Genética	46
VIII.3 Patrón Geográfico	47
VIII.4. Perspectivas de Conservación	48
IX. CONCLUSIONES	49
X. LITERATURA CITADA	50
XI. APÉNDICES	58

LISTA DE TABLAS

Tabla I.	Localización geográfica de las poblaciones estudiadas de <i>Echinocereus leucanthus</i> en este trabajo. El tipo de vegetación para todas las poblaciones fue matorral espinoso costero (DMM= Grados, minutos y fracciones de minutos en decimales)	25
Tabla II.	Parejas de primers utilizados para el análisis de secuencias del cloroplasto	30
Tabla III.	Volumen utilizado para el PCR con el iniciador ISSR 840.	31
Tabla IV.	Programa de amplificación PCR utilizado para el primer ISSR 840	32
Tabla V.	Poblaciones de <i>E. leucanthus</i> analizadas y el número de individuos analizados por población	36
Tabla VI.	Parámetros de diversidad genética para las cinco poblaciones estudiadas de <i>E. leucanthus</i> . Tamaño de muestra (N), porcentaje de loci polimórficos (criterio 95%), heterocigosis esperada (H) e índice de diversidad de Shannon (I)	38
Tabla VII.	Análisis de varianza molecular (AMOVA) para las 5 poblaciones de <i>E. leucanthus</i> estudiadas en este trabajo (g.l: grados de libertad)	39
Tabla VIII.	Valores de diversidad genética para varias especies de cactáceas estudiadas en México. He: diversidad genética de Nei; Fst: diferenciación genética	44
Tabla IX.	Valores de diversidad genética para varias especies amenazadas que han sido evaluadas con marcadores ISSR. He: diversidad genética de Nei; I: índice de diversidad de Shannon; Fst: diferenciación genética	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotografía de un individuo de <i>Echinocereus leucanthus</i> durante el periodo de floración a principios de mayo del 2012 en la población de Las Guásimas (Autor: Ruth Rivera)	18
Figura 2	Fotografía de <i>E. leucanthus</i> en la población de Las Bocas durante el periodo de lluvias, a principios de julio del 2013. Nótese la diferencia de coloración entre ambos individuos en diferentes épocas del año (Autor: Ruth Rivera)	19
Figura 3	Distribución estimada de <i>E. leucanthus</i> , especie endémica del sur de Sonora y norte de Sinaloa, basada en la literatura (Taylor, 1985) y registros de herbario.	24
Figura 4	Distribución del desierto sonorense y el matorral espinoso (A) en el noroeste de México. Poblaciones de <i>E. leucanthus</i> muestreadas en este estudio: Cruz de Piedra; Camahuiroa; Las Bocas; Bajerobeta (Bachoco); Las Guásimas, en el contexto de la distribución de las zonas agrícolas Valle del Yaqui y Valle del Mayo, y las granjas acuícolas en el sur del Estado de Sonora. (Fuente: Google Earth y Dimmitt, 2000 modificado por la Dra. Anabel)	26
Figura 5, 6 y 7	Fotografías de las poblaciones: Las Bocas (arriba izquierda), Camahuiroa (arriba derecha) y Bajerobeta (abajo izquierda) nótese en la figura 7 al fondo el manglar.	27
Figura 8	Muestra colectada aun sin etiquetar de <i>E. leucanthus</i> en la población de Las Bocas	28
Figura 9	Bandas visualizadas en geles de agarosa al 1% con el primer ISSR 840, para la población Camahuiroa de <i>E. leucanthus</i> (en negro se muestran los individuos que no amplificaron y por tanto no fueron tomas en	37

	cuenta para los análisis posteriores)	
Figura 10	Dendrograma UPGMA basado en las distancias genéticas de Nei encontradas a partir de los datos obtenidos con el primer ISSR 840 de 5 poblaciones de <i>E. leucanthus</i> .	40
Figura 11	Índice de diversidad de Shannon como función de la latitud de las poblaciones estudiadas. Nótese como se observa una disminución conforme aumenta la latitud	41
Figura 12	Valores de la heterocigosis esperada (H_e) como función de la latitud de las poblaciones estudiadas. Nótese cómo se observa una disminución conforme aumenta la latitud.	42

RESUMEN

Echinocereus leucanthus es una cactácea endémica de México, sujeta a protección especial por la NOM-ECOL-059-2010. Su distribución se restringe al sur del Estado de Sonora y norte de Sinaloa. Solo existe un estudio ecológico previo y una población bien ubicada de esta especie en Las Guásimas, Guaymas. En este trabajo se analizó la diversidad genética de 5 poblaciones sonorenses de *E. leucanthus* utilizando marcadores moleculares ISSR. Las poblaciones colectadas de *E. leucanthus* se localizan en una matriz de diferente tipo de perturbación antropogénica. El valor de la diversidad genética de esta especie usando el índice de Nei fue de 0.297 y el valor para el índice de Shannon fue de 0.442, valores similares a los reportados para otras cactáceas de zonas áridas y plantas amenazadas en distintas partes del mundo. Los valores de diversidad genética de las poblaciones mostró un patrón latitudinal: los valores más bajos de diversidad genética fueron registrados en la población Cruz de Piedra, mientras que los valores más altos se registraron en la población de Camahuiroa. Sin embargo, el análisis de regresión lineal no mostró una relación significativa entre diversidad genética y latitud, probablemente debido a que solo se emplearon 5 poblaciones. El análisis de aislamiento por distancia reveló que para esta especie no existe una correlación significativa entre las distancias genéticas y las distancias geográficas. Dado el estatus de especie bajo protección especial y el patrón latitudinal de diversidad genética registrada en este estudio, los programas de conservación priorizan la protección de las poblaciones sureñas y posiblemente el establecimiento de una reserva ecológica en el matorral espinoso costero en la región de Las Bocas y Camahuiroa.

I. INTRODUCCIÓN

México cuenta con una gran diversidad biológica; es uno de los cinco países mega diversos, los cuales en conjunto poseen más del 70% de la diversidad biológica conocida del planeta. México posee el 12% de la riqueza biológica del planeta y aproximadamente el 50% de las especies mexicanas son endémicas (CONABIO, 2013); ocupa además el decimocuarto lugar del mundo en superficie y el primero en riqueza de reptiles, segundo en mamíferos y cuarto en anfibios y plantas (Llorente-Bousquest y Ocegueda, 2008).

Con respecto a las plantas, en nuestro país han sido descritas alrededor de 26,500 especies de plantas lo cual lo ubica como uno de los mayores centros de diversidad florística del mundo. Se calcula que la mitad son endémicas, las cuales se concentran principalmente en zonas áridas y semiáridas (CONABIO 2013).

Esta gran diversidad de especies es resultado de la compleja y variada topografía y geología que dan como resultado diversos microclimas y suelos que se encuentran a lo largo de todo el país. Uno de los factores importantes es la ubicación latitudinal de México, ya que éste es un punto de transición entre dos regiones biogeográficas; la Neártica y la Neotropical las cuales tienen una extensa historia evolutiva que han constituido un factor clave para la evolución de la especies del país (Espinosa et al., 2008).

Una de las familias más representativas de nuestro país es la familia de las Cactáceas. La familia Cactaceae es endémica del continente americano, aunque se han introducido como especies exóticas en otras partes del mundo. Se han descrito un total de 1810 especies (Anderson 2001) y en México hasta la década de los 90s se contaban 850 (Arias-Montes 1993), lo cual equivale al 40% de las especies totales de la familia. La mayoría de estas especies se encuentra en matorrales xerófilos y se calcula que un total de 715 son endémicas de México (Arias-Montes, 1993).

Las principales amenazas a la biodiversidad del mundo son la pérdida y degradación de hábitats, la sobreexplotación de recursos, la contaminación y las invasiones biológicas (Groom et al., 2006). Para el caso particular de las cactáceas de México, las principales amenazas son la extracción ilegal del medio silvestre y la destrucción y modificación del hábitat (Arias-Montes, 1993). Las cactáceas son muy apreciadas en el mercado internacional de plantas ornamentales, generalmente en Estados Unidos y Europa, por lo que se extraen ilegalmente de los hábitats naturales para transportarse a los mercados internacionales, práctica que amenaza seriamente a la especies de distribución restringida o poblaciones pequeñas. Por otra parte, la destrucción y modificación del hábitat afecta en enorme medida a aquellas especies con distribución restringida (Arias-Montes, 1993).

Las cactáceas son, junto con las orquídeas y las cícadadas, las plantas más amenazadas de nuestro país. En México, se han elaborado diversos instrumentos legales para la protección de las cactáceas y otras plantas que se encuentran en peligro de extinción. Por ejemplo, la NOM-059-ECOL (SEMARNAT, 2010) provee de un marco legal para la protección de 255 taxones, entre especies y subespecies de esta familia de plantas (SEMARNAT, 2010)

Esta norma incluye tres categorías de riesgo basándose los siguientes criterios: características de la distribución geográfica, características del hábitat, vulnerabilidad biológica intrínseca e impacto de la actividad humana. Las categorías son las siguientes: a) En peligro de extinción, b) Amenazada y c) Sujeta a protección especial (SEMARNAT, 2010). En general se considera que las especies tienen diferente susceptibilidad a la extinción, dependiendo de su historia evolutiva, su ecología y el impacto de la actividad humana, entre otros factores. Sin embargo es bien conocido que las especies con distribución restringida y poblaciones pequeñas suelen ser más susceptibles a la extinción debido a 3 razones principales: tienden a tener menor variabilidad genética, y son más propensas a ser afectadas por las fluctuaciones del medio ambiente, así como por las fluctuaciones demográficas (Primack et al., 2001).

El principal problema que genera la pérdida de la diversidad genética es que “la capacidad de una población de adaptarse a un ambiente cambiante depende de su variabilidad genética” (Primack et al., 2001). Esto se debe a que entre mayor diversidad genética exista, mayor será la capacidad de respuesta de los individuos presentes en las poblaciones ante presiones ambientales. En resumen, las poblaciones pequeñas suelen ser más propensas a la extinción debido a factores genéticos, demográficos y ambientales (Rocha y Gasca, 2007). En este trabajo de tesis se aborda el estudio de la diversidad genética de *Echinocereus leucanthus*, una especie de distribución restringida en el Estado de Sonora y que se encuentra bajo la categoría "sujeta a protección especial" en la Norma Oficial Mexicana 059.

II. ANTECEDENTES

II.1 La Variabilidad Genética

La variabilidad o diversidad genética es el componente más básico de la biodiversidad y se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones de cada especie. El resto de la biodiversidad se deriva de los procesos evolutivos que operan sobre esas variaciones (Piñeiro et al., 2008).

El conocimiento y comprensión de la diversidad genética de las especies son de vital importancia tanto para la conservación como para la salud pública, la sustentabilidad, la biomedicina, la productividad agrícola, pecuaria, pesquera y forestal (Rozzi et al., 2001). La evidencia sobre diversos aspectos de la diversidad genética puede ayudar a responder preguntas sobre cómo las especies o poblaciones pueden responder frente a presiones ambientales y sus consecuencias como adaptación, especiación y extinción (Piñeiro et al., 2008).

En México, hasta ahora se han estudiado cerca de 200 especies desde el punto de vista genético, incluyendo desde microorganismos hasta árboles y mamíferos. En comparación con la riqueza de especies mexicanas, el número de estudios sobre la variabilidad genética de las especies es minúsculo, pero representa un gran avance que produce nueva información (Piñeiro et al., 2008).

Alrededor de un tercio de la vegetación del territorio nacional corresponde a zonas áridas, mismas que pueden dividirse en Desierto Chihuahuense, Desierto del Valle de Tehuacán y Desierto Sonorense. Estos desiertos albergan una buena cantidad de endemismos que hacen que la biodiversidad de México sea rica en especies restringidas a nuestro país, por lo que el análisis de diversidad genética de sus especies es particularmente importante (Piñeiro et al., 2008).

II.1.1 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son herramientas que ayudan a describir la variabilidad genética. En un inicio se utilizaban otro tipo de técnicas para describir la variación, como caracteres morfológicos pero estos eran bastante inexactos. Con el paso de los años y el desarrollo de la tecnología, se desarrollaron otros métodos para estimar la variabilidad, basados en enzimas (Isoenzimas). Dichas enzimas podían presentar varias formas alélicas y eran llamadas aloenzimas, y por eso se utilizaban como marcadores hereditarios para cuantificar las frecuencias alélicas y genotípicas de los individuos, los cuales son estimadores básicos de una población. Aunque fueron un importante avance y usadas durante más de 3 décadas, estos marcadores tenían limitantes ya que no detectaban toda la variación genética (Alcántara, 2007).

Para analizar dicha diversidad hoy en día se utilizan datos moleculares para así poder establecer las relaciones entre organismos, para estimar la variación entre poblaciones y para probar hipótesis de adaptaciones ecológicas (Alcántara, 2007). Al describir los patrones de variación, se busca entender cómo los factores del medio ambiente influyen sobre la diversidad genética y cómo el flujo genético contribuye a la organización de la variación dentro y entre las poblaciones (Parker et al., 1998). Para el estudio del material genético, se utilizan una serie de marcadores moleculares específicos o generales, dependiendo del caso. La selección del marcador molecular se hará en base a las características y objetivos del estudio, así como los datos particulares que se requieran (Scheinvar, 2008).

El rápido desarrollo de técnicas moleculares ofrece hoy en día múltiples herramientas para el análisis de poblaciones, con las cuales se puede describir la variación dentro y entre poblaciones. Los marcadores moleculares que se han empleado para describir la variación genética desde entonces han sido los RFLP (Polimorfismos de la longitud de los fragmentos

de restricción), RAPD (polimorfismos de ADN amplificados al azar), ISSR (Secuencias repetidas intersimples), los microsatélites y las secuencias de ADN (Schlotterer, 2004).

II.1.1.1 Marcadores moleculares ISSR

Los ISSR son marcadores moleculares conocidos como secuencias repetidas intersimples (Alcántara, 2007). La técnica que hoy se utiliza fue desarrollada por Zietkiewicz y colaboradores de varias instituciones de Canadá (Zietkiewicz, 1994). Es un método sencillo, rápido y de bajo costo por el cual se obtienen bandas con pesos moleculares de 100 a 2000 pb y la variación alélica de este marcador molecular consiste en la presencia-ausencia de los productos amplificados, es decir la presencia-ausencia de las bandas. Una de las principales ventajas de estos marcadores es que son altamente variables, es decir tienen un gran número de bandas polimórficas. Otra de las ventajas que ofrece la técnica es que es relativamente fácil de montar, altamente repetible y ya existen primers universales para plantas (Falcón y Valera 2007). Sin embargo también presenta desventajas, ya que las bandas son leídas como marcadores dominantes; esto significa que en las bandas de los geles no se puede diferenciar si el individuo es homócigo o heterócigo debido a que con este marcador la presencia de las bandas se interpretan como genotipos homócigos dominantes o heterócigos, mientras que la ausencia de banda se interpreta como homócigo recesivo. El uso de este marcador supone que cada banda representa un locus con dos alelos en equilibrio de Hardy-Weinberg (Falcón y Valera 2007).

Los loci de los ISSR se generan usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida de electroforesis en geles (Parker et al., 1998) que pueden ser de acrilamida y teñidos con nitrato de plata o agarosa y teñidos con bromuro de etidio (Falcón y Valera 2007), lo que permitirá la resolución de los alelos que pueden diferir en tamaño por tan poco como un par de pares de bases (Parker et al., 1998).

Los marcadores ISSR han sido empleados para abordar diversos problemas en el estudio de plantas tales como la descripción de la diversidad genética (Rodríguez-Echeverría et al., 2008), el origen de especies invasoras (Paterson & Zachariades, 2013) y la organización de la diversidad genética de especies en peligro de extinción (Xia et al., 2008), entre otros.

II.1.2 Genética de la Conservación

La genética de la conservación se encarga de aportar una perspectiva genética a problemas de conservación biológica de especies en peligro de extinción (Premoli et al., 2011). Estudia problemas tales como la estimación de los tamaños efectivos de las poblaciones, la depresión por endogamia, la pérdida de diversidad genética debido a problemas de deriva y endogamia asociados a poblaciones pequeñas y la habilidad de las especies para evolucionar en respuesta a cambios ambientales. Los análisis genéticos también permiten estudiar los efectos de la fragmentación del hábitat y la reducción del flujo génico en poblaciones estructuradas y los efectos de las mutaciones deletéreas (Rocha y Gasca, 2007).

Otros de los objetivos de la genética de la conservación son la identificación de poblaciones y especies prioritarias para la conservación, resolver problemas taxonómicos, definir unidades de conservación evolutivamente significativas y unidades de manejo, e idealmente, poder proteger los procesos evolutivos que mantienen la diversidad biológica (Moritz, 2002).

II.1.2.1 Estudios de conservación con ISSR

En México son pocos los estudios que se han hecho en cactáceas con este tipo de marcador molecular (Otero-Arnaiz et al. 2004; Clark-Tapia et al. 2005). Sin embargo en otros países los marcadores ISSR son muy utilizados para estudios de genética de la conservación por ejemplo en grupos de plantas tales como las cícadas, y familias como las Orchidaceae y Ranunculaceae (Xiao et al., 2004; Pinheiro et al., 2012; Cires et al., 2013) que veremos a continuación.

Las orquídeas son la familia de angiospermas que contienen la mayor proporción de especies amenazadas, con aproximadamente un 6% de especies en peligro de extinción (Pinheiro et al., 2012). Las principales amenazas se derivan de la extracción ilegal y las actividades humanas. Por ejemplo, *Calanthe tsoongiana* (Qian et al., 2013) es una orquídea rara y endémica de China que ha sufrido severos cambios en sus poblaciones como consecuencia de la pérdida y fragmentación de su hábitat. Se utilizaron marcadores ISSR para estimar la diversidad genética de 6 poblaciones y se encontró una diversidad relativamente baja. Los resultados sugieren que el flujo génico es restringido posiblemente debido a la fragmentación del hábitat y la reducción del tamaño de sus poblaciones como resultado de las actividades humanas. Basándose en los resultados, se propusieron varias estrategias de conservación para la protección de esta especie amenazada (Qian et al., 2013).

Otro estudio con orquídeas es el de *Cattleya labiata*, una orquídea de uso ornamental muy popular, buscada sobre todo por su gran belleza, fragancia y facilidad para cultivarse (Pinheiro et al., 2012). Es nativa del noroeste de Brasil y está siendo amenazada por la pérdida de hábitat y sobrecolecta de material silvestre. Su nivel de endemismo, su dispersión restringida, así como la eliminación de su hábitat ponen en serio peligro a esta especie. En estos casos, el conocimiento de la diversidad genética puede ayudar a identificar poblaciones importantes para la preservación de especies en peligro de extinción y entender cómo la pérdida de diversidad genética afecta la supervivencia en estado natural. En este caso se

utilizaron marcadores RAPD e ISSR. En este trabajo se encontró un bajo nivel de diversidad genética de las poblaciones, lo cual puede ser resultado de la disminución del tamaño de las poblaciones debido a la destrucción de su hábitat en los últimos años, ya que las poblaciones analizadas no se encontraban en áreas protegidas. Los resultados de este estudio sugieren que para la conservación de esta especie es indispensable la preservación de su hábitat natural y la prevención de la colecta de plantas en su medio natural (Pinheiro et al., 2012).

Para el caso de cícadas, el estudio de Xiao et al., (2004) sobre *Cycas guizhouensis* utilizó ISSR como marcador molecular. Esta cícada amenazada y endémica del sureste de China, ha experimentado una rápida destrucción de su hábitat y sobrecolecta para su uso alimenticio, medicinal y ornamental (Xiao et al., 2004). El estudio se realizó con 12 poblaciones y los resultados arrojaron una baja diversidad genética y una alta diferenciación entre las poblaciones. Este patrón parece deberse, nuevamente como en los casos anteriores, a la destrucción y fragmentación de hábitats, lo cual restringe el flujo génico entre poblaciones. La principal recomendación del estudio fue preservar tanto como fuera posible el potencial evolutivo de la especie a través de mantener la mayor diversidad genética posible en las poblaciones actuales. Por esto se propone como estrategia conservar todas las poblaciones existentes de *C. guizhouensis in situ* y prevenir la destrucción causada por el hombre, así como propagar e incrementar el tamaño de las poblaciones naturales. En caso de necesitarse una conservación *ex situ* se deberán coleccionar tantas muestras como sea posible, especialmente de aquellas poblaciones que albergan diversidad genética relativamente alta (Xiao et al., 2004).

II.1.3. Diversidad genética de plantas en México

En México se han llevado a cabo diversos estudios para determinar la variación genética con diversos fines los cuales pueden ser de interés agrícola, ecológico, médico, etnobiológico, pesquero, ornamental o evolutivo (Piñeiro et al., 2008).

No se cuenta con la cifra exacta de estudios de diversidad genética en plantas hechos en México, pero para el año 2008 se tenía un aproximado de 97 trabajos de las casi 24 mil especies de plantas mexicanas (Piñeiro et al., 2008), de los cuales 15 fueron hechos con cactáceas, y ninguno para el género *Echinocereus*. En su mayoría los trabajos hechos con cactáceas fueron realizados con especies del Desierto Sonorense y del Valle de Tehuacán (Piñeiro et al., 2008).

II.1.3.1 Diversidad genética de plantas sonorenses

La flora sonorense actualmente cuenta con 3483 especies; de éstas, 58 especies se encuentran dentro de la NOM-059-ECOL-2010 (SEMARNAT, 2010), con cuatro categorías, E: probablemente extinta, P: en peligro de extinción, A: amenazada y Pr: bajo protección especial (Van Devender et al., 2010). Durante los años setentas se hicieron los primeros trabajos sobre la diversidad genética de plantas en el estado, para lo cual se utilizaron aloenzimas como marcadores moleculares (Molina-Freaner et al., 2010). Los estudios sobre la diversidad genética de plantas en Sonora incluyen solo 17 taxones, la gran mayoría especies pertenecientes a dos familias: Cactaceae y Agavaceae. En estos estudios se ha detectado que la diversidad genética en especies de plantas con amplia distribución la variación genética suele aumentar con la disminución de la latitud. Estos resultados se han interpretado como evidencia de eventos de expansión y contracción de la distribución de las especies en respuesta a las fluctuaciones climáticas que ocurrieron a lo largo del Pleistoceno (últimos 2.6 millones de años), tales como periodos de enfriamiento y calentamiento regional y global (Molina-Freaner et al., 2010). En estas especies, la diversidad genética tiende a ser mayor en la parte sur del área de distribución, donde se cree que las poblaciones se refugiaron durante las glaciaciones, y menor hacia el norte donde la diversidad genética disminuyó como consecuencia de eventos de recolonización (Molina-Freaner et al., 2010).

Para el caso de plantas en alguna categoría de riesgo, solo existen dos estudios previos sobre diversidad genética de plantas de importancia para la conservación en Sonora. Uno es un estudio sobre la diversidad genética de un girasol endémico de las dunas del Desierto Sonorense (*Helianthus niveus*) usando marcadores ISSR y nueve poblaciones de California, Arizona y Sonora (Mandel et al., 2013). Los resultados de este estudio revelaron que la diversidad genética de la especie es relativamente baja y que la población de Sonora es genéticamente distinta a las demás poblaciones, por lo que se considera de prioridad para la conservación como recurso genético para el mejoramiento del girasol (Mandel et al., 2013). Otro estudio es sobre una cícada de Sonora (*Dioon sonorensis*) utilizando secuencias del cloroplasto (Gutiérrez-Ortega et al., 2014). Esta es una especie endémica y en peligro de extinción debido a la extracción ilegal de material silvestre, para la cual solo las poblaciones de la parte sur de su distribución se encuentran protegidas dentro de una reserva (Sierra de Álamos-Río Cuchujaquí). En contraste, las poblaciones de la parte norte de su distribución no están protegidas por ninguna reserva. En este estudio filogeográfico se encontró un bajo nivel de variabilidad y se identificaron dos unidades evolutivas correspondientes a dos haplotipos: un haplotipo del sur protegido por la reserva de Álamos y un haplotipo del norte que no está protegido y no cuenta con medidas para protegerlo de la extracción ilegal. Los resultados de este estudio sugieren incluir las poblaciones norteñas en programas de conservación efectiva, tal y como pudiera ser declarar la Sierra de Mazatán como una reserva (Gutiérrez-Ortega et al., 2014).

II.1 Generalidades de las Cactáceas

Los cactus son plantas eudicotiledóneas pertenecientes al Orden Caryophyllales y a la Familia Cactaceae. Con la excepción de las especies introducidas al viejo mundo, se distribuyen exclusivamente en el continente americano, de donde son nativas (Anderson, 2001), desde Canadá hasta Argentina y Chile, y en altitudes desde el nivel del mar hasta 4000 m (Arias-Montes, 1993). Son una familia de plantas muy diversas en las zonas áridas y semiáridas de América, con cerca de 1900 especies comprendidas en 125 géneros (Anderson, 2001). México

es uno de los 2 países con mayor diversidad de cactáceas, pues cuenta con 850 especies (Arias-Montes, 1993), y se considera como su principal centro de diversificación ya que posee la mayor riqueza tanto a nivel genérico como específico (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991). Además, las cactáceas presentan un alto grado de endemismo en México, con cerca de 73% a nivel de géneros y 78% a nivel de especies (Arias-Montes, 1993).

El clima característico del hábitat de las Cactáceas es seco con lluvias esporádicas y largos períodos de sequía intermedios, pero con abundante rocío matinal, cuando descienden las temperaturas (Arias-Montes, 1993). En el Desierto Sonorense, el cual incluye en México la península de Baja California y la planicie costera de Sonora, se presentan cactáceas arbóreas, algunas de las cuales destacan por su gran tamaño, como sucede con el cardón (*Pachycereus pringlei*) que puede alcanzar 15 m, el etcho (*P. pecten-aboriginum*) y el sahuaro (*Carnegiea gigantea*). En estas zonas también encontramos sinitas (*Lophocereus spp*), así como algunas especies de nopales (*Opuntia spp*), chollas (*Cylindropuntia spp*), biznagas (*Echinocactus polycephalus*, *Ferocactus cylindraceus* y *F. diguetii*, entre otras), y una gran diversidad de pequeños organitos semi-postrados con tallos de consistencia semisuave del género *Echinocereus* (*E. barthelownanus*, *E. brandegeei*, *E. engelmannii*, *E. laui*, entre otros), los cuales son muy llamativos por sus grandes flores de color escarlata, rosa purpúreo, amarillo o amarillo verdoso (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1978).

En Sonora, en todos los tipos de hábitat, han sido registrados 107 taxones, entre géneros y especies, para la familia Cactaceae, número inferior al de las familias Asteraceae (513), Poaceae (360) y Fabaceae (344), y apenas por debajo de Euphorbiaceae (149) y Malvaceae (130) (Van Devender et al., 2010)

II.3 Amenazas a las Cactáceas

México se encuentra entre los países con mayores tasas de deforestación (Challenger et al., 2009), por lo que la pérdida de la biodiversidad se da de manera acelerada. La agricultura, el sobrepastoreo, la deforestación y la extracción ilegal de plantas son las prácticas que ponen en mayor riesgo la pérdida de diversidad de plantas. Se calcula que el 15% de las plantas

vasculares endémicas de México se encuentran dentro de alguna categoría de riesgo; sin embargo el conocimiento de plantas nativas en algunas regiones es casi inexistente, por lo que es todavía muy limitada nuestra noción acerca de las plantas en peligro (Vovides, 1995).

Las perturbaciones antropogénicas en las zonas desérticas son muchas y su intensidad se ha acentuado con el incremento de la población humana. En primer lugar, el cambio de usos del suelo provoca que los ambientes naturales sean completamente transformados, ya sea en áreas agrícolas, ganaderas o utilizados con fines urbanos (Morales-Romero, 2013). Estas transformaciones provocan la pérdida indirecta de muchas poblaciones de especies silvestres (Álvarez et al., 2004). La transformación de los desiertos en campos de cultivo, por otro lado, puede propiciar una pérdida completa de los ecosistemas naturales, no sólo por la pérdida de la cubierta vegetal original, sino porque es probable que al introducir agua a estas áreas, se propicie una salinización de los suelos, debida a la alta tasa de evaporación de los suelos, y con ello se lleve a la pérdida de fertilidad (Jiménez-Sierra, 2011).

Por otra parte, la introducción de especies exóticas (especies no nativas) ha provocado serios problemas ecológicos en especies nativas. La llegada de ganado de diversos tipos (caprino, ovino, bovino, equino y asnar), desde la época colonial a las comunidades desérticas de México, ha cambiado por completo el paisaje de las mismas, propiciando la desaparición de las especies más vulnerables (Challenger, 1998). El ganado es una amenaza directa cuando utiliza las cactáceas como alimento, mientras que en otras ocasiones transforma la dinámica de la comunidad vegetal, pues la extracción del follaje de árboles y arbustos disminuye las áreas protegidas de la insolación, donde algunas especies de cactáceas suelen vivir. Además, el pisoteo por parte de estos animales pone en riesgo a muchas especies de cactáceas, y disminuye las posibilidades de reclutamiento de nuevos individuos (Challenger, 1998).

Gran cantidad de cactáceas están sujetas a la colecta directa, debido a que las especies son buscadas con un interés determinado. Muchas cactáceas ofrecen algún beneficio al hombre y han sido utilizadas como alimento para el ganado y para la población humana, ya que los tallos (nopales) y los frutos (tunas, pitayas, etc.) de muchas especies son recursos alimenticios importantes en las zonas áridas. Algunas especies son buscadas para la construcción o fabricación de artesanías, en algunos casos medicinales, además otras especies

son apreciadas por los coleccionistas y son buscadas por su rareza, lo cual las ha llevado a un tráfico ilegal, lo que ha llevado a poner en grave riesgo a varias especies (Jiménez-Sierra, 2011).

II.3.1. La Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010

Esta Norma Oficial Mexicana tiene por objeto identificar las especies o poblaciones de flora y fauna silvestres en riesgo en nuestro país, mediante la integración de las listas correspondientes, así como establecer los criterios de inclusión, exclusión o cambio de categoría de riesgo para las especies o poblaciones. Los criterios de inclusión o exclusión usan un método de evaluación de su riesgo de extinción y es de observancia obligatoria en todo el Territorio Nacional, para las personas físicas o morales que promuevan la inclusión, exclusión o cambio de las especies o poblaciones silvestres en alguna de las categorías de riesgo, establecidas por esta Norma (SEMARNAT, 2010). El método de evaluación de riesgo (MER) utiliza cuatro criterios para evaluar el estatus de cualquier especie. Estos criterios incluyen: A) Amplitud de la distribución del taxón en México, B) Estado del hábitat con respecto al desarrollo natural del taxón, C) Vulnerabilidad biológica intrínseca del taxón, D) Impacto de la actividad humana sobre el taxón (Sánchez et al., 2007).

Dependiendo de la suma del puntaje de cada uno de estos aspectos, las especies se clasifican en las categorías de: en peligro de extinción, amenazada, bajo protección especial o sin necesidad de incluirse en la NOM (Sánchez et al., 2007).

En México, de acuerdo a la NOM-ECOL-059, se tienen contabilizadas 2605 especies en todos los grupos taxonómicos distribuidas en las siguientes categorías: 49 especies extintas, 475 en peligro de extinción, 896 amenazadas y 1185 sujetas a protección especial (SEMARNAT, 2010).

II.3.1.1 Las cactáceas en la NOM-059

De las 2,605 especies incluidas en la NOM-ECOL-059, 987 especies son plantas (CONABIO, 2013). De esta cifra, 536 son endémicas, 340 se encuentran en la categoría amenazada, 458 sujetas a protección especial, 183 en peligro de extinción y seis están prácticamente extintas del medio natural (CONABIO, 2013). De estas 987 especies de plantas sobresalen el grupo de las orquídeas, las cactáceas y las cícadas. Las cactáceas son una de las familias más amenazadas (junto con la familia Orchidaceae) por la colecta ilegal, lo que no solo contribuye a la pérdida de este recurso natural, sino que además contribuye a la desertificación del suelo, alterando las comunidades y su regeneración (Jiménez-Sierra, 2011). Además, las condiciones biológicas de estas especies las hacen aún más vulnerables, ya que en general poseen un crecimiento lento, y requerimientos muy específicos de suelo que las hacen aún más vulnerables (Hernández y Godínez, 1994). De acuerdo con la NOM-059-2010 se tienen actualmente registradas 279 especies de cactáceas, de las cuales 260 son endémicas. *Echinocereus leucanthus* se encuentra en esta norma como sujeta a protección especial (SEMARNAT, 2010).

II.4. Género *Echinocereus*

Este género se encuentra dentro de la familia Cactaceae. El género incluye alrededor de 50 especies con una distribución desde el sudeste de Estados Unidos hasta la parte sur del centro de México, habitando semi-desiertos, bosques secos y praderas, desde el nivel del mar hasta 3000 msnm (Taylor, 1985).

Presentan un tallo simple o ramificado de 1 a 60 cm de longitud, de globoso a cilíndrico, con costillas y cubierto de espinas. Las flores suelen ser de colores llamativos adaptadas a entomofilia diurna u ornitofilia, y nacen a través de la epidermis de la planta. El fruto suele ser ovalado de color verde a rojo, con espinas caducas al madurar. La semilla es negra, ovoide y tuberculada (Taylor, 1985).

II.4.1 Descripción de *Echinocereus leucanthus*

Es una especie considerada rara y endémica de México (SEMARNAT 2010; Paredes-Aguilar et al., 2000). El número de cromosomas se ha reportado de $2n=22$ (Cota y Philbrick, 1994); su sistema radicular cuenta con raíces tuberosas, presenta un parénquima de almacenamiento con tejido vascular escaso, el tallo es erecto de hasta 1m de longitud y de 3-6 mm de diámetro, de color verde-púrpura y con espinas radiales blancas (Taylor, 1985). La floración ocurre a principios de mayo (Martin et al., 1998) y tiene flores diurnas que abren durante varios días, cerrándose durante la noche; su color es blanco y miden de 3.5 a 4.5cm de longitud a 2.3 a 3cm de diámetro, las anteras son de color amarillo (Paredes-Aguilar, et al. 2000).

Como antecedente solo se ha hecho un estudio con una población en Las Guásimas (Santos 2011), donde se estimó una densidad promedio equivalente a 880 plantas por hectárea. Sin embargo posiblemente en esta población no existen más de 200-300 individuos; todos los individuos se encontraron asociados con arbustos, principalmente *Lycium californicum*. La distribución espacial de los individuos es agregada (Santos, 2011), y no se encontró evidencia de reproducción vegetativa o clonal (Santos, 2011).

La especie se distribuye en los estados de Sonora y Sinaloa (Taylor, 1985). Según los escasos registros disponibles, se localiza en la comunidad de Las Guásimas (Santos, 2011), así como en Bachoco y Yavaros (Martin et al., 1998; Paredes Aguilar et al., 2000; Guzmán,

2003); las observaciones de campo encontraron que actualmente hay poblaciones en los municipios de Guaymas, Empalme y Huatabampo en Sonora (Figura 3). En Sinaloa solo se ha encontrado un registro cerca de Los Mochis (Taylor, 1985). Se describe su hábitat como matorral espinoso costero (Paredes-Aguilar et al, 2000) y la especie como tolerante a la salinidad (Martin et al., 1998).

La especie se ha encontrado al norte de los Valles agrícolas Mayo y Yaqui (Empalme y Guaymas) y al sur del mismo (Huatabampo) por lo que probablemente la agricultura en esta zona afectó su distribución (Figura 4). Además de esto, la acuicultura podría afectar también su hábitat, ya que para construir una granja acuícola se elimina la vegetación natural costera para convertir la tierra en represas hasta donde llega el agua de mar (Figura 4); al establecerse esta especie de cacto tan cerca de la costa podría verse afectado también por este tipo de cultivos dado que las granjas acuícolas se encuentran al sur del estado en su mayoría y llegan hasta el norte de Sinaloa (Figura 4).

La Red de Información Ambiental del Suroeste de los Estados Unidos (SEINet) cuenta con varias observaciones de *E. leucanthus* desde 1965 hasta 2010 (SEINet, 2013), puntos que fueron usados solo como punto de partida para el muestreo, dado que no precisaban ubicación exacta y algunos tenían casi 50 años de haber sido reportados.



Figura 1. Fotografía de un individuo de *Echinocereus leucanthus* durante el periodo de floración a principios de mayo del 2012 en la población de Las Guásimas (Autor: Ruth Rivera).



Figura 2. Fotografía de *E. leucanthus* en la población de Las Bocas durante el periodo de lluvias, a principios de julio del 2013. Nótese la diferencia de coloración entre ambos individuos en diferentes épocas del año (Autor: Ruth Rivera).

III. JUSTIFICACIÓN

En México, son pocos los esfuerzos que se han hecho por describir la diversidad genética de su biota. Solo se tiene conocimiento de estudios sobre la diversidad genética de apenas 200 especies entre microorganismos, hongos, plantas y animales (Piñero et al., 2008). De plantas vasculares, hay muy pocos trabajos sobre variación genética, a pesar de que son 23,522 las especies de plantas mexicanas que se han registrado, y para el caso de la familia de las cactáceas, solo 15 han sido estudiadas (Piñero et al., 2008). El conocimiento de la diversidad genética permite la detección de especies y poblaciones prioritarias en la conservación, así como el establecimiento de acciones para su conservación y así mantener la biodiversidad.

En este trabajo de tesis, se pretende aportar conocimiento acerca de la diversidad genética de *Echinocereus leucanthus*, una cactácea endémica de las planicies costeras del sur de Sonora y norte de Sinaloa (Paredes-Aguilar et al., 2000) que se encuentra sujeta bajo protección especial en la NOM-ECOL-059 (SEMARNAT, 2010), El conocimiento sobre la variación genética de esta especie tiene importancia para la conservación, ya que gran parte de su hábitat ha sido convertida en campos agrícolas (Paredes-Aguilar et al., 2000).

IV. HIPÓTESIS

E. leucanthus es una cactácea de distribución restringida al sur de Sonora y norte de Sinaloa (Martin et al., 1998; Paredes et al., 2000). Dado que los escasos registros de la especie sugieren que las poblaciones son pequeñas, se espera encontrar bajos niveles de diversidad genética, debido a que en las poblaciones pequeñas aumenta la probabilidad de endogamia y la frecuencia de homócigos.

V. OBJETIVOS

V.1 Objetivo General

Describir la variabilidad genética de poblaciones de *Echinocereus leucanthus* del Estado de Sonora usando marcadores moleculares ISSR.

V.2 Objetivos Particulares

Describir los niveles de variación genética dentro y entre poblaciones de *E. leucanthus*, usando marcadores tipo ISSR.

Determinar qué poblaciones de *E. leucanthus* poseen mayores niveles de diversidad genética y por tanto, identificar poblaciones con mayor prioridad en la conservación.

Proponer áreas potencialmente viables para la conservación *in situ* de esta especie protegida.

VI. METODOLOGÍA

VI.1 Sitios de Muestreo

Existen registros de ejemplares de *Echinocereus leucanthus* en el sur de Sonora, en especial la población de las Guásimas, cercana a Guaymas, donde se tiene bien identificada esta especie (Santos, 2011). Se hizo una búsqueda de registros de colecta usando la red de información ambiental del suroeste de los Estados Unidos (SEINet 2013), los cuales se usaron como guía para la búsqueda de lugares de colecta de muestras de tejido de esta especie. Después de varios viajes al campo buscando ejemplares de esta especie usando los registros depositados en Herbarios reportados en SEINet (Herbario de Plantas Vasculares de la Universidad del Estado de Arizona, Herbario del Jardín Botánico Huntington, Herbario de la Universidad de Arizona y una observación de la Biodiversidad del Archipiélago Madreño), se pudieron localizar 5 poblaciones (Figura 4) y se elaboró un mapa con la distribución estimada de la especie al sur de Sonora y norte de Sinaloa, tomando como referencia los puntos de muestreo, datos de SEINet y un mapa con ubicación de poblaciones de *E. leucanthus*, elaborado a mediados de la década de los 80 por Taylor (Taylor, 1985).

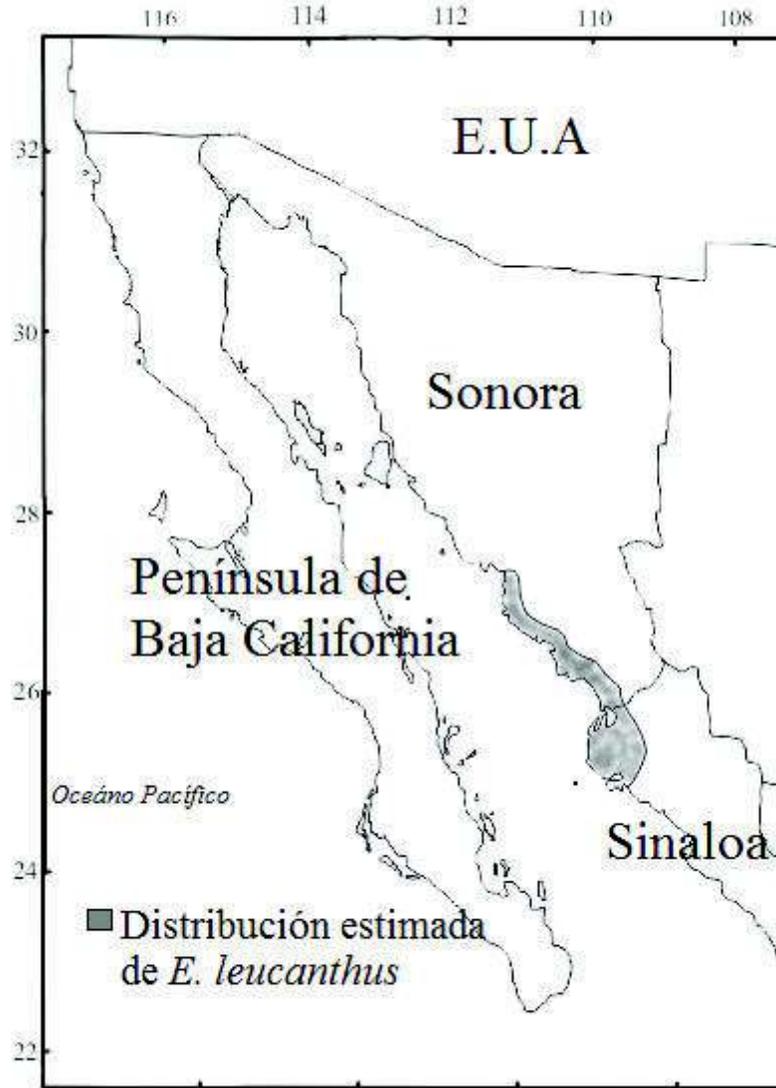


Figura 3. Distribución estimada de *E. leucanthus*, especie endémica del sur de Sonora y norte de Sinaloa, basada en la literatura (Taylor, 1985) y registros de herbario. Las poblaciones encontradas se describen en la tabla I. Las figuras 5, 6 y 7 muestran imágenes del hábitat donde fueron colectadas las plantas.

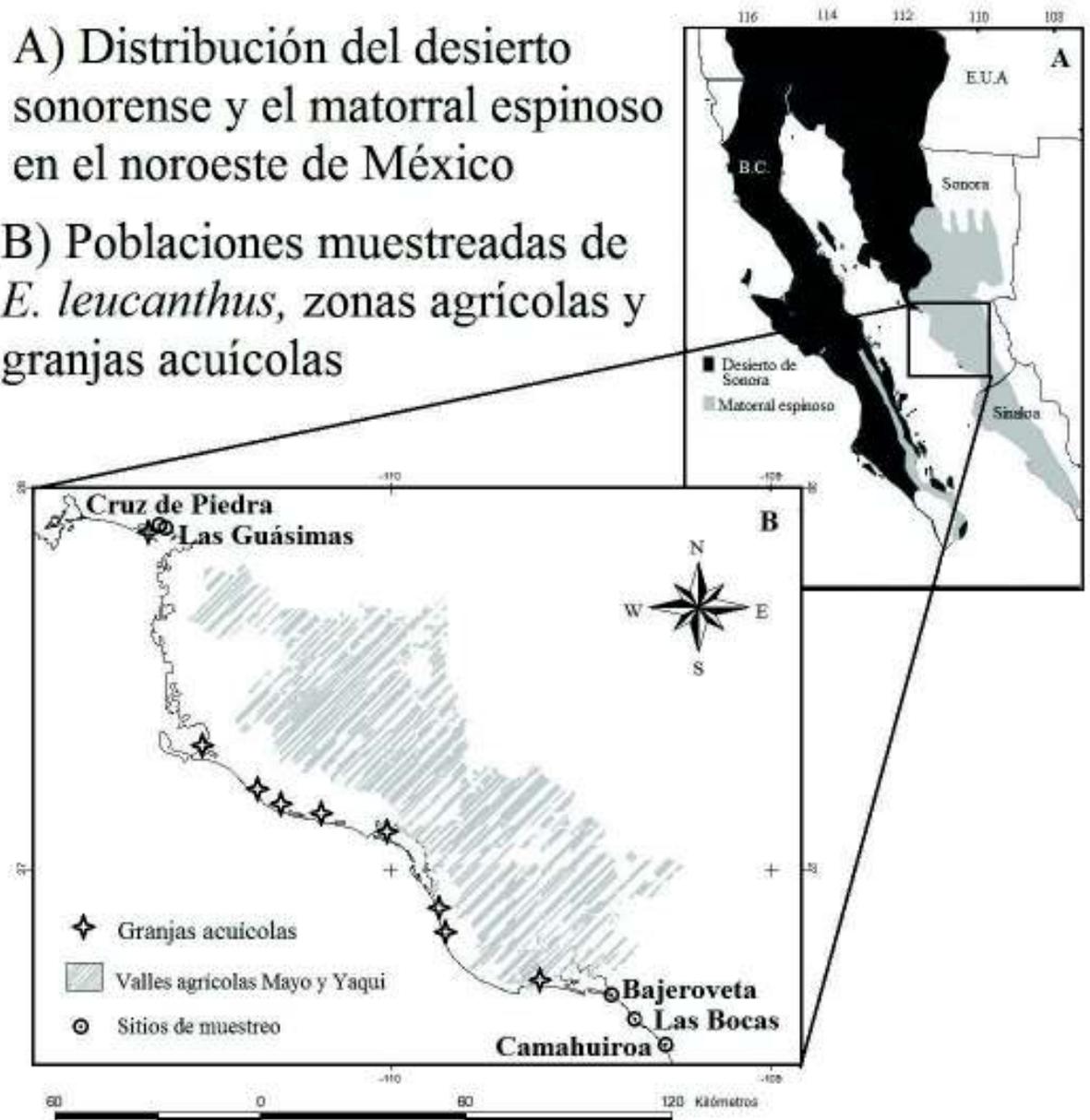
Tabla I. Localización geográfica de las poblaciones estudiadas de *Echinocereus leucanthus* en este trabajo. El tipo de vegetación para todas las poblaciones fue matorral espinoso costero. (DMM= Grados, minutos y fracciones de minutos en decimales).

Población	Municipio	Coordenadas (DMM)	Altitud
Cruz de Piedra (exterior de una granja acuícola)	Empalme	27° 54.118' N 110° 36.561' O	9 msnm
Las Guásimas	Guaymas	27° 53.737' N 110° 35.554' O	22 msnm
Bajerobeta (Bachoco)	Huatabampo	26° 40.179' N 109° 25.314' O	2 msnm
Las Bocas	Huatabampo	26° 36.38' N 109° 21.622' O	46 msnm
Camahuiroa	Huatabampo	26° 32.272' N 109° 16.908' O	16 msnm

Todas las poblaciones colectadas se encontraron en el tipo de vegetación de matorral espinoso costero, (Figura 4a). Además, se encontró que dichas poblaciones se ubican al norte y al sur de los valles agrícolas mayo y yaqui (Figura 4b), y una de las poblaciones se ubica especialmente cerca una granja acuícola.

A) Distribución del desierto sonorense y el matorral espinoso en el noroeste de México

B) Poblaciones muestreadas de *E. leucanthus*, zonas agrícolas y granjas acuícolas



Autor: Rivera-Aguirre Ruth

Figura 4. Distribución del desierto sonorense y el matorral espinoso (A) en el noroeste de México. B) Poblaciones de *E. leucanthus* en este estudio: Cruz de Piedra, Camahuiroa, Las Bocas, Bajerobeta (Bachoco) y Las Guásimas, en el contexto de la distribución de las zonas agrícolas Valle del Yaqui y Valle del Mayo, y de las granjas acuícolas en el sur del Estado de Sonora. (Fuentes: Google Earth y Dimmitt 2000 modificado por la Dra. Amabel)



Figuras 5, 6 y 7. Fotografías de las poblaciones: Las Bocas (arriba izquierda), Camahuiroa (arriba derecha) y Bajerobeta (abajo izquierda); nótese en la figura 7 al fondo el manglar.

VI.2. Colecta de muestras

Se tomaron muestras del tejido fresco cortando de dos a tres centímetros aproximadamente a partir del ápice de los tallos (Figura 8). Se muestrearon cinco poblaciones de *E. leucanthus* con una separación superior a 10 km entre ellas. En cada población se colectaron de 15 a 25 individuos, dependiendo de su abundancia.



Figura 8. Muestra colectada aún sin etiquetar de *E. leucanthus* en la población de Las Bocas.

Las muestras fueron etiquetadas debidamente y empacadas en bolsas con cierre y se mantuvieron en hielo durante el transporte al laboratorio, hasta colocarlas en un ultra congelador (-80°C) en el laboratorio de Ecología Molecular y Funcional de la UNAM Estación Regional del Noroeste.

VI.3. Extracción de ADN

Para la extracción del ADN se utilizó el protocolo de Doyle y Doyle (1987), el cual ha probado ser eficiente en la extracción de ácidos nucleicos de cactáceas (Falcón, 2007). Debido a la gran cantidad de polisacáridos y compuestos secundarios contenidos en los tejidos de cactáceas, se modificó el protocolo según Falcón, (2007) para este tipo de plantas el cual probó ser eficaz en la eliminación de estos compuestos. Se extrajo ADN de 15 individuos de cada población, sumando un total de 75 muestras para el presente trabajo sobre esta especie.

VI.3.1 Análisis preliminar de secuencias del ADN del cloroplasto

Se hizo un análisis preliminar con secuencias del cloroplasto, para lo cual se utilizaron 6 parejas de primers (Tabla II). Se amplificaron fragmentos de 18 individuos de tres poblaciones representativas en el norte y sur del área de estudio en el sur del Estado de Sonora (Cruz de Piedra y Camahuiroa respectivamente) para cada uno de los primers, teniendo un total de 18 muestras. Para cada pareja de primers se utilizó un programa de amplificación distinta (Apéndice IV). Los productos de PCR se mandaron a secuenciar a la Universidad de Arizona, y las secuencias obtenidas se alinearon y analizaron con los programas Bioedit y Phred Phrap. Dado que no se detectó variación en ninguna de las secuencias de nucleótidos de los fragmentos amplificados de los individuos analizados, se concluyó que las secuencias del cloroplasto no son buenos indicadores para analizar la diversidad genética y se optó por utilizar marcadores ISSR.

Tabla II. Parejas de primers utilizados para el análisis de secuencias del cloroplasto.

Primers del cloroplasto
atpB-rbcL (Golenberg et al, 1993)
aTab-bTab (Taberlet et al, 1991)
cTab-dTab (Taberlet et al, 1991)
eTab-fTab (Taberlet et al, 1991)
trnh-psba (Hamilton 1999)
rpl20-rps12 (Hamilton 1999)

VI.4. Amplificación de ISSR

Para la amplificación de ISSR se utilizó el ADN genómico de 64 muestras, ya que de las 75 amplificaciones realizadas, 11 presentaron bandas muy tenues, por lo que fueron eliminadas en el análisis de datos. Las muestras de ADN obtenidas de *Echinocereus leucanthus* fueron sometidas a una reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) utilizando protocolos estándar para ISSR (Falcón, 2007). Se probaron 9 primers de inter secuencias repetitivas simples (ISSR) elaborados por la Universidad de Columbia Británica, Canadá (Zietkiewicz, 1994).

Las pruebas preliminares con 9 primers permitieron identificar qué primers producían bandas claras y repetibles. El primer ISSR 840 produjo bandas claras y reproducibles y se seleccionó en base al mayor número de bandas mostradas en las pruebas preliminares. Este primer tiene la secuencia (GA) 8YT, que son 8 repeticiones de Guanina-Adenina seguidas de un nucleótido que puede ser X o Y (que pueden ser Citosina o Timina) y por último una Timina (Zazueta, 2013).

Las reacciones de amplificación tuvieron un volumen final de 20 μ l para cada muestra; los reactivos utilizados y las cantidades se muestran en la siguiente tabla:

Tabla III. Volumen utilizado para el PCR con el iniciador ISSR 840.

Reactivo	Volumen (en μl)
Buffer PCR 10x	2.5
MgCl (2mM)	1.5
dNTP (0.1 mM)	0.2
Primer ISSR 840 (10mM)	2.5
ADN	3.5
Taq Pol	0.3
Agua	9.5
Total	20

El programa utilizado para la amplificación de PCR de ISSR se muestra a continuación:

Tabla IV. Programa de amplificación PCR utilizado para el primer ISSR 840

Iniciación	94°C	90 segundos
Desnaturalización	94°C	30 segundos 35 ciclos
Alineación	52.5°C	45 segundos
Extensión	72°C	90 segundos
Finalización	72°C	7 minutos
Reposo	4°C	---

Los productos amplificados de PCR se corrieron por electroforesis en geles de 300 ml de agarosa al 1% en buffer TAE y la tinción se hizo con 26.2 µl de bromuro de etidio con un marcador de peso molecular de 2000 a 200 pares de bases (Invitrogen) y posteriormente se corrió durante 90 minutos a 100 volts y se procedió a su observación en un transiluminador ultravioleta.

VI.5. Lectura de Geles

La lectura de los geles se realizó manualmente elaborando diagramas en hoja milimétrica para anotar los resultados obtenidos en el gel, para posteriormente trasladar los datos a una matriz de presencia/ausencia de los loci encontrados. La alineación de las bandas de los geles se realizó en base a las bandas respecto al marcador de peso molecular y las bandas de mayor intensidad como referencia. De la matriz de presencia/ausencia de bandas se eliminaron aquellos individuos que presentaron amplificadas poco claras, lo que resultó en 64 individuos analizados en este trabajo.

VI.6. Análisis de Datos

Para el análisis estadístico se construyó una base de datos en base a los geles de cada población, asignándose los valores de 0 a la ausencia de banda y 1 a la presencia de dicha banda. Con esta base de datos se calcularon los parámetros descriptivos básicos de variación genética: el número de loci polimórficos, la heterocigosis esperada (Nei, 1972), así como el índice F_{st} que describe la diferenciación genética entre poblaciones. Con el programa TFPGA se estimó el porcentaje de loci polimórficos, la heterocigosis esperada asumiendo el equilibrio de Hardy-Weinberg y el índice de diversidad genética de Shannon-Wiener (Miller, 1997). En el Apéndice 3 se encuentran las fórmulas de los diferentes índices analizados.

Para estudiar la relación entre las poblaciones estudiadas se calcularon las distancias genéticas de Nei (1972) y se construyó un dendrograma que agrupa a las poblaciones con

mayor similitud genética, usando el algoritmo UPGMA. Las matrices de distancia y el dendrograma fueron obtenidos usando el programa POPGENE1 3.2 (Yeh, 1997).

Para conocer cómo se distribuye la variación genética dentro y entre las poblaciones se empleó un análisis de varianza molecular (AMOVA). Se calculó el porcentaje de la variación inter e intrapoblacional utilizando el programa Arlequín V 2.0 (Schneider et al., 2000). Finalmente, con el objetivo de conocer si las poblaciones de *E. leucanthus* presentan un patrón de aislamiento por distancia (Slatkin, 1993), se evaluó si las distancias genéticas entre poblaciones están correlacionadas con las distancias físicas entre las poblaciones; es decir, si las poblaciones cercanas son más similares genéticamente que aquellas que están más alejadas. Las distancias genéticas fueron calculadas mediante la fórmula de Nei (1978) y las distancias físicas mediante Coordinate Distance Calculator (<http://boulter.com/gps/distance/>) la prueba de Mantel que evalúa esta correlación fue implementada usando el programa TFGA (Miller, 1997).

VII. RESULTADOS

VII.1. Secuencias del Cloroplasto

No se encontró variación en las secuencias del cloroplasto para ninguna de las muestras de 3 individuos de varias poblaciones para cada uno de las siete parejas de primers evaluados. Por lo tanto en este trabajo se optó por utilizar marcadores moleculares ISSR.

VII.2. ISSR

De las muestras colectadas y de las cuales se extrajo ADN, se amplificaron 15 individuos de cada población usando el primer ISSR 840. Sin embargo, algunos individuos no pudieron ser analizados ya que no presentaron bandas claras. A continuación se muestra una tabla con los individuos analizados.

Tabla V. Poblaciones de *E. leucanthus* analizadas y número de individuos analizados por población.

Población	Localidad	Tamaño de la Muestra
1	Cruz de Piedra	12
2	Las Guásimas	14
3	Bajerobeta (Bachoco)	11
4	Las Bocas	13
5	Camahuiroa	14
Total		64

En la figura 9 se muestra un gel de agarosa con los productos amplificados con el primer ISSR 840 de la población Camahuiroa, donde se muestran 13 bandas con un marcado polimorfismo. Se puede observar cómo todos los individuos amplificados presentan una banda cerca de la de 800 pares de bases del marcador de peso molecular y otra presente también cercana a las 400 pares de bases, en este caso se puede decir que no fue polimórfico este loci para ésta población de Camahuiroa. En cambio en el resto de las bandas las diferencias entre los individuos son más notorias. Por ejemplo los individuos 1, 6, 9, 10 y 15 presentan una banda final poco antes de los 200 pares de bases que el resto de los individuos no presentan, por lo que se puede decir que para este caso si fue un loci polimórfico para dicha población (ver flechas negras en la Figura 9).

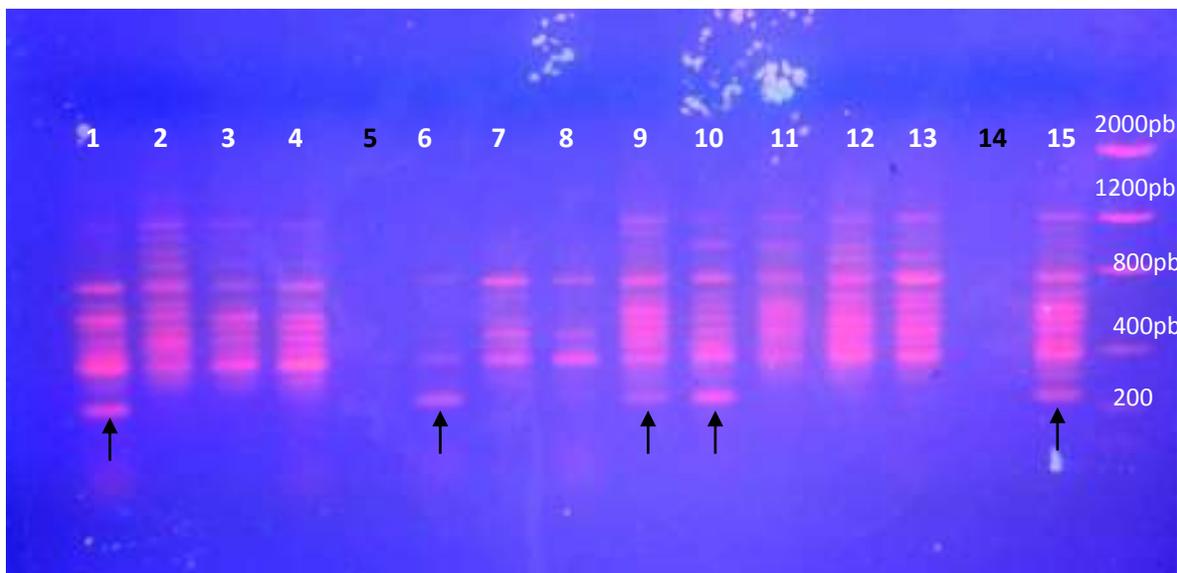


Figura 9. Bandas obtenidas en geles de agarosa al 1% con el primer ISSR 840, para la población Camahuiroa de *E. leucanthus* (en negro se muestran los individuos que no amplificaron y por tanto no fueron tomados en cuenta para los análisis posteriores).

VII. 2 Diversidad Genética de las poblaciones

A partir de las amplificaciones realizadas con el primer ISSR 840 se obtuvieron un total de 13 loci de los cuales el 100% fue polimórfico con el criterio del 95 y 99%, valor arrojado por el programa POPGENE 3.2.

Se calculó la heterocigosis esperada (H_e), el porcentaje de loci polimórficos (P), el índice de diversidad de Shannon y la diferenciación genética (G_{st}) para las poblaciones estudiadas (Tabla VI). El número de individuos analizados para cada población varió de 11 a 14 con un promedio de 12.8 individuos por población. El porcentaje de loci polimórficos varió de 69 a 92% entre poblaciones, la heterocigosis esperada varió de 0.20 a 0.35 entre

poblaciones mientras que el índice de diversidad de Shannon fluctuó entre 0.31 y 0.52 entre poblaciones.

Tabla VI. Parámetros de diversidad genética para las cinco poblaciones estudiadas de *E. leucanthus*. Tamaño de muestra (N), porcentaje de loci polimórficos (criterio del 95%), heterocigosis esperada (H) e índice de diversidad de Shannon (I).

Población	N	P (95%)	H	I (Shannon)
1. Cruz de Piedra	12	69.23	0.2041	0.318
2. Las Guásimas	14	69.23	0.2673	0.3899
3. Bajerobeta	11	92.31	0.3187	0.4772
4. Las Bocas	13	92.31	0.3442	0.5033
5. Camahuiroa	14	92.31	0.3556	0.5236
Promedio	12.8	83.078	0.29798	0.4424
Total	64			
Gst	0.1405			

El valor observado en la heterocigosis promedio entre las poblaciones de la especie fue de 0.298 (tabla VI).

Los valores máximos de diversidad los presentó la población de Camahuiroa según el valor de H de Nei (1972) y el índice de Shannon (0.3556 y 0.5236 respectivamente), con un polimorfismo del 92.3% (Tabla VI). La población con los índices de diversidad más bajos fue la población Cruz de Piedra con 0.2041 y 0.318 para el valor de He de Nei y el índice de Shannon respectivamente, con un polimorfismo de 69.23%. El valor de diferenciación entre poblaciones usado G_{st} fue de 0.14.

Los valores obtenidos con el análisis de varianza molecular, que se muestran en la tabla VII, descomponen la variación debida a diferencias entre poblaciones y dentro de poblaciones. El resultado de diferenciación entre las poblaciones F_{st}, tuvo un valor de 0.16. El análisis de varianza molecular (AMOVA) mostró que la mayor parte de la variación se encuentra dentro

de las poblaciones con un 84% y un 16% entre las poblaciones. El índice de diferenciación de Wright (Fst) generó un valor 0.16.

Tabla VII. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para las 5 poblaciones de *E. leucanthus* estudiadas en este trabajo. (g.l.: grados de libertad)

Fuente de Variación	g.l.	Suma de Cuadrados	Componentes de la Varianza	Porcentaje de Variación
Entre Poblaciones	4	28.948	0.41185	16.08
Dentro de las Poblaciones	57	122.471	2.14862	83.92
Total	61	151.419	2.56047	
Fst:		0.16085		

El dendrograma de la Figura 10 muestra las relaciones entre las poblaciones estudiadas basado en la distancia genética de las poblaciones. Este dendrograma forma tres grupos: la población más norteña quedando como una población más diferenciada (Cruz de Piedra) y los otros dos grupos son: Camahuiroa y Las Bocas por un lado, y Bajerobeta y Las Guásimas por otro. Dicho dendrograma agrupa a la población de Las Guásimas (cercana geográficamente a Cruz de Piedra con 1.8km de separación) junto a Bajerobeta, población que se encuentra separada por una distancia de 178.57 km (calculada en línea recta con las coordenadas geográficas) que corresponde a la región donde se entienden los valles agrícolas del Mayo y del Yaqui. Por otro lado, agrupa a las poblaciones Camahuiroa y Las Bocas, que son las poblaciones más sureñas y con valores de He (Nei) y Shannon más altos reportados en este trabajo y se encuentran a una distancia de 10.9km de distancia. Finalmente, la población Cruz de Piedra queda separada de las demás poblaciones, donde se encontró el valor de H y Shannon más bajo.

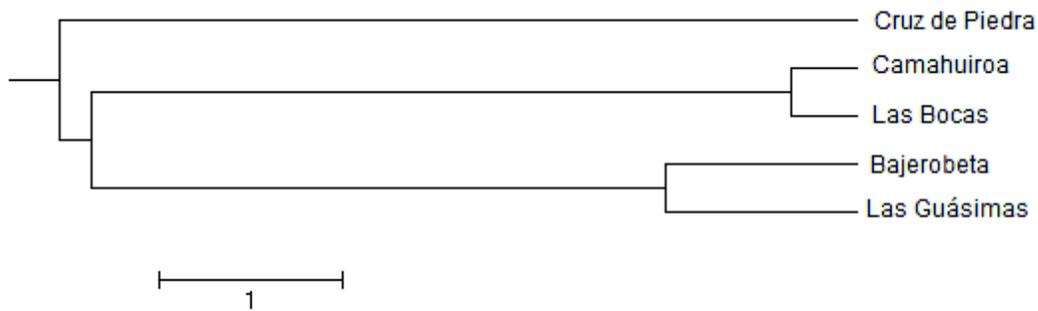


Figura 10. Dendrograma UPGMA basado en las distancias genéticas de Nei encontradas a partir de los datos obtenidos con el primer ISSR 840 de 5 poblaciones de *E. leucanthus*.

Los valores de diversidad genética (H_e , I) mostraron una tendencia geográfica (Ver figura 11 y 12). La diversidad genética fue mayor en las poblaciones del sur y disminuyó en las poblaciones del norte de la distribución. Sin embargo al hacer el análisis estadístico, y probablemente debido al tamaño de muestra tan pequeño (5 poblaciones), no hubo significancia en la relación entre diversidad y latitud ($F= 0.23$, $P= 0.66$ para diversidad de Nei y $F= 0.16$, $P= 0.70$ para el índice de Shannon, respectivamente).

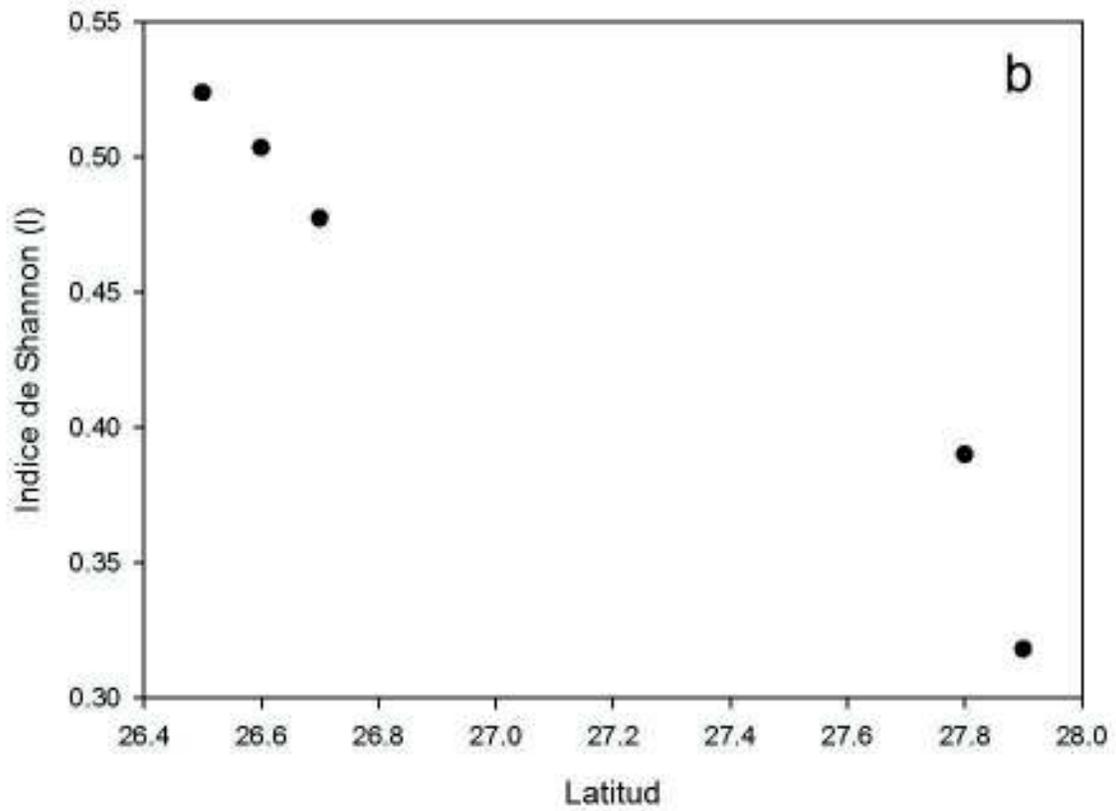


Figura 11. Índice de diversidad de Shannon como función de la latitud de las poblaciones estudiadas.

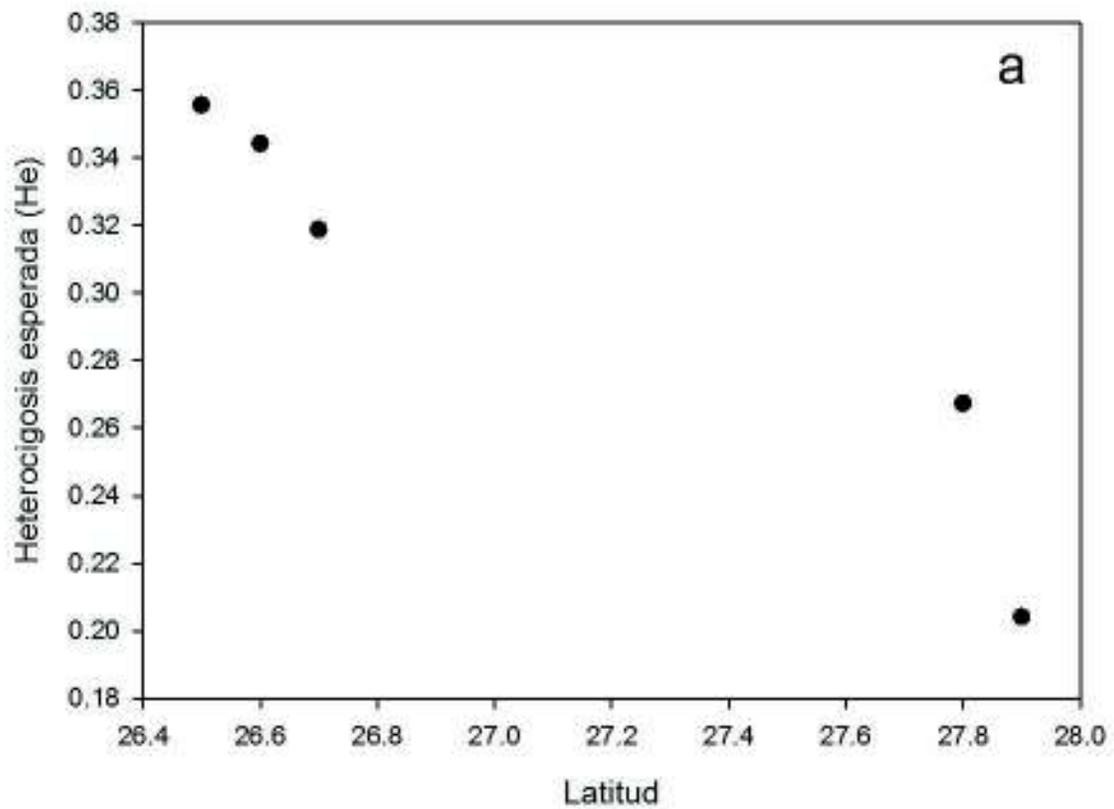


Figura 12. Valores de la heterocigosis esperada (He) como función de la latitud de las poblaciones estudiadas. Nótese cómo se observa una disminución conforme aumenta la latitud.

La prueba de Mantel que evalúa la correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas arrojó un valor no significativo ($p= 0.67$). Es decir que no hay relación significativa entre las distancias genéticas y las distancias geográficas en las 5 poblaciones de *E. leucanthus*.

VIII. DISCUSIÓN

VIII.1 Diversidad genética

Se describió la diversidad genética de 5 poblaciones de *E. leucanthus*, usando el marcador ISSR-840. Este marcador reveló 13 bandas de las cuales todas fueron polimórficas. Los niveles de diversidad ($H_e=0.29$) y diferenciación genética ($F_{st}=0.16$) fueron intermedios en comparación con otros estudios de otras especies de plantas. Por ejemplo el promedio de diversidad genética ($H_e=0.25$) y de diferenciación ($F_{st}=0.19$) para muchas especies de plantas perennes de ciclo de vida larga evaluadas con marcadores dominantes, como ISSR (Nybom 2004), son similares a los encontrados en este trabajo. La diversidad genética de las poblaciones en el extremo sur de la distribución fue mayor que la diversidad de las poblaciones al norte de la distribución.

La fase inicial de este trabajo enfrentó dificultades en la extracción debido al alto contenido de azúcares, proteínas y compuestos secundarios que dificultaba la obtención de ADN de alta calidad. Por esta razón el protocolo tuvo que ser adaptado para la eliminación de dichos compuestos duplicando algunos pasos en la extracción. Este problema en la extracción de ácidos nucleicos del tejido de plantas que producen alto contenido de compuestos secundarios o gran contenido de polisacáridos ha sido resuelto de diversas formas, tal como lo señala Falcón (2007) que modificó el protocolo conocido como *miniprep* (Doyle y Doyle, 1987) en función de estas necesidades (Falcón, 2007).

Al comparar la diversidad genética de *Echinocereus leucanthus* con la reportada para otras cactáceas de México con diversos marcadores moleculares (Tabla VIII), se puede observar que se encuentra dentro del rango de variación que se ha reportado previamente para

este grupo de especies. Por ejemplo, la diversidad genética de Nei (He) de *E. leucanthus* fue de 0.29, mientras que para otras Cactáceas los valores varían de 0.12 a 0.38 (Tabla VIII). Con respecto a la diferenciación genética entre poblaciones (Fst), *E. leucanthus* tuvo un valor de 0.16, mientras que los valores para otras especies fluctuaron entre 0.07 y 0.43 (Tabla VIII). De estas comparaciones se puede inferir que a pesar de ser una especie de distribución restringida, la diversidad genética observada está dentro del rango de variación reportada para otras cactáceas usando diferentes tipos de marcadores moleculares.

Tabla VIII. Valores de diversidad genética para varias especies de cactáceas estudiadas en México. He: diversidad genética de Nei, Fst: diferenciación genética. *Según la NOM-ECOL-059 2010

Especie	Nombre común	Tipo de Marcador	No de población	Porcentaje polimorfismo	He	Fst	Referencia
<i>Carnegiea gigantea</i>	Sahuaro	Isoenzimas	16	93.3	0.129	0.075	Hamrick et al 2002
<i>Lophocereus schottii</i>	Cimita	Isoenzimas	21	90.3	0.214	0.431	Nason et al 2002
<i>Pachycereus pringlei</i>	Cardón	Isoenzimas	19	91.7	0.212	0.076	Hamrick et al 2002
<i>Stenocereus thurberi</i>	Pitahaya	Isoenzimas	20	62.4	0.169	0.128	Hamrick et al 2002
<i>Stenocereus gummosus</i>	Pitaya agria	Isoenzimas	12	81.8	0.290	0.102	Clark-Tapia y Molina-Freaner 2005
<i>Polaskia chichipe</i>		Microsatélites	-	93.3	0.389	-	Lucio 2006
<i>Echinocereus leucanthus</i>	Órgano pequeño de flor blanca*	Marcadores de ISSR	5	83.07	0.297	0.160	Este estudio

Se compararon los índices de diversidad de Shannon (I) y de Nei (He) (Tabla IX) de varias especies amenazadas de diferentes familias como Cactaceae (*E. leucanthus*), Orchidaceae (*Cattleya labiata*, *Calanthe tsoongiana*), Caprifoliaceae (*Dipsacus chinensis*), Burseraceae (*Commiphora wightii*), Lamiaceae (*Mentha cervina*) y Cycadaceae (*Cycas guizhouensis*). En este caso se puede observar que los valores de *Echinocereus leucanthus* tienden a estar en el rango más alto de los valores reportados para especies amenazadas en diversas partes del mundo.

Tabla IX. Valores de diversidad genética para varias especies amenazadas que han sido evaluadas con marcadores ISSR. He: diversidad genética de Nei; I: Índice de diversidad de Shannon; Fst: diferenciación genética.

Especie	Tipo de marcador	Numero de poblaciones estudiadas	Porcentaje de polimorfismo	He (Nei)	I (Shannon)	Fst	Referencia
<i>Echinocereus leucanthus</i>	Marcadores ISSR	5	83.07	0.297	0.442	0.160	Este trabajo
<i>Calanthe tsoongiana</i>	Marcadores ISSR	6	96.08	0.183	0.271	0.55	Qian et al 2013
<i>Cattleya labiata</i>	Marcadores ISSR	-	62.03	0.19	0.29	-	Pinheiro et al 2012
<i>Dipsacus chinensis</i>	Marcadores ISSR	3	61.27	0.220	0.323	-	Chen et al 2013
<i>Commiphora wightii</i>	RAPS & ISSR	8	86.72	0.294	0.439	0.566	Harish et al 2014
<i>Mentha cervina</i>	Marcadores ISSR	18	98.3	0.325	0.23	-	Rodríguez et al 2013
<i>Cycas guizhouensis</i>	Marcadores ISSR	12	35.90	0.108	0.168	-	Xiao et al 2004

VIII.2. Diferenciación Genética

El análisis de varianza molecular (AMOVA) mostró que el 84% de la variación global se debe a diferencias dentro de las poblaciones y el 16% se debe a diferencias entre las poblaciones. De igual forma, el valor de F_{st} (0.16) mostró congruencia con el valor obtenido del análisis de varianza molecular. Al comparar este valor de diferenciación con el de otras especies amenazadas, es posible observar que *E. leucanthus* tiene menor diferenciación que otras especies (Tabla IX). Sin embargo, al comparar la diferenciación con los valores reportados en otras cactáceas, *E. leucanthus* se encuentra dentro del rango de variación registrado para la familia (Tabla VIII).

Las poblaciones colectadas de *E. leucanthus* se localizan en una matriz de diferente tipo de perturbación antropogénica. Por un lado se encuentran separadas por los valles agrícolas del Mayo y el Yaqui. Las poblaciones del norte están alejadas de las poblaciones del sur por una distancia de aproximadamente 200km de separación (Figura 4). Estas regiones agrícolas pueden estar funcionando como una barrera que impide el flujo genético entre las poblaciones del norte y del sur. Las poblaciones posiblemente también están siendo afectadas por las granjas acuícolas de la costa ya que al menos en el caso de la población Cruz de Piedra, las plantas de *E. leucanthus* estaban ubicadas muy cerca de una granja. Este tipo de perturbación pudiera estar afectando también a las poblaciones de esta cactácea ocasionando una barrera que impide el flujo genético entre las poblaciones al norte y las poblaciones en el sur, además que por el cambio de uso de suelo se puede estar dando una eliminación de la vegetación natural, incluida *E. leucanthus* disminuyendo los números de individuos.

VIII.3. Patrón Geográfico

En el presente trabajo se encontró un ligero patrón de disminución de la diversidad genética con la latitud. Tanto para el índice de Nei como para el de Shannon se detectó que los valores de diversidad fueron mayores en las poblaciones del sur que los valores en las poblaciones del norte.

Sin embargo, al analizar estadísticamente la relación entre diversidad genética y la latitud, no se detectó un efecto significativo. Tanto para la diversidad genética de Nei (H_e) como para la diversidad de Shannon, el análisis de regresión indica que no hay un efecto significativo ($F= 0.23$, $P= 0.66$ para diversidad de Nei y $F= 0.16$, $P= 0.70$ para diversidad de Shannon). Esto significa que los niveles de diversidad genética (H_e / I) no mostraron una clara tendencia geográfica. Sin embargo se observó una ligera tendencia a disminuir la diversidad conforme aumentaba la latitud (Ver tabla X). Por ejemplo la población que mostró la diversidad más alta fue la de Camahuiroa con valores de H_e de 0.35 y el índice de Shannon de 0.52, mientras que la población que presentó los valores más bajos fue la población más norteña (Cruz de Piedra) con valores de 0.20 y 0.31 para H_e y Shannon, respectivamente. Una posible explicación pudiera ser que el número de poblaciones analizadas fue muy pequeño para detectar estadísticamente un patrón latitudinal. Sin embargo, vale la pena resaltar que el esfuerzo de búsqueda de poblaciones de esta especie fue grande y no fue posible localizar más poblaciones. Esto se debe a que la especie es realmente rara y no existen muchas poblaciones o se requiere de un esfuerzo mucho mayor para ubicar algunas poblaciones más, que posiblemente seguirían siendo insuficientes y poder establecer con un mayor poder de resolución si existe una relación significativa entre diversidad y latitud.

El dendrograma de la Figura 10 muestra las similitudes genéticas entre las poblaciones de *E. leucanthus*. Este dendrograma agrupa por un lado a las poblaciones de Camahuiroa y Las Bocas; a Bajeroveta y las Guásimas como otro grupo, dejando a la población Cruz de

Piedra como la más diferente. Este dendrograma revela que las distancias genéticas no están estrechamente relacionadas con las distancias geográficas, ya que ubica a poblaciones genéticamente similares con poblaciones que están separadas por distancias grandes. El análisis de aislamiento por distancia confirma esta inferencia y revela que para esta especie no existe una correlación significativa entre las distancias genéticas y las distancias geográficas.

VIII.4 Perspectivas de Conservación

Los resultados de este estudio sugieren varios criterios para la conservación de esta especie. El hecho de que las poblaciones del sur tengan mayor diversidad sugiere que esta región del área de distribución posee el mayor reservorio genético con que la especie pudiera responder a cambios medioambientales. Este patrón geográfico sugiere que el conservar las poblaciones sureñas es prioritario en cualquier plan de conservación que se quiera implementar con esta especie. Una reserva ecológica en el matorral espinoso costero del sur de Sonora pudiera representar una medida de conservación efectiva de esta especie.

En resumen, la diversidad genética de *E. leucanthus* se encuentra dentro del rango de variación de las especies reportadas para el Desierto Sonorense. De igual forma, la diversidad genética también se encontró dentro del rango de variación reportado para especies de plantas amenazadas y en peligro de extinción alrededor del mundo. La variación genética de esta especie muestra una ligera tendencia a aumentar conforme disminuye la latitud por lo que la conservación de esta especie deberá priorizar esas poblaciones. Sin embargo hace falta más trabajo para un óptimo programa de conservación, ya que si bien se ha descrito la densidad de una población de *E. leucanthus*, su distribución y asociación y parte de su biología reproductiva, muchos aspectos de la ecología de esta especie, tal como la polinización y dispersión, son aún desconocidos y constituye un factor importante que pudiera ayudar a entender los mecanismos responsables de la diversidad genética.

VX. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos sugieren que los marcadores ISSR son adecuados para describir la variabilidad genética de *Echinocereus leucanthus*, en cambio, las secuencias del cloroplasto no fueron adecuadas.

La evidencia obtenida en este trabajo indica que *E. leucanthus* muestra niveles de variación genética intermedios o ligeramente mayores a los de otras especies de plantas en peligro de extinción y similares a cactáceas de zonas áridas estudiadas con otro tipo de marcador molecular.

Las poblaciones que presentaron una mayor diversidad fueron las poblaciones de Las Bocas y Camahuiroa. Este patrón geográfico sugiere que las acciones para la conservación de esta especie deberían de priorizar las poblaciones de la región sur de la distribución conocida de esta especie. Sin embargo, las observaciones sobre la abundancia de la población de Las Guásimas, encontradas en el presente trabajo, sugieren que en este sitio la densidad poblacional es relativamente más alta, por lo que también podría ser un punto importante para su conservación.

Finalmente es importante evaluar el estado ecológico de las poblaciones para conocer su densidad, su patrón de distribución y el impacto humano que está sufriendo esta especie. La integración de evidencia ecológica y genética permitiría hacer inferencias más sólidas sobre el estatus de esta especie amenazada.

X. LITERATURA CITADA

- Alcántara R. M., 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. En: Ecología Molecular Primera Edición. Instituto Nacional de Ecología, Semarnat. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), México, D. F. 541-562
- Álvarez R., Godínez-Álvarez H., Guzmán U., Dávila P. 2004. Aspectos Ecológicos de dos Cactáceas Amenazadas: Implicaciones para su Conservación. Boletín de la Sociedad Botánica de México 75: 7-16.
- Anderson E., 2001. The cactus family. Timber press, Inc. Portland, Oregon, U.S.A.
- Arias-Montes, S. 1993. Cactáceas: Conservación y Diversidad en México. Diversidad Biológica en México. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural. México D.F. Vol. XLIV (especial) pp. 109-116
- Bravo, H. y Sánchez-Mejorada. 1991. Las cactáceas de México, vols. 2 y 3. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Challenger, A. 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México: presente y futuro. CONABIO-Instituto de Biología, UNAM-Agrupación Sierra Madre, México.
- Challenger, A., R. Dirzo, J. C. López-Acosta, E. Mendoza, A. Lira-Noriega e I. Cruz. 2009. Factores de cambio y estado de la biodiversidad, en Capital natural de México, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. CONABIO, México, pp. 37-73.
- Cires E., C. Cuesta y J.A. Fernández-Prieto 2013. Genetic diversity and structure in fragmented populations of the endangered species *Ranunculus cabrerensis* (Ranunculaceae): implications for conservation. Biología. Section Botany. 68: 30-40

- Clark-Tapia, R. C. Alfonso-Corrado, L. E. Eguiarte y F. Molina-Freaner. 2005. Clonal diversity and distribution in *Sterocereus eruca* (Cactaceae), a narrow endemic cactus of the Sonoran Desert. *American Journal of Botany* 92: 272-278
- Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (CONABIO). Consultado en mayo 2013 (<http://www.biodiversidad.gob.mx/biodiversidad/biodiversidad.html> y <http://www.biodiversidad.gob.mx/pais/quees.html>).
- Cota, J. H. y C. T. Philbrick. 1994. Number of variation and polyploidy in the genus *Echinocereus*. *American Journal of Botany* 81: 1054-1062.
- Dimmitt M. A. 2000. Biomes & Communities of the Sonoran Desert Region pp. 3-18. En: Philips, S. & P. Wentworth (Eds.), *A Natural History of the Sonoran Desert*. Arizona-Sonora Desert Museum. Tucson, Az.
- Doyle, J. J. y J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11-15.
- Espinosa, D.S., S. Ocegueda, C. Aguilar, O. Flores, J. Llorente, B. Vázquez. 2008. El conocimiento biogeográfico de las especies y su regionalización natural. En: *Capital Natural de México*, Vol. 1: Conocimiento Actual de la Biodiversidad. CONABIO, México D.F., pp. 33-65.
- Falcón L. I. y A. Valera 2007. Extracción de Ácidos Nucleicos pp. 499-515. En: Eguiarte, L., V. Souza y X. Aguirre (Comp.), *Ecología Molecular Primera Edición*. Instituto Nacional de Ecología, Semarnat. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (Conabio), México, D. F.
- Golenberg E., M. Clegg, M. Durbin, J. Doebley y D. Pow. 1993 Evolution of a Noncoding region of the chloroplast genome. *Molecular phylogenetics and evolution* Vol. 2 No 1. pp. 52-64
- Gutiérrez-Ortega J. S., T. Kajita, Molina-Freaner F. 2014. Conservation genetics of an endangered cycad: *Dioon sonorense* (Zamiaceae): Implications of variation of chloroplast DNA. *Botanical Sciences* 92: 441-451.

- Guzmán U., S. Arias, P. Dávila 2003. Catálogo de cactáceas mexicanas Primera Edición. Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México D.F.
- Groom M., G. Meffe y R. Carrol 2006. Principles of Conservation Biology tercera edición. Sinauer associates, 23 Plumtree Road, Sunderland, MA USA.
- Hamilton M. B. 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variations. *Molecular Ecology* 8: 515-525
- Hernández, H. M. y H. Godínez-Álvarez. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana* 26: 33-52
- Jiménez-Sierra C. L. 2011. Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista Digital Universitaria*. Universidad Nacional Autónoma de México. Vol. 12 Núm. 1.
- Llorente-Bousquets, J., y S. Ocegueda 2008. Estado del conocimiento de la biota, en *Capital natural de México*, vol I: Conocimiento actual de la biovidersidad. CONABIO, México, pp. 283-322.
- Mandel J., E. Milton, L. Donovan, S. Knapp, J. Burke. 2013. Genetic diversity and population structure in the rare Algodones sunflower (*Helianthus niveus* ssp. *tephrodes*). *Conservation Genetics* 14; 31-40
- Martin, P.S., D. Yetman, M. Fishbein, P. Jenkins, T.R. Van Devender y R. K. Wilson. 1998. *Gentry's Rio Mayo Plants. The Tropical Deciduous Forest and Environs of Northwest of Mexico*. University of Arizona Press, Tucson, Arizona.
- Miller, M. 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA). Version 1.3. Department of Biological Sciences. Northern Arizona University, Estados Unidos de América.
- Molina-Freaner, F .E., T. A. Markow, E. J. Pfeiler, O.R. Rojas-Soto, A. Varela-Romero, A. Quijada-Mascareñas, M. Esqueda-Valle y G. Yépiz-Plascencia. 2010. Diversidad genética de la biota.

pp. 97-128 En: F. E. Molina-Freaner y T. R. Van Devender, (eds.). Diversidad biológica de Sonora. UNAM, México.

Morales-Romero, D. 2013. Influencia de la conversión de matorrales a praderas de zacate buffel en las propiedades del suelo y la demografía de una cactácea columnar del Noroeste de México. Tesis Doctoral. Instituto de Ecología UNAM; Posgrado en Ciencias Biológicas. UNAM. México D.F.

Moritz C. 2002. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes than sustain it. *Systematic Biology*. 5: 238-254.

Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-295

Nybom H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraespecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13, 1143–1155.

Otero-Arnaiz, A., J. Cruse-Sanders, A. Casas y J.L. Hamrick. 2004. Isolation and characterization of microsatellites in the columnar cactus: *Polaskia chichipe* and cross-species amplification within the tribe Pachycereae (Cactaceae). *Molecular Ecology* 4: 265-267.

Paredes-Aguilar, R., T.R. Van Devender y R. S. Felger. 2000. Cactáceas de Sonora: Su diversidad, uso y conservación. Arizona-Sonora Desert Museum Press, Tucson.

Parker P., A. Snow, M. Schug, G. Booton, P. Fuerst 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79: 361-382

Paterson I. y Zachariades C. 2013. ISSRs indicate that *Chromolaena odorata* invading southern Africa originates in Jamaica or Cuba. *Biological Control* 66: 132-139

Pinheiro, R. L., Carregosa R. A., Cruz da Silva A. V., da Silva L. A., Garcia P. K., Cardamone D. L. 2012. Genetic diversity and population structure in the Brazilian *Cattleya labiata* (Orchidaceae) using RAPD and ISSR marker. *Plant Systematics and Evolution* 298:1815–1825

- Piñero, D., A. Barahona, L. Eguiarte, A. Rocha-Olivares, R. Salas-Lizana . 200 8pp. 415-435. La variabilidad genética de las especies: Aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, en: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. El Capital Natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. México.
- Piñero, D., J. Caballero-Mellado, D. Cabrera-Toledo, C. Canteros, A. Casas, A. Castañeda Sortibrán, A. Castillo, R. Cerritos, O. Chassin-Noria, P. Colunga-GarcíaMarín, P. Delgado, P. Díaz-Jaimes, L. E. Eguiarte, A. E. Escalante, B. Espinoza, A. Fleury, S. Flores Ramírez, G. Fragoso, J. González-Astorga, V. Islas Villanueva, E. Martínez, F. Martínez, J. Martínez-Castillo, A. Mastretta Yanes, R. Medellín, L. Medrano-González, F. Molina-Freaner, B. Morales Vela, A. Murguía Vega, E. Payró de la Cruz, M. R. Reyes-Montes, M. R. Robles Saavedra, G. Rodríguez-Arellanes, L. Rojas Bracho, R. Romero-Martínez, J. H. Sahaza-Cardona, R. Salas Lizana, E. Sciutto, C. Scott Baker, Y. Schramm Urrutia, C. Silva, V. Souza, M. L. Taylor, J. Urbán Ramírez, M. Uribe-Alcocer, M. J. Vázquez Cuevas, E. 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: Estudios en especies mexicanas pp. 437-494, en: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. El Capital Natural de México, vol I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO, México.
- Premoli C. A., Quiroga M. P., Souto C. P., P. Mathiasen. 2011. Genética de la conservación: de poblaciones a filogeografía Cap. II. En: Simonetti, J. y R. Dirzo, Conservación Biológica: Perspectivas desde América Latina. Primera Edición. Editorial Universitaria, S. A. Santiago de Chile.
- Primack, R.B., R. Rozzi, P. Feinsinger, R. Dirzo, y F. Massardo. 2001. Elementos de Conservación Biológica: Perspectivas Latinoamericanas. Fondo de Cultura Económica, México DF.
- Qian, X., C. Wang, M. Tian. 2013. Genetic Diversity and Population Differentiation of *Calanthe tsoongiana*, a Rare and Endemic Orchid in China. International Journal of Biological Sciences No. 14 20399-20413.

- Rocha M. y J. Gasca 2007. Ecología molecular de la conservación en: Ecología Molecular primera edición. Instituto Nacional de Ecología, Semarnat. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (Conabio), México, D. F.
- Rodríguez-Echeverría A, S.; Freitas, H., y Van der Putten W. H. 2008. Genetic diversity and differentiation of *Ammophila arenaria* (L.) Link as revealed by ISSR markers. Journal of Coastal Research 24: 122–126.
- Sánchez O., Medellín R., Aldama A., Goettsch B., Soberón J., Tambutti M., Soto M. A., Gallo-Reynoso J. P., Villalobos-Hiriart J. L., Mejía-Ortiz L. M., Álvarez-Noguera F., González-Medrano F. 2007. Método de Evaluación de riesgo de extinción en especies silvestres en México. SEMARNAT, Instituto Nacional de Ecología, Instituto de Biología, UNAM y CONABIO, México.
- Santos-González A. E. 2011. Estudio ecológico de una población sonorensis de *Echinocereus leucanthus* N.P. Taylor, una cactácea enlistada en la NOM-059. Tesis de Licenciatura, Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México.
- Schlotterer C. 2004. The evolution of molecular markers. Just a matter or fashion?. Nature Reviews Genetic 5: 63-69.
- Schneider S., D. Roessli, L. Excoffier. 2000. Arlequin: a software for population genetic data analysis. User manual ver vol 2 pp. 2496-2497.
- Scheinvar E. 2008. Genética de poblaciones silvestres y cultivadas de dos especies mezcaleras: *Agave cupreata* y *Agave potatorum*. Tesis de Maestría. Instituto de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF.
- Slatkin, M. 1993. Isolation by Distance in Equilibrium and Non-Equilibrium Populations. Evolution 47: 264-279.
- SEMARNAT 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-ecol-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental especies nativas de México de flora y fauna silvestre, categorías de riesgo y

especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio, lista de especies en riesgo. Secretaría de Gobernación, México

Southwest environmental information network (SEINet 2013). Seinet collections search results: *Echinocereus leucanthus*. Consultado por última vez en agosto 2014 (<http://swbiodiversity.org/seinet/collections/list.php>).

Taberlet P., Gielly L., Bouvet P. J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Molecular Ecology Notes* 5: 152-154

Taylor, N. P 1985. The genus *Echinocereus*. Ed. The Royal Botanical Gardens, Kew in association with Timber Press. Portland Oregon.

Van Devender, T. R., R. S Felger, M. Fishbein, F. E. Molina-Freaner, J. J. Sanchez-Escalante y A. L. Reina Guerrero et al. 2010. Biodiversidad de las plantas vasculares. En Molina-Freaner, F. E. y T. R. Van Devender (Eds). *Diversidad Biológica de Sonora*. Universidad Nacional Autónoma de México y CONABIO. México D.F.

Vovides, A.P. 1995. Experiencias y Avances en el conocimiento de las plantas mexicanas en peligro de extinción. En: E. Linares, P. Dávila, F. Chiang, R. Bye y T. Elias (Eds.) *Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques*. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Xia T., L. Meng, K. Mao, B. Tian, G. Miehle, y J. Liu. 2008. Genetic variation in the Qinghai-Tibetan Plateau Endemic and Endangered conifer *Cupressus gigantea*, detected using RAPD and ISSR markers. *Silvae Genetica* 57: 85-92.

Xiao L., X. Ge, X. Gong, G. Hao, X. Zheng 2004. ISSR Variation in the Endemic and Endangered Plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae). *Annals of Botany* 94: 133-138.

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.

Zazueta-Bustamante H. 2013. Diversidad genética de *Dioon sonorensis* utilizando marcadores moleculares ISSR. Memoria de Tesis. Universidad de la Sierra. Moctezuma, Sonora, México.

Zietkiewicz Ewa, Rafalski Antoni y Labuda Damian. 1994. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

XI. APÉNDICES

Apéndice I. Protocolo de extracción de ADN de CTAB *miniprep* (Doyle y Doyle 1987) utilizado por Gutiérrez-Ozuna (2006) con modificaciones para plantas de gran contenido de azúcares y carbohidratos según Falcón (2007):

1. Moler en un mortero alrededor de 0.5g de tejido (2-3 centímetros del ápice) hasta obtener una consistencia fina.
2. Agregar 260µl de buffer de extracción CTAB y 975µl de buffer STE con una micro pipeta. Moler hasta eliminar los grumos. Recuperar el contenido en un tubo eppendorf de 1.5ml.
3. Centrifugar a 12000 rpm durante 8 minutos.
4. Eliminar el sobrenadante y re suspender en vórtex con 250µl de buffer CTAB y 750µl de buffer STE.
5. Centrifugar a 12000 rpm durante 8 minutos.
6. Eliminar el sobrenadante y agregar 600µl de buffer CTAB 2X.
7. Agregar 4µl de RNAasa (7000 u/ml) e incubar por 20 minutos a 37°C a baño maría.
8. Agregar 25µl de Proteinasa-K (solución de 20 mg/ml) e incubar por 30 minutos a 65°C a baño maría.
9. Incubar en hielo durante 15 minutos.
10. Agregar 600µl de cloroformo:octanol 24:1, agitar hasta homogenizar.
11. Centrifugar a 9000 rpm durante 12 minutos.
12. Recuperar el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo con ayuda de una micropipeta.
13. Repetir los pasos 10, 11 y 12.
14. Precipitar el ADN con 600µl de isopropanol frío.
15. Dejar reposar por 24 horas a -20°C.

16. Centrifugar a 12500 rpm durante 7 minutos y eliminar el sobrenadante.
17. Limpiar el ADN agregando 1 ml de etanol al 70% frío y agitar suavemente por 5 minutos.
18. Eliminar el sobrenadante, secar el pellet y agregar 100µl de agua ultrapura.

Apéndice II . Preparación de los Buffers de Extracción

Según el protocolo utilizado por Scheinvar (2008):

Buffer de extracción CTAB 2X

- Tris-HCl 100 mM pH8
- NaCl 1.4 M
- EDTA 20 mM pH8
- CTAB 2%
- b-mercaptoetanol 0.3% (agregar este reactivo hasta el momento de usar el buffer)

Buffer de extracción CTAB

- Tris-HCl 100 mM pH8
- NaCl 1.5 M
- EDTA 20 mM pH8
- CTAB 4%
- PVP40 4%
- Ácido ascórbico 0.1%
- DIECA 0.1%
- b-mercaptoetanol 0.3% (agregar este reactivo hasta el momento de usar el buffer)

Buffer de extracción STE

- Tris-HCl 100 mM pH8
- EDTA 50 mM pH8
- NaCl 100mM

- b-mercaptoetanol 0.3% (agregar este reactivo hasta el momento de usar el buffer)

Apéndice III: Fórmulas generales de los índices H (Nei), I (Shannon) y el coeficiente de diferenciación genética G_{ST} :

La diversidad genética (H) se calculó según 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.

Índice de diversidad de Shannon-Wiener (I), con la fórmula:

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

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

Coefficiente de diferenciación genética (G_{ST}) según Nei (1978) con la fórmula:

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

Donde D_{ST} es el promedio de la distancia genética entre poblaciones y H_T la diversidad total de la especie.

Apéndice IV. Programas utilizados para la amplificación por PCR para las distintas parejas de primers

trnh-psba				
	Ciclo	Segmento	Temperatura	Tiempo (minutos)
1	1	1	80°C	5
2	30	1	94°C	0.5
		2	49°C	0.5
		3	72°C	2
3	1	1	72°C	5
4	1	1	4°C	

atab-btab ctab-dtab etab-ftab				
	Ciclo	Segmento	Temperatura	Tiempo (minutos)
1	1	1	94°C	2
2	35	1	94°C	15 seg
		2	49°C	30 seg
		3	72°C	90 seg
3	1	1	72°C	3
4	1	1	4°C	

atpB-rbcL				
	Ciclo	Segmento	Temperatura	Tiempo (minutos)
1	1	1	94°C	2
2	30	1	94°C	45 seg
		2	48°C	1 15seg
		3	72°C	1 15seg
3	1	1	72°C	10
4	1	1	4°C	

rpl20-rps12				
	Ciclo	Segmento	Temperatura	Tiempo (minutos)
1	1	1	80°C	5
2	30	1	94°C	0.5
		2	50°C	0.5
		3	72°C	2
3	1	1	72°C	5
4	1	1	4°C	

Apéndice V Glosario con conceptos básicos de genética.

Alelo: Cada una de las formas alternativas que puede tener un mismo gen o secuencia de ADN.

Bandas: Fragmentos de ADN que tienen el mismo peso molecular que se agrupan juntos en el gel electroforético.

Locus: Es una región específica de un gen o una secuencia de ADN

Loci: Plural de locus

Marcadores Moleculares: Son herramientas que se basan en segmentos de ADN con una ubicación física en el genoma. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos únicos o múltiples.

PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa por sus siglas en inglés): Es una técnica utilizada para amplificar una región específica del ADN situada en una región conocida.

Polimorfismo: Diferentes formas de un alelo.

Primers (u Oligonucleótidos): Consisten en secuencias relativamente cortas que son diferentes entre sí y a su vez complementarias con sitios de reconocimiento en el ADN. Determinan la región donde se llevara a cabo la amplificación.

Análisis de Varianza Molecular (AMOVA): Es un modelo estadístico para la variación molecular en las especies similar al ANOVA.

Diferenciación Genética (F_{st}): Estima la proporción de variación genética que se encuentran dentro y entre las poblaciones.

Apéndice VI. Matrices de presencia-ausencia generadas con el primer ISSR 840 en 5 poblaciones de *Echinocereus leucanthus*.

A) Población Cruz de Piedra

LOCUS														Individuo		
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	Nombre del individuo	Clave del individuo		
1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	CP-1	A-1		
0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	CP-2	A-2		
0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	CP-3	A-3		
1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	CP-4	A-4		
1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	CP-5	A-5		
1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	CP-8	A-6		
1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	CP-9	A-7		
0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	CP-10	A-8		
1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	CP-11	A-9		
1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	CP-13	A-10		
1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	CP-14	A-11		
1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	CP-15	A-12		

B) Población Las Guásimas

LOCUS														Individuo		
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	Nombre del individuo	Clave del individuo		
0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	LG-1	E-1		
1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	LG-3	E-2		
1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	LG-4	E-3		
1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	LG-5	E-4		
1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	LG-7	E-5		
1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	LG-14	E-6		
1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	LG-15	E-7		
1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	LG-16	E-8		
1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	LG-17	E-9		
0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	LG-18	E-10		
1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	LG-20	E-11		
1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	LG-21	E-12		
0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	LG-22	E-13		
0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	LG-26	E-14		

C) Población BajeroBeta

LOCUS														Individuo		
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	Nombre individuo	del	Clave individuo	del
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	BJ-1		D-1	
1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	BJ-2		D-2	
1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	BJ-3		D-3	
1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	BJ-7		D-4	
0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	BJ-9		D-5	
1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	BJ-10		D-6	
1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	BJ-11		D-7	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	BJ-13		D-8	
1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	BJ-14		D-9	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	BJ-17		D-10	
0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	BJ-12		D-11	

D) Población Las Bocas

LOCUS														Individuo		
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	Nombre individuo	del	Clave individuo	del
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	LB-6		C-1	
0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	LB-2		C-2	
0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	LB-3		C-3	
1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	LB-1		C-4	
0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	LB-9		C-5	
1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	LB-11		C-6	
1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	LB-12		C-7	
1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	LB-13		C-8	
1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	LB-14		C-9	
1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	LB-15		C-10	
1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	LB-16		C-11	
1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	LB-17		C-12	
1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	LB-21		C-13	

E) Población Camahuroa

LOCUS														Individuo		
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	Nombre del individuo	Clave del individuo	del	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	CA-1	B-1		
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	CA-4	B-2		
0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	CA-5	B-3		
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	CA-6	B-4		
1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	CA-8	B-5		
0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	CA-9	B-6		
0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	CA-10	B-7		
1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	CA-12	B-8		
1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	CA-14	B-9		
0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	CA-15	B-10		
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	CA-16	B-11		
0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	CA-17	B-12		
0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	CA-19	B-13		
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	X-22	B-14		