

Informe final* del Proyecto. R187

Estructura genética y biología reproductiva de *Stenocereus eruca*: una cactácea endémica amenazada de las Planicies de Magdalena, Baja California Sur

Responsable:	Dr. Francisco Elizandro Molina Freaner
Institución:	Universidad Nacional Autónoma de México Instituto de Ecología Estación Regional Noroeste Departamento de Ecología Evolutiva
Dirección:	Blvd. Luis Donaldo Colosio s/n entre Sahuaripa y Madrid, Los Arcos, Hermosillo, Son, 83250, México
Correo electrónico:	freaner@servidor.unam.mx
Teléfono/Fax:	91(62)13 9303
Fecha de inicio:	Septiembre 15, 1998
Fecha de término:	Abril 10, 2000
Principales resultados:	Informe final, cartografía.
Forma de citar** el informe final y otros resultados:	Molina Freaner, F.E. y R. Clark, 2001. Estructura genética y biología reproductiva de <i>Stenocereus eruca</i> : una cactácea endémica amenazada de las Planicies de Magdalena, Baja California Sur. Universidad Nacional Autónoma de México Instituto de Ecología. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. R187 . México D. F.
Forma de citar hoja de cálculo	Molina Freaner, F.E. y R. Clark, 2001. Estructura genética y biología reproductiva de <i>Stenocereus eruca</i> : una cactácea endémica amenazada de las Planicies de Magdalena, Baja California Sur. Universidad Nacional Autónoma de México Instituto de Ecología. Hoja de cálculo SNIB-CONABIO proyecto No. R187 . México D. F.

Resumen:

El presente proyecto tiene como propósito documentar la variación y estructura genética de *Stenocereus eruca*; especie endémica de las planicies de Magdalena, Baja California Sur. Esta cactácea es extremadamente interesante desde el punto de vista biológico por su hábito rastrero. Es una especie que se supone se reproduce predominantemente por la vía asexual con un rango de distribución muy restringido y con poblaciones distantes de su biología reproductiva. El hábitat que ocupa está en riesgo eminente por el avance de las actividades agrícolas en el área de Las Planicies de Magdalena, así como por el saqueo de colectores ilegales de cactus. Por lo tanto, es apremiante realizar un estudio básico sobre su variación y estructura genética. En especies con reproducción asexual, es difícil reconocer a los clones en el campo y por lo tanto no es fácil hacer evaluaciones sobre sus tamaños poblacionales. En este proyecto proponemos hacer una descripción de la estructura genética y clonal de esta cactácea rastrera que nos permita en el largo plazo implementar estrategias de conservación que resulten viables para esta especie.

-
- * El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en www.conabio.gob.mx
 - ** El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

REPORTE FINAL DEL PROYECTO R187

Estructura genética y biología reproductiva de *Stenocereus eruta*: una cactácea amenazada, endémica de las Planicies de Magdalena, Baja California Sur.

Dr. Francisco Molina Frenar Ing. Ricardo Clark
Tapia

Instituto de Ecología UNAM Estación Regional del
Noroeste Ave. Colosio s/n esq. Madrid Colonia Los
Arcos
Hermosillo, Sonora C.P. 83250

**ESTRUCTURA GENÉTICA Y BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE *STENOCEREUS ERUCA*: UNA CACTACEA
ENDÉMICA AMENAZADA DE LAS PLANICIES DE MAGDALENA, BAJA CALIFORNIA SUR.**

INTRODUCCIÓN

Genética de Poblaciones

El estudio de la genética de poblaciones está enmarcada dentro de la microevolución. La genética de poblaciones es, junto con la ecología, una de las pocas disciplinas biológicas que cuentan tanto con un desarrollo teórico como con uno observacional (Lewontin 1974).

La genética de poblaciones es la disciplina que describe y analiza la variación genética dentro y entre poblaciones a partir de las frecuencias alélicas y genotípicas. La interpretación de esta variación en los organismos se basa en el principio de Hardy-Weinberg, el cual establece que en poblaciones panmíticas y en ausencia de fuerzas evolutivas como migración, selección, deriva génica y mutación, las frecuencias alélicas permanecen constantes de generación en generación, lo que permite predecir las frecuencias genotípicas a partir de las alélicas (Eguiarte 1988, 1990; Hartl y Clark 1989). La manera como se distribuye la variación genética dentro y entre poblaciones constituye su estructura genética. Describir la estructura genética de las poblaciones de organismos es el paso previo para entender que fuerzas evolutivas han prevalecido en la evolución de estas poblaciones (Loveless y Hamrick 1984).

Variación Genética

El estudio moderno de los procesos evolutivos está basado en comprender los niveles de variación genética, los procesos por los cuales esta se origina y los factores que alteran los patrones de variación en las poblaciones (Futuyma 1998).

Las técnicas de la biología molecular desarrolladas a partir de los años 60's han permitido observar una gran variabilidad genética en poblaciones naturales (Lenay 1994; Hartl y Clark 1989). El procedimiento más utilizado para estimar niveles de variación ha sido principalmente la electroforesis de proteínas (Eguiarte y Piñero 1990, Hartl y Clark 1989, Leberg 1992).

La técnica de electroforesis puede detectar aquellas diferencias en la secuencia de nucleótidos que tienen efectos en la sustitución de uno o varios aminoácidos y estos a su vez, en la estructura final de la proteína. Las diferencias en la composición de aminoácidos de las proteínas se pueden detectar por diferencias en polaridad y peso al aplicársele una corriente eléctrica. Ciertas sustituciones de aminoácidos alteran la carga neta de la proteína lo que genera variantes (alelos), los cuales pueden ser distinguidos por

su movilidad electroforética. En el caso de que todos los individuos analizados presenten la misma movilidad electroforética, se considera al gen (locus) monomórfico. Si por el contrario, la movilidad varía, se considera al locus polimórfico, en el que pueden distinguirse genotipos homocigos y heterocigos (Hedrick 1985; Futuyma 1998).

Biología de la Conservación

En este siglo y como consecuencia de los procesos de desarrollo y crecimiento poblacional, la diversidad del planeta esta siendo reducida de una forma acelerada (Frankham 1995). Ello ha generado en los últimos años una preocupación activa en torno a la conservación de la diversidad biológica, tanto in situ como ex situ (Lande 1988; Eguiarte et al. 1992).

En el diseño de estrategias de conservación de especies se han utilizado datos demográficos y muy recientemente genéticos (Lande 1988; Eguiarte y Piñero 1990). Esto últimos, se han convertido en información importante para establecer estrategias de conservación, debido al gran desarrollo que han tenido las diferentes técnicas moleculares en estas tres últimas décadas.

Los estudios genética de poblaciones pueden ser una herramienta útil para decidir el número de individuos por población y el número de poblaciones que se deben muestrear para conservación en bancos de germoplasma o reintroducciones, así como para determinar cuales son las poblaciones criticas para conservación in-situ y delimitación de áreas protegidas (Lande 1988).

Las especies con distribuciones geográficas restringidas, bajas densidades y que crecen en habitats muy específicos son más propensas a experimentar los efectos de la deriva génica en comparación con aquellas de amplia distribución y que se encuentran menos aisladas (Godt y Hamrick 1993). Sin embargo, este patrón puede modificarse dependiendo de los niveles de flujo génico que ocurran dentro y entre poblaciones y del sistema de cruzamiento predominante en la especie. Las especies que estén dentro de esta categoría son las que potencialmente están en peligro de desaparecer y en consecuencia, son las más urgentes a estudiar y conservar.

Uno de los grupos de plantas nativas del continente americano y del cual se han realizado escasos estudios, es el de las Cactáceas. México es el más importante centro de concentración de especies a nivel mundial (Hernández y Godínez 1994), ya que el 68 % de las cactáceas descritas hasta la fecha se distribuyen en nuestro país (Arias 1993). La gran mayoría de las cactáceas presentes en México, presentan rangos geográficos restringidos, lo que las convierte endémicas de nuestro país, pero a su vez susceptibles a verse amenazadas debido a la constante presión que se ejerce sobre ellas. Una de estas cactáceas es *Stenocereus eruta*, una especie amenazada y endémica de las Planicies de Magdalena y extremadamente interesante desde el punto de vista biológico, ya que es una de las dos únicas cactáceas del grupo columnar que presenta hábito rastrero: *S. eruta* en Norteamérica y *Trichocereus thelegonus* en América del Sur (Gibson y Nobel 1986).

Objetivo General

El objetivo de este estudio es evaluar el estado actual de la estructura genética y conocer aspectos básicos de la biología reproductiva de *S. eruta*, especie endémica y amenazada incluida en la Norma Oficial Mexicana. Esta especie ofrece una excelente oportunidad para evaluar la relación entre la variación genética y la distribución geográfica al compararla con *S. gummosus* especie de amplia distribución. Además, otro objetivo es el generar información básica que nos permite plantear algunas estrategias de conservación viables para *S. eruta*.

Objetivos particulares

- 1.- Estimar los parámetros de variación genética poblacional: polimorfismos, número de alelas por loci, heterocigosis observada y esperada e índices de fijación de *S. eruta*.
- 2.- Estimar los parámetros de la estructura genética: f , F y B de la especie.
- 3.- Describir la estructura clonal de esta cactácea.
- 5.- Conocer la biología reproductiva y ecología de la polinización de *S. eruta*.
- 4.- Hacer recomendaciones sobre las estrategias de conservación más viables para *S. eruta*.

Stenocereus eruca (Brandege) Gibson & Horak (*S. eruca* (Brandege) Britton & Rose). Nombres comunes: chirinola, casa de ratas, creeping devil. La especie toma su nombre del griego debido a su similitud con una oruga (Fig. 1).

Esta cactácea presenta tallos procumbentes, excepto por las puntas erectas o ascendentes. Ramas de 1-3 m de largo, 4-8 cm de diámetro por lo común simples, enraizadas sobre la superficie inferior y mueren en el extremo más viejo y crecen en el otro. A veces varias ramas parten de una principal, que funciona como centro. Presenta de 12-18 costillas, con areolas grandes a distancias de 2 cm entre ellas. Sus espinas son corpulentas de color gris a plateado, las exteriores son prolongadas y cilíndricas, las interiores gruesas y aplanadas; la más larga alcanza unos 3 cm de longitud. Las flores tienen forma funeliforme de color crema amarillento, tienen una longitud de 10-12 cm de longitud y 8-10 cm de ancho con un pericarpio muy espinoso. Los frutos son globosos de 3-4 cm de diámetro, color escarlata con espinas al madurar. El número de cromosomas de la especie aún no se ha determinado, pero a juzgar por el patrón de bandas observadas en la mayoría de las enzimas ensayadas y su similitud con *S. gummosus*, es muy probable que sea diploide. Su distribución está restringida a las planicies de Magdalena, Baja California Sur (Fig. ,A) (Turner et al. 1995; Cancino et al. 1995).



Fig .1-- Individuos de *S. eruca* en Poza Grande, B.C.S.

Tabla 1.- Ubicación geográfica de los sitios de colecta de *S. eruta*.

SITIO DE COLECTA	UBICACIÓN GEOGRAFICA
A.- LA BOCANA	26°03'28" N y 112°17'21" W
B.- LA POZA GRANDE	25°45'25" N y 112°02'48" W
C.- SANTO DOMINGO	25°29'44" N y 111°53'12" W
D.- ADOLFO LÓPEZ MATEOS	25°11'42" N y 112°05'27" W
E.- SAN CARLOS Km. 35	24°54'47" N y 111°59'32" W
F.- SAN CARLOS-TERMOELECTRICA	24°49'35" N y 112°05'09" W
G.- ESTERO SALINAS	24°36'39" N y 111°46'49" W
H.- EL CAYUCO	24°34'24" N y 111°41'56" W

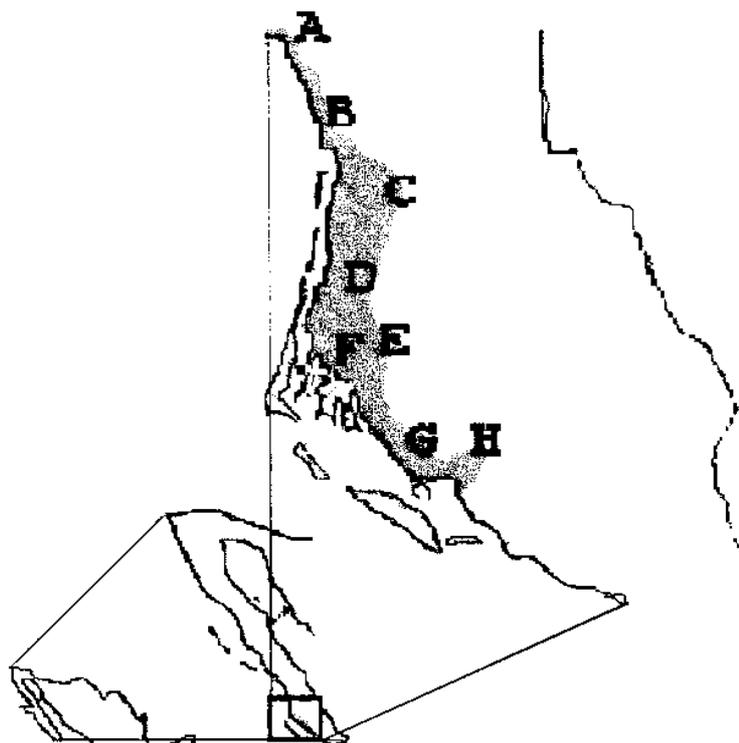


Fig. 2.- Distribución geográfica de *S. eruta* y sitios de colecta. Tomado de Turner et al. 1995 y Cancino et al 1995. (ver tabla 2 para identificar a las poblaciones)

MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio

Dado que se conoce con precisión los rangos de distribución de *S. eruca* (Turner et al. 1995; Cancino et al. 1995, Fig. 2), se trató que las colectas realizadas incluyeran todo el rango de distribución de la especie. Por tal motivo, primeramente se realizó un recorrido por todo su rango de distribución, y en base a esta prospección se colectaron 8 poblaciones (Tabla 1). No se pudieron colectar las poblaciones de isla Santa Margarita e isla Magdalena por lo que nuestro muestreo no incluyó realmente toda la distribución geográfica de esta especie.

La posición geográfica de las localidades fue obtenida con un geoposicionador (Magellan GPS Satellite Navigator). La distancia entre poblaciones de *S. eruca* varía de 27 a 220 km.

Caracterización de la estructura y variación genética

De cada población muestreada se colectó de 50 individuos una porción de clorenquima de una costilla (aproximadamente 2.0 cm³). Para la colecta, cada individuo debía estar separado por lo menos de 3 a 5 metros del siguiente individuo colectado para reducir la probabilidad de muestrear al mismo clon. Además, para tener representada la población, la colecta se realizó recorriendo un transecto de por lo menos 200 metros. El tejido colectado se mantuvo en nitrógeno líquido hasta llegar al laboratorio en donde se almacenó en un ultracongelador a -70°C hasta ser utilizado.

El método de extracción utilizado consistió en macerar 0.04mm³ de clorenquima de cada individuo colectado en 0.3 ml. de buffer de extracción. El buffer de extracción utilizado fue el de Milton et al. (1979) debido a que en ensayos preliminares fue el buffer que dió mejor resolución entre varios ensayados. El extracto obtenido fue absorbido en °wicks° de papel filtro de 2x10mm, los cuales se colocaron en *geles* de 12% de almidón y 5% de sacarosa.

La electroforesis en geles de almidón fue utilizada para analizar 11 sistemas enzimáticos en tres sistemas de buffer electroforéticos. El sistema 6 de Wendel y Weeden (1989) fue utilizado para analizar a G6PDH, MDH, PGI, EST, ADH, Y DIA. El sistema D de Stuber et al. (1988) fue usado para resolver a APH, PGM Y MNR, y el sistema PP de Mitton et al. (1977) para resolver a SOD y LAP. El protocolo de tinción fue idéntico al de Wendel y Weeden (1989) para G6PDH, EST, MDH, ADH y SOD, al de Morden et al. (1987) para LAP, PGM y PGI y al de Stuber et al. (1988) para MNR y DIA. El apéndice 1 presenta una descripción del método seguido

para realizar las extracciones y las electroforesis (Mitton et al. 1979; Stuber et al. 1988; Wendel y Weeden 1989), así como las condiciones de corrida. El apéndice 1 también muestra las recetas de los buffers utilizados y las soluciones de tinción para cada una de las enzimas ensayadas. Una vez teñidas las rebanadas para cada enzima se fijaron en alcohol etílico al 35% durante 24 horas en el refrigerador.

A partir de los geles teñidos de cada enzima, se realizó una lectura visual de los mismos. Los geles presentan un patrón de bandas, del cual se puede inferir el genotipo de cada individuo. En un locus, el número de bandas que se observan depende de si los individuos son homocigos o heterocigos y de la estructura cuaternaria de la enzima. Si se trata de un monómero, los homocigos presentan una banda, mientras que los heterocigos dos bandas. En el caso de una enzima dimérica, los heterocigos presentan tres bandas [Wendel y Weeden 1989].

Para la interpretación de los geles se enumeraron los loci y las alelos. Se asignó el número 1 al locus que tuvo una mayor migración, el número 2 al siguiente y así sucesivamente. Para la designación de los alelos se usó el mismo procedimiento, con la excepción de que se utilizaron letras (A,B,C, etc.) en lugar de números.

Análisis Estadístico

La base de datos con la distribución de los genotipos en las poblaciones se analizó usando el programa TFGA (Miller 1997). Para estimar la variación genética en las diferentes poblaciones de la *especie*, se obtuvieron los siguientes parámetros poblacionales:

Proporción de loci polimórficos (P): Un locus se consideró polimórfico, si la frecuencia del alelo más común no excedía 0.99. P toma valores entre 0 y 1; si es cero no existe variación genética y cuando el valor es 1, todos los loci analizados son polimórficos.

Se obtiene mediante la fórmula $P = x/m$, donde: x es el número de loci polimórficos en una muestra de m loci (Hedrick 1985).

Heterocigosis promedio esperada (He) la heterocigosis esperada en el equilibrio de Hardy-Weinberg para un locus con n alelos puede estimarse como (Hedrick 1985):

$$He = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2, \text{ donde: } p_i \text{ representa las frecuencias alélicas para ese locus.}$$

Posteriormente, se obtuvo una heterocigosis promedio por población con las heterocigosis esperadas para todos los loci estudiados. El error estándar de H_e se obtuvo utilizando el programa BIOSYS (Sworford y Silander 1989).

$$N m$$

Heterocigosis observada (H_o): Puede calcularse como (Hedrick 1985): $H_o = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^m ij$

Donde: H_{ij} representa la heterocigosis observada específica para un locus (m) en el i ésimo individuo (N). El error estándar de H_o se obtuvo utilizando el programa BIOSYS (Sworford y Silander 1989).

Número promedio de alelos por locus (A): Es simplemente el promedio aritmético de alelos por locus. Se puede estimar como: $A = \sum_{i=1}^m a_i / m$, donde: a_i es el número de alelos observados en el locus i , y m es el número de loci analizados (Hedrick 1985).

Frecuencias alélicas: Se calcularon las frecuencias alélicas en cada locus, para cada población (Hedrick 1985) como:

$$p = \frac{(a_{11} + 1/2 a_{12})}{N} \quad q = \frac{(a_{22} + 1/2 a_{12})}{N}$$

Donde: a_{11} , a_{12} y a_{22} son las frecuencias absolutas de los tres genotipos y N es el tamaño de la muestra. Se realizó una prueba de $R \times C$ de Fisher utilizando el programa de TFPGA (Miller 1997) para determinar si existen diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre poblaciones.

Índice de fijación (F): este índice propuesto por Wright en 1951 (Hedrick 1985), es una medida de la desviación con respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg y se define para el caso de un locus con dos alelos como:

$F = 1 - (H_o / H_e)$ donde: H_o , es la proporción de heterocigotos observados y H_e es la proporción de heterocigotos esperados. Este índice toma valores de -1 a +1. Tiene un valor de cero si la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg. Los valores positivos indican una deficiencia de heterocigotos, mientras que los negativos indican un exceso (Hedrick 1985; Hartl y Clark 1989).

Estadísticos F , f y θ de Weir y Cockerham (1984): estos estadísticos son equivalentes a las F_{IT} , F_{IS} y F_{ST} de Wright, respectivamente. Los estimados de Weir y Cockerham, asignan peso al número de individuos y al número de localidades muestreadas, por ello los estimadores que se generan no tienen sesgo. El modelo parte de la premisa de que un número r de poblaciones del mismo tamaño ha descendido en forma independiente de una sola población ancestral que estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg y de ligamiento. El cálculo de estos estimadores se realizó mediante el programa de TFPGA (Miller 1997).

Para evaluar si F y f eran estadísticamente diferentes de 0, se utilizó una prueba de chi-cuadrada: $X^2 = F^2 N (k-1)$, con $k(k-1)/2$ grados de libertad, donde N es el tamaño de la muestra y k el número de alelos (Li y Horvitz 1953). Para el caso del parámetro B se utilizó la prueba de chi-cuadrada: $X^2 = 2NFsr(k-1)$, con

$(k-1)(s-1)$ grados de libertad, donde N es el tamaño de muestra, k el número de alelos y s el número de subpoblaciones (Workman y Niswander 1970).

Para cada uno de los parámetros (F, f y e), se calculó también el intervalo de confianza del 95% utilizando el programa TFPGA (Miller 1997). TFPGA obtiene el error estándar de los estimados mediante un "jackknife" sobre todos los loci, y al mismo tiempo obtiene el intervalo de confianza de los estimados (al 95%) mediante la técnica de remuestreo denominada 'bootstrap',

A partir del índice B se estimó Nm (que es un estimador indirecto del flujo génico), con la fórmula de Crow y Aoki (1984), que toma en cuenta el número de subpoblaciones:

$$Nm = \frac{1}{4\alpha} \left(\frac{1}{O} - 1 \right)$$

donde: N es el tamaño de la población, m es la fracción de inmigrantes a N y $\alpha = (n/n-1)^2$, donde n es el número de subpoblaciones.

Los valores de Nm $\ll 1$ producen una fuerte diferenciación entre las subpoblaciones (i.e. deriva genética, actuando independientemente en cada subpoblación; Slatkin 1994). Por otro lado, si Nm > 1 , las subpoblaciones se comportan como una sola población panmítica y el flujo génico restringe el efecto de la deriva genética (Kimura y Maruyama 1971; Harti y Clark 1989; Slatkin 1994).

Utilizando el programa de Slatkin (1993) de aislamiento por distancia DIST, se realizó un análisis para explorar si el flujo génico y la separación geográfica presentaban un patrón de aislamiento por distancia. Para

Λ

estimar esto, primero se realiza una estimación indirecta de los niveles de flujo génico M para pares de poblaciones (Slatkin 1993), calculado como:

$$M = \frac{1}{4} \left(\frac{1}{O} - 1 \right)$$

Λ

Λ

Después de calcular M, se hizo una regresión de los valores de M contra las distancias geográficas

entre las poblaciones. Para realizar este análisis se calculan los logaritmos en base diez de las distancias

Λ

geográficas (log₁₀D) y la estimación indirecta del flujo génico (log₁₀ M). Si se cumple el patrón de aislamiento por

distancia, la pendiente de la regresión tendría que ser de -1.0 para una distribución lineal de las poblaciones y de -0.5 para el caso de dos dimensiones (Slatkin 1993).

Λ

Para determinar si la relación entre flujo génico (M y distancia geográfica (D) era estadísticamente significativa, se obtuvo el coeficiente de determinación r² para regresión lineal y se realizó una prueba de Mantel

(Mantel 1967) mediante el programa TFPGA.. Esta prueba genera n (1000 a 10,000) matrices distintas de log

Λ
(M) al reorganizar aleatoriamente las filas (o columnas) de la matriz original. Después calcula el coeficiente de Spearman (r) para cada uno de los pares de matrices de log Λ (M) y log (distancia). El programa genera también

intervalos de confianza al 95% para evaluar la significancia de la correlación (p) (Comes y Abbott 1998).

Distancias e identidades genéticas.

La identidad genética 1 se calculó con la fórmula de Nei (1978):

$1 = J_{xy} / (J_x J_y)^{1/2}$, donde: $J_{xy} = \sum p_{ix} * p_{iy}$, que es la probabilidad de escoger un par de alelos idénticos, uno de la población x y uno de la población y. $J_x = \sum p_i^2$ y $J_y = \sum p_i^2$, que son las probabilidades de escoger un par idéntico dentro de cada población (Hedrick 1985; Hartl y Clark 1989). La identidad genética 1 toma valores de 0 (si no comparten alelos) a 1 (si las poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas) (Hedrick 1985). A partir de las identidades se puede obtener la distancia genética D de Nei (1972):

$$D = -\ln I$$

Las distancias genéticas toman valores de 0, si las poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas, hasta infinito si las poblaciones no tienen ningún alelo en común (Hedrick 1985). Estructura clonal

Debido a *que* *S. eruca* se reproduce vegetativamente, se evaluó la diversidad clonal dentro de cada población. Todos los individuos muestreados fueron analizados para obtener su genotipo multilocus. Se partió de la suposición de que cada genotipo multilocus detectado representaba a un clon. En términos estadísticos un gran número de loci polimórficos analizados y un gran número de alelos detectados aumentan el poder de detección de genotipos únicos. Para estimar la diversidad genotípica se utilizaron tres medidas:

Primeramente, se estimó el número de genotipos posible (N_g). Cuando los alelos son codominantemente se calcula como (Cheliak y Pitej 1984):

$$N_g = \prod_{i=1}^L \{n_i(n_i+1)\} / 2$$
, donde: N_g es el número de genotipos únicos, n_i es el número de alelos detectados en el i ésimo locus y L es el número de loci analizados.

La segunda medida es la tasa de descubrimiento de nuevos genotipos o probabilidad de que el siguiente individuo muestreado sea un nuevo genotipo multilocus, denominada como 'proporción distinguible' por Ellstrand y Roose (1987). Esta medida tiene un estimador sencillo que consiste en G/N donde G es el número de genotipos distintos en una población y N el número de individuos muestreados. Esta medida tiene rango de 0 a 1; un valor de 1 significa que todas las plantas muestreadas son de genotipo multilocus distinto y un valor cercano a 0 implica que se detectaron muy pocos genotipos en la población.

La última medida de diversidad genotípica multiloci que se usó esta basada en el índice de Simpson ($D = 1 - \sum p_i^2$) pero corregida para tamaño de muestras pequeñas ($D = 1 - \sum (n_i(n_i-1)) / (N(N-1))$) donde n_i es el número de individuos del genotipo i y N el número total de individuos (Pielou 1969). Si el valor es 1, indica que no existe replicación de genotipos y cercanos a 0 cuando existe dominancia de un genotipo.

En el caso de especies que se reproducen exclusivamente por la vía sexual, se espera que los estadísticos GIN y D sean iguales a 1, debido a que es poco probable que por recombinación sexual se genere el mismo genotipo multilocus entre diferentes individuos (Ellstrand y Roose 1987).

La descripción de la distribución espacial de genotipos multilocus (genets) se realizó en la población de Salinas. En esta población, se seleccionó un área donde se ubicó un punto central. A partir de este punto, se midieron las distancias y azimut entre ramets hacia los cuatro puntos cardinales. Esto se realizó con la ayuda de un medidor de distancia y una brújula, con la finalidad de ir trazando un mapa con la distribución espacial de los ramets. Al conocer los genotipos multilocus de cada ramet muestreado se trazó la distribución espacial de los genets.

Diversidad Genética

Se analizaron los datos usando el enfoque de diversidad génica de Nei (1977). En este caso se calculó la diversidad total (HT) así como sus componentes de variación dentro y entre poblaciones (Hs y Dsr). **Se calculó** también Grs que es una medida de la diferenciación entre poblaciones. Estos estadísticos se calcularon utilizando el programa GDIS de Ritland (1989).

Biología reproductiva

Con el fin de conocer el sistema reproductivo de *S. eruca*, se realizaron tratamientos de autopolinización y polinización cruzada en más de 30 individuos. En cada individuo se marcaron y aislaron (mediante bolsas de malla) botones próximos a abrir. Ya abiertas las flores, se realizaron autopolinizaciones frotando el estigma con antenas de la misma flor. El tratamiento de polinización cruzada se realizó frotando el estigma con antenas de al menos dos individuos lejanos (5 m). También se marcaron botones no excluidos para tenerlos como control de polinización natural y comparar los resultados de este tratamiento con los de polinización cruzada para saber si existe limitación por polinizadores. Cada tratamiento incluyó al menos 30 flores. Finalmente, durante la época de maduración de frutos, se contaron el número de frutos producidos de cada tratamiento, así como el número de semillas por fruto.

Los visitantes florales se registraron mediante observaciones de 10 flores durante el período que permanecen abiertas.

RESULTADOS

Variación Genética dentro de poblaciones

De un total de 24 sistemas enzimáticos ensayados, solo 10 enzimas tuvieron buena resolución (Tabla 7; en Apéndice 2). Los 10 sistemas enzimáticos ensayados para *S. eruta* están codificados por un mínimo de 13 loci (Tabla 7; en Apéndice 2).

En *S. eruta*, 7 loci (53.85%) fueron polimórficos en al menos una población utilizando el criterio de 99%. Los loci que fueron monomórficos en todas las poblaciones de *S. eruta* fueron LAP-1, MDH-1, EST-1, PGI-1, MNR-1 y APIO-1. El número total de alelos detectados en los loci analizados fue de 22 (en un rango de 1-3 por locus) (Tabla 7, en Apéndice 2).

Por otro lado, las frecuencias alélicas obtenidas en *S. eruca* muestra que las poblaciones B y H presentan los alelos raros SOD-1-A y SOD-1-B, ausentes en las poblaciones restantes, mientras que la población C tiene los alelos raros SOD-1-A y SOD-1-C, y la población G el alelo MNR-1-D el cual esta ausente en las demás poblaciones (Tabla 7, en Apéndice 2).

El número de alelos por locus polirnorfico (A) tuvo un promedio de 1.48 (en un rango de 1.4 a 1.5 por población). La heterocigosis esperada (H_e) presenta un rango entre poblaciones de 0.135 a 0.200, con un promedio de 0.158, en tanto que la H_o presento un rango de 0.026 a 0.055, con un promedio de 0.040 (Tabla 2).

El análisis de heterogeneidad en las frecuencias alélicas por locus se presenta en la tabla 7 (ver Apéndice 2). Los resultados obtenidos en *S. eruta* muestra diferencias significativas para 6 loci polimórficos ($X^2=112.72$; $P=0.400$) entre las poblaciones (Tabla 7, ver Apéndice 2). Para esta especie las frecuencias alélicas en el locus ADH no fueron significativos ($P=0.819$), posiblemente debido a que en tres poblaciones (Poza Grande, Santo Domingo y el Cayuco) no se obtuvo buena resolución para este locus y por lo tanto no se estimaron las frecuencias alélicas (Tabla 7, ver Apéndice 2).

Diversidad Clonal

Debido a que *S. eruta* se reproduce vegetativamente, se estimaron parámetros de diversidad genotípica con el objeto de describir y comparar la estructura clonal de las poblaciones de cada especie. En cerca de 400 individuos de *S. eruca* se detectaron 189 genotipos multiloci distintos (G_m) con un promedio de

28.6 por población (Tabla 2). En contraste, el número de genotipos multilocus distintos (N_g) que son teóricamente posibles fue de 8748 con un promedio para todas las poblaciones de 518 (Tabla 2).

La diversidad genotípica encontrada en las poblaciones de *S. eruca*, medida como GIN fluctúan de 0.42 a 0.68 con un promedio de 8.54 (Tabla 2). El promedio del parámetro GIN sugiere que para el esquema de muestreo utilizado, la probabilidad de detectar un genotipo diferente al muestrear individuos separados por 3 a 5 metros es del 50%.

Las estimaciones de diversidad genotípica, medidas como D , varían de 0.78 a 4.98, con un promedio de 0.92 (Tabla 2). Los valores promedio obtenido por este estadístico nos sugieren que en esta especie, no existe dominancia de un genotipo en particular, sino que la diversidad genotípica es repartida por múltiples clones.

La distribución espacial de genotipos multilocus (Fig.3) sugieren que algunos de los genets de *S. eruca* presentan gran movimiento con lo cual pueden extenderse y colonizar grandes áreas (i.e. el genotipo multilocus A y B).

Tabla 2.- Medidas de variación genética dentro de poblaciones de *S. eruca*. Porcentaje de loci polimórficos* (%P), número de alelos promedio por locus polimórficos (A), heterocigosis observada (Ho), heterocigosis esperada** (He), número posible de genotipos multilocus (Ng), número observado de genotipos multilocus (Gm), tasa de descubrimiento de nuevos genotipos (GIN) y índice de diversidad (D). Entre paréntesis se dan los errores estándar.

POBLACIO	%P	A	Ho	He	Ng	Gm	GIN	D
A	46.2	1.5 (0.1)	0.053 (0.021)	0.159 (0.053)	243	25	0.48	0.94
B	46.2	1.4 (0.1)	0.026 (0.013)	0.136 (0.054)	729	22	0.44	0.93
C	46.2	1.5 (0.2)	0.029 (0.016)	0.135 (0.059)	729	21	0.42	0.90
D	46.2	1.5 (0.1)	0.040 (0.014)	0.200 (0.063)	729	34	0.68	0.98
E	46.2	1.5 (0.1)	0.034 (0.012)	0.165 (0.053)	243	28	0.57	0.95
F	46.2	1.5 (0.1)	0.034 (0.011)	0.170 (0.057)	243	32	0.64	0.95
G	46.2	1.5 (0.2)	0.055 (0.018)	0.154 (0.050)	729	48	0.48	0.78
H	46.2	1.4 (0.1)	0.039 (0.018)	0.144 (0.056)	1458	20	0.57	0,94
PROMEDI	46.2	1.48	0,040	0.154	518	28,6	0.54	0.92

n locus es considerado polimorfo si se detectó más de un alelo **
Estimado (ver Nei 1978)

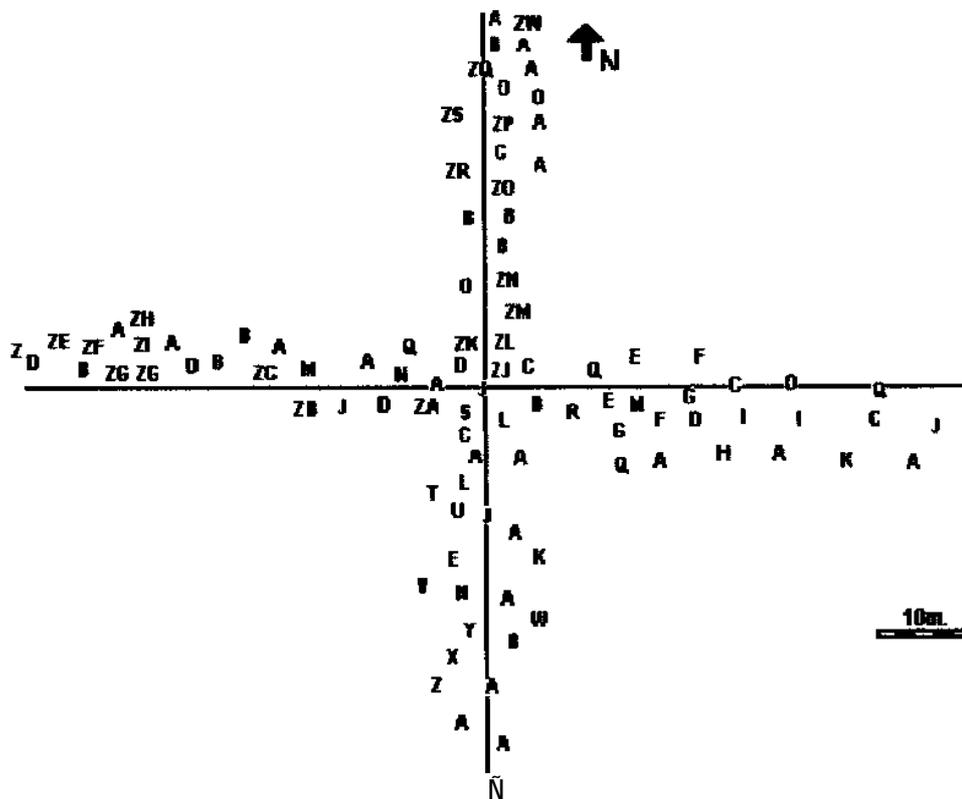


Fig. 3: Distribución espacial de genotipos multilocus (indicados con letra) de *S. eruca* en la población de Salinas.

Cada línea representa un eje cardinal (N, E, S y %

Índice de Fijación (F)

Los valores de los índices de fijación F por locus y para cada población de *S. eruca* se muestran en la tabla 3. Para esta especie, se encontró que de 46 de estos índices, 45 son positivos, y solo uno de estos índices resultó estadísticamente igual a cero (ADH-1 en la población A). El único índice negativo resultó igual a cero (PGM-1 en población C). Por otra parte, los valores promedio por población fueron positivos y significativamente diferentes de cero en todos los casos, indicando que las poblaciones están fuera del equilibrio de HardyWeinberg.

Tabla 3.- Indices de fijación (F) por locus polimórfico, en las poblaciones de S. enlca.

Locus	A	B	C	D	E	F	G	H
SOD-1		1.000	1.000**	---	-----	-----	---	1.000`
G6PDH	0.435 ⁺	0.848 ^{ns}	0.671	0.724 ^{ns}	0.779 ^{ns}	0.802 ^{**}	0.545 ^{ns}	0.745 ^{**}
PGM	0.769 ^{ns}	-	-0.010 ^{ns}	0.871 ^{ns}	0.851 ^{ns}	0.819 ^{ns}	0.621 ^{ns}	0.650 ^{ns}
PGM-2	0.852 ^{ns}	0.864 ^{ns}	0.844 ^{ns}	0.605 ^{ns}	0.734 ^{ns}	0.634 ^{ns}	0.610 ^{ns}	-----
ADH 1	0.257 ⁻	+	+	0.781 ⁺	0.644 ^{ns}	0.883 ^{ns}	0.601 ^{ns}	+
MNR 2	0.675 ^{ns}	0.790 ^{**}	0.826 ^{ns}	0.919 ^{ns}	0.795 ^{ns}	0.785 ^{ns}	0.631 ^{ns}	0.755 ^{ns}
APH-2	0.790 ^{ns}	0.745 ^{ns}	0.636	0.826 ^{ns}	0.772 ^{ns}	0.790 ^{ns}	0.803 ^{ns}	0.701 ^{ns}
PROM	0.630 ^{ns}	0.849 ^{**}	0.636	0.788 ^{ns}	0.763 ^{ns}	0.786 ^{ns}	0.635 ^{ns}	0.770 ^{ns}

Las poblaciones que fueron monomórficas para un locus particular son indicadas con guiones. Chi-cuadrada * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$ y ns: $X > 0.05$ + Sin resolución en la población

Estadísticos F de Weir y Cockerham y Flujo génico

Los valores de los estadísticos f y F obtenidos en S. eruta fueron significativamente diferentes de cero, indicando un alto nivel de endogamia dentro de las poblaciones (Tabla 4). El valor promedio de f y F es de 0.739 y 0.757, respectivamente, con un rango de 0.634 a 1 para f y de 0.630 a 1 para F (Tabla 4).

Los valores de O varían de -0.011 a 0.149 con un promedio de 0.069, siendo significativamente distintos de cero solo para los loci SOD-1, G6PDH, PGM-1 y MNR-2. Los valores promedio de B indican que aproximadamente 7% de la variación se debe a diferencias entre poblaciones.

Tabla 4.- Estadísticos F de Weir y Cockerham para las poblaciones de *S. eruta*. t y F son medidas de la desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg dentro de las poblaciones y en la población total, respectivamente. B es una medida de la diferenciación genética entre poblaciones y (Nm) es una medida de la desviación estándar.

LOCUS	f	F	0	Nm
SOD-1	1.000*	1.000*	0.029*	6.37
G6PDH	0.689*	0.736*	0.149*	1.10
PGM-1	0.783*	0.811*	0.126*	1.33
PGM-2	0.708*	0.712*	0.013n	14.43
ADH-1	0.634*	0.630*	0.003n'	63.67
MNR-2	0.790*	0.808*	0.087*	2.01
ACPH-2	0.779*	0.787*	0.035&	5.26
PROMEDIO SD	0.739 (0.028)	0.757 (0.027)	0.069 (0.025)	13.46
IC	(0.665-0.798)	(0.672-0.814)	(0.0005-0.139)	

Chi-cuadrada *:($P < 0.001$), ns:($P > 0.001$). El intervalo de confianza (IC) se calculo mediante Bootstrap entre oci a 95%.

Los valores de Nm para todos los loci de *S. eruta* son mayores a 1 y el valor promedio de Nm fue 13.46 (Tabla 4). **Aislamiento por distancia**

Λ

La relación del flujo génico *entre pares* de poblaciones (M) o **y las distancias geográficas en *S. eruca*** no mostró un patrón de aislamiento por distancia ($m=0.123$, $r^2=0.007$). La prueba de Mantel realizada en *S. eruta* ($P=0.354$ y $P=0.647$, $r=0.074$) sugiere que para esta especie, no existe aislamiento por distancia. Las gráficas correspondientes a estos análisis no se presentan debido a que no son significativas.

Identidades y Distancias genéticas de Nei

Los valores de las identidades genéticas (I_0) entre poblaciones tienen rangos de 0.97 a 1.00 para pares de poblaciones *de S. eruca* (con un promedio de 0.98). Por otra parte, el promedio de las distancias (D) de todas las poblaciones en *S. eruca* es de 0.02 con rangos de 0.0001 a 0.03.

El fenograma de UPGMA de *S. eruca* muestra la existencia de tres grupos de poblaciones, en los que se puede observar una asociación geográfica. Un primer grupo formado por San. Carlos A, San. Carlos B, Salinas y Cayuco. El segundo grupo formado por Sto. Domingo, Bocana, y A. L. Mateos. Finalmente, el tercer grupo que está formado por sólo una población: Poza Grande. Después de 10,000 permutaciones los valores de proporción de replicas apoyando cada nodo fue entre 0.22 hasta 1, observándose algunas ramas robustas (Fig.

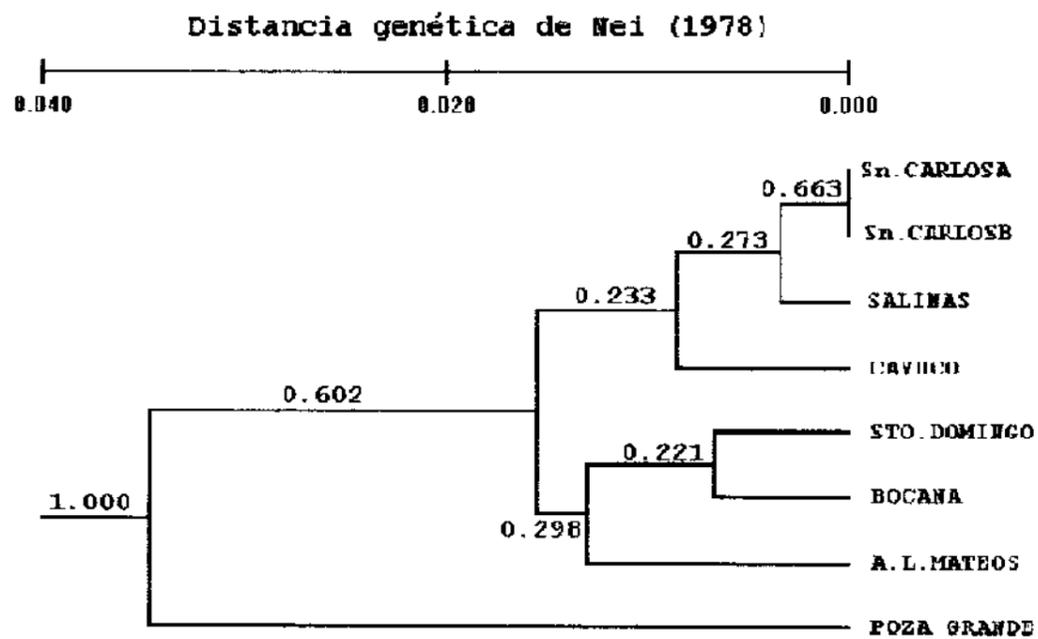


Fig. 4.- Fenograma de las poblaciones de *S. eruca*, construido con los datos de distancias genéticas en UPGMA. El porcentaje de los Bootstrap de las nodas a las 10,111 replicas son indicadas arriba de cada rama.

Biología reproductiva

Los resultados de la eficiencia reproductiva (Fruit set) en los tratamientos con flores se muestran en la figura 5. Se encontró que *S. errata* es una especie autoincompatible debido a que los tratamientos de autopolinización no produjeron fruto. Asimismo, al comparar los resultados de los tratamientos de polinización natural y cruzada, se observó que para *S. eruta* existe una gran deficiencia de polinizadores. Esto debido a que sólo 7% de las 72 flores marcadas tuvieron éxito en el tratamiento de polinización natural contra un 46.7% del tratamiento de polinización cruzada.

Al realizar la estimación del número de semillas por fruto también se encontraron ligeras diferencias entre tratamientos. El número de semillas promedio en el tratamiento de polinización natural fue de 336.65 (\pm 187.59, n=20), mientras que en el de polinización cruzada fue de 417.21 (\pm 10.24, n=14).

La curva de apertura y cierre de las flores de esta especie se muestra en la figura 6. La apertura de flores inicia a las 6:00 de la tarde, antes del ocaso y cierra a las 6:30 de la mañana al salir el sol.

Los visitantes florales que se detectaron fueron solo una especie nativa de abeja que visita las flores durante el período de tiempo en el que hay luz. No se observaron esmirgijos visitando a las flores.

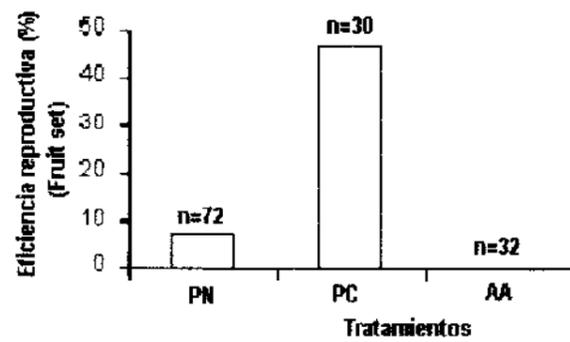


Fig. 5.- Estimación de la eficiencia reproductiva en los tratamientos de biología reproductiva: polinización natural (PN), polinización cruzada (PC), autopolinización manual (AA) en *S. eruca*.

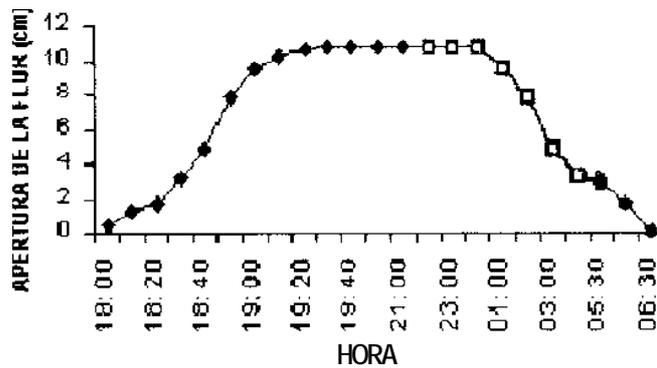


Fig. 6.- Curva de apertura y cierre de las flores de *S. eruca*.

Discusión

Comparación de la variación genética de *S. eruca* con otras especies

S. eruca muestra valores ligeramente menores en cuanto a porcentaje de loci polimórficos (%P), número promedio de alelos/locus polimórficos (A) y diferenciación genética entre poblaciones 0 (G_{ST}), al compararla con otras especies de cactáceas columnares (Tabla 5). Es también notable que los valores de f , son más altos que el de otras cactáceas. Los valores de heterocigosis esperada (H_e) están dentro del rango obtenidos para las otras cactáceas, pero los valores de heterocigosis observada (H_o) son muy inferiores (0.040) a los encontrados para estas especies (Tabla 5).

Tabla 5. - Niveles de variación genética dentro y entre poblaciones de varias cactáceas columnares. Porcentaje de loci polimórficos (%P), número promedio de alelos/locus polimórfico (A), heterocigosis observada (Ho), heterocigosis esperada (He), endogamia local (*f*) y diferenciación genética entre poblaciones θ (Gsr).

Especie	Variación genética dentro de Poblaciones		Distribución de la variación genética entre poblaciones			
	%P	A	Ho	He	<i>f</i>	θ (Gsr)
<i>Carnegiea gigantea</i> *	53.7	2.20	0.110	0.116	0.057	0.075
<i>Lophocereus schottii</i> *	49.5	2.33	0.142	0.144	-0.003	0.242
<i>Pachocereus pringlei</i> *	62.1	2.50	a	0.200	a	0.076
<i>Pereskia guamacho</i> *	63.4	2.42	0.169	0.202	0.196	0.112
<i>Stenocereus griceus</i> *	57.1	2.36	0.139	0.167	0.202	0.096
<i>Stenocereus thurberi</i> *	62.4	2.36	0.157	0.169	0.036	0.128
<i>Stenocereus gummosus</i>	75.0	2.18	0.103	0.261	0.608	0.102
<i>Stenocereus eruca</i>	46.2	1.98	0.040	0.154	0.739	0.069

a P. Pringlei es autotetraploide.

* Datos tomados de Hamrick et al.

Al comparar los valores obtenidos en *S. eruca* con el de plantas con características de historia de vida y ecológicas semejantes se observa que el valor obtenido en el porcentaje de loci polimórficos (%P) y número de alelos por locus (A) es semejante al reportado para especies endémicas (Hamrick *et al.* 1992). En cambio, los valores obtenidos de θ (Gsr) en *S. eruca* son inferiores al de especies endémicas o de distribución restringida. Por otra parte, el valor de *He* en *S. eruca* (0.154) es mayor que el reportado para especies endémicas, siendo este valor más semejante al obtenido en especies con distribución restringida (0.165) (Tabla 6). Por otro lado, Frankham (1995) menciona que las especies de plantas amenazadas presentan en general bajos niveles de variación genética. Lo expuesto por Frankham (1995) no concuerda con lo observado en *S. eruca* dado que en esta especie se observaron valores considerables de variación genética, superiores a los de otras especies amenazadas tales como *Brighamia insignis* (Gemmill *et al.* 1998) y *Ptilimnium nodosum* (Kress *et al.* 1994).

Tabla 6.- Comparación de los niveles promedio de variación genética de *Stenocereus gummosus* y *Stenocereus eruta* con otras plantas con características de historia de vida y ecológicas semejantes. Porcentaje de loci polimórficos (%P), número promedio de alelos/locus polimórfico (A), heterocigosis esperada (He) y diferenciación genética entre poblaciones 0 (Gsr).

Especie	Variación genética		Distribución de la variación	
	entro de Poblaciones		entre poblaciones	
	%P	A	He	9 (Gsr)
Leñosas de larga vida*	65.0	2.22	0.177	0.228
Endémicas*	42.5	1.82	0.078	0.141
Distribución restringida*	61.5	2.08	0.165	0.124
Distribución amplia*	67.8	2.11	0.257	0.033
Autopolinizan*	11.0	1.15	0.025	
Entrecruzan (polinización animal)*	63.2	2.18	0.211	0.099
Dispersadas (por ingestión)*	67.8	2.18	0.231	0,051
Reproducción asexualsexual*	72.7	2.12	0.251	0.051
<i>Stenocereus gummosus</i>	75.0	2.18	0.261	0.102
<i>Stenocereus eruta</i>	46.2	1.96	0.154	0.069

*Datos tomados de Hamrick et al. 1992. - valor saltante o sin calcular

Hamrick y Godt (1989) encontraron, que al nivel de especie y dentro de poblaciones, las especies endémicas contienen significativamente menor diversidad genética que especies con amplia distribución (i.e. la proporción de loci heterocigos por individuo, proporción de loci polimórficos, y alelas por locus polimórficos). Estos investigadores sugieren que las especies con amplia distribución pueden tener una larga historia de poblaciones continuas, mientras que las endémicas pueden consistir de poblaciones más pequeñas y ecológicamente limitadas por lo que pueden ser susceptibles a pérdida de variación por deriva o cuellos de botella. Sin embargo, algo interesante es que las especies endémicas mantienen los mismos niveles de diferenciación genética entre poblaciones que especies de amplia distribución.

Los resultados en este estudio con *S. eruta* comparados con *S. gummosus*, especies cercanas filogenéticamente y con distribuciones contrastantes indican que existe una relación clara entre la distribución geográfica de una especie y su variación genética. Los niveles de variación genética encontrados en *S. eruta*, especie endémica restringida, son inferiores en todos los aspectos (%P, A, Ho y He) a los encontrados en *S. gummosus*, una especie de más amplia distribución. Este resultado concuerda con lo encontrado por Van

Treuren et al. (1991) y Karron et al. (1988). Sin embargo, no debe generalizarse este resultado debido a que en diversos estudios la distribución geográfica no ha resultado ser un buen predictor de la variación genética como lo es el caso de especies de *Podaechmea* (Izquierdo 1995).

Los niveles moderados de variación genética presentes en las poblaciones de *S. eruta*, podrían deberse al sistema reproductivo predominantemente de entrecruzamiento y a la dispersión de semillas muy probablemente llevada a cabo por aves, lo que implicaría alto flujo génico y mayor intercambio genético importante en la determinación de la estructura genética.

Frecuencias alélicas de *S. eruta*

La tabla de frecuencias de los diferentes loci (tabla 7, Apéndice 2) muestran variabilidad genética para 6 loci (SOD-1, G6PDH, PGM-1, PGM-2, ADH-1, MNR-2 Y APH-2). Se encontró, que las frecuencias alélicas de estos loci difieren significativamente ($X^2=112.7$, $P>D.05$) entre poblaciones (con excepción de ADH-1) (Tabla 7, Apéndice 2). Los alelos que carecen de actividad, son generalmente referidos como "alelos nulos". Se ha propuesto que la presencia de estos alelos en poblaciones naturales es debido a que los variantes nulos permanecen protegidos, dado a que su presencia esta enmascarada en la condición heterocigota (Weeden y Wendel 1989). En *S. eruta*, desconocemos las causas de la presencia de alelos nulos en las poblaciones de Poza Grande, Santo Domingo y Cayuco. Sin embargo, descartamos como posibles causas la desnaturalización de las enzimas al momento de realizar la extracción o durante la electroforesis, debido a que cuando se corrieron muestras de otras poblaciones que recibieron el mismo protocolo de extracción junto a muestras de estas poblaciones, solo los extractos de estas mostraron actividad "nula".

La presencia de alelos raros (tabla 7, Apéndice 2) en las poblaciones de Poza Grande, Cayuco, Santo Domingo y de Salinas, podría deberse a un efecto de fundador ocurrido durante la colonización de estas poblaciones o debidos a deriva génica posterior a la colonización.

Diferenciación genética y flujo génico

Las distancias e identidades genéticas de las poblaciones de *S. eruta* y el fenograma construidos con UPGMA (Fig. y,) muestran que estas están muy cercanas entre si. Los valores encontrados para *S. eruta* no están muy alejados de los reportados en la literatura para distancias genéticas entre poblaciones de la misma

especie; por ejemplo al encontrado por Linhart et al. (1981) de 0.015, entre poblaciones de en *Pinus ponderosa* y al de *Eguiarte (1990) de 0.024* en adultos de *Asírocaryum ntexicanum*.

Para *S. eruta*, no existe un patrón de aislamiento por distancia entre pares de poblaciones, tal como se observa en los fenogramas construidos. Cuando en las poblaciones se presenta aislamiento por distancia, el flujo génico disminuye al aumentar la distancia física que separa las poblaciones (Slatkin 1993). Para *S. eruta*, el coeficiente

Λ

de determinación (r^2) muestra que la distancia solo explica 0.7 % en *M*. Esta ausencia de aislamiento encontrada entre las poblaciones sugiere que las poblaciones están fuera del equilibrio entre deriva génica y migración (Slatkin 1993), debido a que existe un constante flujo génico entre las poblaciones, que impide que haya una gran diferenciación genética entre ellas, y/o que el tiempo transcurrido ha sido insuficiente para alcanzar el equilibrio. Sugiere además, que la fragmentación a la que están sometidas las poblaciones de *S. eruta* no ha afectado el intercambio genético,

Sin embargo, los resultados obtenidos en *S. eruta* sugieren que la deriva génica no juega un papel muy importante en la diferenciación genética entre poblaciones debido a que en las frecuencias alélicas de los loci polimórficos, no se observó fijación o pérdida de ningún alelo, característica distintiva de la deriva.

Los valores de diferenciación genética *B* entre poblaciones en *S. eruta* tiene un valor (0.069) significativamente distinto de cero (Tabla 4). Esto indica que aproximadamente un 7% de la diferenciación genética, es debida a diferencias entre poblaciones; este valor es similar al obtenido en especies endémicas y dispersadas por animales (Harrick et al. 1992; Tabla 6). Esta ausencia de aislamiento entre poblaciones concuerda con el valor de *Nm* promedio, que es de 13.46 que al ser mayor que 1, podría estar contrarestando la diferenciación (Wright en Harti y Clark 1989). Cabe destacar que este resultado, es considerando al loci ADH-1, dei cual no se obtuvieron frecuencias genotípicas en tres poblaciones, por la razón discutida anteriormente. Por el contrario, el valor de *Nm* promedio, sin incluir al loci ADH-1 es de 4.36, lo cual es alto. Esta ausencia de aislamiento por distancia encontrada en *S. eruta*, sugiere que sus poblaciones están fuera del equilibrio entre deriva génica y migración (Slatkin 1993). Lo anterior podría deberse a que el flujo génico entre poblaciones es grande; a que las poblaciones fueron fundadas recientemente y la deriva génica y/o selección natural han tenido

poco o ningún efecto en ellas o a eventos históricos (i.e. expansiones recientes en su rango de distribución), lo cual no ha permitido la diferenciación, Índice de Fijación F y Estadísticos F de Wright de *S. eruca*

En plantas la endogamia comúnmente ocurre por diversas causas: i) por autopolinización, ii) a través de cruza entre parientes (Ellstrand y Elam 1993) y iii) selección a favor de homocigos o subdominancia (Futuyma 1998). La autopolinización puede ser prevenida en las plantas por sistemas de autoincompatibilidad o por dioicismo. Por otro lado, la endogamia biparental puede generarse en las poblaciones, cuando esta presenta tamaños efectivos de población pequeños (N_e) o exhiben una estructura genética espacial (subdivisión). Esta estructura puede ser desarrollada en las poblaciones cuando la dispersión de genes vía polen o semillas son espacialmente restringidas (Ellstrand y Elam 1993).

Los resultados de los índices de fijación (F) encontrados en todos los loci indican que las poblaciones están fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg (Tabla 3). De igual forma, los estadísticos f y F de Weir y Cockerham (Tabla 4) encontrados en las poblaciones de *S. eruca* sugieren un exceso de homocigos por endogamia al nivel de subpoblación y al nivel de población total.

Por otra parte, se observó que los valores de f son para todos los loci mayores a los valores de O_e , esto podría sugerir que el sistema de apareamiento está jugando un papel determinante en la estructura genética de *S. eruca*. Esta especie presenta un sistema de autoincompatibilidad por lo que la autopolinización puede ser descartada (R. Clark obs. pers.). Basándose en este precedente, se piensa que el déficit de heterocigos en las poblaciones de esta especie es debido al apareamiento entre parientes o vecinos genéticamente muy parecidos. Se ha reportado en especies que muestran una baja dispersión de semillas (e.g. por gravedad, Foster y Sork 1997) altos niveles de endogamia a causa de que individuos emparentados quedan muy cerca unos de otros. Este aparentemente no es el caso de *S. eruca*, pues aparentemente es dispersada por aves o mamíferos (i.e. *Canis latrans*, R. Clark obs, pers.) que tienen gran capacidad de desplazamiento. Otra posible causa de endogamia biparental pudiera ser la dispersión limitada de polen, ya que esta especie es polinizada por abejas y posiblemente esfingidos (R. Clark obs, pers.) por lo que la dispersión de polen a grandes distancias sería poco probable.

Genética de la Conservación para las poblaciones de *S. eruca*.

S. eruta, es una especie considerada como endémica extrema según los criterios planteados por Rabinowitz (1980) debido a que es una especie que presenta una distribución geográfica pequeña y es restringida a hábitats específicos. Drury (1980) menciona que este tipo de especies son potencialmente más vulnerable en el contexto de la biología de la conservación. Sin embargo, la información obtenida en este trabajo, nos sugiere que las poblaciones de *S. eruta* no se encuentran genéticamente en riesgo de extinción, debido a que los valores de variabilidad genética encontrados en *S. eruta* son relativamente altos comparados a los reportados para otras especies endémicas (ver Pleasants y Wendel 1989; Sipes y Wolf 1997).

Por otra parte, el flujo génico entre las poblaciones de *S. eruta* es alto, por lo que se podría considerar a estas poblaciones, como una metapoblación, según el concepto propuesto por Levins (1970), para hacer referencia a un conjunto de poblaciones conectadas por migración.

Considerando que no existe una población donde la variación genética sea mayor, la estrategia más viable de conservación de la diversidad genética de esta especie es la protección de una buena parte de las áreas donde esta se desarrolla. Esto podría lograrse con la creación de una o más reservas naturales, las cuales permitirían que la especie continúe evolucionando en su hábitat natural. De acuerdo con nuestro conocimiento de las poblaciones visitadas, el sitio más viable para la conservación a largo plazo de esta especie podría ser la población de Salinas, debido a la dificultad de acceso a esta población, al enorme tamaño de la población y a que ésta no presenta disturbios humanos. Asimismo, se podría implementar un programa de conservación in-situ a escala metapoblacional con el fin de preservar a la mayor parte de las poblaciones que se encuentran cerca de centros poblacionales y áreas de cultivo. Esta estrategia tendría que implementarse en el corto plazo pues detectamos peligros inminentes en varias poblaciones de las planicies de Magdalena.

Sin embargo, en caso de que no sea posible una estrategia de conservación in situ de todas las poblaciones en peligro inminente, se debería de optar por un enfoque ex situ. Detectamos poblaciones que crecen en áreas rodeadas por zonas agrícolas, ganaderas y urbanas, donde probablemente el número de individuos esté disminuyendo progresivamente. La vía más adecuada para la conservación ex-situ pudiera ser mediante la colecta de semillas y tallos para su preservación y su eventual reintroducción vía plantas generadas a partir de semillas o cultivo de tejidos en programas de restauración una vez que se pudiera lograr una

protección permanente a las poblaciones. La técnica de cultivo de tejidos se ha aplicado eficientemente en la propagación de especies en peligro de extinción utilizando diferentes explantes (fragmentos de tejido u órgano de una planta, Martínez, 1998).

Lande (1988) sugiere que la conservación de *especies* raras, requiere del conocimiento demográfico y de la estructura genética. Por este motivo, sería interesante complementar los resultados genéticos obtenidos con estudios demográficos y/o ecológicos, que nos permitan contar con evidencia más sólida para implementar programas de conservación a largo plazo en esta especie.

Estructura clonal de *S. eruca*

La reproducción asexual involucra a todos aquellos mecanismos a través de los cuales se produce progenie sin que ocurra recombinación genética. Este tipo de reproducción permite la producción de nuevos individuos (ramets) genéticamente idénticos a su madre (Harper y White 1974). La reproducción sexual, por otro lado permite la creación de nuevas recombinaciones alélicas (Richards 1986; McLellan et al. 1997).

Debido a que las especies clonales presentan reproducción tanto sexual como vegetativa, la adecuación del genotipo es determinada por ambas características, que se encuentran asociadas con la producción de semillas y la reiteración a propagarse vegetativamente (Cheplick 1995). Es probable que ambas estrategias representen alternativas dentro de la historia de vida de una planta y que exista un balance óptimo entre individuos sexuales y asexuales (McLellan et al. 1997). Sin embargo, el reclutamiento de nuevos genets a través del establecimiento de plántulas, es un *evento* raro en la mayoría de las poblaciones de plantas clonales (Sarukhán y Gadgil 1974; Callaghan 1984).

Un patrón similar ha sido reportado por Gibson (1989) y Tumor et al. (1995) para *S. eruca*. Ellos sugieren que esta especie presenta una reproducción predominantemente vegetativa, debido a que no se observan en el campo individuos juveniles o reclutamientos vía sexual. Diversos estudios (i.e. Izquierdo 1995; Ellstrand y Roose 1987; Hernández 1999) han evaluado la importancia relativa del reclutamiento por la vía sexual y de la propagación vegetativa en especies clonales. Esto se ha logrado, estimando la diversidad genotípica de esas especies, a través de diversos índices de diversidad (i.e. GIN y D). Los valores de diversidad encontrados por ellos, son similares a los obtenidos en *S. eruca* (Tabla 2). En promedio, se detectaron 28.6 genotipos multilocus únicos (Gm) en *S. eruca* (Tabla 2), este resultado *sugiere que la recombinación sexual es*

relativamente frecuente. Esto se puede observar en los valores de la tasa de descubrimiento genotípica (GIN) promedio de *S. eruca*, que es de 0.54. Esto significa, que existe una probabilidad del 54% de detectar genotipos diferentes en *S. eruca*. Lo anterior podría interpretarse como evidencia de que existe un 50% de individuos originados por recombinación sexual contra un 50% reclutados vegetativamente en esta especie.

Por otra parte, los valores de diversidad (D) en esta especie son cercanos a 1, esto sugiere una ausencia de replicación de genotipos, es decir, que existe la presencia de muchos clones, pero con genotipos multilocus distintos. Este resultado es similar al encontrado en otras especies con crecimiento clonal (Tabla S).

Los resultados obtenidos en *S. eruca*, no apoyan las observaciones hechas por Gibson (1989) y Turner *et al.* (1995) con relación a que esta especie se reproduce predominantemente por la vía vegetativa, debido a que los valores obtenidos de diversidad genotípica indican que con frecuencia ocurren eventos de reclutamiento vía sexual.

En la tabla 8 se pueden apreciar los estimadores de la diversidad genotípica y diferentes estimadores de diversidad genética en algunas plantas clonales. Se puede observar, que los valores obtenidos para la especie de estudio están dentro del rango de los valores de diversidad genotípica reportados para otras especies clonales (Tablas). *S. eruca* presenta valores moderados de diversidad genotípica y ligeramente mayores al de otras plantas clonales, por ejemplo *E. propullans* la cual es una especie que también presenta distribución restringida, pero a diferencia de *S. eruca* esta es una especie muy clonal (Tabla S.).

Tabla 8.- Diversidad genotípica y genética de especies clonales. Porcentaje de loci polimórficos (%P), número de alelos por locus (A), diversidad genética (HT), proporción de diversidad genética entre poblaciones 0 (GST), número de poblaciones/individuos muestreados (PobsI/N), genotipos multilocus encontrados (G), tasa de descubrimiento de nuevos genotipos (GIN) y diversidad genotípica (D).

	Diversidad genética				Diversidad genotípica			
	dentro de especies		entre especies		dentro de poblaciones			
	%P	A	Hr	\$ (Gsr)	PobsI	G	GIN	D
<i>Lophocereus schottii</i> 1	44.4	1.55	0.33	0.13	81336	87	0.43	0.87
<i>Quercus laevis</i> b	64	2.36		0.032	1/3402	842	0.23	0.99
<i>Q. margaretta</i> b	73	2.60			11240	84	0.35	0.98
<i>Erythronium albidum</i> *	38	3.0	0.42	0.01	71770	63	0.90	0.96
<i>E. propullans</i> *	24	1.8	0.18	0.33	7/93	21	0.23	0.66
<i>Spartina patens</i> *	48		0.43	0.12	4134	101	0.29	0.93
<i>Populus tremuloides</i> *	92	2.3	0.42		71222	222	1.00	1.00
<i>Alnus incata</i> *	40	3.0	0.57	0.07	4/409	5	0.01	0.69
<i>Typha-4 spp.</i> *	0	-	0			1		0
<i>Aechmea tuitensis</i> c	38.3	2.60		0.196	11109	33	0.30	0.88
<i>Stenocereus gummosus</i>	73.5	1.93	0.30	0.121	12/600	382	0.72	0,98
<i>Stenocereus eruca</i>	46.2	1.48	0.20	0,068	8/400	189	0.54	0,92

- Valores faltantes o sin calcular, * datos tomados de Pleasants y Wendel 1989.
a valores tomados de Parker y Hamrick 1992; b de Berg y Hamrick 1994; c Izquierdo 1995.

En general, se puede observar que *S. eruca*, al igual que otras plantas clonales presentan niveles considerables de diversidad genética (tabla 8). Diversos estudios han encontrado que los niveles de diversidad genética en especies clonales son similares a lo encontrados en especies que se reproducen sexualmente (Ellstrand y Roose 1987; Hamrick y Godt 1989). Sin embargo, el origen de estos niveles de variación genética en muchas plantas clonales no esta del todo claro. Existen diversas hipótesis al respecto, entre ellas están: un reclutamiento simultáneo dado por eventos tanto sexuales y asexuales, selección, inmigración, mutación y heterogeneidad ambiental, lo que permite que las especies clonales mantengan niveles altos de diversidad genética (Ellstrand y Roose 1987).

La especie bajo estudio presenta aparentemente ambas alternativas de reproducción (sexual/asexual) tal como se menciono anteriormente. Además, la especie muestra niveles considerables de flujo génico (Tabla y) lo cual probablemente ha permitido que esta especie mantengan niveles considerables de variación genética

similares al de especies con reproducción sexual (0.261) y predominantemente de entrecruzamiento (0.251)(Loveless y Hamrick 1984).

De acuerdo a Slatkin (1985) las mutaciones somáticas pueden generar variación genética adicional en poblaciones de plantas que se reproducen vegetativamente. Whitman y Slobodchikoff (1981) le confieren también gran importancia a este proceso (reportando evidencias de ello en plantas cultivadas) y señalan que estas mutaciones pueden ocurrir en las células de las yemas y posteriormente propagarse a través de mecanismos sexuales y asexuales. Sin embargo, las evidencias de mutaciones somáticas en especies clonales silvestres son escasas y la frecuencia con que ocurren parece ser bastante baja (Antolin y Strobeck 1985; Klekowski 1997).

Biología reproductiva

El estudio de biología reproductiva en *S. eruca* sugiere que esta especie es autoincompatible, por lo que esta vía es descartada como posible responsable de los altos niveles de endogamia de la especie. Por tal motivo es necesario evaluar con mayor detalle el entrecruzamiento entre parientes como otra alternativa de los altos valores de endogamia de la especie.

La deficiencia de polinizadores que se encontró para esta especie, puede ser producto de que las abejas son deficientes como polinizadores de flores que evidentemente presentan el síndrome de polinización por esfingidos. Es probable que al recorrer cortas distancias (menores a 10 metros), las abejas pueden estar polinizando al mismo genet (ver Fig. 3j, que al ser autoincompatible trae como consecuencia la aborción de las flores visitadas. Otra posible explicación a la escasa presencia de polinizadores, en especial de esfingidos son las condiciones climáticas (noches frías) que imperan durante la época de floración, que impiden que estos insectos entren en actividad durante ese período.

CONCLUSIONES

- Los valores de variación genética encontrados en este estudio en *S. eruca* son similares a los de especies con distribución restringida y endémicas.
- Los índices de Fijación (F) y estadísticos de Weir y Cockerham f y F sugieren que las poblaciones de esta especie están fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg, lo cual pudiera ser generado por cruza entre parientes.
- Se encontró que no existe un patrón de aislamiento por distancia, lo que sugiere que las poblaciones están fuera del equilibrio entre deriva génica y migración, debido a que existe un constante flujo génico entre poblaciones distantes.
- Se encontró que las poblaciones de *S. eruca*, especie endémica y restringida a las Planicies de Magdalena, B.C.S. no están depauperadas genéticamente, debido a que los valores de variabilidad obtenidos son relativamente altos.
- Los valores de diversidad genotípica obtenidos indican que en esta especie ocurre tanto reproducción sexual como vegetativa.
- Se encontró que la especie es autoincompatible, además de que existe una gran limitación por polinizadores.

Recomendaciones

- Se recomienda realizar estudios de índole demográfico y ecológicos con la finalidad de contar con evidencia más sólida que permitan implementar programas de conservación a largo plazo en esta especie.
- Evaluar con mayor detalle la biología reproductiva y ecología de la polinización, con la finalidad de entender las causas de los altos niveles de endogamia encontrados en la especie. También se recomienda estudiar las causas reales por la cual los supuestos polinizadores de esta especie (esfingidos) no se detecten durante la etapa reproductiva.

Dado los niveles de perturbación antropogénica que presentan las poblaciones de *S. eruca*, y dada su relevancia biológica por ser la única cactácea columnar rastrera de Norteamérica sería pertinente declarar un área (i.e. Salinas) como zona natural protegida.

LITERATURA CITADA

- Antolin, M.F. y C. Strobeck. 1985. The population genetics of somatic mutation in plants. *Amer. Nat.* 126: 52-62. Berg, E.E. y J.L. Hamrick. 1994. Spatial and genetic structure of two sandhills oaks: *Quercus laevis* and *Q. margaretta*, (Fagaceae). *Am. J. Bot.* 81:7-14.
- Callaghan, T.V. 1984. Growth and translocation in a clonal southern hemisphere sedge, *Uncinia meridensis*. *J. of Ecology.* 72:529-546.
- Cancino, J., H. Romero-Schmidt, A. Ortega-Rubio y J.L. León de La Luz. 1995. Observations on distribution and habitat characteristics of the endangered Mexican endemic cacti *Stenocereus eruca*. *Journal of Arid Environments.* 29:55-62.
- Cheliak, W. M. y J.A. Pitel. 1984. Electrophoretic identification of clones in trembling aspen. *Can. J. For. Res.* 14:740-743.
- Cheplick, G.C. 1995. Life history trade-off in *Amphibromus scabrivalvis* (Poaceae): Allocation to clonal growth, storage, and cleistogamous reproduction. *Am. J. Bot.* 82:621-629.
- Conte, A.C. y C.E. Glass. 1998. Guía para la identificación de cactáceas amenazadas de México. Vol. 1. CONABIO, México. 90 pp.
- Crow, J.F. y K. Aoki. 1984. Group Selection for a polygenic behavioral trait: Estimating the degree of population subdivision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:6073-6077.
- Drury, W.H. 1980. Rare species of plants. *Rhodora.* 82:3-48.
- Eguiarte, L.E. 1988. Una guía para principiantes en la genética de poblaciones. En polémicas contemporáneas en evolución (compilador) A.O. Franco. AGT Editor, S.A. pp:41-56.
- Eguiarte, L. E. 1990. Genética de poblaciones de *Astrocaryum mexicanum*. Liebm. en los Tuxtlas, Veracruz. Tesis de Doctorado. Centro de Ecología IUAAPyP de el CCH, UNAM, México.
- Eguiarte, L. E. y D. Piñero, 1990. Genética de la conservación: leones vemos, Genes no Sabemos. *Ciencias.* No. especial 4:34-47.
- Ellstrand, N.C. y D.R. Elam. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 24:217-242.
- Ellstrand, N.C. and M.L. Roose. 1987. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *Amer. J. Bot.* 74: 123-131
- Felsenstein, J. 1993. *Phylip (Phylogeny Inference Package) 3.5c.* University of Washington, Seattle.
- Foster, P.F. y V.L. Sork. 1997. Population and genetic structure of the **west African rain forest liana** *Ancistrocladus korupensis* (Ancistrocladaceae). *Am. J. Bot.* 84. 1078-1091.
- Frankham, R. 1995. Conservation genetics. *Ann. Rev. Genetics.* 29:305-27.
- Futuyma, D.J. 1998. *Evolutionary Biology.* Sinauer Associates Publishers. Sunderland, Mass.

Gemmill, C.E.C., T.A. Ranker, D. Ragone, S.P. Perlman y K.R. Wood. 1998. Conservation genetics of the endangered endemic Hawaiian *genus Brighamia* (Campanulaceae). *Amer. J. Bot.* 85:528-539.

Gibson, A.C. 1989. The systematic and evolution of the subtribe Stenocereinae. 7. *The Machaerocerei of Stenocereus*. *Cactus and Succulent Journal (U.S)* 61:104112.

Gibson, A.C. y K.E. Horak. 1978. Systematic anatomy and phylogeny of Mexican columnar cacti. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 65:999-1057.

Godt, M.J.W. y J.L. Hamrick. 1993. Genetic diversity and population structure in *Tradescantia hirsuticaulis* (Commelinaceae). *Am. J. of Bot.* 80:959-966.

Hamrick, J.L., y M.J.W. Godt. 1989. Allozyme diversity in plant species. En Brown, A.D.H., M.T. Clegg, A.L. Kahler and B.S. Weir (eds), *Plant populations genetics, breeding and genetic resources*, 43-63. Sinauer, Sunderland, Mass.

Hamrick, J.L., M.J.W. Godt, y S.L. Sherman-Broyles. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* 6:95-124.

Hamrick, L. J., J. D. Nason y T. H. Fleming. 1999. Genetic diversity in columnar cacti. En Fleming, T. y A. Valiente (eds.) Chapter for symposium for meeting on 'Evolution, Ecology and Conservation of columnar cacti and their mutualists'. Tehuacan, Mexico.

Harper, J.L. 1985. Modules, branches and the capture of resources. En: J.B. Jackson, L.W. Buss y Cook, R.E. (eds.). *Population biology and evolution of clonal organisms*. Yale University Press. New Haven. Pp:1-33.

Harper, J.L. y J. White. 1974. The demography of plants. *Annuals Review of Ecol. Syst.* 5:419-463.

Hartl, D.L. and A.G. Clark. 1989. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates. Sunderland, Mass.

Hedrick, P.W. 1985. *Genetics of Populations*. Jones and Bartlett. Boston.

Hernández, A. 1999. Consecuencias genéticas y evolutivas de surgimiento de golfo de California en poblaciones de *Bursera microphylla* (Burseraceae) en el Desierto Sonorense. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias UNAM, México.

Izquierdo, Y.L. 1995. Estructura y variación genética en cuatro especies de *Aechmea* (Bromeliaceae) en México: *A. mexicana* (Baker), *A. lueddemanniana* (L.Koch) Brongn. Ex Mez in Engl. *Pflanzenr.*, *A. macvaughii*, L.B. Smith y *A. tuitensis* (P. Magaña y E. Lott). Tesis de Doctorado. Centro de Ecología. UNAM. México, D.F.

Jonsson, B.O., S. I. Jónsdóttir y N. Cronberg. 1996. Clonal diversity and allozyme variation in populations of the arctic sedge *Carex bigelowii* (Cyperaceae). *J. of Ecology*. 84:449-459.

Karron, N.R., Y.B. Linhart, C.A. Chaulk y C. Roberson. 1988. Genetic structure of populations of geographically and widespread species of *Astragalus* (Fabaceae). *Am. J. Bot.* 75:1114-1119.

Kimura, M., y T. Maruyama. 1971. Pattern of neutral polymorphism in geographically structured population. *Genet. Res.* 18:125-30.

Klekowski, J.E. 1997. Somatic mutations theory of clonality. En: Kroon, H. y J.V. Groenendaal (Eds). *The Ecology and Evolution of clonal plants*. Backhuys Publishers. Leiden. pp:227-241. The Netherlands.

Kress, J.W., G.D. Maddox y C. S. Roesel. 1994. Genetic variation and protection priorities in *Ptilimnium nodosum* (Apiaceae), an *Endangered* plant of the eastern United States. *Cons. Biol.* 8:271-276.

Kruckerbeg, R.A y D. Rabinowitz. 1985. Biological aspects of endemism in higher plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 116:447-479.

- Lande, R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science* 241:1455-1460.
- Leberg, L.P. 1992. Effects of population bottlenecks on genetic diversity as measured by allozyme electrophoresis. *Evolution* 46:477-494.
- Lenay, C. 1994. La evolución: de la bacteria al hombre. RBA Editores, S.A. Barcelona, España, pp. 128.
- Levins, R. 1970. Extinction. *Lectures on Mathematics in the life. Science* 2:75-105.
- Li, C.C. y D.G. Horvitz. 1953. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *Am. J. Human Genetics* 5:107-117.
- Linhart, J.B., K.B. Milton y M.L. Davis. 1981. Genetic variation in space and time in a population of ponderosa pine. *Heredity* 46:407-426.
- Loveless, M.D. y J.L. Hamrick. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15:65-95.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalizad approach. *Cancer Res.* 27:209-220. Martinez, P.A. 1998. Evaluación genética y demográfica de *Agave victoriae-reginae* T. Moore y aplicación de cultivo de tejidos para su conservación. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM, México.
- Mendoza, O.E.A. 1994. Demografía e integración clonal en *Reinhardtia gracilis*, una palma tropical. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM, México.
- Menken, S.B., E. Smit y H. Den Nijs. 1995. Genetical population structure in plants: gene flow between diploid sexual and triploid asexual dandelions (*Taraxacum* section *Ruderalia*). *Evolution* 49: 1108-1118
- McClintock, K.A. y M.J. Waterway. 1993. Patterns of allozyme variation and clonal diversity in *Carex lasiocarpa* and *C. pellita* (*Cyperaceae*). *Am. J. Bot.* 80:1251-1263.
- McLellan, J.A., D. Prati, O. Kaltz y B. Schmid. 1997. Structure and analysis of phenotypic and genetic variation in clonal plants. En: Kroon, H. y J.V. Groenendael (Eds). *The Ecology and Evolution of clonal plants*. Backhuys Publishers. Leiden. pp:227-241. The Netherlands.
- Miller, M.P. 1997. Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA). A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Software distributed by author Mitton, J.B., Y.B. Linhart, J.L. Hamrick y J.S. Beckman.
1977. Observations on the genetic structure and mating system of ponderosa pine in the Colorado front range. *Theor. Appl. Genet.* 51:5-13. Mitton, J.B., Y. Linhart, B.K. Sturgeon, and J.L. Hamrick. 1979. Allozyme polymorphisms detected in mature needle tissue of ponderosa pine. *Journal of Heredity* 70:86-89.
- Morden, C.W., J. Doebley, y K.F. Schertz. 1987. A manual of techniques for starch gel electrophoresis of *Sorghum* isozymes. Texas Agricult. Exper. Station. MP-1635.10 pp.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Amer. Naturalist* 106:283-292.
- Nei, M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet.* 41:225-233. Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Parker, C.K. and J.L. Hamrick. 1992, Genetic diversity and clonal structure in a columnar cactus, *Lophocereus schottii*. *Amer. J. Bot.* 79: 86-96
- Pielou, E.C. 1969. *An Introduction to Mathematical Ecology*. Wiley-Interscience. New York

Pleasants, J.M. y J.F. Wendel. 1989. Genetic diversity in a clonal narrow endemic, *Erythronium propulans*, and in its widespread progenitor, *Erythronium albidum*. *Am. J. of Bot.* 76:1136-1151.

Rabinowitz, D. 1980. Seven forms of rarity. En: H. Synge (ed.). *The biological aspects of rare plants conservation*. Wiley, N.Y. Pp: 205-218.

Richards, J.A. 1986. *Plant breeding systems*. George Allen & Unwin. London.

Ritland, K. 1989. Genetic differentiation, diversity and inbreeding in the mountain monkeyflower (*Mimulus caespitosus*) of the Washington Cascades. *Canadian J. Botany*. 67:2017-2024.

Saitou, N. Y M. Nei. 1977. The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

Sarukhán, J. y M. Gadgil. 1974. Studies on plant demography: *Ranunculus repens* L., *R. acris* L. III. A mathematical model incorporating multiple modes of reproduction. *J. of Ecology*. 62:921-936.

Silander, J.A. 1985. Microevolution In clonal plants. En J.B.C. Jason, L. W. Buss y R. E. Cook (eds.) *Populations biology an evolution of clonal organisms*. Yale, University Press. New Heaven. pp. 107-152.

Sipes, D.S. y P.G. Wolf. 1997. Clonal structure and patterns of allozyme diversity in the rare endemic *Cycladenia humilis* var. *jonesii* (Apocynaceae). *Am. J. Pot.* 84:401-409.

Slatkin, M. 1985. Gene flow in natural populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 16:393-430.

Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47: 264-279

Slatkin, M. 1994. Gene flow and population structure. En Real, L. (ed.) *Ecological genetics*. Princeton University Press. Princeton, N.J.

Stubber, C.W., J.F. Wendel, M.M. Goodman and J.S.C. Smith. 1988. Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays* L.). Technical bulletin 286. North Carolina Agricultural Research Service. N.C. State University, Raleigh N.C.

Swoford, D.L. and R.K. Selander 1989. BIOSYS-1 (release 1.7): a computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematic. Illinois Natural History Survey. Turner, R.M., J.E. Bowers and T.L. Burgess. 1995. *Sonoran Desert Plants*. University of Arizona Press. Tucson, Az. USA

Van Treuren, R., R. Bijtsma, W. Van Delden y N.J. Ouborg. 1991. The significance of genetic erosion in the process of extinction. 1. Genetic differentiation in *Salvia pratensis* and *Scabiosa columbaria* in relation to population size. *Heredity*, 66:181-189.

Weir, B.S. y C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistic for the analysis of population structure. *Evolution*. 38:1358-1370.

Weeden, F.N. y F.J. Wendel. 1989. Genetics of plants isozymes. En Soltis, D.E. y P.S. Soltis (eds.). *Izozymes in Plant Biology*. Dioscorides Press. Portland. pp.46-72

Wendel, J.F. y N.F. Weeden. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. En Soltis, D.E. y P.S. Soltis (eds.). *Izozymes in Plant Biology*. Dioscorides Press. Portland. pp.5-45

Whitman, T.G. y C.N. Slobodchikoff. 1981. Evolution by individuals, plant-herbivore interactions and mosaics of genetic variability: the adaptative significance of somatic mutations in plants. *Oecologia*. 29:287-292.

Widén, B., N. Croberg y M. Widén. 1994. Genotypic diversity, molecular markers and spatial distribution of genets in clonal plants, a literature survey. *Plant clonality*. En Soukupová, I., C. Marshall, T. Hara y T. Herben (eds.). *Biology and diversity*. Opulus Press, Uppsala. pp. 139-157,

Workam, P.L. y J.D. Niswander. 1970. Population studies on Southwestern Indian Tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago, Amer. J. Hum. Genet. 22:24-29.

Wright, S. 1978. Evolution and the genetics of populations, Vol. 4. Variability within and among populations. University of Chicago Press. Chicago, IL, USA.

APENDICE 1

Buffer de extracción de Mitton et al. (1979)

Para preparar 100 ml de buffer es necesario pesar 0.093 g de dióxido de Germanio y disolverlo en 65 ml de agua destilada, hervirlo hasta que se disuelva y dejar que este se enfríe a temperatura ambiente.

Posteriormente agregar

0.3 g ácido dietildiocarbámico
4.4 g polivinilpirrolidone
4.4 g ascorbato de sodio
0.33 g metabisulfito de sodio
1.21g borato de sodio
8.8 ml 0.16M buffer fosfato pH 7.0 *

Finalmente se agrega

8.8ml sulfóxido de dimetil
0.8 ml 1-fenoxietanol
0.18 ml B-Mercaptoetanol

Todo se afora a 100 ml.

*Para preparar 100ml de buffer fosfato pH 7.0 se pesan 2.272 g de fosfato dibásico y se afora a 100 mL.

Recetas utilizadas para preparar los sistemas de buffer:

Sistema 6 (Soltis & Soltis 1989). Correr a 280volts y 60 mA.

Litio-Borato, pH 8.31 Tris-citrato, pH 8.3 ELECTRODO

0.192 M Acido Borico (11.87 g) titular a pH 8.3 con hidróxido de Litio (aprox. 1.59 g, con Molaridad aproximada de 0.038 M)

GEL

0.019M Acido Borico (1.17g)

0.004 M LiOH(0.16 g)

0.047 M Tris (5.69 g)

0.007 M Acido cítrico (1.47); la otra forma de prepararlo es:

Este buffer es preparado utilizando 1 volumen de buffer de electrodo y 9 volúmenes de Tris-Citrato, pH 8.3 (0.052 M Tris- 0.008 M Acido cítrico).

Sistema PP (Mitton et al. 1977). Correr a 250 volts y 60

mA. ELECTRODO

0.031 M Hidróxido de sodio (NaOH) (1.25 g)

0.295 M Acido bórico (18.25 g)

Aforar a un litro con agua destilada. Ajustar el pH a 7.5 con NaOH o con Acido bórico. GEI

0.015 M Trizma Base (1.8 g)

0.295 M Acido Cítrico (monote.) (0.7 g)

Aforar a un litro con agua destilada. Ajustar el pH a 7.6 con NaOH o con Acido cítrico.

Sistema D (Stuber et al. 1988) modificado. Correr a 250 volts y 60 mA. L-Histidina-

Acido cítrico pH 6.51L-Histidina-Acido cítrico pH 6.0 ELECTRODO

0.065 M L-Histidina (10.088 g);

0.007 M Acido cítrico.H₂O

(aprox. 1.50 g; pH ajustarlo con acido cítric)

GEL

0.0108 M L-Histidina;

0.0012 M Acido cítrico.H₂O

(1:5 dilución del buffer del electrodo en agua destilada)

Recetas de tinción de las isoenzimas montadas

Acida Fosfatasa (APH; E.C.3.1.3.2) 100 ml

0.05mM Acetato de sodio, pH 5.0 75 mg alpha-

naphthyl acido fosfato, sodium salt 80 mg Fast

garnet GBC salt

Incubar en la oscuridad a 37°C (cerca de 1 hora) y fijar.

Alcohol dehidrogenasa (ADH; E.C.1.1.1.1) 50 ml 50mM

Tris-HCL, pH 8.0

20 mg NAD

1 ml Etano! (95%)

10 mg MTT

2mgPMS

Incubar en la oscuridad a 37°C (cerca de 1 hora) y fijar.

Diaforasa (DIA; É.C.1.6.4.3)

50 ml 50mM Tris-HCL, pH 8.0
0.5 mg 2,6-dichlorofenol-indofenol
13 mg s-NADH
0.5 ml MTT

Incubar en la oscuridad a 37°C (cerca de 1 hora) y fijar.

Esterasa (EST; E.C.3.1.1)

50 ml 100mM Na-fosfato, pH 6.0
35 mg ALPHA-Naphthyl acetato
50 mg A-Naphthyl acetato Fast
Garnet GBC

Añadir a los sustratos 1 ml de acetona. Incubar a 37°C (cerca de 30 min.) y fijar.

Glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G6PDH; E.C.1.1.1.49)

50 ml 50mM Tris-HCL, pH 8.0
5 mg NADA
50 mg MgCl₂
80 mg Glucosa-6-fosfato, Na₂-salt
10 mg MTT
2mgPMS

Incubar en la oscuridad a 37°C (cerca de 40 min.) y fijar.

Leucina aminopeptidasa (LAP; E.C.3.4.11.1)

Pesar:

60 mg Fast Black K salt

disolverlo bien en 5 ml de agua destilada justo antes de teñir.

Añadir:

50 ml 0.2 M Tris-maleato pH 5.2
3 ml L-leucina b-naftilamida-HCL 2.5%

Incubar en la oscuridad a 37°C por 30 minutos.

Malato dehidrogenasa (MDH; E.C.1.1.1.37)

50 ml 50mM Tris-HCL, pH 8.5
10 mg NAD
150 mg ácido málico
10 mg MTT 2 mg
PMS

Incubar en la oscuridad a 37°C por 30 minutos.

(N)	1	52	50	50	50	49	150	1100	35	$1X^2=112.72 i$
-----	---	----	----	----	----	----	-----	------	----	-----------------

++ Poblaciones donde no hubo resolución para el locus.

Menadione reductasa (MNR; E.C.1.6.99.2)

75 ml 0.2M Tris-HCL, pH 7.0

25 mg Menadione

25 mg NAD H 10

mg NBT

Incubar en la oscuridad a 37°C (cerca de 30 min.) y fijar.

Fosfoglucosa isomerasa (PGI; modificada de O'Malley et al. 1980)

50 ml 0.1M Tris-HCL, plí 8.0

20 mg Fructosa-6-Fosfato

10 U G-6-PDH (NADP) 5

mg NADP 50 mg MgCl₂ 5

mg MTT

1.5 mg PMS

Incubar en la oscuridad a 37°C por 30 minutos.

Fosfoglucomutasa (PGM; E.C.5.4.2.2)

50 ml 50mM Tris-HCL, pH 8.5

120 mg Glucosa-I-Fosfato, Na₂-salt

20 U G-6-PDH (NAD)

50 mg MgCl₂

10 mg NAD 10

mg MTT 2 mg

PMS

Incubar en la oscuridad a 37°C por 1 hora.

Superoxidaza dismutasa (SOD; E.C.1.15.1.1)

50 ml 50mM Tris-HCL, pH 8.0

2 mg Riboflavina 1

mg EDTA 10 mg

NBT

Incubar en la oscuridad a 37°C por 30 minutos (el tiempo puede variar dependiendo de la actividad). Removerla de la incubación y colocarla ante luz. Lavar y fijar.