



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Mammillaria rekoii* Britton y Rose
(Cactaceae) ENDÉMICA DE OAXACA.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A

SAÚL QUEZADA RAMÍREZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. SOFÍA SOLÓRZANO LUJANO

ESTADO DE MÉXICO 2016





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PREÁMBULO

La presente tesis de licenciatura fue realizada en la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la FES Iztacala, dentro del grupo de investigación dirigido por la Dra. Sofía Sólorzano Lujano, una admirable persona a quien seguiré agradeciendo por haberme dado la oportunidad de integrarme en su equipo de trabajo, bajo su tutela tuve también la fortuna de realizar mi servicio social, en el programa: “Manejo y conservación de especies en riesgo y de sus hábitat”. Así comenzó mi formación académica estudiando algunos aspectos ecológicos y genéticos del género *Mammillaria* de la familia Cactaceae. En particular, el objetivo de mi trabajo de tesis fue evaluar la diversidad genética de *Mammillaria rekoj*.

Acepto que no me enamoré lo suficiente de ésta tesis, pero no tengo justificación por haberme demorado tanto en ella, y como se lo he mencionado a los miembros de mi jurado, me avergüenzo por ello. Pero como dice Goethe: “el hombre yerra mientras tiene aspiraciones”, y como cualquier humano, también las tengo. Lo mío son las cactáceas, bien lo supe desde que comencé a recorrer los alrededores del lugar donde crecí y donde antes abundaban. Lo mío son las cactáceas pero no la genética de las cactáceas, me inclino más por lo ecológico. Por ello ha sido un verdadero reto estudiar a *M. rekoj*, una integrante más de ésta sensible familia de plantas que nos caracteriza como mexicanos –y aunque no fuésemos–, debemos sentirnos obligados a protegerlas; créanme que si de mí dependiera, incluiría una mamilaria con frutos rojos, debajo del nopal de mi bandera.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Esta tesis fue realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IN217208.

A mi directora de tesis, Dra. Sofía Solórzano Lujano, por su dedicación y compromiso durante mi formación académica.

A mi jurado, cuyo tiempo, comentarios y correcciones fueron indispensables para la realización de esta tesis, conformado por los Doctores:

- Patricia Dolores Dávila Aranda
- Rafael Lira Saade
- Oswaldo Téllez Valdés
- Salvador Arias Montes

A la M. en C. Laura Márquez del Instituto de Biología de la UNAM por su apoyo en las electroforesis de las muestras analizadas.

A mí noble UNAM, que me cobijó y fue parte de mis primeros tropiezos desde el CCH Vallejo hasta mi paso por mi querida FES Iztacala.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Nuevamente agradezco a Sofía Solórzano Lujano por su comprensión, tolerancia, confianza y amistad que depositó en mi persona, al no tirar la toalla tampoco ella, ha dejado una profunda marca en mi forma de pensar y de conducirme por la vida.

Agradezco a la Dra. Patricia Dávila Aranda, porque aun sin merecerlo, me ha brindado una atención muy especial que valoro como nunca antes.

A mis compañeros y sobretodo grandes amigos no sólo de campo y laboratorio: Nelly María López Ortiz, Diana Cuevas Alducin, Paola Salas González, Fabián Macías Arrastio y Aidé Cruz Santos, por su ayuda, su amistad y por el respetuoso cariño que sigue existiendo entre nosotros. Las mamilarias se embellecen todavía más cuando estoy con ustedes.

A la Dra. Claudia Tzasná Hernández, por todo lo que incondicionalmente ha hecho por mi persona.

A Verónica Montoya Quintana, ya que sin sí apoyo y comprensión, este trabajo hubiera sido más difícil de concluir.

DEDICATORIA

A Iris Ramírez Mondragón y a Catarino Quezada Quezada, porque en los buenos, pero sobre todo en los malos momentos, siempre me han brindado todo su apoyo y su incondicional amor. Son un ejemplo a seguir.

A Magnolia Quezada Ramírez, que ha compartido gran parte de mis vivencias desde la infancia hasta el día de hoy, es una parte fundamental de mi vida.

A Leticia Berber y Francisco Quesada, sin olvidar nunca a sus hijos, Paco y Jazmín.

A mis pequeñines Sergio Roberto Balderas Ramírez y Luis Enrique Quezada Montoya, ya que todos necesitamos un poco de inocencia, ingenuidad y mucha imaginación para alegrar este México difícil, desordenado y confuso en el que vivimos.

A mi familia Balderas Robles de Apan, siempre pienso en ustedes.

No deben pasar por alto los grandes amigos, empezando por los del CCH Vallejo; Manuel, Lucero y Azucena. Y de la FESI; Daniel, Javier (el pelón), Ismael, Aldo, todos los Bitlos, Diana, Gis, María, Paola e Irene. No sería lo mismo sin ustedes, disculpen la falta de apellidos pero no recuerdo los de la gran mayoría de ustedes.

Al chiapaneco Abelardo Gómez, espero sigas vivo.

“El que quiere nacer tiene que romper un mundo”.

Hermann Hesse

ÍNDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Hipótesis.....	8
Objetivos	8
Objetivo general	8
Objetivos particulares.....	8
Materiales y métodos	9
Área de estudio	9
Sistema biológico	9
Trabajo de campo	11
Trabajo de laboratorio	11
Aislamiento de ADN genómico total.....	11
Amplificación de regiones microsatélite	12
Resultados.....	13
Discusión	14
Conclusiones	18
Literatura citada.....	19

RESUMEN

Este estudio evaluó la diversidad genética de dos poblaciones de *Mamillaria rekoï*, una especie endémica de Oaxaca, y clasificada en la Lista Roja de la IUCN, en la categoría de preocupación menor. Para ello se colectaron muestras de 0.5cm² de tejido vegetativo de 40 individuos (20 por población) en las localidades de Mitla y Cuajimoloyas. Para los análisis genéticos se aisló ADN genómico total, y se ensayaron cinco loci de microsatélites con la técnica de PCR bajo condiciones estandarizadas. Se estimó para la población de Mitla un promedio de 13 alelos por locus con una heterocigosidad observada menor a la esperada ($H_O = 0.53$, $H_E = 0.88$). En contraste, Cuajimoloyas presentó un promedio de 10.5 alelos por locus, ligeramente más bajo que Mitla, y una heterocigosidad observada también menor a la esperada ($H_O = 0.62$, $H_E = 0.85$). Las dos poblaciones se encontraron en desequilibrio Hardy-Weinberg y los valores del estadístico de endogamia resultaron significativos $F_{IS} = 0.37$, $F_{IS} = 0.33$ para Mitla y Cuajimoloyas respectivamente. De acuerdo con el coeficiente de diferenciación ($R_{ST} = 0.065$) existe una homogeneidad genética poblacional. En comparación con otras especies ya estudiadas del género *Mamillaria*, los niveles altos de polimorfismo sugieren que *M. rekoï* tiene una alta variabilidad genética, sin embargo, los resultados también muestran una alta homocigosidad en las poblaciones, a pesar de la gran riqueza alélica y el flujo génico tan alto que se documentó. Por lo tanto, estos análisis permiten establecer que existe endogamia en ambas poblaciones. Sin embargo, debido a que se desconoce si esta especie se autofecunda, estudios futuros deben analizar si ésta participa en los niveles de endogamia. En este momento la presente tesis concluye que a largo plazo la endogamia podría incrementar el riesgo de extinción de la especie. También, se propone incrementar el análisis de un mayor número de poblaciones, de individuos y de loci. Por último, también es necesario abordar de una manera más exhaustiva los aspectos biológicos y ecológicos de *M. rekoï*, que permitirán establecer de una manera más general, el estado de conservación de la especie.

INTRODUCCIÓN

La genética de poblaciones estudia los factores que determinan los cambios evolutivos entre las poblaciones a través del tiempo. Estos cambios se ven reflejados en las frecuencias alélicas entre los individuos de una población (Hartl y Clark, 2007; Hedrick, 2000). Las bases teóricas de esta materia se desarrollan con las aportaciones de las leyes de Mendel entre las décadas de 1920 y 1930, esto gracias a las contribuciones de Robert A. Fisher, John Haldane y en especial de Sewall Wright (Provine, 1971). Otras aportaciones genéticas y evolutivas son las de Theodosius Dobzhansky, sus investigaciones son numerosas y muy variadas (Ayala, 1985), pero cabe resaltar la importancia que da a la genética de poblaciones con la siguiente frase: “Dado que la evolución es un cambio en la composición genética de las poblaciones, los mecanismos de la evolución son asunto de la genética de poblaciones” (Feria y Nieto, 2003).

Los avances moleculares más importantes para el desarrollo de la genética de poblaciones, fueron la secuenciación de proteínas después de 1960, y del ADN a partir de 1980 (Hedrick, 2000). Esto permitió diseñar marcadores moleculares con los que es posible estimar parámetros de diversidad genética, tales como la heterocigocidad y la riqueza alélica, esta diversidad consiste en el conocimiento de toda la variación genética (alelos y genotipos) entre individuos dentro de una población y entre poblaciones (Frankham *et al.*, 2002).

La diversidad genética es un elemento importante para la conservación de las especies que los genetistas estiman para evaluar la variabilidad poblacional (Haig, 1998). La selección natural, la deriva génica, la endogamia, la migración, el flujo genético y las mutaciones, se consideran como los principales factores que causan cambios en la variación genética dentro de las poblaciones (Hartl y Clark, 2007; Hamilton, 2009).

La selección natural es el éxito diferencial de los genotipos en su contribución a la siguiente generación (Allendorf y Luikart, 2007), este mecanismo puede causar una homogeneidad o bien una diferenciación entre las poblaciones (Futuyma, 2003). El impacto de la selección es mayor en las poblaciones grandes, porque cuando son pequeñas, han sido fragmentadas o están aisladas: se incrementa la deriva génica y la endogamia, lo que ocasiona una pérdida considerable de la variación genética (Frankham *et al.*, 2002; Young *et al.*, 1996).

Una pérdida de la variación genética a causa de la endogamia es un efecto negativo que pueden conducir a una disminución en la adecuación poblacional (Keller y Waller, 2002). Esto se conoce como “depresión por endogamia”. En poblaciones vegetales, el apareamiento de individuos genéticamente emparentados suele ocurrir por autofecundación y por endogamia biparental, es decir, porque en las poblaciones la dispersión vía polen o por semillas está restringida, lo que ocasiona que los individuos posean los mismos alelos y que haya un aumento de homocigotos (Ellstrand y Elam, 1993). Bajo estas condiciones la deriva génica intensifica aun más los efectos, ya que puede fijar alelos deletéreos en la población y en pocas generaciones declina la adecuación en poblaciones enteras (Cruzan, 2001).

La deriva génica y la endogamia disminuyen la cantidad de variación genética, mientras que las mutaciones la incrementan (Hedrick, 2000). Estos cambios en la secuencia de nucleótidos del ADN pueden ser de tres tipos: perjudiciales, benéficas y neutras. Kimura en 1983 propuso que la mayoría de los nuevos alelos que aparecen por mutación son perjudiciales, sin embargo, una porción significativa son selectivamente neutras y muy pocas son ventajosas. La neutralidad de estas mutaciones explica una gran parte de la variabilidad genética observada en las poblaciones naturales, que a su vez dependen de la deriva génica (Kimura, 1983).

El flujo de genes juega un papel fundamental en la variabilidad genética de las poblaciones vegetales. Por ejemplo, si el flujo génico es alto, se resalta un efecto de homogeneización genética, mientras que si es bajo, la deriva génica, la selección y

las mutaciones en conjunto, reflejan una estructura genética en las poblaciones (Loveless y Hamrick, 1984; Hartl y Clark, 2007; Frankham *et al.*, 2002; Hedrick, 2000).

La medida de la diversidad genética puede estimarse a nivel de especie, dentro de las poblaciones y entre los individuos (Hamrick *et al.*, 2002). Para medir esta diversidad, en los últimos 30 años se han utilizado herramientas como los marcadores moleculares, que son caracteres medibles, discretos y que se heredan de forma mendeliana. Entre ellos destacan las isoenzimas, RFLPs, RAPDs, secuencias de ADN y los microsatélites o SSR (Avice, 1989; Carvalho, 1998). Con estos marcadores se han abordado principalmente cuestiones ecológicas, filogenéticas y genealógicas. Sin embargo, actualmente adquieren una gran importancia para la genética de poblaciones y la genética de la conservación, pues permiten estimar parámetros de vital importancia, tales como la diversidad y la variabilidad genética, la endogamia, los ritmos de migración, el tamaño poblacional y la existencia de cuellos de botella (Avice, 1994; Dhondt, 1996; Sunnucks, 2000).

Actualmente los marcadores moleculares más utilizados en genética de poblaciones son los microsatélites o SSR, se distinguen por ser secuencias repetidas en tándem de uno a cuatro nucleótidos. Son de gran interés por sus ventajas sobre otros marcadores moleculares; son altamente polimórficos al presentar variaciones en el número de repeticiones. Además, muestran codominancia, es decir, permiten identificar la presencia de individuos heterocigotos (Tagu y Moussrad, 2003). El uso de los microsatélites es actualmente uno de los métodos más eficientes para realizar estudios de genética de poblaciones y de genética de la conservación. Esta última materia se ha formalizado recientemente como campo de investigación, gracias al avance de las tecnologías moleculares (Primmer, 2009).

En un gran número de plantas superiores como las cactáceas, se han hecho estudios enfocados a cuantificar parámetros de diversidad genética tales como la heterocigocidad, la diferenciación genética, la endogamia y el flujo génico (Hamrick

et al., 2002). Los primeros estudios se realizaron utilizando a las isoenzimas, ya que debido a su eficacia y a su bajo costo, eran desde 1966 los marcadores moleculares más utilizados en este tipo de análisis (Brown, 1978).

La familia Cactaceae está integrada por plantas adaptadas a condiciones de temperatura extrema; generalmente las hojas están reducidas a primordios, mientras que las espinas se desarrollan, los tallos son suculentos y fotosintéticos (Reyes *et al.*, 2004). La importancia de las cactáceas ha tenido un gran impacto desde épocas precolombinas a nivel económico, social y cultural. El jeroglífico de la Gran Tenochtitlan, ostentaba airesamente un nopal, símbolo que conserva el escudo actual mexicano (Bravo-Hollis, 1978).

Las cactáceas debido a su rareza y su gran belleza han sido usadas comúnmente como plantas de ornato, motivo por el cual millones de ejemplares de diferentes especies o sus semillas, han sido sustraídas ilegalmente de sus hábitats, ya que tienen una gran demanda a nivel internacional (Becerra, 2000; Jiménez, 2011).

Determinar qué nivel de deterioro, vulnerabilidad o riesgo posee una especie, es complicado, ya que se desconocen parámetros de gran importancia como la distribución, la demografía y la biología de un gran número de taxones, lo que dificulta la aplicación de los criterios establecidos por el MER (Método de Evaluación de Riesgo de Extinción de Especies Silvestres en México) o por la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) (Sánchez-Salas *et al.*, 2013). Aunque no hay cifras precisas, se estima que un alto porcentaje de especies de cactáceas son vulnerables en su supervivencia, esto es causado en parte a la organización heterogénea que presentan los hábitats donde se distribuyen sus poblaciones (Wilhelm *et al.*, 2010; Mutke y Barthlott, 2005). Además, la gran mayoría de las especies de cactáceas amenazadas son muy longevas, suelen presentar demografías bajas, una distribución restringida, su crecimiento es lento, y el reclutamiento es muy bajo o nulo (Becerra, 2000; Hernández y Godínez, 1994). Como se ha descrito, algunas de estas características biológicas y ecológicas suelen

provocar una reducción en el tamaño poblacional y un aislamiento geográfico; condiciones propicias para que se incremente la influencia de la endogamia y de la deriva génica, causando una pérdida considerable de la variación genética (Young *et al.*, 1996).

En estudios genéticos recientes en la tribu Cactae, se ha utilizado a los microsatélites como marcador molecular para analizar diversas especies de los géneros *Ariocarpus*, *Astrophytum*, *Echinocactus*, *Coryphantha* y *Mammillaria* (Hughes *et al.*, 2008; Terry *et al.*, 2012; Hardesty *et al.*, 2008; Butterworth, 2011; Solórzano *et al.*, 2009). Los resultados de dichas investigaciones han sido muy variables, sin embargo, los estimadores de diversidad genética han mostrado un mayor polimorfismo que con el uso de otros marcadores como las isoenzimas y los RAPDs.

Particularmente el género *Mammillaria* es uno de los más representativos de la familia Cactaceae ya que cuenta con aproximadamente 200 especies (Guzmán *et al.*, 2003). Estas plantas se caracterizan por ser globosas, su crecimiento es lento y presentan tubérculos en el tallo (Britton y Rose, 1919; Pilbeam, 1999). *Mammillaria* ha estado sujeto a intensos disturbios, tales como la fragmentación de sus hábitats, al comercio ilegal y al cambio de uso de suelo para actividades como la agricultura y la ganadería (Arias *et al.*, 2005; Hernández y Godínez, 1994). En particular, de las 172 especies de *Mamillaria* que se distribuyen en el país (Guzmán *et al.*, 2003), 150 son endémicas lo que representa un 87%.

Para las casi 200 especies que integran el género *Mammillaria* no existe información ecológica y genética suficiente que permita establecer un diagnóstico más preciso sobre su estado de conservación. Por lo tanto, es necesario generar un mayor número de datos ecológicos y genéticos de las especies de *Mammillaria*. Actualmente solo se tienen datos genéticos para *M. crucigera*, *M. huitzilopochtli*, *M. napina*, *M. solisoides*, *M. sphacelata*, *M. supertexta* y *M. zephyranthoides* (Solórzano *et al.*, 2009; Solórzano *et al.*, 2014; Tapia-Salcido, 2011; Macías-Arrastio, 2014; Cuevas-Alducin, 2013 y López-Ortiz, 2013). Para contribuir al conocimiento de

este peculiar grupo de cactáceas, en el presente estudio se analizó la diversidad genética de dos poblaciones de *Mammillaria rekoï* (Cuajimoloyas y Mitla), para ello se utilizaron cinco loci de microsatélite. Esta especie es endémica de Oaxaca y su distribución se restringe fuera de la reserva de Tehuacán-Cuicatlán (Pilbeam, 1999). Algunas observaciones de campo sugieren que esta especie presenta densidades poblacionales bajas 1.79 ind/m² (Solórzano, 2008).

HIPÓTESIS

Debido a que *Mammillaria reko* presenta una distribución restringida y registra densidades poblacionales bajas, se esperaría encontrar una baja diversidad alélica y una marcada diferenciación genética entre las poblaciones de Cuajimoloyas y Mitla.

OBJETIVO GENERAL

Describir la diversidad y la estructura genética de *Mammillaria reko* en las poblaciones de Cuajimoloyas y Mitla, con la finalidad de proponer estrategias de conservación.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Estimar la diversidad genética de *Mammillaria reko* para contribuir al conocimiento que permita inferir los posibles procesos ecológico-evolutivos que determinan su variación genética.
- Evaluar el flujo génico entre las dos poblaciones de *Mammillaria reko*, con la finalidad de determinar si existe una diferenciación genética entre ellas.

MATERIALES Y MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDIO

Las poblaciones de estudio de *M. reko*, se ubican en Mitla y Cuajimoloyas, pertenecen a la Sierra de San Felipe, ubicada en el municipio de San Miguel Amatlán, en el estado de Oaxaca. La distancia que separa ambas poblaciones es de aproximadamente 20 km (Figura 1). Estas zonas presentan suelos ácidos, la precipitación anual es de aproximadamente 800 a 900 mm y la época de lluvias es de mayo a octubre (INEGI, 2013).

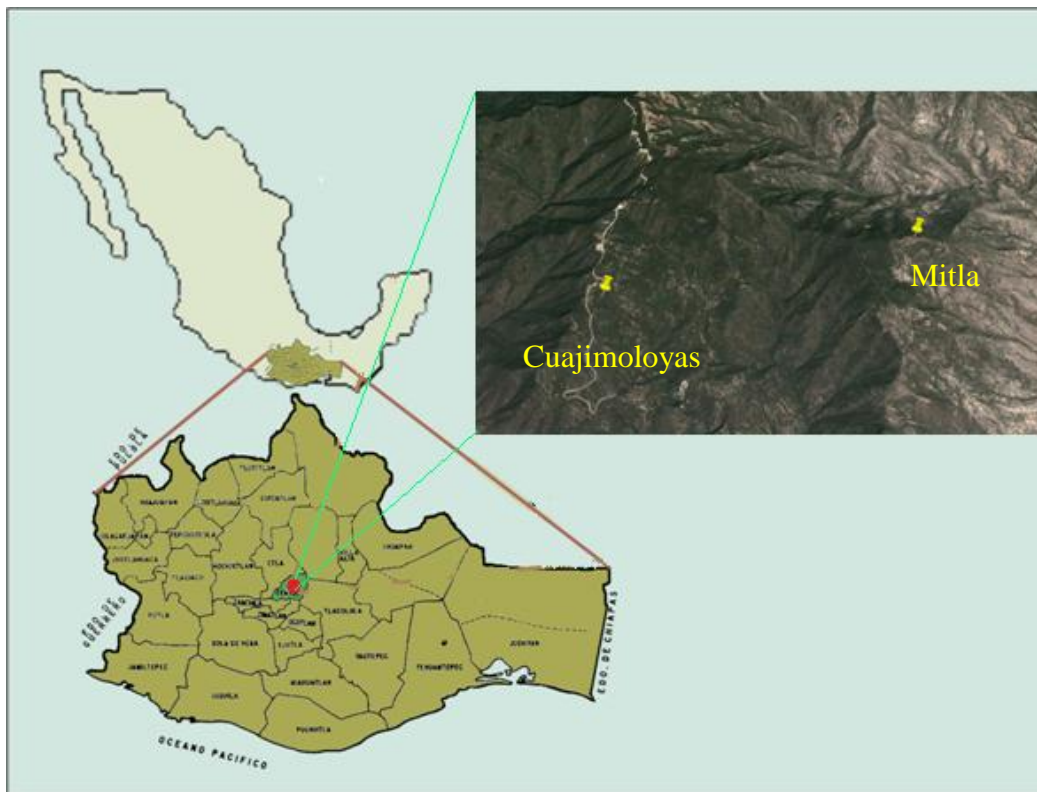


Figura 1. Ubicación geográfica de las poblaciones de estudio de *M. reko*.

SISTEMA BIOLÓGICO

La especie globosa, *Mammillaria reko* Britton y Rose, puede tener crecimiento clonal o crecer de forma solitaria; por lo regular tiene cuatro espinas centrales y alrededor de 20 radiales por aréola. La flor es de color morado intenso, de aproximadamente

15 mm de largo. El fruto es rojo (Figura 2a y 2b) y las semillas generalmente cafés (Pilbeam, 1999). Esta cactácea es endémica de Oaxaca. Actualmente no está incluida bajo alguna categoría de riesgo en la NOM-059-SEMARNAT-2010 (DOF, 2010), aunque en un estudio la proponen como una especie en peligro (Volvides *et al.*, 1997). Sin embargo, *M. reko*i está incluida en la lista roja de la IUCN, como una especie en preocupación menor (IUCN, 2016), así como en el apéndice II de la CITES (CITES, 2016).

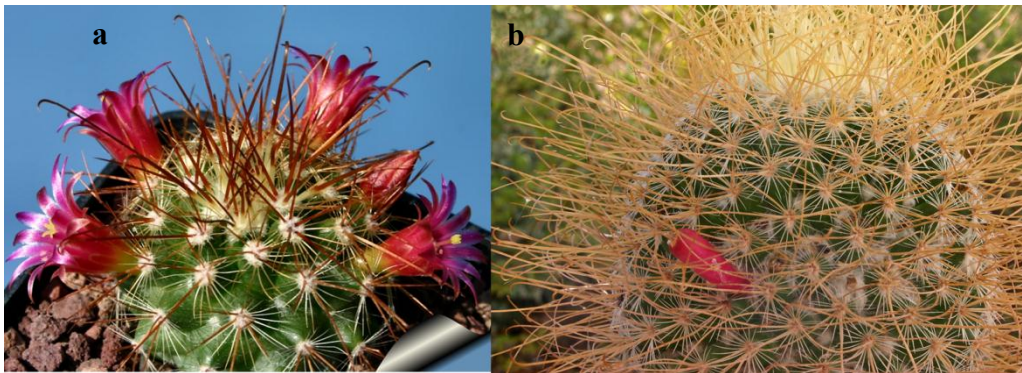


Figura 2. Individuos adultos de *M. reko*i con presencia de estructuras reproductivas, flores (a) y frutos (b) (Dave's Garden).

*Mammillaria reko*i crece en sitios protegidos, húmedos y cerca de arroyos en bosques de pino-encino, así como en peñas expuestas en altitudes que varían entre los 2000 y 2300 msnm. Esta especie globosa se documentó compartiendo su hábitat con *Echeveria zorzaniana* (Figura 3), una planta también suculenta, pero de la familia Crasulaceae (Reyes y Brachet, 2009).



Figura 3. Individuo de *M. reko*i creciendo al lado de *Echeveria zorzaniana* (Reyes y Brachet, 2009).

TRABAJO DE CAMPO

Para la realización de los análisis genéticos se colectó tejido vegetativo de 20 individuos por población. El tejido recolectado se etiquetó y se guardó individualmente en nitrógeno líquido, hasta su posterior almacenamiento en el laboratorio.

TRABAJO DE LABORATORIO

El ADN genómico de 200 mg de tejido vegetativo fue aislado y macerado con nitrógeno líquido de 40 individuos de *M. rekoii* (20 por población), siguiendo el protocolo del Kit DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). Para amplificar cinco loci de microsatélite diseñados previamente para *M. crucigera* (Solórzano *et al.*, 2009), se empleó la técnica de PCR (Cuadro 1), utilizando primero oligonucleótidos no marcados para optimizar condiciones. Los PCR individuales se prepararon con 5 pmol de cada oligonucleótido (F y R), 100µM de cada dNTP, 2mM de NaCl₂, 10µM de Tris-HCl pH 8.3, 76µM de KCl, BSA 0.08% (Albumina de suero de bovino), 1U de Taq (Invitrogen) y 1µl del total del ADN aislado, todo en un volumen total de 10µl. Para confirmar la amplificación se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) y utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb, se visualizó con luz ultravioleta. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, después 34 ciclos de 94°C durante 15 segundos de desnaturalización, alineamiento con temperaturas entre 54°C y 60°C (dependiendo del locus) por 15 segundos, extensión a 72°C por 15 segundos y una extensión final por 3 minutos a 72°C.

Los oligonucleótidos que se usaron fueron marcados con fluorocromos NED y FAM. De las reacciones de PCR se tomaron alícuotas de 5µl y se llevaron a electroforesis en el secuenciador ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) del Instituto de Biología de la UNAM. Los electroferogramas se analizaron con el programa Peak Scanner (Applied Biosystems) y se obtuvo el tamaño de alelos en pares de bases.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa ARLEQUIN versión 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

Cuadro 1. Microsatélites ensayados en *M. reko*i previamente diseñados para *M. crucígera* (Solórzano *et al.*, 2009). Nombre del locus, secuencia de las regiones 5'-3" y 3"-5" con los fluorocromos NED y FAM, temperaturas de alineamiento, repeticiones microsatélite y la amplitud del tamaño de los alelos para la especie de estudio.

Locus	Secuencia del primer	T(C°)	Repeticiones microsatélite	Tamaño (pb)
Mam VTC5	F-NED TACAGACGCCATAGGCAAAG R: GGTGGAGATGAGGGACTGAA	54-56	(GA) ₅ CA(GA) ₇ AA(GA) ₁₂	184–242
Mam VTC8	F-FAM TCGATTATCTGCTGCTTCCA R: CCGAGAAAGCCCTAAAACCT	60	(GA) ₁₅ GGG(GAA) ₅	163–190
Mam VTC9	F-FAM TGGATACGTGGCTCTTCGAT R: CCAAATGCCAATCCTCCTAA	60	(GT) ₃ G(GT) ₃	190
Mam VTC11	F-NED TGGGGAATGGGCTATGATTA R: CGGCGTTTATTAGCCAATCT	54-55	(GT) ₃ G(GT) ₃	164–172
Mam VTC12	F-FAM TGGATACGTGGCTCTTCGAT R: CCAAATGCCAATCCTCCTAA	60	(GA) ₂₄	222–235

Para analizar la diversidad genética se estimó la heterocigosidad observada (H_o), que es la proporción de individuos heterocigotos observados para un locus determinado (Hedrick, 2000), También se evaluó la heterocigosidad esperada (H_E), que es definida como la proporción de individuos heretocigos esperados en una población con apareamiento al azar (Allendorf y Luikart, 2007). Así mismo, se calculó el número promedio de alelos por locus (A) y el equilibrio Hardy-Weinberg por locus. Además, se calculó el número de alelos exclusivos (A_P) por población y el número efectivo de alelos (A_E), que es el número de alelos necesarios para proveer la misma heterocigosidad si todos los alelos fueran igualmente frecuentes (Frankham *et al.*, 2002). Cuando existe un déficit de heterocigotos, es necesario determinar la presencia de alelos nulos, para lo cual se utilizó el programa Micro Checker 2.2.3 (Oosterhout *et al.*, 2004). Para determinar estructura genética se utilizó el índice R_{ST} que es un análogo al F_{ST} utilizado en marcadores como los microsatélites (Slatkin, 1995; Selkoe y Toonen, 2006). También se estimó el coeficiente de endogamia de Sewall Wright F_{IS} para cada población. El valor de flujo génico (Nm) se determinó a partir del índice R_{ST} (Excoffier *et al.*, 2005).

RESULTADOS

Para las dos poblaciones de los cinco loci, cuatro resultaron ser polimórficos, el número promedio de alelos por locus fue de 11.75. El locus MamVTC9 fue descartado del análisis por resultar monomórfico. Los loci MamVTC5 y MamVTC8 fueron los que tuvieron la mayor cantidad de alelos con 19 y 21 respectivamente, por su parte, el MamVTC11 tuvo un total de 13 alelos y el MamVTC12 16 alelos. Las frecuencias de los alelos encontradas, fueron en general, bajas (0.026 a 0.35). En la población de Mitla se obtuvo un promedio de 13 alelos por locus, con una heterocigosidad observada menor a la esperada y solo el locus MamVTC8 está en equilibrio Hardy-Weinberg. En contraste, la población de Cuajimoloyas presentó un promedio de 10.5 alelos por locus, ligeramente más bajo que Mitla, con una heterocigosidad observada también menor a la esperada y no se encontró equilibrio Hardy-Weinberg en ninguno de los loci (Cuadro 2).

Entre las poblaciones, el coeficiente de diferenciación R_{ST} fue muy bajo (0.065), mientras que los coeficientes de endogamia resultaron positivos, para Mitla ($F_{IS}=0.37$) y para Cuajimoloyas ($F_{IS}=0.33$). Por su parte el flujo génico entre ambas poblaciones fue alto ($Nm > 3$). Además, se observó que el promedio de alelos exclusivos en Mitla (6.7), fue moderadamente más alto que en Cuajimoloyas (4.5).

El programa Micro Checker 2.2.3 confirma la presencia de alelos nulos, sin embargo, la frecuencia de estos es muy baja en todos los loci ($< 10\%$)

Cuadro 2. Índices de la variabilidad alélica para *M. rekoï* mediante el uso de microsatélites. Nombre del locus, heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_E), el valor de $P < 0.05$ indica desviación de las proporciones Hardy-Weinberg, número efectivo de alelos (A_E) y el número promedio de alelos de las dos poblaciones(A).

Locus	Mitla			Cuajimoloyas					
	H_o	H_E	Valor de P	A_E	H_o	H_E	Valor de P	A_E	A
MamVTC5	0.63	0.9	0.18	7.9	0.55	0.91	0.002	9.1	13.5
MamVTC8	0.73	0.93	0.058	11.3	0.73	0.87	0.03	6.7	13.5
MamVTC11	0.46	0.87	0.002	6.3	0.56	0.77	0.02	3.9	8.5
MamVTC12	0.42	0.83	0.0007	5.3	0.65	0.82	0.0001	5.06	11

DISCUSIÓN

En este estudio se encontraron niveles de heterocigosidad observada de moderados a altos, en contraste con lo que se observa en otras especies de *Mammillaria* (Cuadro 3). En particular la riqueza alélica que se observa en *Mammillaria rekoii* ha sido una de las más altas registradas dentro del género. De hecho, después de lo documentado para *M. crucígera* (Solórzano y Dávila, 2015), el único estudio con resultados similares es el que se refiere a *M. huitzilopochtli* (Solórzano *et al.*, 2014), que registra un número promedio de alelos ligeramente mayor (Cuadro 3). *Coryphanta robustispina* es otra especie globosa de la tribu Cactae en que se ha documentado una gran riqueza alélica, para un locus se registraron 20 alelos (Butterworth, 2011).

Cuadro 3. Densidad poblacional y atributos genéticos de especies del genero *Mammillaria*. Heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_E), número promedio de alelos (N_A), índice de endogamia (F_{IS}), flujo génico (Nm), estructura genética y déficit o exceso de heterocigotos (al menos en una población).

Especie	Densidad poblacion al (ind/m ²)	H_o	H_E	N_A	F_{IS}	Nm	Estructura genética	Heterocigos	Referencia
<i>M. crucígera</i>	2.6	0.54	0.76	20	0.29	>1	Sí	Déficit	Solórzano y Dávila, 2015.
<i>M. huitzilopochtli</i>	0.6	0.55	0.80	11.8	0.308	---	Sí	Déficit	Solórzano <i>et al.</i> , 2014.
<i>M. napina</i>	2.39	0.58	0.72	8	0.331	>1	No	Déficit	Tapia-Salcido, 2011.
<i>M. solisioides</i>	9.29	0.75	0.68	6	-0.08	>1	Sí	Exceso	Macías-Arrastio, 2014.
<i>M. sphacelata</i>	4.5***	0.66	0.69	9.4	0.105	>1	No	Déficit	Tapia-Salcido, 2011.
<i>M. supertexta</i>	1.42	0.69	0.76	9.3	0.132	>5	Sí	Exceso	Cuevas-Alducin, 2013; Solórzano <i>et al.</i> , 2014.
<i>M. zephyranthoides</i>	1.51	0.81	0.68	5	-0.19	>2	Sí	Exceso	López-Ortiz, 2013; López <i>et al.</i> , 2013.
<i>M. rekoii</i>	1.79	0.57	0.86	11.6	0.35	>3	No	Déficit	Presente tesis.

*** En esta especie por su tipo de crecimiento clonal, la densidad poblacional está dada por el número de genetos que hay en un m² (Tapia-Salcido, 2011), mientras que para el resto de especies, está dado por el número de individuos que hay en un m².

Las especies *M. supertexta* y *M. sphacelata* presentan valores moderados de riqueza alélica, sin embargo, esta última especie interesantemente puede presentar reproducción asexual (Tapia-Salcido, 2011). En contraste, *M. rekoii* por lo general crece de manera solitaria pero también puede presentar este tipo de reproducción (Pilbeam, 1999). De acuerdo a algunos estudios en ciertas especies que presentan

reproducción asexual, se ha documentado que, en ocasiones, dicha reproducción puede proveer suficiente variabilidad para mantener altos niveles de diversidad genética (Persson y Gustavsson, 2001; Gabrielsen y Brochmann, 1998). No obstante, la gran riqueza alélica puede atribuirse al uso de microsatélites, pues estos marcadores son uno de los factores más relevantes para estimar variabilidad genética, ya que muestran mayores valores de variabilidad que los que se obtienen con otros marcadores como las aloenzimas (Solórzano *et al.*, 2014).

Las dos poblaciones de *M. rekoï* presentan un exceso de homocigotos, además sus frecuencias alélicas se encuentran en desequilibrio Hardy-Weinberg, lo cual puede ser causado por factores como la presencia de alelos nulos, por subdivisión poblacional o por endogamia (Callen *et al.*, 1993). El análisis llevado a cabo en este estudio confirma la presencia de alelos nulos, no obstante, su frecuencia es muy baja en todos los loci, por lo cual es poco probable que dichos alelos sean la causa de la alta homocigosidad encontrada (Brookfield, 1996). Así mismo, es difícil que exista una subdivisión poblacional debido a que se encontraron índices muy bajos de diferenciación genética y un flujo genético alto. Por lo tanto, dicha homogeneidad podría indicar que hay o hubo un intercambio de genes vía polen o por la dispersión de semillas entre los sitios de Mitla y Cuajimoloyas, ya que es suficiente un bajo número de individuos migrantes para mantener conectadas ambas poblaciones (Dhondt, 1996). Las dos poblaciones tienen un gran número de alelos en común, cuya frecuencia puede ser alta (0.35). Considero que este hecho refleja el efecto de homogeneidad entre las dos poblaciones de *M rekoï*.

Actualmente, no hay estudios de fenología reproductiva, así como de dispersión de semillas que aporten la información necesaria para explicar el flujo de genes entre Mitla y Cuajimoloyas, pero quizá por las características de las flores (Foto 2), podría suponerse que *M. rekoï* es polinizada por insectos tales como abejas o avispa, ya que sus flores tienen una morfología similar a la de *M. huitzilopochtli*. En esta última especie se han observado estos insectos visitando sus flores (Flores *et al.*, 2013), como también ha sido documentado en *M. gaumeri* (Giovanetti *et al.*, 2007). Tomando en consideración que los insectos pequeños, por lo regular,

restringen el movimiento de polen, podrían causar a largo tiempo una diferenciación entre las poblaciones (Hamrick *et al.*, 2002).

Con respecto al flujo génico encontrado, es indispensable hacer estudios enfocados en conocer la biología reproductiva de la especie y la dispersión de sus semillas, ya que estos aspectos ecológicos, aportarían datos de gran relevancia que podrían ayudar a explicar este aparente intercambio de genes entre las poblaciones de *M. rekoii*. La importancia del flujo de genes ha sido reconocida por la mayoría de los evolucionistas contemporáneos, como una de las principales fuerzas evolutivas en las plantas (Ellstrand, 2014).

Los resultados sugieren, que la endogamia es el factor principal que causa una alta homocigocidad en las poblaciones de *M. rekoii*. El índice de endogamia F_{IS} resultó positivo en Mitla y en Cuajimoloyas. En contraste con las especies en las que se documentaron valores positivos de endogamia, *M. rekoii* presentó el valor más alto dentro del género *Mammillaria*, aunque similar que en *M. napina*, *M. huitzilopochtli* y *M. crucígera*, pero moderadamente más alto que en *M. sphacelata* y *M. supertexta*. Omitiendo ésta última especie, cabe destacar que las cuatro especies también presentan un déficit de heterocigotos en al menos una de sus poblaciones (Cuadro 3). Eventos como estos, tienen como consecuencia apareamientos endogámicos que podrían aumentar los niveles de homocigosis en las poblaciones (Hartl y Clark, 2007; Hedrick, 2000). En tales circunstancias se ha registrado que en poco tiempo, la endogamia junto con la deriva génica, causan cambios en los patrones de la diversidad genética y en la adecuación (Ellstrand y Elam, 1993; Young *et al.*, 1996). Esto puede ocurrir porque se incrementa la expresión de alelos deletéreos, o bien, se pierden las combinaciones favorables de los heterocigotos (Wright *et al.*, 2008; Keller y Waller, 2002; Charlesworth y Charlesworth, 1999). En otras palabras, la depresión endogámica podría ser el factor más importante que a largo plazo, situó en riesgo de extinción a *M. rekoii*.

En ambas poblaciones se encontró un número alto de alelos exclusivos, en la población de Mitla se encontraron cinco, cuya frecuencia es mayor a 0.1, mientras

que en Cuajimuloyas solo se encontraron dos alelos que muestran frecuencias similares, la deriva génica puede causar este tipo de patrón fijando y eliminando ciertos alelos, sin embargo, la frecuencia más alta es de 0.18, si se compara con *M. zephyranthoides* es baja, ya que esta especie documenta valores de hasta 0.4 (López-Ortiz, 2013). El efecto de la deriva génica aunado a la endogamia que se observó en *M. rekoii* podría llevar a una pérdida de la diversidad alélicas en pocas generaciones. Sin embargo, para poder predecir con más fidelidad este proceso, es indispensable conocer el tamaño actual de las poblaciones, ya que de confirmarse que presentan pocos individuos, el efecto la deriva sería más negativo y más rápido que si las poblaciones fueran grandes (Frankham *et al.*, 2002; Young *et al.*, 1996).

Por último, al comparar las amplitudes del tamaño de los alelos entre algunas especies del género *Mammillaria*, se observó una posible homoplasia, es decir, dos alelos pueden ser iguales en secuencia pero no idénticos por descendencia (Grimaldi y Roy, 1997). Esta es una posible desventaja al usar microsatélites y podría sobreestimar los valores de la diversidad genética y del flujo génico cuando el ritmo de la mutación es alta (Estoup *et al.*, 2002; Selkoe y Toonen, 2006). Las estimaciones empíricas para detectar homoplasia en microsatélites documentan entre (1-2 %) de subestimación de la diferenciación genética (Selkoe y Toonen, 2006). Sin embargo, un estudio de homoplasia con seis microsatélites en cítricos demostró que el número de alelos microsatélites es claramente subestimado en las secuencias variantes presentes (Barkley *et al.*, 2008). Para confirmar esto, sería necesario secuenciar los alelos de microsatélite, en especial se propone utilizar el locus MamVTC8, ya que todas las especies en las que se han hecho estudios de diversidad genética, muestran que es polimórfico (Solórzano *et al.*, 2009; Tapia-Salcido, 2011; Cuevas-Alducin, 2013; López-Ortiz, 2013). Además, las amplitudes de tamaño sugieren que algunas especies del género *Mammillaria*, comparten los mismos alelos. Así mismo, estas secuencias de microsatélite podrían ser utilizadas para realizar estudios evolutivos, como genealogías y filogenias para describir un poco más, este megadiverso género de la familia Cactaceae.

CONCLUSIONES

Actualmente para *Mammillaria rekoï* no existen investigaciones de relevancia ecológica o evolutiva que aporten la información suficiente para entender de una manera más amplia el comportamiento de la especie. A pesar de ello, los resultados generados en esta tesis apoyan la existencia de una alta homocigosidad en las poblaciones, lo cual no se ajusta con la gran riqueza alélica y el flujo génico alto que se encontraron. Por lo tanto, la endogamia es el principal proceso que explica los patrones de diversidad genética observados en las poblaciones de *M. rekoï*. Esta situación podría generar problemas en la adaptabilidad de la especie en varias generaciones, colocándola en riesgo de extinción.

Es necesario realizar más estudios, incluyendo un mayor número de poblaciones, de individuos, y de loci. También se recomienda abordar de una manera más exhaustiva el estudio de aspectos demográficos, ecológicos y reproductivos, para que junto con esta tesis se genere la información necesaria que indique de una manera más general, el estado de conservación de *M. rekoï*.

La cactácea *M. rekoï* actualmente está incluida en la lista roja de la IUCN como una especie en preocupación menor, pero con los datos obtenidos se sugiere que esta especie debería ser considerada para estar en la categoría de vulnerable.

Las estrategias de conservación que en *M. rekoï* deberían fomentarse para asegurar su supervivencia son:

- Propagar esta especie en jardines botánicos para así disminuir la presión ejercida en las poblaciones naturales.
- Tener una colección en el jardín botánico de pocos individuos de esta especie y contemplar varias poblaciones, incluyendo las analizadas en esta tesis, para así tener material genético que podría ser usado en investigaciones posteriores.

LITERATURA CITADA

Allendorf, F.W. y F. Luikart. 2007. Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing. USA.

Arias, S., U. Guzmán, M.C. Mandujano, M. Soto, M. y J. Golubov. 2005. Las especies mexicanas de cactáceas en riesgo de extinción. *Cactáceasy Suculentas Mexicanas*. 50; 100-125.

Avise, J.C. 1989. A role for molecular genetics in the recognition and conservation of endangered species. *Trends in Ecology and Evolution*. 4; 279-281.

Avise, J.C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall. USA.

Ayala, F.J. 1985. Theodosius Dobzhansky 1900-1975: A Biographical Memoir. National Academy of Sciences. Washington D.C. U.S.A.

Barkley, N., R. Krueger, C. Federici y M. Roose. 2008. What phylogeny and gene genealogy analyses reveal about homoplasy in citrus microsatellite alleles. *Plants Systematics and Evolution*. 282; 71-86.

Becerra, R. 2000. Las cactáceas, plantas amenazadas por su belleza. CONABIO. *Biodiversitas*. 32; 1-5.

Bravo, H. 1978. Las cactáceas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. México.

Britton, N. y Rose, N. 1919. The Cactaceae. Descriptions and illustrations of plants of the cactus family. Carnegie Institution of Washington, USA.

Brookfield, F.Y. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency

from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*. 5; 453-455.

Brown, A. 1978. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. *Theoretical and Applied Genetics*. 52(4); 145-57.

Butterworth, C.A. 2011. Isolation and characterization of 10 polymorphic microsatellite loci in *Coryphantha robustispina* ssp. *robustispina*. *Conservation Genetics Resources*.3(2); 247-249.

Callen, D.F., A.D. Thompson, Y. Shen, H. Philips, R.I. Richards, J.C. Mulley y G.R. Sutherland. 1993. Incidence and origin of „null“ alleles in the (AC)*n*. *American Journal of Humans Genetics*. 52; 992-927.

Carvalho, G.R. 1998. Advances in molecular ecology. IOS Press New York, USA.

Charlesworth, B. y D. Charlesworth. 1999. The genetic basis of inbreeding depression. *Genetical Research*. 74; 329-340.

CITES. 2011. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora Appendices I, II and III. <<http://cites.org/>> Consulta 15 de enero del 2016.

Cruzan, M.B. 2001. Population size and fragmentation thresholds for the maintenance of genetic diversity in the herbaceous endemic *Scutellaria montana* (Lamiaceae). *Evolution*. 55;1569-1580.

Cuevas-Alducin, D.P. 2013. Análisis de la diversidad y la estructura genética poblacional de *Mammillaria supertexta* Mart. Ex Pfeiff (Cactaceae) especie endémica del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.

Dave's Garden. <http://davesgarden.com/guides>

Dhondt, A. 1996. Molecular techniques in conservation and evolutionary biology: a quantum leap? *Trends in Ecology and Evolution*. 11; 147-148.

DOF. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-ECOL-059-SEMARNAT -2001. Protección ambiental-especies nativas de México flora y fauna silvestres. *Diario Oficial de la Federación*. D.F. México.

Ellstrand, N.C. 2014. Is gene flow the most important evolutionary force in plants?. *American Journal of Botany*. 101(5); 737-753.

Ellstrand, N.C. y D.R. Elam. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 24; 217-242.

Estoup, A., P. Jarne y J. Cornuet. 2002. Homoplasmy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*. 11; 1591-1604.

Excoffier, L., G. Laval y S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 1; 47-50.

Feria, O.M. y A. Nieto. 2003. Genética de poblaciones una perspectiva histórica. 2003. *Ciencias*. 71; 33-42.

Flores, M.A., G.I. Manzanero, J. Golubov y M.C. Mandujano. 2013. Biología floral de *Mammillaria huitzilopochtli*, una especie rara que habita acantilados. *Botanical Sciences*. 91; 349-356.

Futuyma, D.J. 2003. *Evolutionary biology*. Sinauer Associates inc. Sunderland Massachusetts. USA.

Frankham, R.J., D. Ballou y D.A. Briscoe. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge, England The University of Cambridge Press. Inglaterra.

Gabrielsen, T.M. y C. Brochmann. 1998. Sex after all: high levels of diversity detected in the asexual plant *Saxifraga cernua* using RAPD markers. *Molecular Ecology*. 7; 1701-1708.

Giovanetti, G., J.C. Cervera y J.L. Andrade. 2007. Pollinators of an endemic and endangered species, *Mammillaria gaumeri* (Cactaceae), in its natural habitat (Coastal Dune) and in a Botanical Garden. *Madroño*. 54 (4); 286-292.

Grimaldi, M.C. y B.C. Roy. 1997. Microsatellite allelic homoplasy due to variable flanking sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 44; 336-340.

Guzmán, U., S. Arias y P. Dávila. 2003. Catálogo de cactáceas mexicanas. Universidad Nacional Autónoma de México. CONABIO. México.

Haig, M.S. 1998. Molecular contributions to conservation. *Ecology*. 79(2); 413-425.

Hamilton, M.B. 2009. Population genetics. Wiley-Blackwell. Malasia.

Hamrick, J.L., J.D. Nason, T.H. Fleming, y J.M. Nassar. 2002. Genetic diversity in columnar cacti. In: Columnar Cacti and Their Mutualists: Evolution, Ecology and Conservation. (eds. Fleming TH, Valiente-Banuet A). University of Arizona Press. Tucson USA. 122-133pp.

Hardesty, B.D., S.L. Hughes, V.M. Rodríguez y J.A. Hawkins. 2008. Characterization of microsatellite loci for the endangered cactus *Echinocactus grusonii*, and the cross-species utilization. *Molecular Ecology Resources*. 8; 164-167.

Hartl, D.L. y A.G. Clark. 2007. Principles of population genetics. Fourth edition.

Sinauer Associates. USA.

Hedrick, P.W. 2000. Genetic of populations. Second edition. Jones and Bartlett. USA.

Hernández, H. y H. Godínez. 1994. Contribución al conocimiento de las cactáceas mexicanas amenazadas. *Acta Botánica Mexicana*. 26; 33-52.

Hughes, S.L., V.M. Rodriguez, B.D. Hardesty, R.T. Bárcenas, H.M. Hernández, R.,M. Robson y J.A. Hawkins. 2008. Characterization of microsatellite loci for the critically endangered cactus *Ariocarpus bravoanus*. *Molecular Ecology Resources*. 8; 1068-1070.

IUCN. 2016. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016.3.<www.iucnredlist.org>. Consultado el 3 enero del 2016.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2013. <www.inegi.org.mx>

Jiménez, C. 2000. Las cactáceas mexicanas y los riesgos que enfrentan. *Revista Digital Universitaria*. 12; (1). Disponible en:
<http://www.revista.unam.mx/vol.12/num1/art04/index.html>

Kimura, M. 1983. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press. Inglaterra.

Keller, L.F. y D.M. Waller. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution*. 17; 230-241.

León, J. y Valiente-Banuet, A. 1994. Las Cactáceas. *Ciencia y Desarrollo*. 117; 58-65.

López-Ortiz, N.M. 2013. Diversidad y estructura genética poblacional de *Mammillaria zephyranthoides* (Cactaceae): una especie endémica de México. Tesis de

Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.

López-Ortiz, N., P. Salas-González, P. Dávila y S. Solórzano. 2013. Diversidad y estructura genética poblacional de *Mammillaria zephyranthoides* Scheidwer, 1841 (Cactaceae) una especie endémica de México. XIX Congreso Mexicano de Botánica. Tuxtla Gutiérrez, Octubre, 2013. Chiapas, México.

Loveless, M.D. y J.M. Hamrick. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 15; 65-95.

Mutke, J, y W. Barthlott. 2005. Patterns of vascular plant diversity at continental to global scales. *Biologische Skrifter*. 55; 521-531.

Oosterhout, C.V., W.F. Hutchinson, P. Derek, M. Wills y P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 4; 435-438.

Persson, H.A. y B.A. Gustavsson. 2001. The extent of clonality and genetic diversity in lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) revealed by RAPDs and leaf-shape analysis. *Molecular Ecology Resources*. 10; 1385-1397.

Pilbeam, J. 1999. *Mammillaria*, the cactus file handbook. Cirio Publish Services Ltd. Inglaterra.

Primmer, C.R. 2009. From conservation genetics to conservation genomics. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1162; 357-368.

Provine, W.B. 1971. The origins of theoretical population genetics. University of Chicago Press. USA.

Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Limusa. México.

Reyes, S. y I.C. Christian. 2009. *Echeveria zorzaniana*, una nueva especie de la familia Crassulaceae para el estado de Oaxaca, México. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. 54; 90-96.

Reyes, S., I.C. Brachet, J.C. Pérez, y R.A. Gutiérrez. 2004. Cactáceas y otras plantas nativas de la Cañada, Cuicatlán, Oaxaca, México. Sociedad Mexicana de cactología A.C., Comisión Federal de Electricidad e Instituto de Biología UNAM. México.

Sánchez-Salas, J., G. Muro, E. Estrada–Castillón y J.A. Alba-Ávila. 2013. El MER: un instrumento para evaluar el riesgo de Extinción de especies en México. *Revista Chapingo, Serie Zonas Áridas*. Disponible en: [http:// www.chapingo.mx/revistas](http://www.chapingo.mx/revistas)

Selkoe, K.A. y R.J. Toonen. 2006. Microsatellite for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*. 9; 615-629.

Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based of microsatellite allele frequencies. *Genetics*.139; 457-462.

Solórzano, S. 2008. Evaluación del estatus genético y ecológico de algunas cactáceas endémicas del valle de Tehuacán-Cuicatlán. Informe final PAPIIT-DGAPA, UNAM (IN217208).

Solórzano, S. y P. Dávila. 2015. Identification of conservation units of *Mammillaria crucigera* (Cactaceae): perspectives for the conservation of rare species. *Plant Ecology & Diversity*. 8(4); 559-569.

Solórzano, S., A.C. Cortes-Palomec, A. Ibarra, P. Dávila and K. Oyama. 2009. Isolation, characterization and cross-amplification of polymorphic microsatellite loci in the threatened endemic *Mammillaria crucigera* (Cactaceae). *Molecular Ecology Resources*. 9; 156-158.

Solórzano, S., P.D. Cuevas-Alducin, V. García-Gómez y P. Dávila. 2014. Genetic diversity and conservation of *Mammillaria huitzilopochtli* and *M. supertexta*, two threatened species endemic of the semiarid region of central Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85; 565-575.

Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Tree*. 15 (5); 199-203.

Tagu, D. y C. Moussard. 2003. Fundamentos de las técnicas de biología molecular. Acribia. Zaragoza, España.

Tapia-Salcido, H. 2011. Análisis de la diversidad y la estructura genética poblacional de dos especies del género *Mammillaria*, endémicas del Valle de Tehuacán-Cuicatlan. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México.

Terry, M.K., A.E. Pepper, A.W. Strong, D.M. Tarin, D.M. Price y J.M. Manhart. 2012. Genetic structure of a population of the endangered star cactus (*Astrophytum asterias*) in southern Texas. *The Southwestern Naturalist*. 57(2); 182–188.

Volvides, A.P., V. Luna y G. Medina. 1997. Relación de algunas plantas y hongos mexicanos raros, amenazados o en peligro de extinción y sugerencias para su conservación. *Acta Botánica Mexicana*. 39; 1-42.

Wright, L.I., T. Tregenza y D.J. Hosken. 2008. Inbreeding, inbreeding depression and extinction. *Conservation Genetics*. 9; 833-843.

Wilhelm, B., K. Burstedde, K. Nadja y J. Mutke. 2010. Biodiversidad y distribución de cactáceas. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas*. 7(1); 6-8.

Young, A., T. Boyle y T. Brown. 1996. The population genetic consequences of

habitat fragmentation for plants. *Tree*. 11; 413-418.

Zavala-Hurtado, A. 1997. *Suculentas mexicanas/Cactáceas*. Edit. UNAM. CONABIO. CVS Publicaciones. México.