



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL OAXACA

PATRONES Y PROCESOS DE LA BIODIVERSIDAD DEL NEOTRÓPICO

“ESTRUCTURA Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Malacomeles denticulata*
ASOCIADA A DIFERENTES TIPOS DE VEGETACIÓN DE OAXACA,
MÉXICO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE
RECURSOS NATURALES

PRESENTA

YESENIA PACHECO HERNÁNDEZ

DIRECTORES:

M. EN C. SONIA TRUJILLO ARGUETA

DR. RAFAEL FELIPE DEL CASTILLO SÁNCHEZ

Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. Junio del 2015.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 12:00 horas del día 22 del mes de Junio del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA) para examinar la tesis titulada:
“Estructura y diversidad genética de *Malacomeles denticulata* asociada a diferentes tipos de vegetación de Oaxaca, México”

Presentada por la alumna:

Pacheco
Apellido paterno

Hernández
Apellido materno

Yesenia
Nombre(s)

Con registro:

B	1	3	0	0	0	5
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de: **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.


LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


M. en C. Sonia Trujillo Argueta


Dr. Rafael Felipe del Castillo Sánchez


Dr. Aniceto Rodolfo Solano Gómez


Dra. Demetria Martha Mondragón Chaparro


Dr. Marko Aurelio Gómez Hernández

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES





Dr. José Rodolfo Martínez y Cárdenas

CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACION PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
I.P.N.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez, el día 22 del mes Junio del año 2015, el (la) que suscribe **Yesenia Pacheco Hernández**, alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro **B130005**, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la M. en C. Sonia Trujillo Argueta y el Dr. Rafael Felipe del Castillo Sánchez y cede los derechos del trabajo titulado: **“Estructura y diversidad genética de *Malacomeles denticulata* asociada a diferentes tipos de vegetación de Oaxaca, México”**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: posgradoax@ipn.mx ó yesenia_pacheco_hernandez@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

YESENIA PACHECO HDEZ

Yesenia Pacheco Hernández



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACION PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
I.P.N.

CONTENIDO

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIA	IV
CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA	1
INTRODUCCIÓN	2
1.2 <i>Malacomeles denticulata</i> (H.B.K.) Koch.....	2
1.2.1 <i>Descripción botánica</i>	2
1.2.2 <i>Sistemas de cruzamiento</i>	2
1.2.3 <i>Distribución de la especie</i>	3
1.2.4 <i>Usos actuales</i>	4
1.2.5 <i>Estudios genéticos recientes</i>	4
1.3 Genes en poblaciones: Modelo de Hardy-Weinberg (H-W).....	5
1.4 Fuerzas evolutivas	6
1.5 Factores ambientales	8
1.6 Características de la historia de vida	8
1.7 Estructura genética	9
1.7.1 <i>Diversidad genética</i>	10
1.8 Marcadores moleculares basados en ácidos nucleicos	10
1.8.1 <i>Polimorfismos de un nucleótido simple (SNP)</i>	11
1.9 PCR en Tiempo Real (PCR-TR)	12
LITERATURA CITADA	14
CAPÍTULO II. ESTRUCTURA Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE <i>Malacomeles denticulata</i> ASOCIADA A DIFERENTES TIPOS DE VEGETACIÓN DE OAXACA, MÉXICO	20
INTRODUCCIÓN	21
MATERIALES Y MÉTODOS	24
2.2.1 <i>Descripción general del área de estudio</i>	24

2.2.2	<i>Estimación de la densidad en las poblaciones de M. denticulata</i>	26
2.2.3	<i>Recolección del material vegetal</i>	26
2.2.4	<i>Diseño de oligonucleótidos y sondas para SNP</i>	27
2.2.5	<i>Aislamiento de ADN</i>	27
2.2.6	<i>Amplificación de SNP en PCR en Tiempo Real</i>	27
2.2.7	<i>Análisis genéticos</i>	27
2.2.7.1	<i>Estimación de la diversidad genética</i>	27
2.2.7.2	<i>Estructura genética de las poblaciones</i>	28
2.2.7.3	<i>Correlación de la distancia geográfica y los factores ambientales con la diversidad genética</i>	30
RESULTADOS	31
2.3.1	<i>Densidad de las poblaciones de M. denticulata</i>	31
2.3.2	<i>Proporción de loci polimórficos, número de alelos y número efectivo de alelos, índice de Shannon, frecuencias genotípicas y alélicas</i>	31
2.3.3	<i>Heterocigosidad observada y esperada en equilibrio H-W</i>	33
2.3.4	<i>Desequilibrio de ligamiento (DL)</i>	33
2.3.5	<i>Distancia genética entre poblaciones</i>	34
2.3.6	<i>Agrupamiento por pares usando la media aritmética (UPGMA)</i>	34
2.3.7	<i>Índices de endogamia y estructura genética</i>	35
2.3.8	<i>Correlación de la distancia geográfica y los factores ambientales con la diversidad genética</i>	37
DISCUSIÓN	38
3.1	<i>Diversidad genética</i>	38
3.2	<i>Diferenciación genética de poblaciones y su relación con factores ambientales</i>	38
3.3	<i>Estructura genética de poblaciones</i>	40
3.4	<i>Implicaciones en restauración</i>	42
CONCLUSIONES	45
RECOMENDACIONES	46
LITERATURA CITADA	47
ANEXOS	54

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** *Malacomeles denticulata* (H.B.K.) Koch. A. rama con hojas e inflorescencias; B. flor en vista externa; C. flor desprovista de pétalos; D. pétalo; E. ramilla con frutos (Tomado de Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2005).....3
- Figura 2.** Ensayo TaqMan®. El ensayo utiliza dos sondas alelo-específicas que llevan diferente reportero (R) y extintor (Q) en cada extremo con una falta de coincidencia en el sitio de SNP. La sonda coincidente libera su reportero durante la amplificación por PCR de la región que contiene el SNP y la fluorescencia resultante indica el genotipo del SNP. (Tomado de Kim y Misra, 2007). ... 13
- Figura 3.** Mapa de localización de las siete poblaciones de *M. denticulata*.24
- Figura 4.** Fenograma basado en las distancias genéticas por pares usando UPGMA.....35
- Figura 5.** Poblaciones sugeridas basadas en el valor máximo de Delta K, con el uso del programa Structure Harvester (Earl y von Holdt, 2012).37

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Datos climatológicos, tipo de vegetación de las poblaciones de <i>M. denticulata</i>	26
Cuadro 2. Criterios de clasificación para el análisis molecular de varianza.	29
Cuadro 3. Densidad de <i>M. denticulata</i> en los sitios de estudio.	31
Cuadro 4. Lista de SNP que amplificaron en <i>M. denticulata</i>	32
Cuadro 5. Porcentaje de loci polimórficos, número de alelos y número efectivo de alelos, índice de Shannon, frecuencias genotípicas y alélicas por población.	33
Cuadro 6. Estimaciones de heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) en equilibrio H-W por loci polimórficos y por poblaciones.	33
Cuadro 7. Prueba de desequilibrio de ligamiento (DL) entre pares de loci polimórficos.	34
Cuadro 8. Comparación de las distancias genéticas (F_{ST}) por pares de poblaciones para los tres loci polimórficos.	34
Cuadro 9. Valores del estimador G_{ST} y los estadísticos de F de Wright: F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} por cada locus polimórfico con un intervalo de confianza del 95% por re-muestreo (bootstrapping).	35
Cuadro 10. Análisis molecular de varianza aplicado con diferentes criterios de agrupación en las siete poblaciones de <i>M. denticulata</i>	36
Cuadro 11. Valores del coeficiente de determinación (R^2) en la prueba de Mantel para las variables ambientales.	37

RESUMEN

Actualmente, se han propuesto especies capaces de crecer en ambientes con condiciones edáfico-climáticas extremas, para recuperar ecosistemas degradados. *Malacomeles denticulata* es un arbusto de la familia Rosaceae, que crece en una gran variedad de hábitats, incluyendo ambientes severamente degradados y erosionados. A este respecto, se desconoce la relación de su diversidad genética con los factores ambientales. Por consiguiente, el objetivo de este trabajo fue estimar los patrones de variación y estructura genética en siete poblaciones de *M. denticulata* de ambientes contrastantes localizadas en Oaxaca, México. La diversidad y estructura genética se estimó con base en experimentos de genotipificación con la técnica polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), en PCR Tiempo Real. Los estimadores del coeficiente de endogamia sobre los tres loci analizados fueron: $F_{IS} = -0.510$, $F_{ST} = 0.337$ y $F_{IT} = -0.001$. Dos factores parecen estar afectando la estructura genética de las poblaciones de *M. denticulata*. Primero, una fuerte depresión endogámica asociada con un efectivo sistema de autoincompatibilidad que produce un exceso de heterocigotos con respecto a las expectativas de Hardy Weinberg a nivel intrapoblacional. Segundo, una diferenciación genética entre poblaciones con distintos niveles de precipitación, evidenciados por una correlación significativa ($R^2 = 38.26\%$ $P = 0.0378$) entre la precipitación y la distancia genética. Además, el análisis de UPGMA, AMOVA y STRUCTURE, sugieren la presencia de dos grupos genéticos asociados significativamente con la precipitación. Esto revela que la disponibilidad del agua afecta las características genéticas de esta especie. La adaptación de *M. denticulata* a distintos ambientes, se debe a su polimorfismo y no a un proceso de plasticidad fenotípica. Por lo tanto, para proyectos de restauración se recomienda utilizar individuos con alta diversidad genética para disminuir los riesgos de baja producción de semilla por autoincompatibilidad o por depresión endogámica. Así mismo, se sugiere que el origen de la semilla y el sitio a restaurar compartan precipitaciones similares.

Palabras clave: *Malacomeles denticulata*, diversidad genética, precipitación, restauración.

ABSTRACT

Nowadays, plant species capable to grow in extreme edaphic and climatic environments are an alternative to recover degraded ecosystems. *Malacomeles denticulata* is a perennial shrub that belongs to the Rosaceae family, which is associated to several habitats, including those severely degraded and eroded. In this regard, the relationship between their genetic diversity and environmental factors is unknown. Therefore, the aim of this study was to estimate patterns of variation and genetic structure in seven populations from contrasting environments of *M. denticulata* located in Oaxaca, Mexico. The diversity and the genetic structure were estimated by the molecular technique of single nucleotide polymorphism (SNP), with the use of Real Time PCR. The estimators of the inbreeding coefficient on the three loci analyzed were: $F_{IS} = -0.510$, F_{IT} and $F_{ST} = 0.337 = -0.001$. Two factors seem to be affecting the genetic structure of populations the *M.denticulata*. First, a strong inbreeding depression associated with an effective self-incompatibility system that produces an excess of heterozygotes with respect to the expectations of Hardy Weinberg intrapopulation level. Second, a genetic differentiation between populations with different levels of precipitation, supported by a significant correlation ($R^2=38.26\%$ $P=0.0378$) between precipitation and genetic distance. Furthermore, analysis of UPGMA, AMOVA and STRUCTURE, suggest the presence of two genetic groups significantly associated with precipitation. This indicates that the availability of water affects the genetic characteristics of this species. *M. denticulata* adaptation to different environments, is due to its polymorphism and not a phenotypic plasticity process. Therefore, for restoration projects it is recommended individuals with high genetic diversity to reduce the risks of low seed production by self-incompatibility or inbreeding depression. Also, it is suggested that the origin of the seed and the restoration site share similar precipitation.

Keywords: *Malacomeles denticulata*, genetic diversity, precipitation, restoration.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo económico brindado mediante la Beca de Estimulo Institucional de Formación de Investigadores (BEIFI-IPN), a través del financiamiento de los proyectos: Patrones genéticos de una rosácea nativa del estado de Oaxaca, que habita en lugares altamente perturbados. Clave SIP: 20140825 y Estudios de ecosistemas naturales y sus componentes ante cambios ambientales antrópicos. Clave SIP: 20140709.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico recibido a través de la beca 298201, para la realización de mis estudios de Maestría.

A la M. en C. Sonia Trujillo Argueta, mi especial reconocimiento por ser una gran persona, además por su invaluable apoyo dentro del laboratorio, y por cada una de sus sugerencias para mejorar este proyecto.

Al Dr. Rafael Felipe del Castillo Sánchez, mi más sincero agradecimiento por todo su apoyo, su guía, por compartirme sus conocimientos y por sus valiosas contribuciones para mejorar este trabajo.

Al Biólogo Raúl Rivera García, por su ayuda en campo y en la elaboración de los mapas de muestreo de densidad.

A los miembros del comité tutorial y de la comisión revisora: M. en C. Sonia Trujillo Argueta, Dr. Rafael Felipe del Castillo Sánchez, Dra. Demetria Martha Mondragón Chaparro, Dr. Aniceto Rodolfo Solano Gómez y Dr. Marko Aurelio Gómez Hernández, por el apoyo y orientación académica brindada, por sus acertadas recomendaciones y buena disposición en todo momento para mejorar este proyecto.

A mi compañero de vida Nemesio, por tu amor, apoyo y paciencia durante estos años y por estar a mi lado siempre.

A María de los Ángeles y Gerardo por su amistad sincera y a mis compañeros Rut, Fernando, Pavel, Beatriz, Taís, Dagoberto y Carlos, fue un honor coincidir en esta etapa de mi vida con ustedes.

DEDICATORIA

A mis padres Guadalupe Hernández Gámez y Miguel Ángel Pacheco Barreras por su amor, apoyo y consejos en todo momento a pesar de la distancia, son el pilar de mi vida.

En memoria de mi hermano Humberto (†), mi cuñada María de la Paz (†) y a mi abuelo Armando (†), a quienes eternamente recordare con mucho amor y cariño.

A mis hermanos Humberto, Rosalva, Adriana, Miguel Ángel y Gerardo gracias por su apoyo y cariño, siempre los tengo presente.

A mis sobrinos Adrián, Humberto, Yessica, Yaneth, Diana, Gerardo, Miguel Ángel, Rene, María y Daniel, por ser una parte fundamental de mi familia.

Yesenia Pacheco Hernández.



Fotografía de Rafael Felipe del Castillo Sánchez.

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo se hace una revisión de la descripción botánica, distribución y estudios genéticos recientes de *Malacomeles denticulata*. También se hace una investigación de los aspectos teóricos ligados con la estructura genética de poblaciones, los factores genéticos y ambientales que influyen en esta estructura, la diversidad genética y las técnicas utilizadas para estimar la variación genética. De igual forma se abordan las bases científicas del método de genotipificación de SNP usando PCR en Tiempo Real.

1.2 *Malacomeles denticulata* (H.B.K.) Koch

Es un arbusto que pertenece a la subtribu Pyrinae de la familia Rosaceae (Campbell *et al.*, 1995; Campbell *et al.*, 2007; Turner, 2011). Es una especie que prospera en una gran variedad de ambientes, tanto conservados como perturbados. En México se conoce localmente con varios nombres en español: membrillo cimarrón, duraznillo, membrillo silvestre, duraznillo, madronillo, membrillo, membrillo silvestre, acebuche, granjenillo, manzanita o mimbre. También tiene nombres en algunas lenguas indígenas del país: tlaxisqui, tlaxistle, tomistlacatli, tlaxioqui, clasisle, tlachistle (Cruz, 2005; Hernández *et al.*, 2011).

1.2.1 Descripción botánica

Arbustos de 1-3 m de alto; tallos ramificados de color grisáceo a pardo. Hojas de 0.5-2.5 cm de largo y 0.3-1.5 cm de ancho, elípticas, obovadas u orbiculares, truncadas a redondeada en el ápice, mucronadas, enteras o denticuladas en el borde, cuneadas, redondeadas o truncadas en la base, glabras en el haz, blanco-tomentosas en el envés, carinadas a lo largo de la nervadura media, con un peciolo de 2-4 cm de largo. Flores umbeliformes, dispuestas en un corimbo apretado; el hipantio de 3-5 mm de largo, densamente tomentoso y blanco; lóbulos del cáliz de 1.5-2 mm de largo, anchamente deltoides, reflejos y glabros en el haz; pétalos blancos, glabros, suborbiculares a reniformes de 4 mm de largo. Fruto rojo, elipsoide o subgloboso, de 1 cm de largo, más o menos tomentoso (Figura 1) (Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2005).

1.2.2 Sistemas de cruzamiento

Malacomeles denticulata es una planta de polinización abierta visitada por abejas por lo que se supone que el sistema reproductivo es esencialmente exogámico, aunque presenta propagación vegetativa (Cruz, 2005). En este género la producción de semillas puede ser de manera sexual, mediante la fecundación, pero también de manera asexual a través de apomixis (Campbell y Wright, 1996), es decir, sin meiosis ni fecundación (Quero *et al.*, 2010; Ramírez, 2009).

Existe una fuerte asociación entre la apomixis y la poliploidía debido a que la apomixis permite a las plantas poliploides mantener la producción de semilla viable, proporcionando una

estrategia de escape a la esterilidad (Quero *et al.*, 2010). La recombinación de individuos apomícticos altamente heterocigotos puede producir una amplia variabilidad genotípica y fenotípica (Cruz, 2005). La poliploidía ha sido reportada en aproximadamente el 88% de las especies de la subfamilia Pyrinae a la que pertenece *M. denticulata* (Campbell y Wright, 1996). Este origen se presume surgió a través de aneuploidía, con reducción del número cromosómico haploide, de 18 a 17 (Dickinson *et al.*, 2007; Evans y Campbell, 2002; Vamosi y Dickinson, 2006).

Respecto a sus dispersores no se tiene una evidencia concreta. Es posible que sus semillas sean dispersadas por aves, dadas las características del fruto, ya que pueden ser atraídas cuando éste madura (Cruz, 2005).

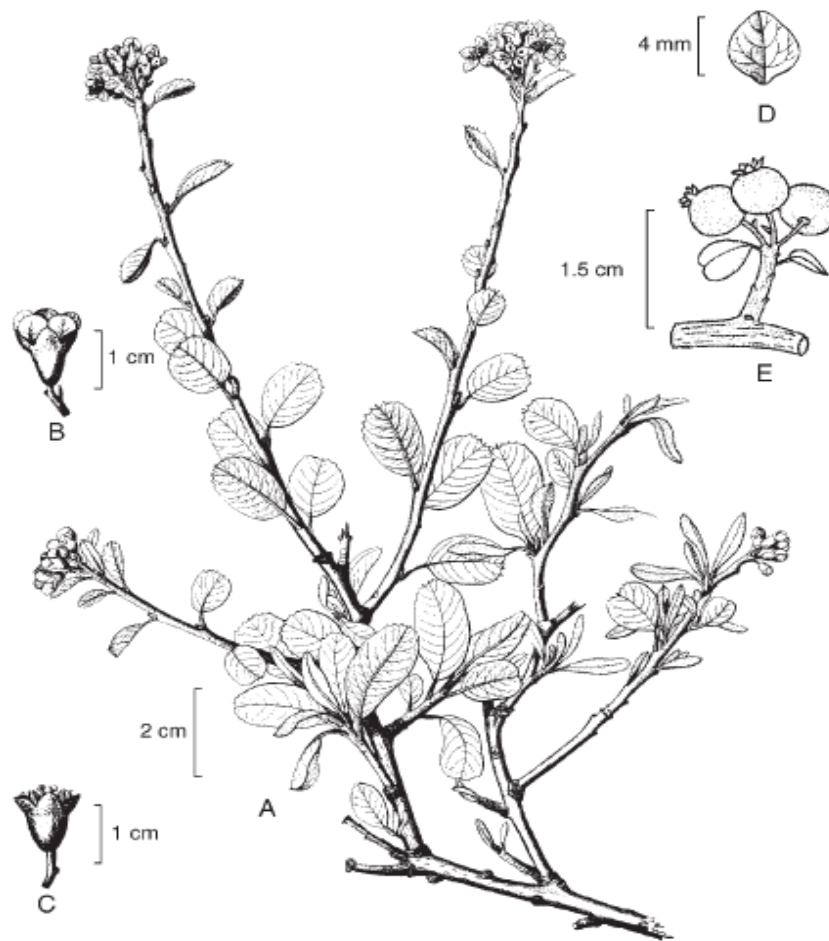


Figura 1. *Malacomeles denticulata* (H.B.K.) Koch. A. rama con hojas e inflorescencias; B. flor en vista externa; C. flor desprovista de pétalos; D. pétalo; E. ramilla con frutos (Tomado de Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2005).

1.2.3 Distribución de la especie

Malacomeles denticulata es considerada una especie nativa de México, se distribuye desde el sur de Texas, en Estados Unidos, hasta Honduras (Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2005). En México se encuentra en las provincias biogeográficas del Eje Volcánico Trans-Mexicano,

Altiplano Mexicano, Sierra Madre Oriental, Sierra Madre del Sur y Sierra Madre Occidental. Sus poblaciones se localizan en elevaciones de 2350 a 3000 m. En Oaxaca, las poblaciones de la especie se encuentra en las regiones Norte, Valles Centrales y Mixteca (Cruz, 2005; Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2005).

1.2.4 Usos actuales

Malacomeles denticulata es ampliamente utilizada en el país como planta forrajera especialmente para cabras. Representa una fuente de alimento en la región de El Bajío, ya que sus frutos son consumidos en fresco e incluso se cosechan para producir mermelada y preservarlo durante todo el año (Núñez y Hernández, 2011). Se le reconocen algunos usos medicinales para tratar padecimientos como la mordedura de víbora, en cuyo caso se administran vía oral infusiones de la planta (Pérez *et al.*, 2003).

Se emplea en construcciones ya que las ramas se utilizan como apoyo para los techos de casas. También se usa en la elaboración de herramientas como escobas y manija de utensilios como cuchillos y martillos, entre otras (Cruz, 2005; Núñez y Hernández, 2011; Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2005).

Este arbusto contribuye al enriquecimiento de la cobertura vegetal en estratos de vegetación con arbolado disperso, ya que puede convivir con especies existentes o crecer bajo laderas de terrenos marginales (Blanco y Martínez, 2001). También ha sido considerada como una especie que puede ser implementada en los procesos de restauración y recuperación de zonas degradadas, debido a que crece de manera natural en amplias regiones geográficas del país y soporta características ambientales adversas (Cruz, 2005; Hernández *et al.*, 2011).

1.2.5 Estudios genéticos recientes

Actualmente se han realizado diversos estudios para determinar diversidad genética en poblaciones de *M. denticulata*, tal como lo hizo Ramírez (2009), quien realizó un estudio de genética cuantitativa con algunos rasgos morfométricos de las hojas como el área foliar, dentición de la hoja y tasa relativa de crecimiento (TRC) en poblaciones de Oaxaca. El autor encontró que dos poblaciones (Huitzo y Yanhuitlan) mostraron mayor variabilidad genética y valores más altos de heredabilidad para los tres caracteres, lo cual sugiere la existencia de variabilidad entre poblaciones.

Hernández *et al.* (2011) analizaron la variabilidad morfológica de semillas de *M. denticulata* en seis poblaciones de Guanajuato, encontrando un alto grado de variabilidad intrapoblacional (el índice de varianza interna fue de 0.2659 a 0.8196). Las localidades de las especies estudiadas se encontraban en ambientes que presentaban diferentes condiciones climáticas, por lo que los autores

suponen que la variación observada en algunos rasgos morfológicos tiene una base genética que favorece la adaptación y la diferenciación genética entre las poblaciones.

Bautista (2012) comparó con aloenzimas la diversidad genética de algunas poblaciones de *M. denticulata* de Oaxaca. Encontró que entre las poblaciones hay un alto grado de variabilidad genética y que aquellas crecidas en cárcavas tienen valores de heterocigosidad promedio observada más altos con respecto a las poblaciones de Teotlán del Valle, Villa de Díaz Ordaz, San Pablo Huitzo y Santo Domingo Yanhuatlán.

Torres *et al.* (2013) utilizaron microsatélites (SSR) para estudiar la variabilidad genética de *M. denticulata* en nueve poblaciones de Guanajuato y Querétaro, con el interés de identificar individuos con potencial hortícola. En este trabajo se encontró que 17 de los 23 SSR ensayados fueron transferibles (amplificaron en *M. denticulata*), fueron polimórficos y presentaron 17 alelos raros (frecuencia ≤ 0.1). La transferibilidad de los loci SSR de *M. denticulata* fue alta (74%), aunque fue menor que la reportada en especies relacionadas del género *Malacomeles* (81%). La mayor parte de la variabilidad genética encontrada en este estudio fue intrapoblacional (72 %); solo el 28 % fue interpoblacional y, por otro lado, permitió identificar tres grupos genéticamente diferenciados. Los autores sugieren la posibilidad de usar esta especie como una alternativa de cultivo en áreas semiáridas de México.

Hasta ahora, todos los estudios realizados indican que las poblaciones de *M. denticulata* estudiadas presentan variabilidad genética dentro y entre las poblaciones, pero solo el estudio realizado por Torres *et al.*, (2013) describe la magnitud de esa variación.

1.3 Genes en poblaciones: Modelo de Hardy-Weinberg (H-W)

El objetivo básico de la genética de poblaciones es caracterizar los reservorios génicos, los cambios en su composición a lo largo del tiempo y del espacio geográfico de las poblaciones, así como investigar los procesos que explican estos cambios evolutivos. Las características del reservorio genético pueden describirse mediante parámetros estadísticos que indican la frecuencia en que se encuentran representados los alelos y sus combinaciones genotípicas. Dado que la evolución es un proceso que se desarrolla en el tiempo, es necesario generar modelos que permitan interpretar cómo se comporta la variabilidad de una población a lo largo de las generaciones (Curtis *et al.*, 2008).

Uno de los modelos fundamentales de la genética de poblaciones es el modelo de Hardy y Weinberg, quienes de manera independiente demostraron que las combinaciones resultantes del proceso de apareamiento y reproducción que ocurre en cada generación en los organismos diploides, no involucra un cambio en la composición general del reservorio genético de una

población. Por lo que propusieron un modelo teórico que permite examinar el comportamiento de los alelos en una población ideal la cual se rige por cinco condiciones:

No ocurren mutaciones.

No hay desplazamiento neto de individuos con sus genes desde otras poblaciones (inmigración) o hacia otras poblaciones (migración).

La población es lo suficientemente grande como para que se apliquen las leyes de probabilidad o sea es altamente improbable que el azar, por sí mismo, pueda alterar la frecuencia de los alelos (sin deriva génica).

El apareamiento entre individuos es al azar (panmixia).

No hay diferencia en el éxito reproductivo de los genotipos considerados, es decir que el llevar diferentes combinaciones de alelos no confiere ventaja a sus portadores.

Bajo los supuestos de este modelo teórico y si las proporciones de descendencia de cada cruzamiento se comportan conforme a las predicciones de las leyes de Mendel, es posible calcular las frecuencias genotípicas en la siguiente generación de acuerdo con el siguiente modelo:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Dónde: p(A) y q(a) son las frecuencias de los alelos en una población

p^2 = frecuencia genotípica de individuos homocigóticos para un alelo (AA=D)

$2pq$ = frecuencia genotípica de individuos heterocigóticos (Aa=H)

q^2 = frecuencia genotípica de individuos homocigóticos para otro alelo (aa=R)

El modelo de equilibrio Hardy-Weinberg se aplica igualmente a situaciones en las que hay alelos múltiples del mismo gen. Este teorema ha demostrado ser un fundamento tan valioso en la genética de poblaciones como los principios de Mendel lo han sido en la genética clásica (Curtis *et al.*, 2008). En general, este teorema ha sido la base para elaborar modelos más complejos donde algunos de los supuestos de ese teorema se eliminan. Por otro lado, también sirve como referencia neutra para analizar a las poblaciones naturales y domesticadas.

1.4 Fuerzas evolutivas

Los agentes evolutivos son los procesos naturales que cambian las frecuencias alélicas (o génicas) de las poblaciones. Estos factores de evolución son: la mutación, la deriva génica, flujo génico resultante de la migración y la selección natural. Es importante mencionar que existen otros procesos como la endogamia que aunque no es considerada una fuerza evolutiva, se ha comprobado que influye de manera importante en las características genéticas de las poblaciones (Eguiarte, 2009).

La mutación es un cambio repentino al azar en el material genético (ADN), es una fuerza evolutiva débil debido a que es poco efectiva como factor de cambio en las frecuencias génicas. Sin

embargo, es importante porque es la única fuerza evolutiva que genera variación genética. Muchas de estas variantes suelen ser eliminadas, pero, ocasionalmente, algunas de estas pueden tener éxito e incorporarse en todos los individuos de la especie. No obstante, es considerada la última fuente de variación genética debido a que se produce a un ritmo muy lento de forma natural, pero es el material sobre el cual se lleva a cabo la evolución molecular (Barbadilla, 2009; Curtis *et al.*, 2008; Eguiarte, 2009).

La deriva génica desempeña un papel fundamental en la evolución de poblaciones y resulta del muestreo aleatorio de gametos. Debido a que en cada generación se produce un sorteo de genes durante la transmisión de gametos de los padres a los hijos. En cuanto más pequeñas sean las poblaciones más significativa será el efecto de la deriva génica, ya que se pierde la diversidad genética y aumenta la homocigosis. Es decir, las poblaciones pequeñas son más susceptibles a extinguirse debido a la baja diversidad genética y a la alta vulnerabilidad a la deriva génica (Barbadilla, 2009; Eguiarte, 2009; Frankel, 1970).

El flujo génico se define como el movimiento de los genes de una población a otra y se presenta cuando individuos o gametos de una población se trasladan a otras poblaciones, fenómeno conocido como migración. La dispersión de genes es favorecida por la migración y con ello la recombinación a lo largo de una distribución de una especie. Por lo que el flujo génico depende de dos aspectos fundamentales 1) la tasa de migración es decir los individuos que llegan a una población nueva y 2) la frecuencia alélica de estos individuos migrantes (Klug *et al.*, 2006; Slatkin, 1985). El flujo genético es considerado uno de los mecanismos que les permite a las especies mantener una variación genética capaz de adaptarse a diferentes condiciones ambientales a través del espacio y del tiempo (Boshier, 2000).

La selección natural es la principal fuerza impulsora de la evolución, ya que generalmente reduce la variabilidad genética de una población dada. En términos de genética de poblaciones, la selección natural se define como la reproducción diferencial de individuos portadores de los distintos genotipos de una población. El éxito reproductivo es el resultado de las interacciones entre organismos y su ambiente, tanto biótico como abiótico. El ambiente moldea la variabilidad genética ya sea produciendo cambios o manteniendo las frecuencias de los alelos que componen el reservorio genético de una población (Curtis *et al.*, 2008). En general, la selección natural permite adaptar la diversidad de cada individuo para el beneficio de toda la población (Darwin, 1963).

La endogamia es el resultado de apareamientos entre individuos emparentados, su efecto suele ser mayor cuanto más relacionados son los individuos que se aparean. Matemáticamente puede definirse como la probabilidad de que dos alelos en un locus sean idénticos por descendencia y se cuantifica por el coeficiente (F) de endogamia (Eguiarte, 2009). Esta tiene efectos negativos en

la selección debido a que da lugar a individuos homocigóticos. En poblaciones pequeñas la probabilidad de consanguinidad es mayor, por lo que se perderá más rápidamente la heterosigosis. Cuando las cruces resultan en una progenie con baja aptitud (capacidad de dejar descendientes) se presenta el fenómeno de depresión endogámica, la cual reduce la aptitud de las poblaciones porque favorece la expresión de genes deletéreos recesivos al aumentar la frecuencia de homocigotos, aumentando los riesgos de extinción de la población (Frankham *et al.*, 2002).

1.5 Factores ambientales

La amplia gama de condiciones ambientales, tales como la temperatura, características del suelo, disponibilidad de agua, intensidad de la luz, humedad relativa, altitud, precipitación, disponibilidad de nutrientes en el suelo y la salinidad, pueden ejercer diversas presiones de selección. Por lo tanto, pueden determinar el curso evolutivo y estructura genética de las poblaciones vegetales (Gaggiotti *et al.*, 2009; Ren *et al.*, 2013). Adicionalmente a estos factores ambientales, el impacto antropogénico puede afectar de manera significativa la diversidad genética de las poblaciones. Uno de los principales factores antrópicos es la perturbación ambiental como consecuencia de la contaminación, actividades como la ganadería y agricultura, urbanización o bien por causas naturales como terremotos, tormentas, incendios entre otros, debido a que causan variación en los procesos demográficos y biológicos (Banks *et al.*, 2013). Generalmente, la perturbación afecta la estructura genética de las poblaciones debido a que provoca fragmentación del hábitat. Este proceso disminuye el tamaño poblacional y rompe la continuidad de las poblaciones, trayendo como consecuencia una reducción del flujo genético existente entre ellas; la diversidad genética intrapoblacional puede aumentar las diferencias entre poblaciones por deriva genética (Young *et al.*, 1996).

1.6 Características de la historia de vida

La distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones está ligada fuertemente a los rasgos de historia de vida, en particular la dispersión y el modo de reproducción (Hamrick *et al.*, 1979; Hamrick y Godt 1996). Los niveles de variación genética están asociados con la dispersión de semillas ya que especies con dispersión restringida tendrán un flujo reducido y por lo tanto menor variabilidad genética, en cambio, especies con dispersión extensiva tendrán mayor flujo genético (Hamrick *et al.*, 1979). La dispersión mediada por animales probablemente produce la dispersión de semillas más variables, favoreciendo la diversidad genética de la especie (Loveless y Hamrick, 1984). Uno de las características importantes en la historia de vida de las plantas son los patrones de movimiento de los polinizadores, debido a que sus movimientos dependen de su fisiología y comportamiento, ya que insectos más pequeños como las abejas, debido a su limitación

energética recorren distancias mas cortas, comparado con otros polinizadores como las aves, las cuales recorren distancias mas largas y pueden visitar mas plantas. En general, polinizadores que recorren largas distancias, aumentaran el tamaño efectivo poblacional y disminuyen la diferenciacion geográfica, mientras que los movimientos restringidos tendran efectos opuestos (Loveless y Hamrick,1984). Las especies de plantas que dispersan ampliamente y con frecuencia sus genes (lo que incluye tanto el polen y semillas) tienden a ser poblaciones genéticamente similares, en igualdad de circunstancias (Hamrick *et al.*,1979).

El sistema de reproducción y cruzamiento son factores importantes en la determinación de la diversidad genética dentro y entre poblaciones ya que plantas autógamias producen una baja heterocigosidad dentro de poblaciones e incrementa la divergencia entre poblaciones por deriva genética y se reduce el flujo génico. Por el contrario, especies exógamas proporcionan mayor variabilidad genética dentro de poblaciones, y entre poblaciones normalmente se reduce la divergencia debido a que incrementa el flujo de polen. En plantas con reproducción por apomixis, se tiene una baja diferenciación dentro de poblaciones dependiendo del número de genes, entre poblaciones el efecto fundador y deriva genética promueven la divergencia, aunque hay baja variabilidad genotípica por falta de recombinación (Loveless y Hamrick,1984). En algunas especies de plantas, se tienen sistemas de autoincompatibilidad ya sea gametofítica o esporofítica, en ambos mecanismos se evita la autofecundación y se promueve la variabilidad genética dentro de poblaciones (Jímenez y Cruz, 2011; García *et al.*, 2013). La combinacion del sistema de cruzamiento y el mecanismo de dispersión de semillas pueden explicar la variacion entre poblaciones (Hamrick y Godt, 1996).

1.7 Estructura genética

Se entiende por estructura genética de una especie la cantidad y distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones de dicha especie. La estructura genética de una población concreta es determinada por los atributos ecológicos de la especie, la historia evolutiva de esa población y va a ser consecuencia de las interacciones de los procesos genéticos como la mutación, deriva genética, flujo génico, sistema de reproducción y selección. Para determinar la estructura genética es necesario comprender el patrón de variación genética de las poblaciones, lo que significa evaluar los genotipos de diferentes individuos (Duminil *et al.*, 2007; Magallán *et al.*, 2009; Slatkin, 1994). La caracterización de la estructura genética de las poblaciones se realiza mediante la estimación de las frecuencias genotípicas y las frecuencias génicas. Desde hace más de 25 años se han desarrollado diversas técnicas moleculares que han sido ampliamente utilizadas en el estudio de la estructura genética para resolver relaciones filogenéticas y evolutivas entre especies, complejos

de especies e incluso para la caracterización de poblaciones de una misma especie (López *et al.*, 2007).

1.7.1 Diversidad genética

La diversidad genética se define como cualquier medida que cuantifica la magnitud de la variabilidad genética dentro de una población (Hughes *et al.*, 2008). Esta variación es denominada polimorfismo y se infiere que está controlada por un sistema genético particular. El polimorfismo depende de la presencia de dos o más alelos en cada locus dentro de la población. Esto surge como consecuencia de las alteraciones en el ADN a nivel de nucleótidos (cambio de una base por otra) o de segmentos de ADN (delección, adición, inversión y transferencia de ADN de una posición a otra), también puede ser resultado de la recombinación (González, 1998).

La diversidad genética se da en tres niveles básicos: entre individuos a nivel de cromosoma, dentro de poblaciones y entre poblaciones. En todos los casos su persistencia se debe principalmente a los mecanismos de reproducción, entrecruzamiento y dispersión (Loveless y Hamrick, 1984; Meffe *et al.*, 2002).

Un parámetro que permite determinar el grado de diversidad genética en cualquier nivel es la heterocigosidad; es decir, la proporción de loci de genes medidos que son heterocigotos en un individuo o una población. A menudo se correlaciona positivamente con la aptitud. Por ello, la heterocigosidad individual o poblacional se considera ventajosa para los individuos o poblaciones (Meffe *et al.*, 2002). La heterocigosidad es menor en poblaciones pequeñas y reduce la habilidad de la población afectada para responder a la selección natural y por consiguiente limitar su potencial evolutivo (Kärkkäinen *et al.*, 2004; Storfer, 1996).

La diversidad genética puede tener consecuencias ecológicas importantes a nivel poblacional, de comunidad o ecosistemas (Hughes *et al.*, 2008). Es por ello, que la diversidad genética es muy importante en la ecología y la genética de la conservación.

Actualmente es posible determinar la variación genética en poblaciones haciendo uso de distintas herramientas basadas en proteínas o tecnologías de ADN, todas ellas con el objetivo de identificar las diferencias genotípicas existentes entre individuos de una población. Estas herramientas han sido muy útiles en diferentes ramas como la ecología evolutiva y sistemática, la taxonomía, la medicina, entre otras (González, 1998; Robledo y González, 2009).

1.8 Marcadores moleculares basados en ácidos nucleicos

Los marcadores moleculares examinan regiones del ADN cuyo polimorfismo se determina con métodos de biología molecular. Actualmente son una de las herramientas empíricas más útiles de las ciencias de la vida (Agarwal *et al.*, 2007; Azofeifa, 2006; Bagali *et al.*, 2010).

Una técnica ideal de marcadores moleculares debe cumplir con los siguientes criterios: 1) ser polimórfica, distribuida a lo largo de todo el genoma, 2) específica de un solo locus, 3) proporcionar adecuada resolución de las diferencias genéticas, 4) ser simple, rápida y de bajo costo, 5) que utilice pequeñas cantidades de ADN, 6) que tenga vinculación con distintos fenotipos y 7) no requiera información previa sobre el genoma del organismo (Agarwal *et al.*, 2007).

Los diferentes marcadores difieren el uno del otro con respecto a las características importantes tales como la abundancia en el genoma, el nivel de polimorfismo, la reproducibilidad, los requisitos técnicos y de costos. Sin embargo, no existe una técnica de marcador molecular ideal para todas las situaciones.

Los marcadores moleculares se clasifican en dos categorías: 1) técnicas no basadas en PCR (Polymerase Chain Reaction) o de hibridación y 2) técnicas basadas en PCR. En la primera encontramos técnicas como el polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP). En la segunda categoría encontramos ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), secuencias caracterizadas de regiones amplificadas (SCAR), amplificación de fragmentos polimórficos (AFLP), secuencias simples repetidas (SSR) y polimorfismo de un nucleótido simple (SNP). Todas estas técnicas tienen importantes y variadas aplicaciones en distintas disciplinas (Agarwal *et al.*, 2007).

1.8.1 Polimorfismos de un nucleótido simple (SNP)

Los polimorfismos de un nucleótido simple son conocidos como SNP por sus siglas en inglés (Single Nucleotide Polymorphisms). Describen el polimorfismo entre individuos causado por mutación puntual que dan lugar a diferentes alelos con una alternativa usual de dos bases en una posición dada. Los SNP constituyen uno de los marcadores moleculares más abundantes en el genoma y están ampliamente distribuidos a lo largo del mismo. Aunque su presencia y distribución varía entre las especies, por ejemplo en el maíz se tiene 1 SNP por cada 60-120 pares de bases (pb) (Ge *et al.*, 2013; Ching *et al.*, 2002), mientras que los humanos tienen 1 SNP estimado por cada 1000 pb (Sachidanandam *et al.*, 2001). Estos suelen ser muy abundantes tanto en regiones codificantes como en las no codificantes del genoma. Por lo tanto, pueden ser afectados por selección natural, aunque generalmente son más prevalentes en regiones no codificantes (Agarwal *et al.*, 2007; Benali *et al.*, 2011). Dependiendo de dónde se encuentren localizados, los SNP pueden tener diferentes consecuencias fenotípicas (Sylvänen, 2001). Este marcador a diferencia de otros, es ubicuo y susceptible a automatización de alto y de ultra-alto rendimiento (Mammadov *et al.*, 2012).

Recientemente, existen una gran variedad de procedimientos analíticos para la detección de SNP, tales como la secuenciación directa, electroforesis en gel desnaturizante gradual, el

polimorfismo de conformación de cadena individual (SSCP), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), y espectrofotometría de masas (MALDI TOF), entre otras (Benali *et al.*, 2011).

Pero la mayoría de los ensayos de genotipificación de SNP se basan en uno o dos de los siguientes mecanismos moleculares: la hibridación específica del alelo, extensión del cebador, ligación de oligonucleótidos y escisión invasiva (Sobrino *et al.*, 2005). Los métodos de genotipificación de alto rendimiento hacen de los SNP uno de los marcadores genéticos más atractivos y se utilizan para una gama de propósitos, incluyendo la rápida identificación de los cultivos, mapeos genéticos y principalmente para determinar diversidad genética (Agarwal *et al.*, 2007). Actualmente, las mejoras en la tecnología de secuenciación y disponibilidad de diferentes métodos analíticos permiten la automatización de la técnica, uno de los métodos comúnmente utilizados para cuantificar SNP es PCR en tiempo real.

1.9 PCR en Tiempo Real (PCR-TR)

Los ensayos basados en PCR en tiempo real han sido ampliamente utilizados en las ciencias de la vida y de diagnóstico debido a su mayor sensibilidad, reproducibilidad, precisión y capacidad de alto rendimiento. Por otra parte, los ensayos en tiempo real basados en la fluorescencia permiten identificar múltiples genes diana de forma independiente dentro de una reacción a través de análisis de temperatura de fusión, eliminando de este modo la necesidad de electroforesis en gel (Baris *et al.*, 2013). Muchas técnicas de fusión utilizan sondas de oligonucleótidos marcados con fluorescencia para determinar el genotipo de segmentos cortos de un producto de PCR. Una de ellas es el empleo de sondas Taqman®, que garantizan la obtención de ensayos de PCR altamente específicos, con una eficiencia de amplificación cercana al 100%, y que además permiten evaluar numéricamente con la más alta precisión, la cantidad de moléculas de material genético presente en cada muestra.

La determinación del genotipo ensayo TaqMan® (Applied Biosystems, CA) combina la hibridación y la actividad 5' nucleasa de la polimerasa acoplada con detección de fluorescencia (Figura 2). Se utilizan cuatro oligonucleótidos: dos sondas alelo-específicas que tienen una base incompatible y un par de cebadores de PCR que flanquean la región que contiene el SNP. Las sondas alelo-específicas llevan un colorante fluorescente en un extremo (reportero) y un colorante no fluorescente en el otro extremo (extintor). Las sondas intactas no muestran fluorescencia debido a la estrecha proximidad entre el reportero y el extintor. Para la detección del SNP, la reacción de PCR se lleva a cabo con el ADN genómico en presencia de todos los elementos (2 sondas y 2 cebadores) utilizando una polimerasa que posee actividad 5' exonucleasa. Durante la extensión del cebador de PCR, la enzima sólo escinde la sonda hibridada que se adapta perfectamente, liberando el colorante indicador desde el extintor. El colorante indicador genera una señal fluorescente en

ausencia de su inhibidor, mientras que la sonda no coincidente se mantiene intacta y no muestra fluorescencia. Como resultado, ambos alelos pueden ser detectados durante la reacción basada en la hibridación de sondas respectivas. Las sondas TaqMan® requieren solamente una etapa enzimática con un procedimiento de operación sencillo (Kim y Misra, 2007). Recientemente las sondas Taqman® son las técnicas más utilizadas para determinar SNP por su eficiencia de amplificación (Servin, 2003).

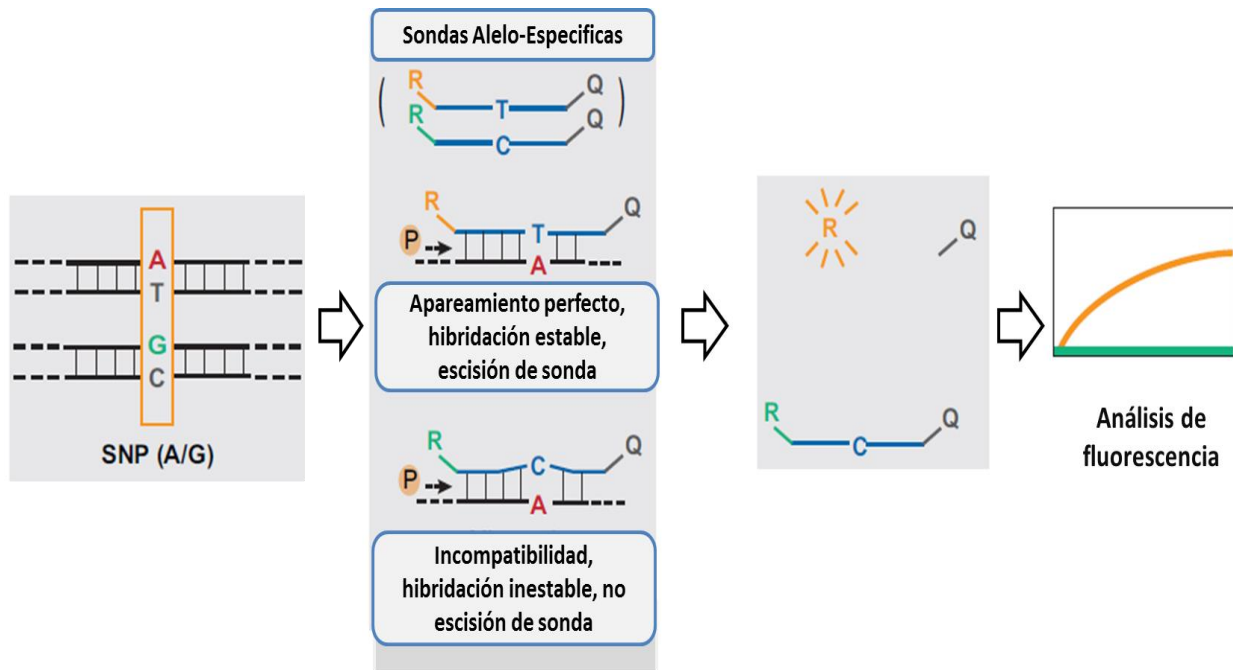


Figura 2. Ensayo TaqMan®. El ensayo utiliza dos sondas alelo-específicas que llevan diferente reportero (R) y extinguidor (Q) en cada extremo con una falta de coincidencia en el sitio de SNP. La sonda coincidente libera su reportero durante la amplificación por PCR de la región que contiene el SNP y la fluorescencia resultante indica el genotipo del SNP. (Tomado de Kim y Misra, 2007).

LITERATURA CITADA

- Agarwal M., Shrivastava N., Padh H. (2007). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*. 27: 617-631.
- Azofeifa D.A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Revista de Agronomía Mesoamericana*. 17(2): 221-242.
- Bagali P.G., Prabhu A.H., Raghavendra K., Bagali P.G., Hittalmani S., Vadivelu J. (2010). Application of molecular markers in plant tissue culture. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. 18(1): 85-87.
- Banks S.C., Cary G. J., Smith A.L., Davies I.A., Driscoll D.A., Gill M.A., Lindenmayer D.B., Peakall R. (2013). How does ecological disturbance influence genetic diversity?. *Trends in Ecology & Evolution*. 20(11): 670-679.
- Barbadilla A. (2009). Genética de poblaciones. Departamento de Genética y Microbiología. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Baris I., Etlik O., Koksal V., Ocak Z., Tugba B.S. (2013). SYBR green dye-based probe-free SNP genotyping: Introduction of T-Plex real-time PCR assay. *Analytical Biochemistry*. 441: 225-231.
- Bautista C.N. (2012). Estudio aloenzimático en poblaciones de *Malacomeles denticulata*, en la región central de Oaxaca, México. Tesis. IPN-CIIDIR, Oaxaca, México. pp. 45-48.
- Benali S., Mohamed B., Eddine H.J., Neema C. (2011). Advances of Molecular Markers Application in Plant Pathology Research. *European Journal of Scientific Research*. 50: 110-123.
- Blanco A.A., y Martínez R.S. (2001). Aplicación de un modelo de balances hídricos en la cuenca alta del Río Mixteco (Oaxaca). Universidad Tecnológica de la Mixteca-Politécnica de Madrid. Huajuapán de León, Oaxaca. pp. 180.
- Boshier D.H. (2000). Mainting systems. In. *Forest conservation genetics: principles and practice*. Boshier y Young (Eds). CSIRO Publishing. Collingwood. Australia. pp. 63-79.
- Campbell C. S., Baldwin B. G., Donoghue M. J., Wojciechowski M. F. (1995) A phylogeny of the genera of Maloideae (Rosaceae): Evidence from Internal Transcribed Spacers of nuclear ribosomal DNA sequences and congruence with morphology. *American Journal of Botany*. 82: 903-918.

- Campbell C.S., y Wright W.A. (1996). Apomixis, Hybridization and Taxonomic Complexity in Eastern North American *Amelanchier* (Rosaceae). *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica*. 31: 345-354.
- Campbell C.S., Evans R.C., Morgan D.R., Dickinson T.A., Arsenault M.P. (2007). Phylogeny of subtribe Pyrinae (formerly the Maloideae, Rosaceae): Limited resolution of a complex evolutionary history. *Plant systematics and evolution*. 266: 119-145.
- Ching A.D., Caldwell K.S., Jung M., Dolan M., Smith O.S., Tingey S., Morgante M., Rafalski A. (2002). SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genetics*. 3: 19.
- Cruz C.E. (2005). Morphological variability and seed dormancy of *Amelanchier* (Rosaceae) grown in Oaxaca, México. Tesis. Oregon State University. pp. 173.
- Curtis H., Barnes N.S., Schnek A., Massarini A. (2008). *Biología*. 7ª Edición. Ed. Panamericana. México. pp. 1009.
- Darwin C. (1963). *El Origen de las Especies por la Selección Natural*. Ed. Ibericas. pp. 79-92.
- Dickinson T.A., Lo E., Talent N. (2007). Polyploidy, reproductive biology, and Rosaceae: understanding evolution and making classifications. *Plant Systematics and Evolution*. 266: 59-78.
- Duminil J., Fineschi S., Hampe A., Jordano P., Salvini D., Vendramin G., Petit R. (2007). Can Population Genetic Structure Be Predicted from Life-History Traits?. *The American Naturalist*. 169(5): 662-672.
- Eguiarte E.L. (2009). Evolución biológica. Capítulo: Nueva guía para principiantes a la genética de poblaciones. Facultad de ciencias UNAM. México. pp. 83-102.
- Eguiarte E.L. (2009). Nueva guía para participantes a la Genética de Poblaciones, en: Morrone J.J. y Magaña P. (Eds). *Evolución Biológica*, 1ª Edición. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de México. México. pp. 82-103.
- Evans R.C., y Campbell C.S. (2002). The origin the apple subfamily (Maloideae; *Rosaceae*) is clarified by DNA sequence data from duplicated GBSSI genes. *American Journal of Botany*. 89(9): 1478-1484.

- Frankel O.H. (1970). Variation the essence of life. Sir William Macleay Memorial Lecture. Proceedings of the Linnean Society of New South Wales. 95: 158-169.
- Frankham J.D., Ballou J.D., Briscoe D.A. (2002). Introduction to conservation genetics. University Press Cambridge: Reino Unido. pp. 617.
- Gaggiotti O.E., Bekkevold D., Jørgensen H., Foll M., Carvalho G., Andre C., Ruzzante D. (2009). Disentangling the effects of evolutionary, demographic, and environmental factors influencing genetic structure of natural populations: Atlantic herring as a case study. *Evolution*. 63(11): 2939-2951.
- García V. L.E., Bravo A.C., y Cruz G. C. (2013). Evitando el incesto en las plantas: control genético y bioquímico. *Revista Especializada en Ciencias Químico Biológicas*. 16(1): 57-65.
- Ge A.J., Han J., Li X.D., Zhao M.Z., Liu H., Dong Q.H., Fang J.G. (2013). Characterization of SNP in strawberry cultivars in China. *Genetics and Molecular Research*. 12(1): 639-645.
- González D. (1998). Marcadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en ecología y sistemática. *Revista Mexicana de Micología*. 14: 1-21.
- Hamrick, J. L., Linhart Y. B., Mitton J. B. (1979). Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable variation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 10: 173-200.
- Hamrick J.L., y Godt M.J.W. (1996). Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 351: 1291-1298.
- Hernández C.L., Guerra de la Cruz V., Santiago M.G., Cuatlal C.P. (2011). Propagation and Mycorrhization of native plants with soil restoration potential. *Revista Mexicana de Ciencia Forestal*. 2(7): 87-96.
- Hernández M.A., Núñez C.A., Guzmán M.S., Espinosa T., Herrera M.G. (2011). Variabilidad morfológica mediante caracteres de semilla de poblaciones *Amelanchier denticulata* (Kunth) Koch, originarias de Guanajuato, México. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 17(3): 161-172.
- Hughes A.R., Inouye B.D., Johnson M.T., Underwood N., Vellend M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters*. 11: 609-623.

- Jiménez D.K. y Cruz G.F. (2011). Sexual incompatibility, a genetic mechanism that prevents self-fertilization and contributes to plant diversity. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 34(1): 1-9.
- Kärkkäinen K., Loe G., Agren J. (2004). Populations structure in *Arabidopsis lyrata*: evidence for divergent selection on trichome production. *Evolution*. 58: 2831-2836.
- Kim S., y Misra A. (2007). SNP Genotyping: Technologies and Biomedical Applications. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 9: 289-320.
- Klug W.S., Cummings M.R., Spencer S.A. (2006). *Conceptos de genética*. 8ª Edición. Pearson Pientre Hall. pp. 884.
- López D.C., Jaramillo C., Guhl F. (2007). Estructura poblacional y variabilidad genética de *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) procedente de diferentes áreas geográficas de Colombia. *Biomédica*. 27(1): 28-39.
- Loveless M.D., y Hamrick J.L. (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of the Ecology and Sistematics*. 15: 65-95.
- Magallán H.F., Martínez M., Hernández S.L., Oyama K. (2009). Genetic structure of populations of *Eriocaulon bilobatum* (Eriocaulaceae): an endangered species of temporary wetlands. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 85: 81-88.
- Mammadov J., Aggarwal R., Buyyarapu R., Kumpatla S. (2012). SNP Markers and Their Impact on Plant Breeding. *International Journal of Plant Genomics*. 1-11.
- Meffe G.K., Mielse L.A., Knight R.L., Schenborn D.A. (2002). *Ecosystem Management: Adaptive, Community Based, Conservation*. Chapter 5: Genetic Diversity in Ecosystem Management. Island Press. pp. 115-130.
- Núñez C.A., y Hernández M.A. (2011). The Mexican serviceberry (*Amelanchier denticulata*): a new potential berry fruit crop from semi-arid areas. *Acta Horticulturae*. 918: 917-924.
- Pérez E.B., Villavicencio M.A., Ramírez A.A. (2003). *Lista de plantas útiles del estado de Hidalgo*. Ed. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. pp. 79.
- Quero C.A., Enríquez Q.J., Morales N.C., Miranda J.L. (2010). Apomixis importance for tropical forage grass selection and breeding. *Review*. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 1(1): 25-42.

- Ramírez I.J. (2009). Variabilidad genética en poblaciones de *Amelanchier denticulata* en Oaxaca, México. Tesis. IPN-CIIDIR Oaxaca, México. pp. 48.
- Ren J., Chen L., Sun D., You F.M., Wang J., Peng Y., Nevo E., Beiles N., Sun D., Luo M., Peng J. (2013). SNP-revealed genetic diversity in wild emmer wheat correlates with ecological factors. *BMC Evolutionary Biology*. 13: 169.
- Robledo J.J., y González S.C. (2009). Marcadores moleculares y ecología del movimiento. *Ecosistemas*. 18 (1): 44-51.
- Rzedowski J., y Calderón de Rzedowski G. (2005). Flora del Bajío y regiones adyacentes: Familia Rosaceae, Fascículo 135. Pátzcuaro: Instituto de Ecología A.C. Centro Regional del Bajío. pp. 157.
- Sachidanandam R., Weissman D., Schmidt S.C., Kakol J.M., Stein L.D., Marth G., Sherry S., Mullikin J.C., Mortimore B.J., Willey D.L. (2001). A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 409: 928-933.
- Servin V.L. (2003). Curso Práctico de PCR en Tiempo Real: Fundamentos y Aplicaciones. Applied Biosystems de México. pp. 6.
- Slatkin M. (1985). Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecological Systems*. 16: 393-430.
- Slatkin M. (1994). Gene flow and population structure. *Ecological Genetics*. Ed. L. Real. Princeton. pp. 1-3.
- Sobrino B., Briona M., Carracedo A. (2005). SNP in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Science International*. 154: 181-194.
- Storfer A. (1996). Quantitative genetics: a promising approach for the assessment of genetic variation in endangered species. *Perspectives*. 2: 343-347.
- Syvänen A.C. (2001). Accessing genetic variation genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nature Reviews Genetics*. 2: 930-941.
- Torres H.S., Pérez R.F., Serrano J.M., Villordo P.E., Hernández M., González M., Núñez C.A. (2013). Genetic variability in *Malacomeles denticulata* (Rosaceae) from central Mexico revealed with SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 1573-5109.
- Turner B.L. (2011). Recension of the genus *Malacomeles* (Rosaceae). *Phytologia*. 93: 99-106.

- Vamosi J.C., y Dickinson T.A. (2006). Polyploidy and Diversification: A Phylogenetic Investigation in Rosaceae. *International Journal of Plant Sciences*, 167(2): 349-358.
- Young A.G., Boyle T., Brown A.D. (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends Ecology Evolution*. 11: 413-418.

CAPÍTULO II

ESTRUCTURA Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Malacomeles denticulata* ASOCIADA A DIFERENTES TIPOS DE VEGETACIÓN DE OAXACA, MÉXICO

INTRODUCCIÓN

En México, uno de los estados con mayor diversidad de ecosistemas es Oaxaca, al poseer una vasta cantidad de especies vegetales y animales (García *et al.*, 2004). Desafortunadamente, a pesar de su riqueza natural, en Oaxaca existen cerca de 1.5 millones de Ha que muestran erosión hídrica, debido a la intensificación del uso de suelo, la expansión de la ganadería caprina, la sobreexplotación de los recursos forestales (madera, carbón), la agricultura, y la urbanización (Altieri *et al.*, 2006).

Como consecuencia de estas actividades la mayoría de los hábitats de muchas especies silvestres se encuentran severamente degradados y con ciertos niveles de erosión, provocando cambios en la estructura, diversidad, distribución y funcionamiento de los ecosistemas (Keller y Largiader, 2003; Saunders *et al.*, 1991).

Una manera de recuperar los ecosistemas erosionados es a través de prácticas de reforestación y restauración que en México, normalmente incluyen plantaciones de coníferas y latifoliadas, principalmente de los géneros *Pinus* y *Quercus* (Hernández *et al.*, 2011). No obstante, en las últimas décadas se ha sugerido el uso de especies con potencial de adaptación a condiciones edáfico-climáticas extremas, entre las que destacan las plantas nativas o autóctonas (Montaño y Monroy, 2000).

Recientemente una de las especies que ha sido propuesta para programas de restauración es *Malacomeles denticulata*, arbusto que habita en una gran variedad de ambientes, desde sitios conservados de clima templado húmedo, con vegetación natural de bosques de pino, pino-encino y encinares arbustivos hasta áreas sujetas a heladas, sequía, drenaje deficiente, así como suelos poco profundos y pobres. Por lo que prácticamente crece en ambientes con alto grado de erosión (Hernández *et al.*, 2011; Núñez *et al.*, 2012). Las plantas adultas de *Malacomeles* son capaces de atrapar y estabilizar el suelo bajo su dosel en zonas sumamente degradadas y fijan suelo, de esta manera permiten el establecimiento de otras plantas en sus alrededores (planta nodriza) (Cruz, 2005). Además, esta especie tiene potencial forrajero, la madera es muy flexible y tiene diferentes usos (Núñez y Hernández, 2011). Otra característica importante es que sus frutos son comestibles principalmente en el centro del país, como fruta fresca y procesada en forma de jugos y mermeladas (Núñez *et al.*, 2012). Todas estas bondades de *M. denticulata* permiten considerarla como un modelo potencial para programas de restauración ecológica, por las grandes ventajas que ofrece en comparación con otras especies de plantas. Pero para recomendar a esta especie en programas de restauración es necesario conocer la estructura genética de sus poblaciones. En particular, es importante identificar qué características genéticas tienen sus poblaciones en ambientes contrastantes, es decir, aquellos sitios cuyas características ambientales son totalmente diferentes,

ya que es muy probable que los individuos de estas poblaciones sean genéticamente diferentes (Hernández *et al.*, 2011). En caso de que estas poblaciones estén genéticamente diferenciadas, cualquier recomendación sobre restauración debería considerar el origen de la semilla y las características del sitio a restaurar. Idealmente, el sitio de origen de la semilla y el entorno a restaurar deben coincidir en todas sus características ambientales.

Entre los factores ambientales determinantes en la estructura genética de poblaciones se encuentran la precipitación, la altitud, la salinidad, los nutrientes del suelo, la intensidad lumínica y la temperatura (Ren *et al.*, 2013). Estos factores pueden ejercer diversas presiones de selección. Por ejemplo, la temperatura influye en la actividad de múltiples enzimas, que conducen a estrategias metabólicas para sobrevivir ante cambios de temperatura extremos. La respuesta dentro de una especie a diferentes temperaturas entre poblaciones de diferentes localizaciones, está asociada con su variación genética en lugar de ser solo atribuible a un proceso de aclimatación (Begon *et al.*, 2009). Otro factor que puede influir en la estructura genética es la densidad poblacional. Al aumentar la densidad, aumentan las probabilidades de competencia entre individuos de la misma población por recursos limitantes. Al crearse condiciones más severas, por una mayor demanda de recursos, es posible que la depresión endogámica cambie y al menos en algunos casos aumente (Cheptou y Donohue, 2011). Es por ello que es importante conocer si la densidad de una especie tiene relación con su diversidad genética de las poblaciones y sus niveles de endogamia.

Sin embargo, dado que el ambiente puede ser caracterizado por múltiples variables, es importante conocer cuál de esas variables es la que más, está relacionada con la estructura genética poblacional de la especie que se va usar para restaurar. De esta manera, la colección de semillas debería proceder de sitios que coincidan en la variable o variables ambientales que más influencia tengan en la estructura genética poblacional. Con esta estrategia se aumentan las probabilidades de tener éxito. Además, es importante identificar las características genéticas de poblaciones degradadas y conservadas, para tener una idea de las fuerzas evolutivas que están actuando sobre esta especie en distintas condiciones; y con base en estas características, decidir qué poblaciones son las más apropiadas como fuente de semilla.

Esencialmente, la estructura genética de las poblaciones de la misma especie puede estar asociada con factores neutros; es decir, independientes de la selección natural y relacionados con deriva genética (Hutchison y Templeton, 1999). En este caso, y si existe un flujo genético limitado, se puede esperar aislamiento por distancia; es decir, que la similitud genética aumente al disminuir la distancia geográfica entre poblaciones (Manel *et al.*, 2003). Alternativamente, si la selección es intensa y domina sobre la deriva genética, es probable que sitios con condiciones ecológicas

similares, sean genéticamente más similares entre sí que aquéllos con los que comparten poca similitud ecológica, independiente de su distancia geográfica. Una asociación genética con ciertos factores ambientales particulares podría indicar que la especie en cuestión requiere diferentes adaptaciones para subsistir en condiciones ecológicas diferentes. En cambio si la deriva génica está influyendo sustancialmente en la estructura genética poblacional y el flujo genético es restringido, deberá de haber aislamiento por distancia es decir una relación positiva entre la distancia genética y geográfica entre poblaciones. Por otra parte, las poblaciones de una especie con gran plasticidad fenotípica no mostrarían relación alguna con condiciones ambientales diferentes, porque uno o pocos genotipos le permiten subsistir en una gran variedad de ambientes. Obviamente las recomendaciones para restauración dependerán de si la especie a ser usada tiene una gran plasticidad fenotípica, o bien, muestra un gran polimorfismo asociado con condiciones ambientales distintas, aun cuando estas condiciones estén en proximidad geográfica.

Este conocimiento, permitirá a los restauradores ecológicos entender con una base científica, cuáles son los patrones genéticos que influyen en la adaptación local de las especies vegetales a diferentes ambientes, así mismo, la importancia que tienen las características ambientales sobre la diversidad genética. Y con ello, contribuir a diseñar estrategias útiles para la restauración, a fin de reducir los riesgos de erosión en los ecosistemas (Aronson *et al.*, 1993; Hufford y Mazer, 2003). Si bien actualmente, existen estudios genéticos en poblaciones de *M. denticulata* originarias de Oaxaca, Guanajuato y Querétaro, que muestran variabilidad genética dentro y entre las poblaciones (Bautista, 2012; Hernández *et al.*, 2011; Ramírez, 2009; Torres *et al.*, 2013); todavía no se tienen estudios que exploren la relación genética de *M. denticulata* con los factores ambientales. Aún se requiere este tipo de información para su futura aplicación en programas de restauración. Por consiguiente, el objetivo de este trabajo es: estimar los patrones de variación y estructura genética en siete poblaciones de *Malacomeles denticulata* de ambientes contrastantes localizadas en Oaxaca, México.

A partir, del objetivo de este estudio se pretende responder las siguientes preguntas 1) ¿Cuál es la estructura y diversidad genética de poblaciones de *M. denticulata* que tienen cierta proximidad geográfica pero presentan condiciones contrastantes de clima y grado de disturbio? 2) ¿Los diferentes tipos vegetación en qué se encuentra *M. denticulata* están asociados con su diversidad y estructura genética? y finalmente, 3) ¿Cuál es la correlación de los patrones genéticos con la precipitación, temperatura, altitud y densidad de la especie?.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Descripción general del área de estudio

Las poblaciones de *M. denticulata* estudiadas se encuentran localizadas en los municipios de Santo Domingo Yanhuitlán, San Pablo Huitzo, Villa de Díaz Ordaz, Ixtlán de Juárez, Teotitlán del Valle y el Paraje Xía de San Juan Chicomezúchil, en el Estado de Oaxaca (Figura 3). Estas poblaciones fueron seleccionadas por las contrastantes características ambientales de los sitios, ya que son zonas con climas y tipos de vegetación diversos. Algunas características ambientales de los sitios de estudio se resumen en el Cuadro 1.

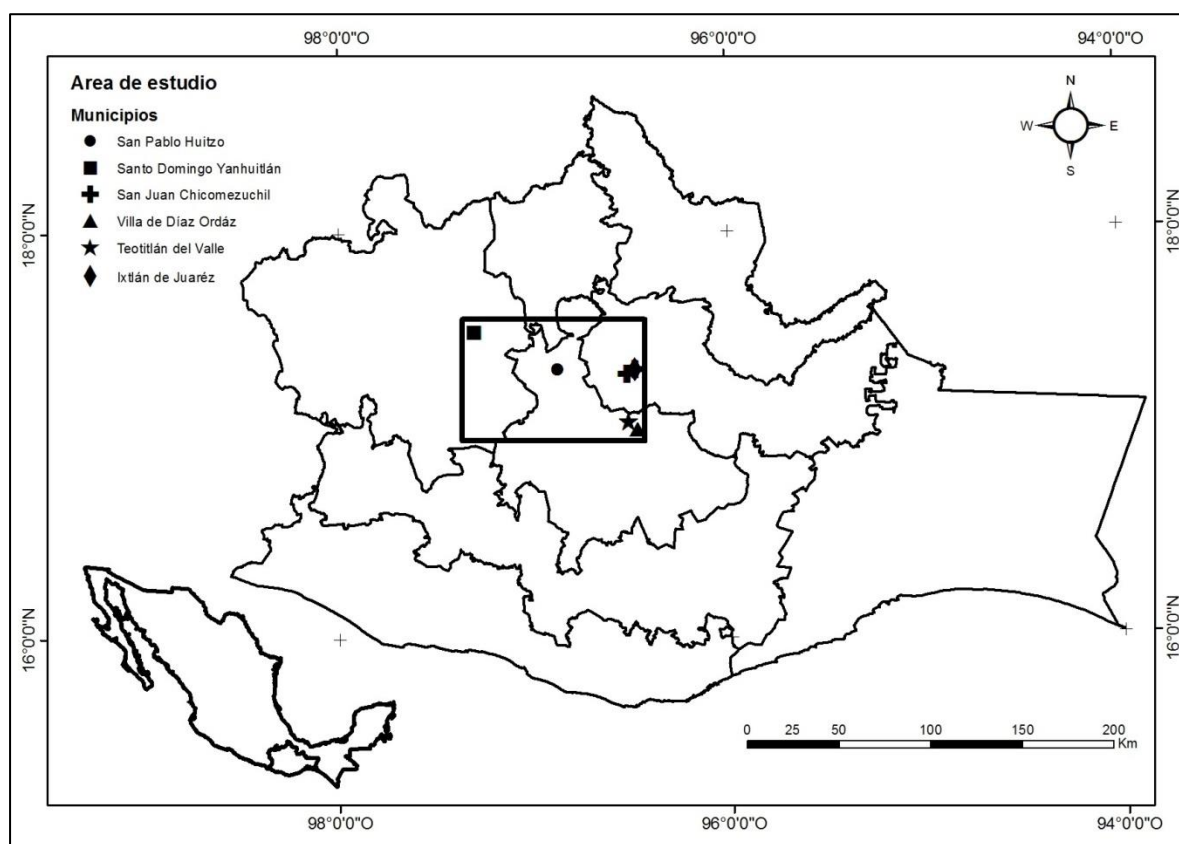


Figura 3. Mapa de localización de las siete poblaciones de *M. denticulata*.

- 1) Santo Domingo Yanhuitlán es una de las regiones con mayor deterioro en el estado de Oaxaca, ya que el 83% de sus suelos están de ligera a moderadamente degradados y el 17% severamente erosionados (Altieri *et al.*, 2006). Estas zonas son cálidas la mayor parte del año, predomina la vegetación tipo matorral xerófilo, con especies como *Acacia farnesiana*, *Eysenhardtia polystachia*, *Mimosa biuncifera* y algunas especies de *Opuntia spp.* (PDM, 2008). Aunque, en el pasado según Contreras *et al.* (2003) existió un bosque de pino (*Pinus pseudostrobus apulcensis*) - encino (*Quercus spp.*), el cual se explotó durante décadas y, como indicio de la degradación en la actualidad, es común encontrar *Dodonaea viscosa* la cual es utilizada como un indicador de

perturbación por la destrucción de bosque de encino (Niembro, 1990). Cuenta con parches divididos por pronunciadas cárcavas que resultan de la erosión de suelo, causado por arroyos temporales formados por lluvias que arrastran gran cantidad de sedimentos, además por el sobrepastoreo de ganado caprino.

- 2) San Pablo Huitzo es una zona con clima templado, la vegetación predominante es bosque de encino (Cruz, 2005), aunque también cuenta con pino, pero en menor densidad. Las especies más comunes de estas comunidades de vegetación son *Quercus laurina*, *Quercus magnoliifolia*, *Quercus candicans*, *Quercus crassifolia*, *Quercus rugosa*, *Quercus castanea*, *Quercus laeta* y *Quercus mexicana* (INEGI, 2009). El estado actual de la vegetación de este sitio muestra cierto grado de perturbación ya que es posible encontrar especies como *Dodonaea viscosa*.
- 3) Villa de Díaz Ordaz es un sitio con clima templado durante algunos meses del año, la vegetación predominante actual es selva baja caducifolia con algunas especies como *Bursera aloexylon* y algunas especies de *Opuntia spp.* Sin embargo, tiempo atrás era posible encontrar Bosque de Pino, Bosque de Pino-Encino, Bosque de Encino y Chaparral (PDM, 2011). Este sitio presenta indicios de perturbación ya que se encontró *Dodonaea viscosa*. La zona cuenta con grandes extensiones de tierras de cultivo, problemas de deforestación y contaminación, por lo que las poblaciones de vegetación natural se encuentran bajo una presión ambiental importante (PDM, 2011; Ramírez, 2009).
- 4) Ixtlán de Juárez es una región de Sierra, con clima templado durante el año y con altas precipitaciones, la vegetación representativa del municipio es el bosque de pino, por la extensión de terrenos que ocupa con algunas especies de pino como *P. pseudostrobus apulcensis*, *P. patula*, *P. pseudostrobus*, *P. teocote*, así mismo en su interior es común encontrar musgos, líquenes, bromelias, orquídeas, especies de hongos como *Amanita muscaria* y los singulares helechos arborescentes. También es posible encontrar algunas especies de *Quercus spp.* pero en menor densidad (PDM, 2005). En este sitio se realizan algunas actividades productivas como la extracción de madera, el desarrollo de cultivos como el maíz, la crianza de ganado principalmente vacuno.
- 5) Teotitlán del Valle se caracteriza por un clima templado, la vegetación que se encuentra en este sitio es selva caducifolia y subcaducifolia con vegetación secundaria, se puede encontrar algunas especies como *Bursera aloexylon*, *Opuntia spp.* y *Dodonaea viscosa* (PDM, 2012).
- 6) Paraje Xía pertenece al municipio de San Juan Chicomezúchil. El clima es cálido a lo largo del año y cuenta con una vegetación tipo selva baja caducifolia y en la parte más alta con bosque de encino seco, con especies como: *Q. macrophylla Née*, *Q. laeta*, *Q. urbanii* y *Q. magnoliifolia*, (PDM, 2008), aunque también tiene algunas especies de pino como *P. pseudostrobus apulcensis*, *P.*

teocote, pero en una densidad baja. También tiene otras especies como *Dodonaea viscosa*, *Acacia farnesiana*, *Opuntia spp*, *Bursera aloexylon*, *Agave spp*.

Cuadro 1. Datos climatológicos, tipo de vegetación de las poblaciones de *M. denticulata*.

Municipio	Altitud (m)	Precipitación (mm)	Temperatura (°C)	Coordenadas	Tipo de vegetación
1) Santo Domingo Yanhuitlán	2140	651**	24.05**	17°30'54.4''N -97°17'47.6''W	Matorral perturbado
2) Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas	2140	651**	24.98**	17°29'51.7''N -97°18'34.4''W	Matorral perturbado y cárcavas
3) San Pablo Huitzo	2017	676*	20.30*	17°19'25.9''N -96°52'34.9''W	Bosque de encino
4) Villa de Díaz Ordaz	2135	636*	18.00*	17°1'24.35''N -96°28'6.50''W	Selva baja caducifolia
5) Teotitlán del Valle	1886	750††	20.00††	17° 3' 56.3574" N -96° 30' 54.9" W	Selva Baja Caducifolia
6) Ixtlán de Juárez	2048	966*	17.20*	17°19'18.4''N -96°28'43.5''W	Bosque de pino
7) Paraje Xía en San Juan Chicomezúchil	1806	800†	19.00†	17° 18' 04.89'' N -96° 31' 14.11''W	Bosque de encino seco y Selva baja caducifolia

Los datos de precipitación y temperatura fueron proporcionados por: *CONAGUA (2014); **INIFAP (2014); †INEGI, (2008); ††INEGI, (1984) e INEGI, (2008).

2.2.2 Estimación de la densidad en las poblaciones de *M. denticulata*

La densidad vegetal se define como el número de individuos expresado por unidad de área o volumen (Martella *et al.*, 2012). En cada sitio de muestreo se estimó la densidad, por georeferenciación de todos los individuos en un área mínima de 10 000 m², con un GPS marca Garmin modelo 60 CSX. El área total muestreada se estimó usando el programa ArcGis versión 10.1 con base en los individuos geoposicionados y el área cubierta por el muestreo. Los parámetros para esta medición fueron: Datum horizontal WGS84, con Error Promedio Estándar (EPS) de 5 m. El análisis de los datos de georeferenciación y determinación del área de muestreo se realizó en el Laboratorio de Sistemas de Información Geográfica y Percepción Remota del CIIDIR-Oaxaca.

2.2.3 Recolección del material vegetal

Se seleccionaron al azar 25 individuos adultos de *M. denticulata* de siete poblaciones diferentes. El material vegetal (hojas) de cada individuo, se colocó en bolsas de plástico y se conservó a 4°C hasta su transporte al laboratorio, donde después fueron almacenadas en un congelador a -20 ° C.

2.2.4 Diseño de oligonucleótidos y sondas para SNP

El diseño de ensayos de SNP se realizó a partir de las secuencias reportadas para *M. denticulata* en el portal del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Únicamente se identificó una secuencia con dos mutaciones puntuales (SNP) para esta especie. Debido a ello, se buscaron mutaciones puntuales en especies filogenéticamente relacionadas a *Malacomeles*, como son los géneros *Crataegus*, *Peraphyllum*, *Amelanchier*, *Mespilus*, *Prunus* y *Malus*, de acuerdo con los estudios de Campbell *et al.* (2007). Adicionalmente, se seleccionaron dos SNP reportados para *Arabidopsis thaliana*. Se realizó un análisis bioinformático de las secuencias seleccionadas (Anexo 1). El diseño de ensayos TaqMan® de genotipificación de los SNP seleccionados (TaqMan® SNP Genotyping Assay) se realizó por Life Technologies-Applied Biosystems. Cada ensayo contenía un par de cebadores específicos para amplificar el polimorfismo de interés, y dos sondas TaqMan® marcadas con los Fluorocromo VIC® y FAM® unidos en el extremo de 5' de la sonda del alelo 1 y 2 respectivamente.

2.2.5 Aislamiento de ADN

La extracción y purificación de ADN genómico se realizó en un FastPrep-24 (MP Biomedicals) siguiendo el protocolo de extracción FastDNA® SPIN Kit catalogo #6540-600-4I01, pero modificando el tiempo de homogenización en el FastPrep® a 2 ciclos de 30 segundos cada uno, a una velocidad de 6.0 m/s. Posteriormente, se cuantificó la concentración y pureza del ADN en un Biofotómetro marca Eppendorf, a una longitud de onda de 260 nm y un volumen de 50.0 µl.

2.2.6 Amplificación de SNP en PCR en Tiempo Real

La amplificación de los SNP se realizó con un volumen final de 20 µl, el cual contenía 0.5 µl de TaqMan® diseñados (40X), 10 µl de TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (Applied Biosystems), 7.5 µl de agua estéril (Marca Sigma) y 2 µl de ADN genómico de *M. denticulata*, a una concentración de 20 ng/µl. La amplificación del SNP (M_domes) se realizó por triplicado. Los experimentos de genotipificación se realizaron en PCR-TR (StepOne™ Real-Time PCR System, Versión 2.3). El programa de amplificación consistió en 50 ciclos, cada uno con una etapa de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, las etapas de hibridación y extensión fueron a 60°C durante 1 minuto.

2.2.7 Análisis genéticos

2.2.7.1 Estimación de la diversidad genética

Para estimar la diversidad genética de las poblaciones se calcularon en los programas FSTAT versión 2.9.3 (Gottlieb L.D, 1981) y Arlequín versión 3.5.1.3 (Excoffier y Lischer, 2010),

los siguientes parámetros: el número de alelos polimórficos (A), las frecuencias genotípicas y alélicas en equilibrio de Hardy-Weinberg, la heterocigosidad observada y esperada y finalmente la prueba de desequilibrio de ligamiento (DL). Este último análisis se realizó porque los SNP están presentes en todo el genoma (Ge *et al.*, 2013), y dada su abundancia es común que se presenten asociaciones alélicas entre pares de loci, por su cercanía física, o por otros factores como su interacción epistática, poblaciones recién fundadas con pocos individuos (Cadien *et al.*, 1978); la migración entre poblaciones con diferentes frecuencias génicas y la subdivisión poblacional (Nei y Li, 1973). El DL permite determinar estadísticamente el grado de asociación entre pares de loci (Iniesta *et al.*, 2005). Adicionalmente por población se calculó el número efectivo de alelos (A_e) y el índice de Shannon (S), en el programa POPGENE32 (Yeh *et al.*, 1999).

La diferenciación entre pares de poblaciones se evaluó calculando los valores de F_{ST} utilizando el programa Arlequín 3.5.1.3 (Excoffier y Lischer, 2010). Se probó si las poblaciones están genéticamente diferenciadas por un método de remuestreo aleatorio de 10000 permutaciones basado en un intervalo de confianza del 95% de significancia.

Para evidenciar las relaciones genéticas entre las poblaciones estimadas a partir de los valores de F_{ST} , se realizó un análisis no ponderado de agrupamiento por pares con medias aritméticas UPGMA (por sus siglas en inglés, Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) con el programa TFPGA 1.3 (Miller, 1997).

2.2.7.2 Estructura genética de las poblaciones

La estructura genética de las poblaciones se calculó mediante los estadísticos F (coeficiente de endogamia) propuestos por Wright (1951), los cuales calculan la endogamia en una población subdividida (F_{IT}), entre el componente debido a apareamientos no aleatorios dentro de poblaciones (F_{IS}) y la subdivisión entre poblaciones (F_{ST}) (Piñero, 2008). Adicionalmente se estimó el coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}). Estos estadísticos permiten comparar de manera clara y cuantitativa la diferenciación existente dentro y entre poblaciones. El análisis de estos parámetros se realizó en el programa FSTAT versión 2.9.3 (Gottlieb L.D, 1981) y TFPGA 1.3 (Miller, 1997). Se realizó un remuestreo aleatorio de 1000 permutaciones basado en un intervalo de confianza del 95% de significancia para los estadísticos F .

Se realizó un análisis molecular de varianza (AMOVA) en el programa Arlequín 3.5.1.3 (Excoffier y Lischer, 2010). Este análisis es una aproximación estadística de la existencia de estructura genética, es decir, que los criterios de agrupación justifican que las poblaciones sean distintas genéticamente. La significancia para los componentes de varianza se calculó a partir de 10100 permutaciones con una probabilidad de 0.05 para los índices de fijación: F_{ST} (Permutaciones de genotipos individuales entre poblaciones entre grupos), F_{SC} (Permutaciones de genotipos

individuales entre poblaciones dentro de grupos) y el índice F_{CT} (Permutaciones de poblaciones entre grupos). Para agrupar las poblaciones se utilizaron tres criterios de clasificación: la precipitación, el tipo de vegetación y la densidad de *M. denticulata* (Cuadro 2). El primer criterio se realizó con base en los valores de precipitación, el primer grupo con valores en un rango de 636 a 676 mm, con diferencias menores a 50 mm entre las poblaciones del grupo, el segundo grupo con valores de 750 a 996 mm y con diferencias mayores a 50 mm entre las poblaciones del grupo, el segundo criterio se basó en la vegetación de tipo matorral, bosque de encino, selva baja caducifolia y bosque de pino compartida por las poblaciones y, finalmente en el tercer criterio se agruparon las poblaciones de menor a mayor densidad de *M. denticulata*.

Cuadro 2. Criterios de clasificación para el análisis molecular de varianza.

Clasificación	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
1) Precipitación	- Santo Domingo Yanhuitlán - Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas - Villa de Díaz Ordaz -San Pablo Huitzo	-Ixtlán de Juárez - Paraje Xía de San Juan Chicomezúchil - Teotitlán del Valle		
2) Tipo de vegetación	- Santo Domingo Yanhuitlán - Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas	- San Pablo Huitzo - Paraje Xía de San Juan Chicomezúchil	- Villa de Díaz Ordaz - Teotitlán del Valle	- Ixtlán de Juárez
3) Densidad de <i>M. denticulata</i>	- Santo Domingo Yanhuitlán - Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas - San Pablo Huitzo	- Ixtlán de Juárez - Paraje Xía de San Juan Chicomezúchil	- Villa de Díaz Ordaz - Teotitlán de Valle	

Se evaluó la estructura genética de las poblaciones estudiadas de *M. denticulata* a partir del método de agrupamiento Bayesiano implementado por el programa Structure 2.3.4. (Pritchard *et al.*, 2000). Se utilizó un modelo de mezcla (admixture), que permite que los individuos se asignen en K (poblaciones) calculando su proporción de pertenencia a cada grupo, con un modelo de frecuencias correlacionadas (Falush *et al.*, 2003). La amplitud de valores de poblaciones (K) analizadas fue de 1 a 7. Se llevó a cabo análisis independientes para verificar la consistencia de los resultados entre los diferentes análisis para cada estimación de K. El número de iteraciones del algoritmo MCMC fue de 100000 y el tiempo para ejecutar la simulación antes de recoger los datos (“bur-in”) se fijó en 10000 con 20 réplicas para cada valor de K. El valor óptimo de K se seleccionó a partir del logaritmo de máxima verosimilitud posterior de los datos (donde X son todos los genotipos) $[\ln \Pr(X/K)]$ para un valor de K determinado (Evanno *et al.*, 2005), y se visualizaron usando el programa Structure Harvester (Earl y von Holdt, 2012).

2.2.7.3 Correlación de la distancia geográfica y los factores ambientales con la diversidad genética

La correlación de la distancia genética (F_{ST}) (Cuadro 8) y distancia geográfica (medida en kilómetros) entre los pares de poblaciones se evaluó con una prueba de Mantel. La significancia de esta asociación se evaluó por permutaciones aleatorias de las matrices (Manel *et al.*, 2003). Se usó el programa IBDWS (Isolation By Distance Web Service) versión 3.23 (Jensen *et al.*, 2005). Como en los análisis anteriores, el nivel de significancia se obtuvo a partir de 10000 permutaciones. La matriz de distancia euclidiana geográfica (Anexo 2) se construyó a partir de las coordenadas de colecta utilizando el programa Google Earth. La finalidad de esta prueba fue comprobar si existe alguna correlación entre las dos matrices de distancia y comprobar si existe aislamiento por distancia; la cual ocurre cuando la diferenciación genética entre los individuos (o poblaciones), aumenta con la distancia geográfica (ya que el flujo de genes disminuye a distancias más grandes) (Manel *et al.*, 2003).

Las variables de altitud, precipitación, temperatura y densidad se utilizaron como un indicador de las distancias ecológicas entre los sitios de estudio. Como las unidades de estas variables son diferentes entre sí, se procedió a estandarizar estas mediante $Z = \frac{x-\mu}{\sigma}$ (con media $\mu=0$ y desviación estándar $\sigma =1$) (Moore, 2000). A partir, de los datos de las variables estandarizadas, se construyó una matriz de distancia euclidiana (Anexo 3 a 6) para cada una de las variables ambientales en el programa SPSS versión 20.0 (IBM, 2011). Para el análisis de correlación entre las matrices de distancia de las variables ambientales y la matriz de distancia genética (F_{ST}) se realizó una prueba de Mantel usando 10000 permutaciones en el programa Arlequín 3.5.1.3 (Excoffier y Lischer, 2010).

RESULTADOS

2.3.1 Densidad de las poblaciones de *M. denticulata*

El sitio donde la población de *M. denticulata* presento la mayor densidad fue Villa de Díaz Ordaz, mientras que la población que mostró menor densidad fue Santo Domingo Yanhuítlán Cárcavas (Cuadro 3). La distribución de los individuos georreferenciados en cada sitio de estudio se pueden visualizar en los mapas de muestreo (Ver Anexos 7 a 13).

Cuadro 3. Densidad de *M. denticulata* en los sitios de estudio.

Poblaciones	Área muestreada (Ha)	Núm. de Individuos	Densidad (Ind Ha ⁻¹)
Santo Domingo Yanhuítlán	4.4	59	12.854
Santo Domingo Yanhuítlán Cárcavas	6.6	82	12.312
San Pablo Huitzo	7.5	121	16.047
Villa de Díaz Ordaz	1.0	106	99.530
Teotitlán del Valle	2.2	128	57.971
Ixtlán de Juárez	2.6	84	32.30
Paraje Xía en San Juan Chicomezúchil	5.6	153	27.321

2.3.2 Proporción de loci polimórficos, número de alelos y número efectivo de alelos, índice de Shannon, frecuencias genotípicas y alélicas

De un total de 15 ensayos TaqMan® SNP probados en siete poblaciones de *M. denticulata*, únicamente amplificaron seis de ellos, el criterio para determinar si un SNP amplificó fue que la curva de amplificación fuese superior al valor umbral (en un rango de 0.01 a 0.2) establecido automáticamente por el equipo PCR-TR (Cuadro 4).

De los loci que amplificaron, cuatro fueron polimórficos al menos en una población y dos de ellos fueron monomórficos. El mayor porcentaje de loci polimórfico se observó en las poblaciones de Teotitlán del Valle y Paraje Xía de San Juan Chicomezúchil, ambas con un 50% de polimorfismo. Se encontró que el número de alelos promedio por los tres loci, fue mayor con respecto al número efectivo de alelos en las poblaciones de Santo Domingo Yanhuítlán, Ixtlán de Juárez, Teotitlán del Valle y Paraje Xía de San Juan Chicomezúchil. Las poblaciones Santo Domingo Yanhuítlán cárcavas, Villa de Díaz Ordaz y San Pablo Huitzo presentaron los mismos valores para el número de alelos para los tres loci y el número efectivo de alelos. Las frecuencias alélicas promedio en equilibrio Hardy–Weinberg (H-W) de los 3 loci y las frecuencias genotípicas promedio se muestran se muestran en el Cuadro 5.

De los seis SNP amplificados cuatro de ellos son nucleares y, dos de ellos corresponden a ADN de cloroplasto (**Per_ramo10** y **Crat_riv07**) de las especies *Peraphyllum ramosissimum* y *Crataegus rivularis* y son mutaciones de transversión (cambio de una base púrica por una

pirimídica y viceversa) (Anexo 1) identificados en el espaciador intergenerico rpI20-Rps 12 y en el gen matK (maturase- like), este último usado para los códigos de barras de ADN en plantas (Selvaraj *et al.*, 2008). Estos dos marcadores fueron monomórficos, esto tal vez se deba a la naturaleza del ADN ya que, el ADN de cloroplasto es heredado vía materna y se esperaría que no hubiese variación porque no hay recombinación genética y tiene bajas tasas de mutación (Eguiarte *et al.*, 2003).

Un cuarto marcador (SNP) nuclear que amplificó, fue **M_domes**. La especie de origen es *Malus x doméstica* y corresponde a una mutación por tranversión (Anexo 1) en el gen S33-RNase, el cual codifica para una ribonucleasa cuya función es participar en la regulación de los sistemas de autoincompatibilidad gametofítica (GSI) (Jiménez y Cruz, 2011). El marcador **M_domes** únicamente se detectó en algunos individuos de todas las poblaciones, por esta razón se consideró polimórfico (Presencia-Ausencia) y se utilizó en la estimación de la proporción de loci polimórficos. Sin embargo, dado que se trata solo de un marcador con estas características (Presencia-Ausencia); no se le realizó ningún análisis estadístico. Por lo tanto, de aquí en adelante, se muestran los resultados de los análisis realizados solo para los tres marcadores polimórficos codominantes (**M_dent1**, **M_dent2** y **A_bart25**).

Cuadro 4. Lista de SNP que amplificaron en *M. denticulata*.

Nombre del SNP	Secuencia de oligonucleótidos	Secuencias de Sondas MGB TaqMan®
SNP M_dent (1)	Forward: CACCGGCGCGTGTTG	VIC:CAAGGAACCTGAACGAA
	Reverse: CGCGCGCACCGTTTT	FAM: AAGGAACCCGAACGAA
SNP M_dent (2)	Forward: CCCGAGAACCAGTTTCAACGT	VIC: CCCGAAAGCCCGCC
	Reverse: CGGACTCCCGGATAAGG	FAM: CCGAAGCCCGCC
SNP A_bart 25	Forward: CGACCCGAGAACCAGTTTCAA	VIC:CGGGAGCTGCTCC
	Reverse: GCGCCGGTGTTTGTGTTGT	FAM: CGGGAGCCGCTCC
SNP Per_ramo 10	Forward: GTTGGATAATGTAGGTTATGACACTAAATATAGTT TACT	VIC: ACGTTTAATTAGTCGAATGTA
	Reverse: CATTAGCGGAAATTATCAAATGATTCTGTTGA	FAM: ACGTTTAATTATTTCGAATGTA
SNP Crat_riv07	Forward: CTGCTTTTTAAAATAGTATTTCCCCTGCTT	VIC: CCATTGATAGCAAATGAT
	Reverse: GTGCAAATCCAATCAACTCCGTTTTAA	FAM: CCATTGATAGGAAATGAT
SNP M_domes	Forward: TTTACGCAGCAATATCAGCCG Reverse: CGTAAACAACCTGTCAGGAGGATCT	VIC: TGCCTGCAACTCTA FAM: TGCCTGCCACTCTA

Cuadro 5. Porcentaje de loci polimórficos, número de alelos y número efectivo de alelos, índice de Shannon, frecuencias genotípicas y alélicas por población.

Poblaciones	Loci polimórficos (%)	Número de alelos (A)	Número efectivo de Alelos (Ae)	Índice de Shannon (S)	Frecuencias				
					Genotipos			Alelos	
					A1A1	A1A2	A2A2	A1	A2
Santo Domingo Yanhuitlán	33.333	1.333	1.0732	0.1084	0.933	0.067	0.000	0.967	0.033
Santo Domingo Yanhuitlán-Cárcavas	16.667	1.000	1.0000	0.0000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.000
Villa de Díaz Ordaz	16.667	1.000	1.0000	0.0000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.000
San Pablo Huitzo	16.667	1.000	1.0000	0.0000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.000
Ixtlán de Juárez	33.333	1.333	1.3167	0.2268	0.680	0.253	0.067	0.807	0.193
Teotitlán del Valle	50.000	1.667	1.3444	0.2827	0.693	0.307	0.000	0.847	0.153
Paraje Xía en San Juan Chicomezúchil	50.000	1.667	1.2985	0.2505	0.747	0.253	0.000	0.873	0.127
Promedio	30.952	1.238	1.1475	0.1240	0.865	0.126	0.010	0.928	0.072

2.3.3 Heterocigosidad observada y esperada en equilibrio H-W

La población con mayor heterocigosidad promedio observada fue Teotitlán del Valle seguido de Ixtlán de Juárez y Paraje Xía. Por el contrario, la menor heterocigosidad observada corresponde a Santo Domingo Yanhuitlán; el resto de las poblaciones fueron totalmente homocigotas debido a su monomorfismo (Cuadro 6).

Cuadro 6. Estimaciones de heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) en equilibrio H-W por loci polimórficos y por poblaciones.

Locus	Estimador	Poblaciones							Promedio
		Santo Domingo Yanhuitlán	Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas	Villa de Díaz Ordaz	San Pablo Huitzo	Ixtlán de Juárez	Teotitlán del Valle	Paraje Xía en San Juan Chicomezúchil	
M_dent1	Ho	0.200	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.028
	He	0.183	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.026
M_dent2	Ho	0.000	0.000	0.000	0.000	0.760	0.880	0.720	0.337
	He	0.000	0.000	0.000	0.000	0.497	0.502	0.470	0.209
A_bart25	Ho	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.040	0.040	0.011
	He	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.040	0.040	0.011
Promedio	Ho	0.066	0.000	0.000	0.000	0.253	0.306	0.253	0.125
	He	0.061	0.000	0.000	0.000	0.165	0.180	0.170	0.082

2.3.4 Desequilibrio de ligamiento (DL)

Los resultados de la prueba de DL indican que no existe evidencia significativa de ligamiento entre los pares de loci analizados (Cuadro 7). Aun cuando los SNPs (de los loci M_dent1, M_dent2 y A_bart25) se encuentran físicamente muy cercanos en el gen 5.8S ribosomal RNA.

Cuadro 7. Prueba de desequilibrio de ligamiento (DL) entre pares de loci polimórficos.

Locus	Estimador	Poblaciones						
		Santo Domingo Yanhuitlán	Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas	Villa de Díaz Ordaz	San Pablo Huitzo	Ixtlán de Juárez	Teotitlán del Valle	Paraje Xía en San Juan Chicomezúchil
Par(0, 1)	DL	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	P	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Par(0, 2)	DL	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	P	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Par(1, 2)	DL	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-22.66	-24.05
	P	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.49	0.49

* $P \leq 0.05$ (0,1) M_{dent1} y M_{dent2} ; (0,2) M_{dent1} y A_{bart} ; (1,2) M_{dent2} y A_{bart25} .

2.3.5 Distancia genética entre poblaciones

Las distancias genéticas (F_{ST}) por pares de poblaciones, muestran diferencias significativas para Teotitlán del Valle, Paraje Xía e Ixtlán de Juárez con base en los pares establecidos con las otras poblaciones. La población de Ixtlán de Juárez fue la más diferenciada del resto de las poblaciones analizadas. Las poblaciones de Santo Domingo Yanhuitlán y Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas son estadísticamente diferentes entre sí. En cambio, las poblaciones genéticamente más relacionadas entre sí, son Teotitlán del Valle y Paraje Xía (Cuadro 8).

Cuadro 8. Comparación de las distancias genéticas (F_{ST}) por pares de poblaciones para los tres loci polimórficos.

	Santo Domingo Yanhuitlán	Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas	Villa de Díaz Ordaz	San Pablo Huitzo	Ixtlán de Juárez	Teotitlán del Valle	Paraje Xía en San Juan Chicomezúchil
Santo Domingo Yanhuitlán	0.00000						
Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas	0.08163*	0.00000					
Villa de Díaz Ordaz	0.08163	0.00000	0.00000				
San Pablo Huitzo	0.08163	0.00000	0.00000	0.00000			
Ixtlán de Juárez	0.49940*	0.57143*	0.57143*	0.57143*	0.00000		
Teotitlán del Valle	0.35131*	0.40994*	0.40994*	0.40994*	0.01813*	0.00000	
Paraje Xía en San Juan Chicomezúchil	0.27721*	0.32868*	0.32868*	0.32868*	0.07140*	-0.00791	0.00000

* $P \leq 0.05$

2.3.6 Agrupamiento por pares usando la media aritmética (UPGMA)

De acuerdo con la similitud genética, las siete poblaciones se dividen en dos grupos. El primer grupo incluye las poblaciones de Villa Díaz Ordaz, San Pablo Huitzo, Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas y Santo Domingo Yanhuitlán. El segundo grupo incluye las poblaciones de Teotitlán del Valle, Paraje Xía e Ixtlán de Juárez (Figura 4). Esto grupos además de su similitud genética comparten cierto patrón de precipitación.

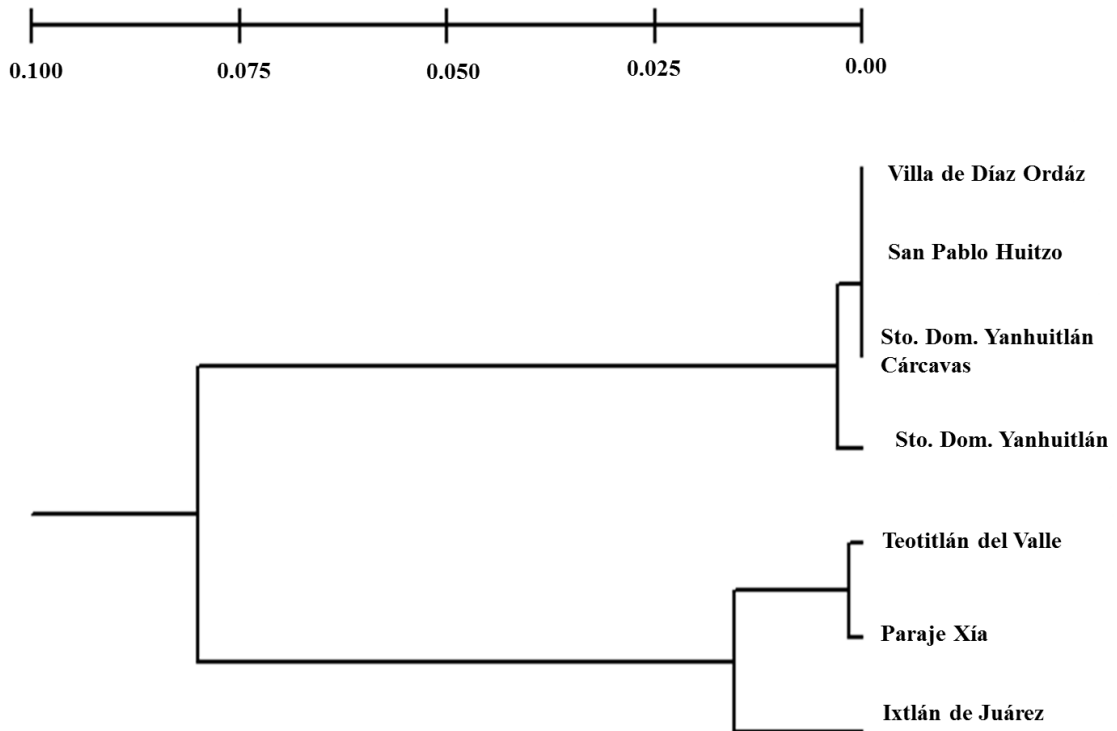


Figura 4.- Fenograma basado en las distancias genéticas por pares usando UPGMA.

2.3.7 Índices de endogamia y estructura genética

Los estadísticos F (coeficiente de endogamia) para los tres loci, mostró un valor negativo en la endogamia en una población subdividida con respecto al total (F_{IT}), y no fue significativamente diferente de cero, este estimador sugiere que al menos se tienen dos procesos evolutivos actuando sobre las poblaciones. La endogamia dentro de poblaciones (F_{IS}) mostró un valor negativo estadísticamente significativo. Este valor indica un exceso de heterocigotos. Finalmente, la endogamia de la subdivisión entre poblaciones (F_{ST}) fue positivo y significativo, y muestra que las poblaciones están genéticamente diferenciadas. El valor G_{ST} promedio indica que sólo un 30% del total de la diversidad genética se debe a diferencias entre las poblaciones (Cuadro 9).

Cuadro 9. Valores del estimador G_{ST} y los estadísticos F de Wright: F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} por cada locus polimórfico con un intervalo de confianza del 95% por re-muestreo (bootstrapping).

Loci	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}	G_{ST}
M_den1	-0.000	0.083	-0.091	0.072
M_den2	-0.001	0.376	-0.604	0.340
A_bart	-0.004	0.009	-0.014	0.008
Total	-0.001	0.337	-0.510	0.303
Intervalo de confianza al 95%, por el método bootstrapping				
	0.0000	0.3758	-0.0141	
	-0.0045	0.0095	-0.6037	

El AMOVA mostró que los índices F_{ST} y F_{SC} tienen valores significativos para los tres criterios de agrupación. Esto indica que la variación genética de los individuos se encuentra entre genotipos individuales entre poblaciones, entre y dentro de grupos. La mayor variación genética se encuentra dentro de poblaciones aproximadamente un 60%. El índice F_{CT} no fue significativo para los criterios de clasificación por tipo de vegetación y densidad de *M. denticulata*. Sin embargo, el criterio de agrupación por precipitación mostró un valor de F_{CT} significativo y representa un 44 % de variación entre grupos, este criterio de agrupación es por lo tanto el mejor criterio ecológico de los utilizados para caracterizar la estructura genética interpoblacional de *M. denticulata* (Cuadro 10).

Cuadro 10. Análisis molecular de varianza aplicado con diferentes criterios de agrupación en las siete poblaciones de *M. denticulata*.

Análisis Molecular de varianza (AMOVA)									
Fuente de variación	Precipitación *Grupo 1; **Grupo 2			Tipo de vegetación ***Grupo 3; †Grupo 4 y ††Grupo 5 y †††Grupo 6			Densidad de <i>M. denticulata</i> ††Grupo 5; ‡Grupo 7 y ‡‡Grupo 8		
	Porcentaje de variación	Índice de fijación	P	Porcentaje de variación	Índice de fijación	P	Porcentaje de variación	Índice de fijación	P
Entre grupos	44.92	F_{CT} :0.44922	0.024*	6.4414	F_{CT} : 0.0644	0.43	22.5864	F_{CT} : 0.2258	0.15
Entre poblaciones dentro de grupos	1.74	F_{SC} :0.03156	0.000*	28.1089	F_{SC} : 0.3004	0.00*	14.9084	F_{SC} :0.1925	0.00*
Dentro de poblaciones	53.34	F_{ST} :0.46660	0.000*	65.4496	F_{ST} : 0.3455	0.00*	62.5051	F_{ST} : 0.3749	0.00*

* $P \leq 0.05$ *Grupo 1: Santo Domingo Yanhuitlán, Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas, Villa de Díaz Ordaz y San Pablo Huitzo; **Grupo 2: Ixtlán de Juárez, Paraje Xía en San Juan Chicomezúchil y Teotitlán del Valle; ***Grupo 3: Santo Domingo Yanhuitlán y Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas, †Grupo 4: San Pablo Huitzo y Paraje Xía en San Juan Chicomezúchil; ††Grupo 5: Villa de Díaz Ordaz y Teotitlán del Valle; ††† Grupo 6: Ixtlán de Juárez; ‡Grupo 7: Santo Domingo Yanhuitlán, Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas y San Pablo Huitzo y ‡‡Grupo 8: Ixtlán de Juárez y Paraje Xía en San Juan Chicomezúchil.

El método de agrupación Bayesiano sugiere un valor de $K = 2$ como el número de poblaciones más probable de acuerdo con la agrupación genética basada en el método de la Evanno et al. 2005 (Figura 5).

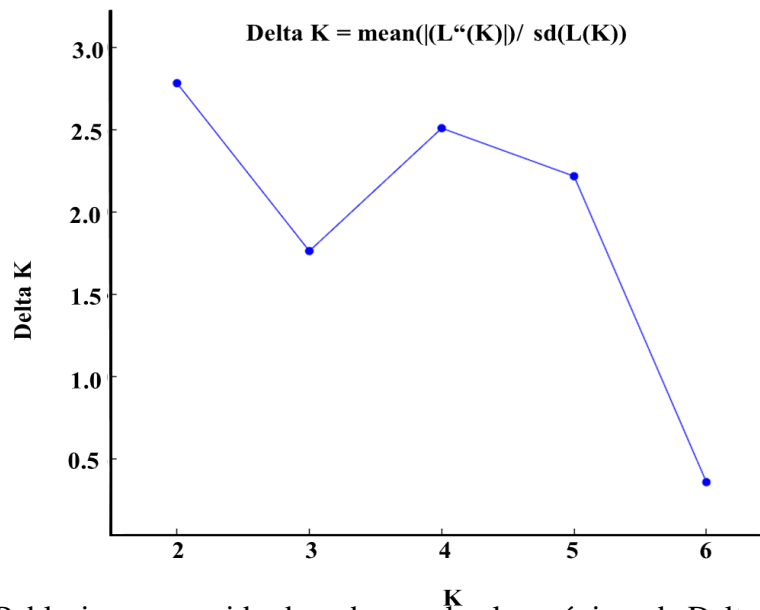


Figura 5. Poblaciones sugeridas basadas en el valor máximo de Delta K, con el uso del programa Structure Harvester (Earl y von Holdt, 2012).

2.3.8 Correlación de la distancia geográfica y los factores ambientales con la diversidad genética

Los resultados de la prueba de Mantel indican que no existe una correlación entre las distancia genética y geográfica de las poblaciones de *M. denticulata* ($R^2=2.59\%$, $P=0.8120$), por lo tanto no hay evidencia de aislamiento por distancia entre ellas. Respecto a las variables ambientales de precipitación, temperatura, altitud y densidad de *M. denticulata*, se encontró que la variable de precipitación está asociada con la estructura genética de las poblaciones de *M. denticulata*, ya que muestra una correlación estadísticamente significativa (Cuadro 11).

Cuadro 11. Valores del coeficiente de determinación (R^2) en la prueba de Mantel para las variables ambientales.

Variables	R^2 (%)	Valor de P
Precipitación	38.26	0.0378*
Altitud	15.12	0.0807
Temperatura	15.63	0.0708
Densidad	10.97	0.1001

* $P \leq 0.05$

DISCUSIÓN

3.1 Diversidad genética

La mayor diversidad genética se encontró en las poblaciones de Teotitlán del Valle y Paraje Xía de San Juan Chicomezúchil, ya que ambas mostraron el mayor polimorfismo genético, la mayor heterocigosidad observada, así como los valores más altos del índice de Shannon. En seguida, la población de Ixtlán de Juárez y finalmente la población de Santo Domingo Yanhuitlán. Estos resultados difieren de lo reportado por Bautista (2012) quién con un método aloenzimático, encontró la mayor diversidad genética en las poblaciones de Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas y San Pablo Huitzo. Otra investigación, realizada por Ramírez (2009); con técnicas de genética cuantitativa; sugiere la presencia de mayor variabilidad en las poblaciones de Santo Domingo Yanhuitlán y San Pablo Huitzo. En cambio, en este estudio las poblaciones de Villa de Díaz Ordaz, Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas y San Pablo Huitzo presentaron la menor diversidad genética. La disimilitud de resultados radica probablemente en la naturaleza de los marcadores utilizados por los autores, dado que el polimorfismo expresado por este tipo de marcadores, puede variar bajo ciertas condiciones ambientales, y representan un método indirecto de las variaciones en el ADN (Becerra y Paredes, 2000; Lowe *et al.*, 2007; Schlotterer, 2004; Solís y Andrade, 2005).

La diversidad genética encontrada en este estudio, apoya el trabajo realizado por Hernández *et al.* (2011), quienes sugieren que la variación observada en algunos rasgos morfológicos de *M. denticulata* tiene una base genética que favorece la adaptación y la diferenciación genética entre las poblaciones. Debido a que efectivamente se tienen distintos genotipos adaptados a ambientes con condiciones ecológicas contrastantes, dando origen a un proceso de adaptación local (McGaughan *et al.*, 2014).

3.2 Diferenciación genética de poblaciones y su relación con factores ambientales

La diferenciación genética entre poblaciones por pares (F_{ST}) muestra que las poblaciones que parecen estar genéticamente diferenciadas son Santo Domingo Yanhuitlán, Teotitlán del Valle, Paraje de Xía e Ixtlán de Juárez con respecto al resto de las poblaciones. La población de Ixtlán de Juárez fue genéticamente la más diferente del resto de las poblaciones. Estas diferencias genéticas observadas en esta población, sugieren una relación con la precipitación, ya que está variable mostró un coeficiente de regresión significativo, debido a que es la zona con mayor precipitación anual. Este posible efecto ha sido observado en otros estudios (Hu *et al.*, 2010; Still *et al.*, 2005), en donde los valores más altos de F_{ST} están en las zonas de mayor precipitación. Así mismo, se ha encontrado que la variación en el tamaño del fruto de *M. denticulata* está significativamente relacionado con la cantidad y distribución de la precipitación (Cruz, 2005), esto a su vez quizá

influya en la producción de semillas. La diversidad genética quizá es favorecida en poblaciones con mayor precipitación, probablemente porque una mayor disponibilidad de agua sugiere menos limitaciones hídricas para el metabolismo de esta especie, esto favorecería la supervivencia de las plántulas y la probabilidad de que éstas lleguen al estado adulto, sea más alta. Además de que el agua, es uno de los elementos más importantes en los procesos fisiológicos de las plantas.

Las poblaciones de Santo Domingo Yanhuítlán Cárcavas, Villa de Díaz Ordaz, y San Pablo Huitzo, son genéticamente similares en los marcadores usados. Esta similitud puede estar asociada a su homocigosidad, ya que probablemente los genotipos homocigóticos estén mejor adaptados a las condiciones ambientales en dichos sitios. Debido a que estas localidades presentan poca precipitación y en especial la población de Santo Domingo Yanhuítlán Cárcavas, presenta altos grados de erosión y perturbación por parte del ganado caprino. Estas condiciones representan presiones de selección para *M. denticulata*, forzándola a adaptarse a estas condiciones ambientales. La selección natural es quizá la principal fuerza evolutiva que está depurando los genotipos en esta especie. La selección natural favorece los genotipos más adecuados para crecer y reproducirse en un ambiente determinado y dentro de ese ambiente, se tiende a preservar e incrementar la proporción de genotipos más adaptados. Cuando una especie crece en una gran variedad de ambientes, la selección natural favorece el desarrollo de diferentes genotipos adaptados a distintos ambientes (Turrialba, 1995), probablemente, es lo que está ocurriendo en el caso de *M. denticulata*. Además, la reducida densidad de *M. denticulata* en las poblaciones de Santo Domingo Yanhuítlán Cárcavas y San Pablo Huitzo, pudo haber dado lugar a un flujo de polen y semillas limitado dentro de estas poblaciones y por lo tanto contribuir a la pérdida de su diversidad genética (Farwig *et al.*, 2008).

Recientemente se ha documentado que el ambiente y la selección natural pueden producir ecotipos dentro de una especie, especialmente adaptados a un ambiente particular. Quizá este fenómeno está ocurriendo en estas poblaciones (los ecotipos, son individuos que difieren genéticamente entre sí, restringidos a un hábitat específico) (Hufford y Mazer, 2003; Stofella *et al.*, 1998).

El análisis de correlación no mostró evidencia de aislamiento por distancia entre las poblaciones estudiadas en la escala estudiada. Esto sugiere un efecto menor de la deriva génica, y muestra que el flujo génico tiene una mayor influencia entre las poblaciones (Hutchison y Templeton, 1999). Esto habla de un buen sistema de dispersión de semillas, e indica que aparentemente los eventos de dispersión de semillas son frecuentes y que sus dispersores se mueven largas distancias. Estos sucesos se favorecen porque se trata de frutos carnosos y de color rojo, haciéndolos sumamente atractivos para especies frugívoras, principalmente aves. Esto permite sugerir que efectivamente, las diferencias genéticas observadas entre las poblaciones de *M.*

denticulata, posiblemente sean el resultado de un proceso de selección natural. Este proceso aparentemente domina sobre la deriva génica, ya que los sitios con condiciones ecológicas similares son genéticamente similares entre sí, comparados con aquellos que comparten poca similitud ecológica.

3.3 Estructura genética de poblaciones

Los valores de los estimadores F_{ST} , F_{IS} y F_{IT} para los tres loci aquí analizados, son comparables con lo reportado por Bautista (2012) y Torres *et al.* (2013). En este estudio, el valor de F_{ST} sugiere que las poblaciones se encuentran genéticamente diferenciadas (efecto de Wahlund) (Johnson y Black, 1984). La diferenciación genética aparentemente no está causada por aislamiento por distancia, sino más bien por un proceso de selección natural o quizá un cuello de botella particularmente en la población de Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas. El valor de F_{ST} concuerda con el índice G_{ST} , lo que sugiere que aproximadamente entre el 30 y el 33 % de la variación genética detectada se debe a diferencias entre poblaciones y que la mayoría de la diversidad genética se encuentra dentro de las poblaciones (entre 67 y 70 %).

El valor negativo de F_{IS} para los tres loci, muestra que existe un exceso de heterocigotos (Rodríguez *et al.*, 2013), con respeto al equilibrio Hardy-Weinberg. Probablemente esto se deba a una depresión endogámica en la que genes dominantes aumentan el vigor de los individuos heterocigotos (Jenkins, 1985). La sobredominancia es un factor importante que conduce a la depresión por endogamia dentro de poblaciones, aunque también puede ser causada por dominancia de alelos recesivos o deletéreos que se expresan en estado homocigoto (Charlesworth y Charlesworth, 1987; Charlesworth y Willis, 2009; Eguiarte *et al.*, 2009). La depresión endogámica es uno de los principales factores que impiden la evolución hacia la autofecundación (Busch, 2005). Por lo tanto poblaciones con alta depresión endogámica tenderán hacia la fecundación cruzada y eso favorece que se incrementen los individuos heterocigotos. Además, probablemente la selección natural (balanceada), mantiene las frecuencias de los alelos sobredominantes y favorecería a los heterocigotos sobre los dos homocigotos (Charlesworth y Willis, 2009; Cheptou y Donohue, 2011).

Recientemente, se ha propuesto que la depresión endogámica es dependiente del ambiente, ya que se reportan diferencias en la aptitud cuando cambia el ambiente, dependiendo si la progenie es o no consanguínea. Dado que ambientes más estresantes a menudo magnifican la depresión endogámica en los descendientes, que son el resultado de una progenie consanguínea, ya que son más sensibles al estrés. En cambio, la depresión por endogamia es más baja en condiciones de estrés, cuando la progenie es resultado de cruza no consanguíneas ya que sus descendientes son capaces de utilizar el ambiente a su favor, para incrementar su aptitud (Cheptou y Donohue, 2011). Este fenómeno quizá se está presentando en diferentes niveles en las poblaciones de *M. denticulata*,

dado que algunas poblaciones están sujetas a condiciones más estresantes que otras, como las poblaciones de Santo Domingo Yanhuítlán, en comparación con la localidad de Ixtlán de Juárez.

Si bien, el sistema de reproducción de *M. denticulata* no es bien conocido, los resultados aquí presentados indican que posiblemente su sistema reproductivo sea exogámico, lo cual podría favorecer los altos niveles de diferenciación genética dentro de las poblaciones. No obstante, en este género se ha reportado que la producción de semilla puede ser asexual mediante apomixis (Campbell *et al.*, 1987), siendo éste un proceso que como la clonalidad, perpetúa la composición genética de un individuo (Quero *et al.*, 2010). Por lo tanto; si los individuos heterocigotos se reproducen apomícticamente sus descendientes también serán heterocigotos ya que en esencia son clones.

Otra posible explicación para el exceso de heterocigotos observados, es que posiblemente *M. denticulata* presente algún mecanismo de autoincompatibilidad gametofítica, tal y como se ha reportado para otras rosáceas de los géneros *Malus*, *Pyrus* y *Prunus* (Kim *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2009; Tsukamoto *et al.*, 2008). Este mecanismo impide la formación de individuos homocigotos, debido a que al menos se tienen tres alelos y todos los individuos son heterocigotos en los alelos del locus S (Kato y Mukai, 2004, Mariette *et al.*, 2010, García *et al.*, 2013 y Glémin *et al.*, 2005), aunque en realidad los homocigotos no son suprimidos por completo a menos que otros genes de otras partes del genoma estuvieran completamente ligados. Inferir la presencia de un sistema de autoincompatibilidad en *M. denticulata*, está apoyado por el hecho de que en este estudio se identificó un SNP (M_domes) asociado con el gen (S33-RNase) que codifica una proteína con actividad de ribonucleasa conocida como S-RNasa. Esta enzima ha sido identificada en *Prunus*, *Pyrus* y *Malus*, y participa en la regulación del sistema de autoincompatibilidad gametofítica (Jiménez y Cruz, 2011). El hecho de haber identificado al menos un alelo relacionado con esta enzima, sugiere que posiblemente *M. denticulata* está vinculada con algún sistema de autoincompatibilidad muy similar al observado en *Malus*, ya que ambas especies comparten genes comunes. Esto sugiere un origen ancestral de este sistema de autoincompatibilidad previo a la separación filogenética de estos dos géneros.

El valor de F_{IT} no fue significativamente diferente de cero, esto sugiere que se tienen dos procesos que actúan en sentidos opuestos sobre las poblaciones, lo que provoca de alguna manera, balance entre estos dos factores, dando un valor igual a cero del estimador. Por un lado, posiblemente, dentro de poblaciones la depresión endogámica, y los sistemas de autoincompatibilidad gametofítica están favoreciendo el exceso de heterocigotos. Por otra parte, la diferenciación entre poblaciones es causada por el efecto Wahlund, como resultado de la selección

natural a nivel interpoblacional (Johnson y Black, 1984). La interacción de estos dos procesos quizá sea antagónica lo que explicaría que el estimador F_{IT} no sea significativo.

El AMOVA reveló la presencia de una estructura genética significativa asociada con los niveles de precipitación en las poblaciones, ya que mostró un valor de F_{CT} estadísticamente significativo. Los patrones de variación genética de las poblaciones, no parecen estar determinados por el tipo de vegetación de sus sitios, ni por la densidad de *M. denticulata*. Los índices de fijación F_{ST} y F_{SC} , así como los valores de F (coeficiente de endogamia), muestran que existe variación genética dentro y entre poblaciones, siendo esta variación mayor dentro de poblaciones. Esto último, refuerza lo sugerido anteriormente, respecto al flujo genético poco restringido entre poblaciones.

El análisis bayesiano para la estructura genética de *M. denticulata*, muestra que el valor de K (poblaciones) al que se ajustan mejor los datos genéticos de este estudio es $K=2$ (Figura 5). Estos resultados revelan evidencia de que posiblemente los individuos mezclados de cada población provienen de dos grupos ancestrales. Este valor $K=2$ parece coincidir con el análisis de UPGMA, en donde se visualizan dos posibles grupos. Esta agrupación además de su similitud genética, quizá puede ser explicada por la similitud en las tasas de precipitación, esta estructura coincide con los resultados del AMOVA. Un primer grupo con precipitaciones promedio de 653.5 mm. Un segundo grupo con precipitaciones promedio de 848.6 mm. Además, ambos grupos incluyen poblaciones asociadas con diferentes tipos de vegetación, lo cual sugiere que la similitud genética entre poblaciones es independiente del tipo de vegetación, esto refuerza lo encontrado en el AMOVA para el criterio de tipo de vegetación. Estos resultados sugieren que la precipitación parece estar jugando un papel importante en la estructura genética de *M. denticulata*, ya que los individuos de estos dos grupos, muestran similitudes genéticas asociadas a este factor ambiental, este efecto ha sido reportado en otros estudios (Hu *et al.*, 2010; Still *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2013).

3.4 Implicaciones en restauración

Los resultados sugieren que la distribución de *M. denticulata* en ambientes heterogéneos se debe probablemente a la variación genética entre sus individuos (es decir, a su polimorfismo) y no a un fenómeno de plasticidad fenotípica. Esto tiene implicaciones importantes en programas de restauración ya que para recomendar a *M. denticulata*, es necesario tener identificado sus genotipos y su relación con las características ambientales de los sitios, específicamente su precipitación. Los resultados de esta investigación muestran que no existe un genotipo ideal de *M. denticulata* para todos los ambientes. Debido a que algunos genotipos son aptos bajo ciertas condiciones ambientales, tal es el caso de las poblaciones de Ixtlán de Juárez, Teotitlán del Valle y Paraje de Xía de San Juan Chicomezúchil, en las cuales se detectó una alta diversidad genética aparentemente

asociada con niveles de precipitación altos. Por su variación genética, estas poblaciones podrían ser empleadas como fuente de semilla para restaurar entornos con condiciones ambientales similares a estas poblaciones, principalmente en términos de precipitación. Con base en, sus características ambientales estos genotipos, no son recomendables para zonas con déficit hídrico o donde las temperaturas son más altas y las precipitaciones escasas, ya que difícilmente se adaptarían a estas condiciones. En cambio, sí se emplearan individuos de las poblaciones de Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas, cuyos genotipos están adaptados a condiciones ambientales extremas, se aumentarían las probabilidades de sobrevivencia. Considerando que en una estrategia de restauración el principal objetivo es introducir especies que se establezcan exitosamente, para acelerar el proceso de regeneración y aumentar la cobertura vegetal, y con ello recobrar ciertos procesos ecosistémicos (Lesica y Allendorf, 1999), pero para lograr esto, se deben superar las condiciones ambientales.

También se debe tener presente el sistema de autoincompatibilidad gametofítica asociado con *M. denticulata*, ya que no es recomendable en un proyecto de restauración establecer individuos homocigotos debido a que probablemente se reduzca la producción de semilla (a menos que realmente *M. denticulata* se reproduzca por apomixis). Con base en, esta característica es más adecuado introducir individuos heterocigotos ya que es más probable que la diversidad genética se mantenga dentro de las poblaciones y esta es fundamental para la adaptación. Además, otra ventaja de emplear a esta rosácea en programas de restauración es la existencia de varios mecanismos de reproducción y dispersión que posee, pues favorecerían el establecimiento de nuevas poblaciones, o bien, el aumento de las ya existentes. Así mismo, *M. denticulata* es una especie nativa del país, y por lo tanto representa una opción aceptable para proyectos de restauración, ya que recientemente se ha incrementado el uso de especies nativas para programas de restauración por varias razones, entre ellas, porque algunos animales e insectos requieren específicamente especies nativas como alimento, además de que la probabilidad de adaptación de especies nativas es más alta, y con ello se evita la invasión de especies exóticas (Lesica y Allendorf, 1999).

En conjunto, las características genéticas y ecológicas de *M. denticulata*, permiten considerarla una especie con potencial para programas de restauración ecológica. Si bien es cierto que las recomendaciones para restauración ecológica dependerán de las características del sitio a restaurar, tales como su grado de disturbio, las condiciones ambientales, así como de los costos que esto implica, se debe tener presente que el conocimiento sobre la diversidad genética de la especie a usar para restaurar, es fundamental porque influye en la forma en que sus individuos interactúan con el entorno físico y con otras especies, y su funcionamiento dentro de los ecosistemas. Los ecólogos de la restauración no deben pasar por alto la variabilidad genética, ya que sería ignorar una fuerza

fundamental que da forma a la ecología de los organismos vivos (Falk *et al.*, 2006). Utilizar adecuadamente la diversidad genética de las poblaciones es un desafío para la restauración ecológica.

CONCLUSIONES

- Con base en los estadísticos F de Wright, las poblaciones de *M. denticulata*, presentan una diferenciación genética dentro y entre poblaciones.
- De acuerdo con el análisis de ligamiento efectuado, los tres SNPs nucleares que amplificaron en *M. denticulata*, no se encuentran ligados a pesar de localizarse en el mismo gen 5.8S ribosomal RNA.
- La estructura y variación genética de las poblaciones de *M. denticulata* está relacionada significativamente con los niveles de precipitación de los sitios donde esta planta crece.
- No se encontró evidencia de aislamiento por distancia entre las poblaciones estudiadas de *M. denticulata*.
- Existe un exceso de heterocigotos dentro de las poblaciones probablemente asociado a la acción de dos procesos importantes, la depresión por endogamia y los sistemas de autoincompatibilidad gametofítica.
- La selección natural es la principal fuerza evolutiva que causa diferenciación genética entre las poblaciones de *M. denticulata*.
- La capacidad de adaptación de *M. denticulata* se debe a su polimorfismo y no a un proceso de plasticidad fenotípica.
- Con base en el valor de K obtenido, el dendrograma y el AMOVA basado en precipitación, se pueden distinguir dos grupos genéticos, en las siete poblaciones estudiadas de *M. denticulata*.
- Para trabajos de restauración se recomienda que el sitio a restaurar y el o los sitios de donde se extraiga la semilla compartan precipitaciones similares, y usar semilla con diversidad genética alta para disminuir los riesgos de baja producción de semilla por autoincompatibilidad o depresión endogámica.

RECOMENDACIONES

- ✓ Se recomienda continuar con la detección de SNPs como marcadores moleculares para estudios de diversidad genética en poblaciones silvestres de plantas, así mismo, buscar métodos más eficientes para su detección.
- ✓ Es necesario documentar con base científica los sistemas de reproducción de *M. denticulata* y con ello verificar si estos tienen alguna relación con la diversidad genética de sus poblaciones.
- ✓ Se requiere comprobar con más estudios genéticos si *M. denticulata*, tiene un mecanismo de autoincompatibilidad gametofítica, el cual favorece la polinización cruzada o exogamia.
- ✓ Aun se requieren estudios que sustenten el origen poliploide de *M. denticulata* y su relación con la capacidad de adaptación a ambientes extremos.
- ✓ El potencial de *M. denticulata* para la restauración de ecosistemas, debe ser sustentado con otros estudios de campo donde se evalúen características del suelo, la cobertura vegetal, así como su capacidad para fungir como especie nodriza.
- ✓ Una vez seleccionada las poblaciones que puedan ser fuente de germoplasma para un programa de restauración y, con base en los estudios sobre la capacidad de germinación de las semillas que ya existen, es necesario evaluar el crecimiento de plántulas en vivero y su sobrevivencia después del trasplante en campo.
- ✓ Se sugiere utilizar individuos heterocigotos de *M. denticulata*, ya que es más probable que la diversidad genética se mantenga dentro de poblaciones, como resultado del sistema de autoincompatibilidad gametofítica, además de que teóricamente la probabilidad de sobrevivencia es mayor en individuos con alta variación genética.

LITERATURA CITADA

- Altieri M., Anta F.S., Caballero J.J., Hernández J.J. (2006). Manejo del agua y restauración productiva en la región indígena Mixteca de Puebla y Oaxaca. Banco Internacional de Reconstrucción y Fomento Banco Mundial. pp. 13-14.
- Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System. (2006). Manual de Experimentos de genotipado. Número de referencia 4377729.
- Aronson J., Floret C., Le Floch E., Ovalle C., Pontanier R. (1993). Restoration and Rehabilitation of Degraded Ecosystems in Arid and Semi-Arid Lands. A View from the South. Society for Ecological Restoration. 8-17.
- Bautista C.N. (2012). Estudio aloenzimático en poblaciones de *Malacomeles denticulata*, en la región central de Oaxaca, México. Tesis. IPN-CIIDIR, Oaxaca, México. pp. 45-48.
- Becerra V.V., y Paredes C.M. (2000). Use of biochemical and molecular markers in genetic diversity studies. Agricultura Técnica. 60(3): 270-281.
- Begon M., Townsend C.R., Harper J.L. (2006). ECOLOGY: From Individuals to Ecosystems. 4ª Edición. Editorial Blackwell Publishing. Reino Unido. pp. 3-4.
- Busch J.W. (2005). Inbreeding depression in self-incompatible and self-compatible populations of *Leavenworthia alabamica*. Heredity. 94: 159-165.
- Cadien J.D., Hassett M.J., Frielaender J.F. (1978). Linkage disequilibrium in Bougainville Island. American Journal of Physical Anthropology. 48(3): 297-304.
- Campbell C.S., Greene C.W., Bergquist S.E. (1987). Apomixis and sexuality in three species of *Amelanchier*, shadbush (Rosaceae, Maloideae). American Journal of Botany. 74: 321-328.
- Campbell C.S., Evans R.C., Morgan D.R., Dickinson T.A., Arsenault M.P. (2007). Phylogeny of subtribe Pyrinae (formerly the Maloideae, Rosaceae): Limited resolution of a complex evolutionary history. Plant systematics and evolution. 266: 119-145.
- Charlesworth D., y Charlesworth B. (1987). Inbreeding depression and its evolutionary consequences. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics. 18: 237- 68.
- Charlesworth D., y Willis J.H. (2009). The genetics of inbreeding depression. Genetics. 10: 783-796.

- Cheptou P.O., y Donohue K. (2011). Environment-dependent inbreeding depression: its ecological and evolutionary significance. *New Phytologist*. 189: 395-407.
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). (2014). Datos de precipitación y temperaturas anuales de San Pablo Huitzo, Ixtlán de Juárez y Villa de Díaz Ordaz.
- Contreras H., Volke H., Oropeza M., Rodríguez F., Martínez S., Martínez G. (2003). Estado actual y causas de la degradación de los agostaderos en el municipio de Yanhuitlán, Oaxaca. *TERRA Latinoamericana*. 21(3): 427-435.
- Cruz C.E. (2005). Morphological variability and seed dormancy of *Amelanchier* (Rosaceae) grown in Oaxaca, México. Tesis. Oregon State University. pp. 173.
- Earl D.A., y von Holdt B.M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. 4: 359-361.
- Eguiarte L., Nuñez J., Souza V. (2009). La reproducción de angiospermas: Perspectivas ecológicas y evolutivas en el bicentenario de Darwin. En Facultad de ciencias UNAM. *Evolución biológica*. Mexico. pp:147.
- Eguiarte L.E. Castillo A., Souza V. (2003). Evolución molecular y genómica en angiospermas. *Interciencia*. 28(3): 141-147.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 14: 2611-2620.
- Excoffier L., y Lischer H.E. (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- Falk D.A., Richards C.M., Montalvo A.M., Knapp E.E. (2006). Population and ecological genetics in restoration ecology. En: Falk D., Palmer M., Zedler J. *Foundations of restoration ecology: The science and practice of ecological restoration*. Washington, D.C.: Island Press. pp:14-41.
- Falush D., Stephens, M., Pritchard, J. K. (2003). Inference of population structure: Extensions to linked Loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164: 1567-1587.
- Farwig N., Braun C., Böhning G. (2008). Human disturbance reduces genetic diversity of an endangered tropical tree, *Prunus africana* (Rosaceae). *Conservation Genetics*. 9: 317-326.

- García L.E., Bravo C.E., Cruz F. (2013). Evitando el incesto en las plantas: control genético y bioquímico. *Revista Especializada en Ciencias Químico Biológicas*. 16(1): 57-65.
- García M.A.J., Ordoñez D.M.J., Briones S. (2004). Biodiversidad de Oaxaca. 1ª Edición. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 22.
- Ge A.J., Han J., Li X.D., Zhao M.Z., Liu H., Dong Q.H., Fang J.G. (2013). Characterization of SNP in strawberry cultivars in China. *Genetics and Molecular Research*. 12(1): 639-645.
- Glémin S., Gaude T., Guillemin M., Lourmas M., Olivieri I., Mignot A. (2005). Balancing Selection in the Wild: Testing Population Genetics Theory of Self-Incompatibility in the Rare Species *Brassica insularis*. *Genetics Society of America*. 171: 279-289.
- Gottlieb L.D. (1981). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices ver. 2.9.3. Electrophoretic evidence and plant populations. Missouri Botanical Garden Press. 7: 1-46.
- Hernández C.L., Guerra de la Cruz V., Santiago M.G., Cuatlal C.P. (2011). Propagation and Mycorrhization of native plants with soil restoration potential. *Revista Mexicana de Ciencia Forestal*. 2(7): 87-96.
- Hernández M.A., Núñez C.A., Guzmán M.S., Espinosa T., Herrera M.G. (2011). Variabilidad morfológica mediante caracteres de semilla de poblaciones *Amelanchier denticulata* (Kunth) Koch, originarias de Guanajuato, México. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 17(3): 161-172.
- Hu Y., Wang L., Xie X., Yang J., Li Y., Zhang H. (2010). Genetic diversity of wild populations of *Rheum tanguticum* endemic to China as revealed by ISSR analysis. *Biochemical Systematics and Ecology* 38: 264-274.
- Hufford K.M., y Mazer S.J. (2003). Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration. *TRENDS in Ecology and Evolution*. 18(3): 147-155.
- Hutchison W.D., y Templeton R.A. (1999). Correlation of Pairwise Genetic and Geographic Distance Measures: Inferring the Relative Influences of Gene Flow and Drift on the Distribution of Genetic Variability. *Evolution*. 53(6): 1898-1914.
- IBM Corp. Released. (2011). IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.

- Iniesta R., Guinó E., Moreno V. (2005). Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gaceta Sanitaria*, 19(4): 333-341.
- Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática (INEGI). (1984). Carta de efectos climáticos regionales: Mayo-Octubre. E14-9.
- Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática (INEGI). (2008). Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos: San Juan Chicomezúchil, Oaxaca. Clave geoestadística 20191.
- Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática (INEGI). (2008). Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos: Teotitlán del Valle, Oaxaca. Clave geoestadística 20546.
- Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática (INEGI). (2009). Marco Geoestadístico Municipal. Sistema para la consulta del anuario estadístico de Oaxaca.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). 2014. Datos de precipitación y temperaturas anuales de Santo Domingo Yanhuitlán.
- Jenkins J.B. (1985). *Genética*. 2^a. Edición. Editorial Reverte S. A. Barcelona. pp. 666.
- Jensen J.L., Bohonak A.J. Kelley S.T. (2005). Isolation by distance, web service 3.23. *BMC Genetics*. 6: 13.
- Jiménez D.K. y Cruz G.F. (2011). Sexual incompatibility, a genetic mechanism that prevents self-fertilization and contributes to plant diversity. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 34 (1): 1-9.
- Johnson M. S., y Black R.(1984). The Wahlund effect and the geographical scale of variation in the intertidal limpet *Siphonaria* sp. *Marine Biology*. 79: 295-302.
- Kato S. y Mukai Y. (2004). Allelic diversity of S-RNase at the selfincompatibility locus in natural flowering cherry populations (*Prunus lannesiana* var. *speciosa*). *Heredity*. (92): 249-256.
- Keller I., y Largiadér C.R. (2003). Recent habitat fragmentation caused by major roads leads to reduction of gene flow and loss of genetic variability in ground beetles. *Proceedings of the Royal Society of London*. 270: 417-423.
- Kim H.T., Hirata Y., Kim H.J., Nou I.S. (2006). The presence of a new S-RNase allele (S10) in Asian pear (*Pyrus pyrifolia* (Burm; Nakai)). *Genetic Resources and Crop Evolution*. 53: 1375-1383.

- Kim H., Kakui H., Kotoda N., Hirata Y., Koba T., Sassa H. (2009). Determination of partial genomic sequences and development of a CAPS system of the S-RNase gene for the identification of 22 S haplotypes of Apple (*Malus domestica* Borkh.). *Molecular Breeding*. 23: 463-472.
- Lesica P., y Allendorf F.W. (1999). Ecological genetics and restoration of plant communities mix o march?. *Society for Ecological Restoration*. 7(1):42-50.
- Lowe A., Harris S., y Ashton P. (2007). *Ecological genetics: design, analysis and application*. Blackwell, Oxford, United Kingdom. pp:1-5.
- Manel S., Schwartz M.K., Luikart G., Taberlet P. (2003). Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *TRENDS in Ecology and Evolution*. 18(4): 189-197.
- Mariette S., Tavaud M., Arunyawat U., Capdeville G., Millan M., Salin F. (2010). Population structure and genetic bottleneck in sweet cherry estimated with SSRs and the gametophytic self-incompatibility locus. *BMC Genetics*. 11: 77.
- Martella M.B., Trumper E., Bellis L., Renison D., Giordano P., Bazzano G., Gleiser R. (2012). *Manual de Ecología Poblaciones: Introducción a las técnicas para el estudio de las poblaciones silvestres*. Reduca (Biología). Serie Ecología. 5 (1): 1-31.
- McGaughran A., Morgan K., Sommer R.J. (2014) Environmental Variables Explain Genetic Structure in a Beetle-Associated Nematode. *PLoS ONE* 9(1): e87317.
- Miller M.P. (1997). TFGPA Version 1.3. A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Depart of Biological Sci. Northern Arizona University.
- Montaño N.M., y Monroy A. (2000). Conservación ecológica de suelos en zonas áridas y semiáridas de México. *Ciencia y Desarrollo*. 154: 26-37.
- Moore D.S. (2000). *Estadística aplicada básica*. 2ª Edición. Editorial Freeman and Company. Barcelona. pp. 67.
- Nei M., y Li W. (1973). Linkage disequilibrium in subdivided popuiations. *Genetics* .75: 213.
- Niembro A.R. (1990). *Árboles y Arbustos útiles de México*. Universidad Autónoma de Chapingo. Ed. Limusa. México. pp. 45-85.

- Núñez C.A., Hernández M.A., Escobedo L.D., Ortega R.C. (2012). Priority areas to collect germplasm of *Malacomeles* (Rosaceae) in Mexico based on diversity and species richness indices. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*. 10(2): 128-133.
- Núñez C.A., y Hernández M.A. (2011). The Mexican serviceberry (*Amelanchier denticulata*): a new potential berry fruit crop from semi-arid areas. *Acta Horticultura*. 918: 917-924.
- Piñero D., Barahona A., Eguiarte L., Rocha A. y Salas E. (2008). La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, en *Capital natural de México, Vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad*. CONABIO. México, pp. 415-435.
- Plan Desarrollo Municipal (PDM). (2005). Plan para el Desarrollo Integral, Sustentable y Pluricultural Ixtlán de Juárez, Oaxaca. Consultado el 28 abril del 2014.
- Plan de Desarrollo Municipal (PDM). (2008). Consejo Municipal de Desarrollo Rural del municipio de San Juan Chicomezuchil, Ixtlán, Oaxaca. Consultado el 6 de octubre del 2014
- Plan de Desarrollo Municipal (PDM). (2008). Santo Domingo Yanhuitlán, Nochixtlán, Oaxaca. Consultado el 26 abril del 2014.
- Plan Desarrollo Municipal (PDM). (2011). Plan Municipal Desarrollo Rural Sustentable del municipio de Villa Díaz Ordaz, Tlacolula, Oaxaca. Consultado el 28 abril del 2014.
- Plan Desarrollo Municipal (PDM). (2012). Teotitlán del Valle, Oaxaca. Consultado el 08 de octubre del 2014.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155: 945-959.
- Quero C.A., Enríquez Q.J., Morales N.C., Miranda J.L. (2010). Apomixis importance for tropical forage grass selection and breeding. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 1(1): 25-42.
- Ramírez I.J. (2009). Variabilidad genética en poblaciones de *Amelanchier denticulata* en Oaxaca, México. Tesis. IPN-CIIDIR Oaxaca, México. pp. 48.
- Ren J., Chen L., Sun D., You F.M., Wang J., Peng Y., Nevo E., Beiles N., Sun D., Luo M., Peng J. (2013). SNP-revealed genetic diversity in wild emmer wheat correlates with ecological factors. *BMC Evolutionary Biology*. 13: 169.

- Rodríguez C. N., López A. Echeverri Z. J. (2013). Population genetic structure of bovine lactoferrine gen in holstein breed of Antioquia Department. *Revista MVZ Córdoba*. 18(1): 3355-3361.
- Saunders D.A., Hobbs R.J., Margules C.R. (1991). Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conservation Biology*. 5: 18-32.
- Schlötterer C. (2004). The evolution of molecular markers-just a matter of fashion?. *Nature Reviews Genetics*. 5: 63-69.
- Selvaraj D., Kumar R.S., Sathishkumar R. (2008) Phylogenetic analysis of chloroplast *matK* gene from Zingiberaceae for plant DNA barcoding. *Bioinformation*. 3(1): 24-27.
- Solís R.L. y Andrade T. A.(2005) ¿Qué son los marcadores moleculares?. *La ciencia y el hombre*. 1(8).
- Still D. W., Kim D.H., Aoyama N. (2005). Genetic Variation in *Echinacea angustifolia* Along a Climatic Gradient. *Annals of Botany*. 96: 467-477.
- Stofella S.G., y Collantes P.M. (1998). Variabilidad fenotípica y genética de poblaciones de *Lotus tenuis* que habitan suelos con distinto pH. *Ecología Austral*. 8: 57-63
- Torres H.S., Pérez R.F., Serrano J.M., Villordo P.E., Hernández M., González M., Núñez C.A. (2013). Genetic variability in *Malacomeles denticulata* (Rosaceae) from central Mexico revealed with SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 1573-5109.
- Tsukamoto T.,Potter D.,Tao R., Vieira c.P., Vieira J., Lezzoni F. (2008). Genetic and molecular characterization of three novel S-haplotypes in sour cherry (*Prunus cerasus L.*). *Journal of Experimental Botany*. 59(11): 3169-3185.
- Turrialba C. R. (1995). Mejoramiento forestal y conservación de recursos genéticos forestales. Tomo I. Manual técnico: CATIE. Costa Rica. pp.14
- Wright S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*. 15: 323-54.
- Yang J., Cushman S.A., Yang J., Yang M., Bao T. (2013). Effects of climatic gradients on genetic differentiation of *Caragana* on the Ordos Plateau, China. *Landscape Ecology*. 28 (9): 1729-1741.
- Yeh F. C., Yang R. C., Boyle T. (1967). PopGene32. Alberta Canada. University of Alberta and Center for International Forestry Research.

ANEXOS

Anexo 1. Secuencias seleccionadas del NCBI para el diseño de los SNP.

Organismo	Secuencia	Tipo de ADN	Tipo de mutación	Símbolo	SNP
<i>Malacomeles denticulata</i>	GenBank: JQ392441.1 (590pb)	Genómico	Transición	Y	T/C
	GenBank: U16194.1 (459 pb)	Genómico	Transición	Y	T/C
<i>Amelanchier bartramiana</i>	GenBank: DQ874909.1 (1839pb)	Genómico	Transición	R	G/A
	GenBank: U15191 (460 pb)	Genómico	Transición	Y-2	T/C
<i>Amelanchier canadensis</i>	GenBank: JQ392363.1 (592 pb)	Genómico	Transición	Y	T/C
<i>Crataegus submollis</i>	GenBank: EU500437.1 (633pb)	Genómico	Transversión	S	G/C
<i>Crataegus rivularis</i>	GenBank: EU500323.1 (723 pp)	Cloroplasto	Transversión	S	G/C
<i>Peraphyllum ramosissimum</i>	GenBank: EU025917.1 (1515 bp)	Cloroplasto	Transversión	K	G/T
	GenBank: U16198.1 (461 pb)	Genómico	Transición	Y-4	T/C
<i>Mespilus germánica</i>	GenBank: U16196.1 (468 bp)	Genómico	Transición	Y	T/C
<i>Prunus dulcis</i>	GenBank: EU919662.1 (681 bp)	Genómico	Transición	Y	T/C
<i>Malus x domestica</i>	GenBank: DQ219464.1 (348 pb)	Genómico	Tranversion	M	A/C
<i>Crataegus engelmannii</i>	GenBank: EU500451.1 (633 pb)	Genómico	Transición	Y	T/C
<i>Arabidopsis thaliana</i>	rs346743728 (201 pb)	Genómico	Transición	Y	T/C
<i>Arabidopsis thaliana</i>	rs347305210 (201 pb)	Genómico	Transición	Y	T/C

Anexo 2. Matriz de distancia geográfica (Medida en Kilómetros)

	Santo Domingo Yanhuitlán	Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas	Villa de Díaz Ordaz	San Pablo Huitzo	Ixtlán de Juárez	Teotitlán del Valle	Paraje Xía en San Juan Chicomezúchil
Santo Domingo Yanhuitlán	0.000						
Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas	0.020	0.000					
Villa de Díaz Ordaz	1.030	1.040	0.000				
San Pablo Huitzo	0.490	0.490	0.550	0.000			
Ixtlán de Juárez	0.890	0.900	0.330	0.430	0.000		
Teotitlán del Valle	0.960	0.970	0.070	0.480	0.290	0.000	
Paraje Xía en San Juan Chicomezúchil	0.850	0.870	0.310	0.380	0.050	0.260	0.000

Anexo 3. Matriz de distancia euclídea de Precipitación

	Santo Domingo Yanhuitlán	Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas	Villa de Díaz Ordaz	San Pablo Huitzo	Ixtlán de Juárez	Teotitlán del Valle	Paraje Xía en San Juan Chicomezúchil
Santo Domingo Yanhuitlán	0.000						
Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas	1.000	0.000					
Villa de Díaz Ordaz	2.003	1.007	0.000				
San Pablo Huitzo	3.006	2.009	1.047	0.000			
Ixtlán de Juárez	4.811	4.018	3.432	2.674	0.000		
Teotitlán del Valle	5.059	4.073	3.127	2.081	2.153	0.000	
Paraje Xía en San Juan Chicomezúchil	6.110	5.132	4.197	3.150	2.511	1.072	0.000

Anexo 4. Matriz de distancia euclídea de Altitud

	Santo Domingo Yanhuitlán	Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas	Villa de Díaz Ordaz	San Pablo Huitzo	Ixtlán de Juárez	Teotitlán del Valle	Paraje Xía en San Juan Chicomezúchil
Santo Domingo Yanhuitlán	0.000						
Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas	1.000	0.000					
Villa de Díaz Ordaz	2.000	1.001	0.000				
San Pablo Huitzo	3.139	2.203	1.336	0.000			
Ixtlán de Juárez	4.059	3.079	2.104	1.027	0.000		
Teotitlán del Valle	5.351	4.431	3.535	2.229	1.575	0.000	
Paraje Xía en San Juan Chicomezúchil	6.503	5.594	4.701	3.393	2.702	1.167	0.000

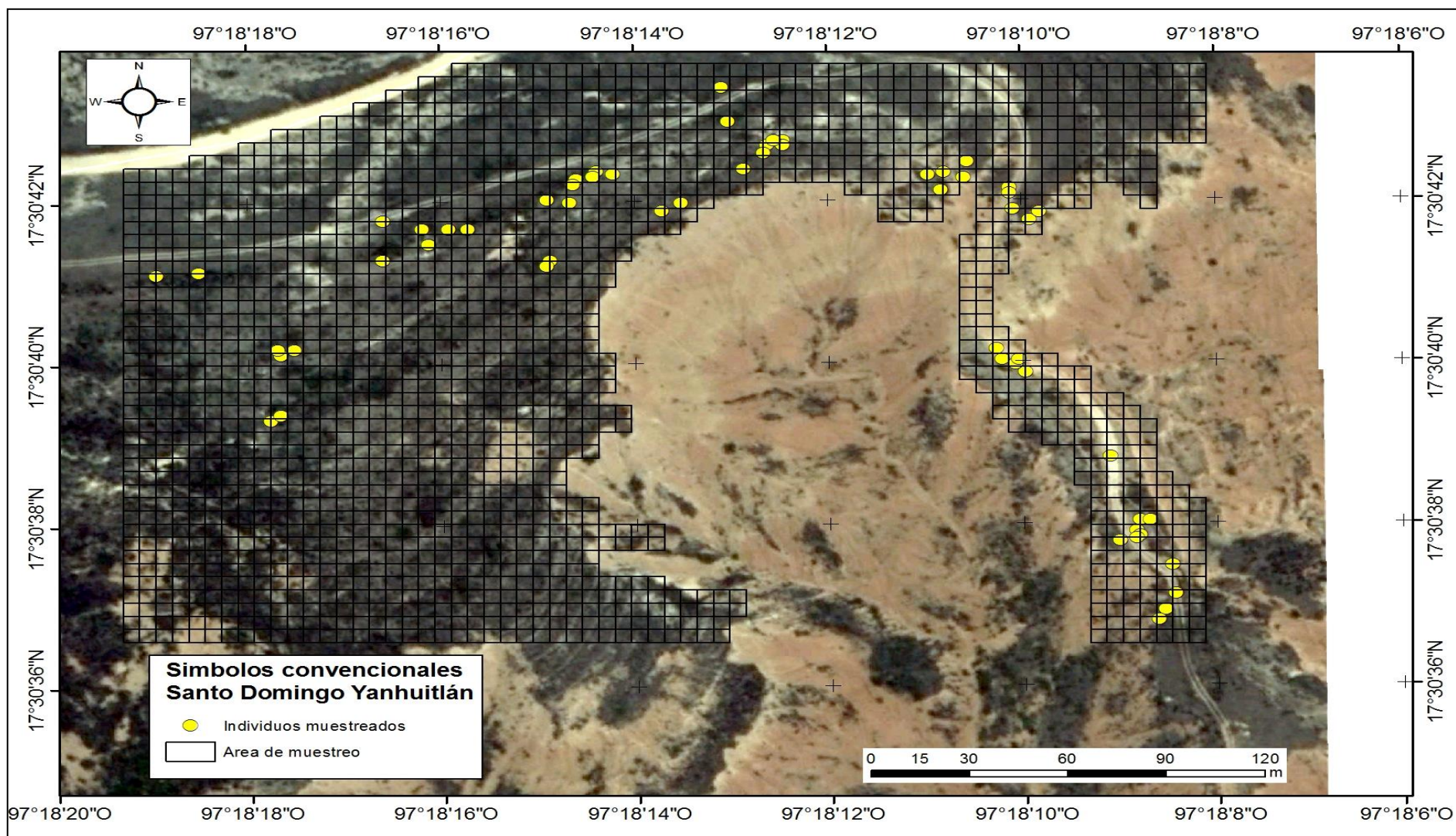
Anexo 5. Matriz de distancia euclídea de Temperatura

	Santo Domingo Yanhuitlán	Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas	Villa de Díaz Ordaz	San Pablo Huitzo	Ixtlán de Juárez	Teotitlán del Valle	Paraje Xía en San Juan Chicomezúchil
Santo Domingo Yanhuitlán	0.000						
Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas	1.048	0.000					
Villa de Díaz Ordaz	2.863	2.566	0.000				
San Pablo Huitzo	3.258	2.552	1.267	0.000			
Ixtlán de Juárez	4.624	3.992	2.018	1.450	0.000		
Teotitlán del Valle	5.185	4.341	3.075	2.003	1.378	0.000	
Paraje Xía en San Juan Chicomezúchil	6.239	5.394	4.014	3.032	2.091	1.056	0.000

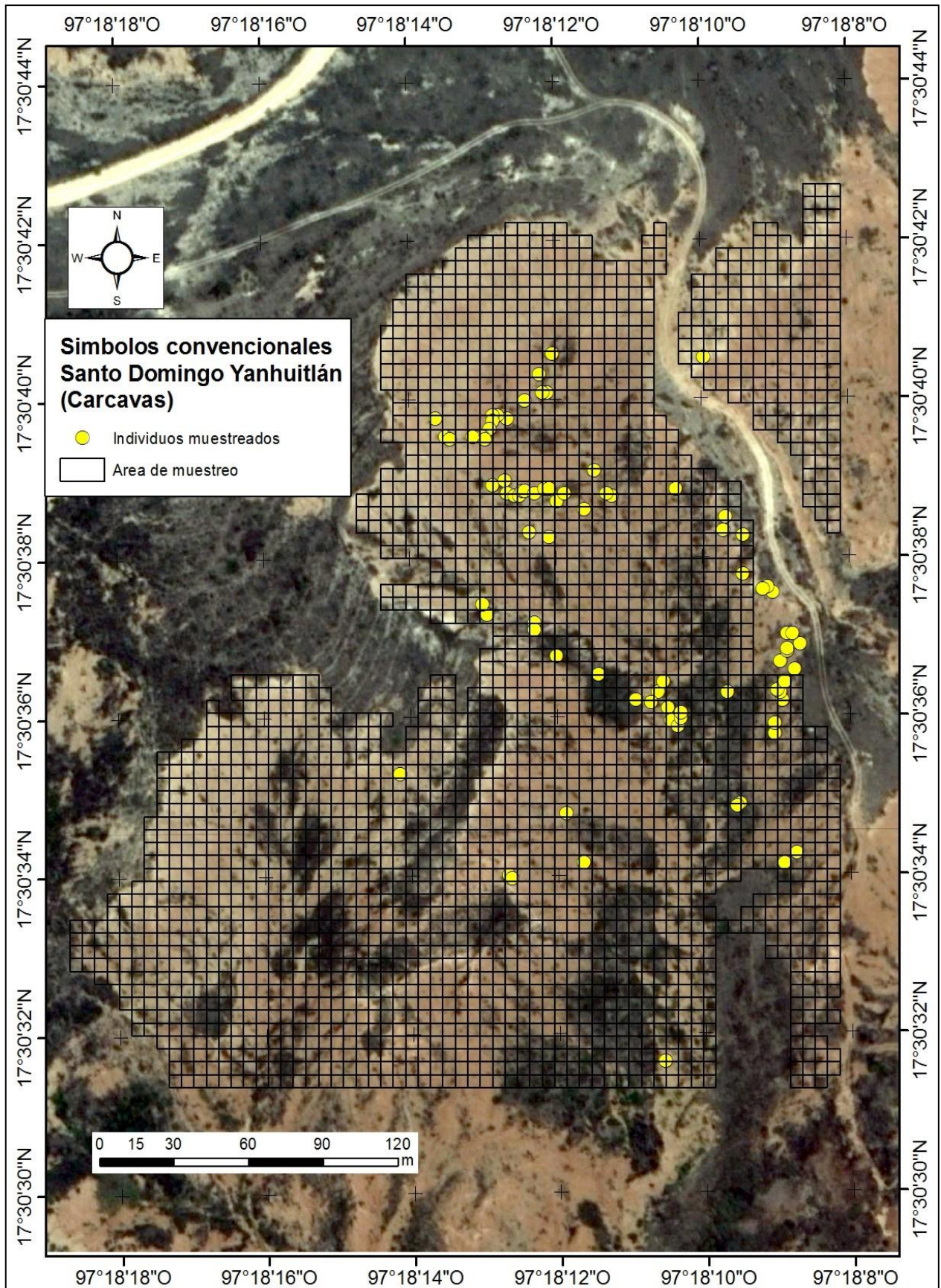
Anexo 6. Matriz de distancia euclídea de Densidad de *M. denticulata*

	Santo Domingo Yanhuitlán	Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas	Villa de Díaz Ordaz	San Pablo Huitzo	Ixtlán de Juárez	Teotitlán del Valle	Paraje Xía en San Juan Chicomezúchil
Santo Domingo Yanhuitlán	0.000						
Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas	1.000	0.000					
Villa de Díaz Ordaz	3.375	2.913	0.000				
San Pablo Huitzo	3.002	2.003	2.803	0.000			
Ixtlán de Juárez	4.046	3.065	2.906	1.123	0.000		
Teotitlán del Valle	5.196	4.249	3.271	2.394	1.284	0.000	
Paraje Xía en San Juan Chicomezúchil	6.017	5.022	4.597	3.021	2.006	1.387	0.000

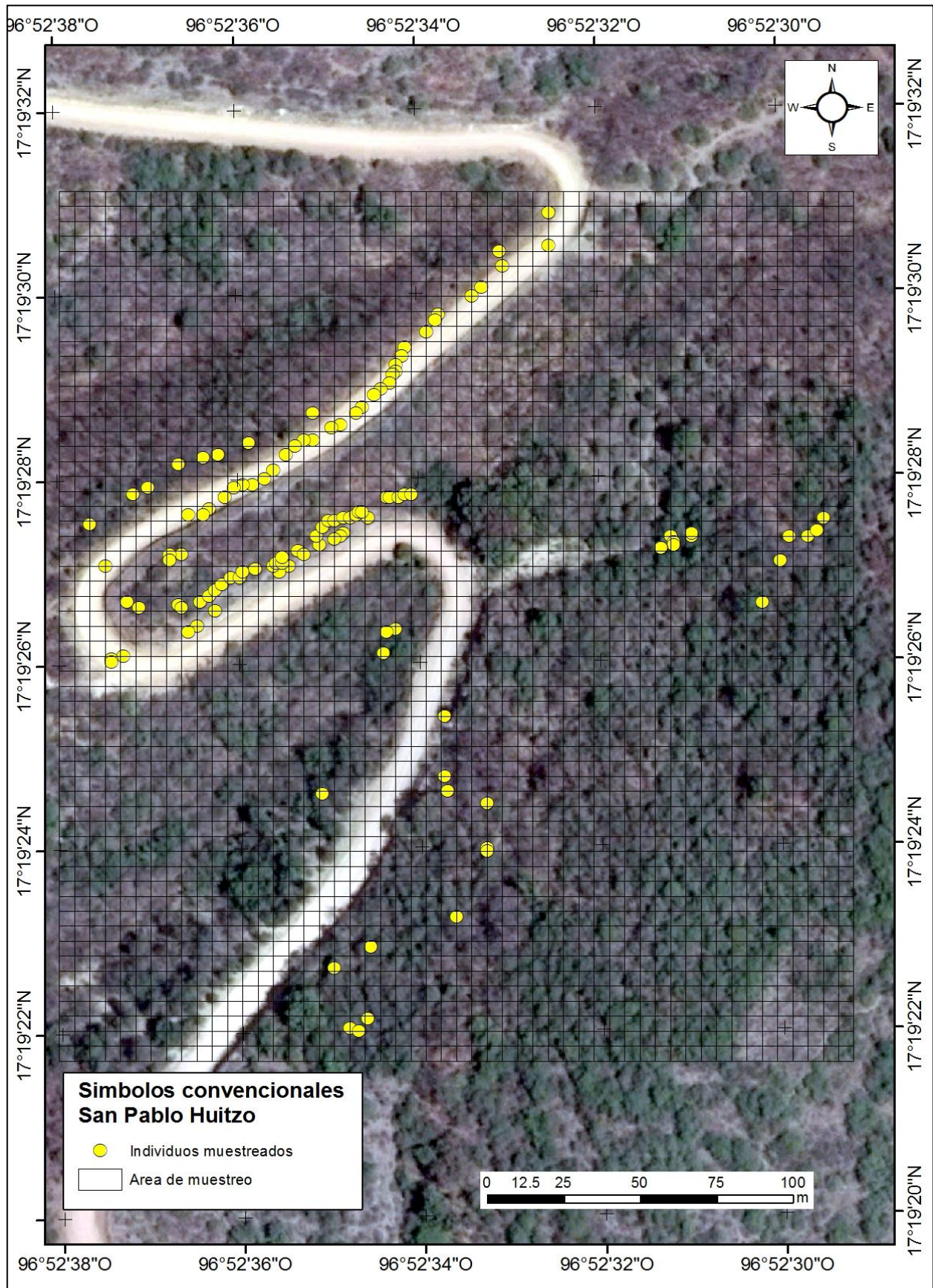
Anexo 7. Mapa de individuos de *M. denticulata* georreferenciados de Santo Domingo Yanhuitlán.



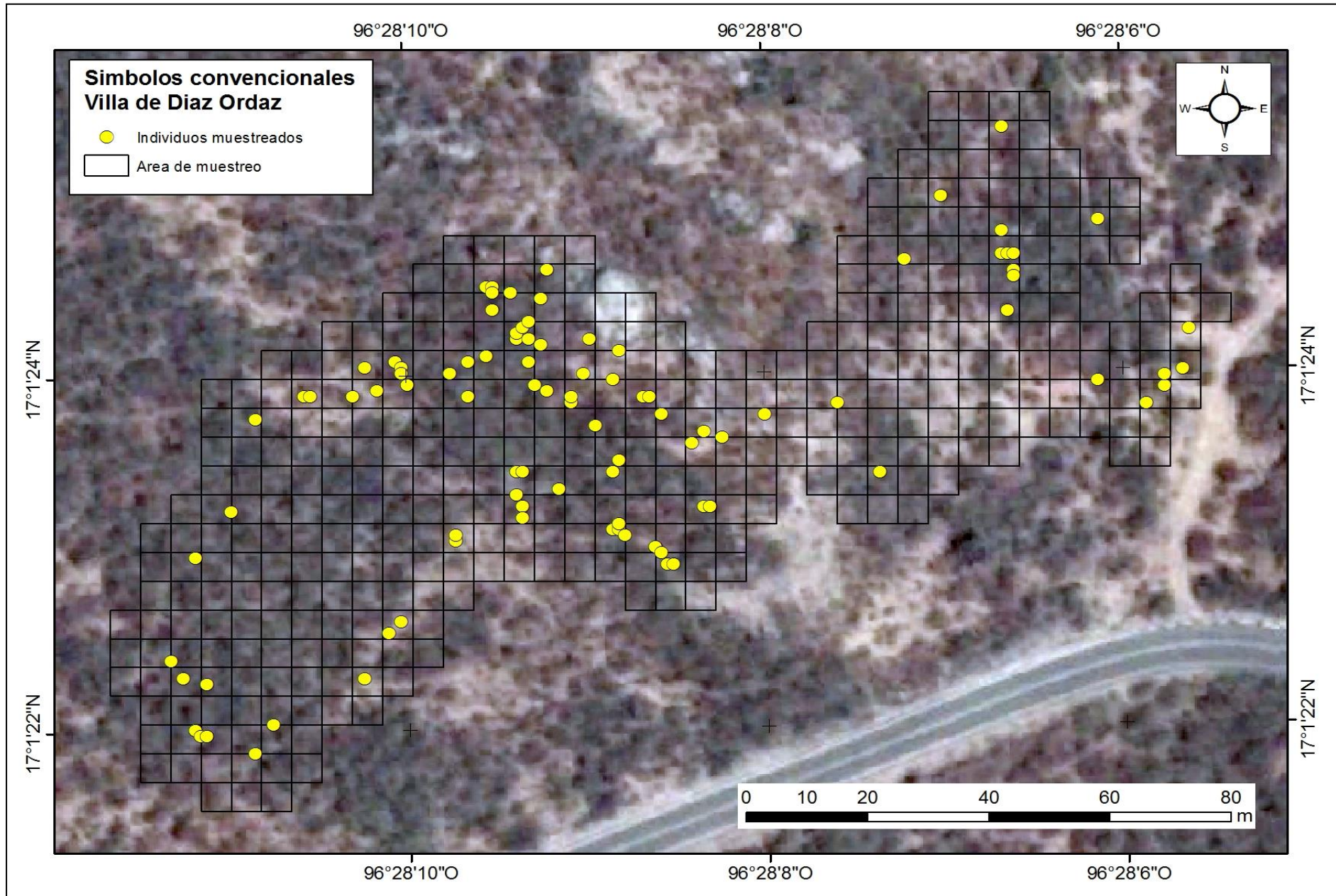
Anexo 8. Mapa de individuos de *M. denticulata* georreferenciados de Santo Domingo Yanhuitlán Cárcavas.



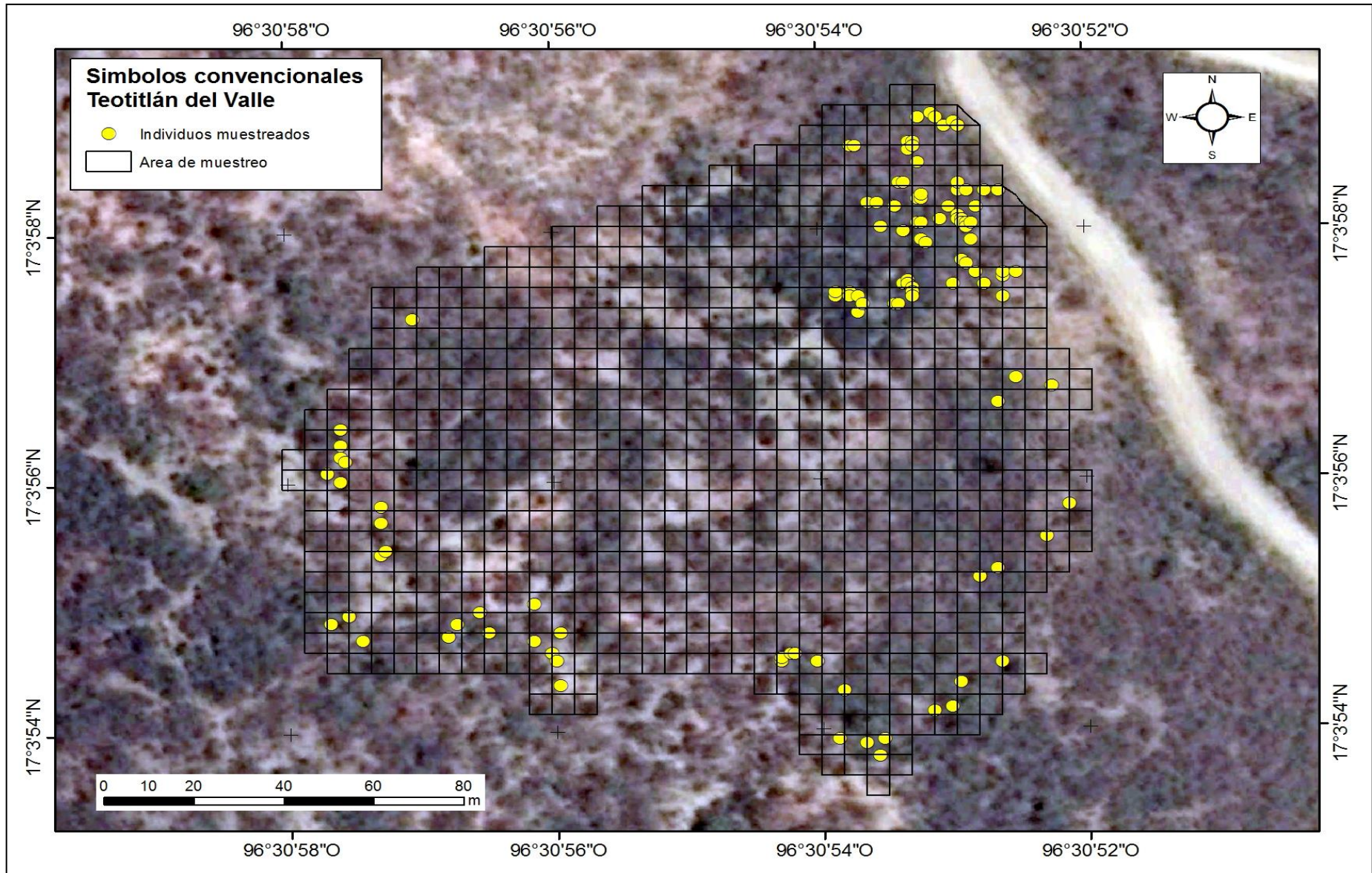
Anexo 9. Mapa de individuos de *M. denticulata* georreferenciados de San Pablo Huitzo.



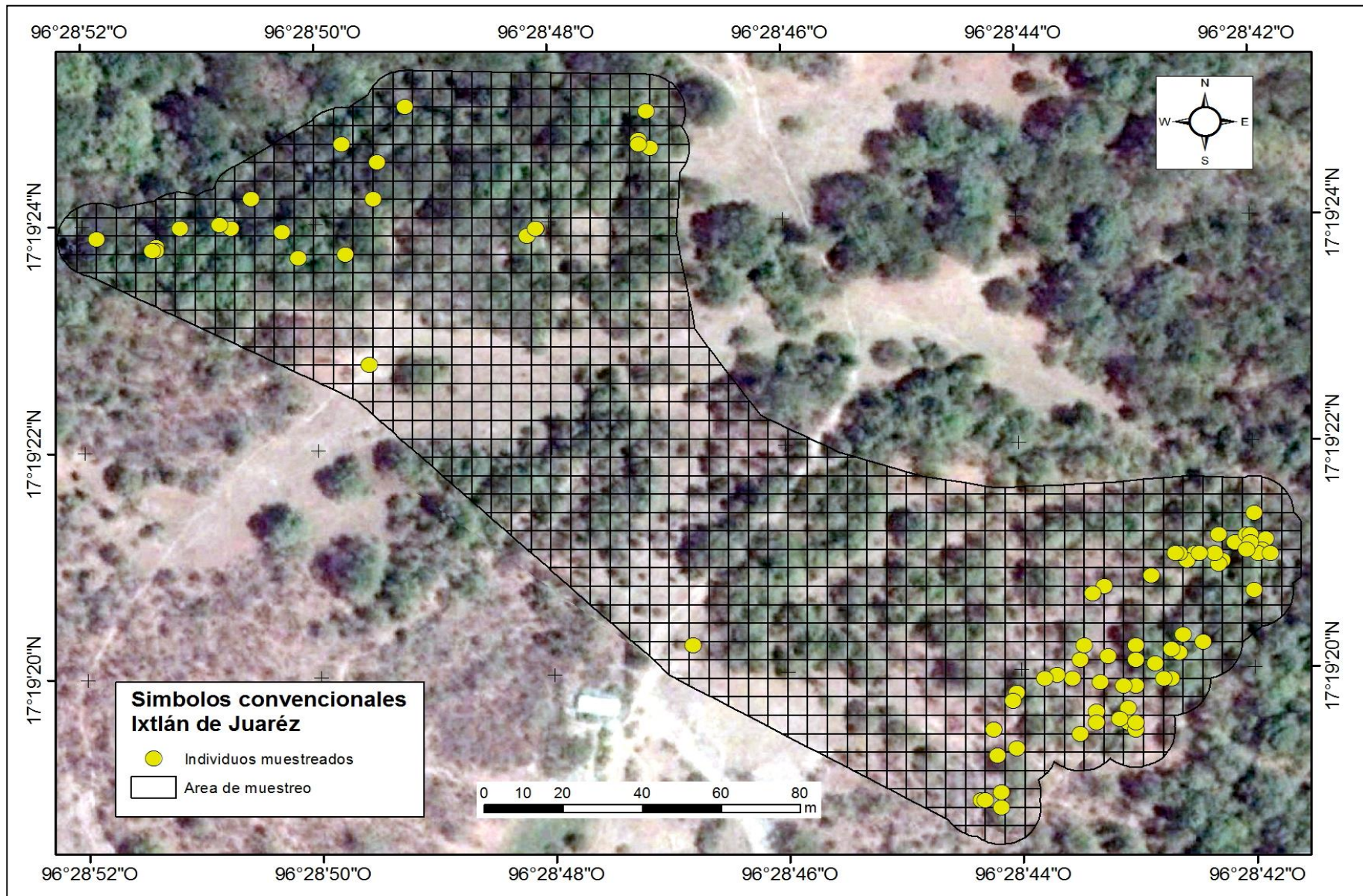
Anexo 10. Mapa de individuos de *M. denticulata* georreferenciados de Villa de Díaz Ordaz.



Anexo 11. Mapa de individuos de *M. denticulata* georreferenciados de Teotitlán del Valle.



Anexo 12. Mapa de individuos de *M. denticulata* georreferenciados de Ixtlán de Juárez.



Anexo 13. Mapa de individuos de *M. denticulata* georreferenciados de Paraje Xía, San Juan Chicomezuchil.

