



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

FILOGEOGRAFÍA Y ESTRUCTURA GENÉTICA
POBLACIONAL DEL CARDÓN *Pachycereus pringlei* EN
EL NOROESTE DE MÉXICO

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Ecología)

Presenta

CARINA GUTIÉRREZ FLORES

La Paz, Baja California Sur, Marzo de 2015

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las horas 11:00 am del día 05 del Mes de Marzo del 2015, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

" FILOGEOGRAFÍA Y ESTRUCTURA GENETICA POBLACIONAL DEL CARDÓN *Pachycereus pringlei* EN EL NOROESTE DE MÉXICO "

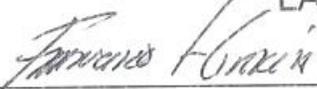
Presentada por el alumno:

CARINA GUTIÉRREZ FLORES

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN ECOLOGÍA DE ZONAS ÁRIDAS

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

LA COMISION REVISORA



FRANCISCO JAVIER GARCÍA DE LEÓN
CO-DIRECTOR DE TESIS



JOSÉ LUIS LEÓN DE LA LUZ
CO-DIRECTOR DE TESIS



PEDRO PEÑA GARCILLÁN
CO-TUTOR



PEDRO CRUZ HERNÁNDEZ
CO-TUTOR



JORGE HUGO COTA SÁNCHEZ
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Y FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Francisco Javier García de León

Co-Director de Tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., La Paz, B.C.S.

Dr. José Luis León de la Luz

Co-Director de Tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., La Paz, B.C.S.

Dr. Pedro Peña Garcillán

Co-Tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., La Paz, B.C.S.

Dr. Pedro Cruz Hernández

Co-Tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., La Paz, B.C.S.

Dr. Jorge Hugo Cota-Sánchez

Co-Tutor

University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canadá.

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dr. Francisco Javier García de León

Dr. José Luis León de la Luz

Dr. Pedro Peña Garcillán

Dr. Pedro Peña Garcillán

Dr. Pedro Cruz Hernández

Dr. Jorge Hugo Cota-Sánchez

JURADO EN EXÁMEN DE GRADO

Dr. Francisco Javier García de León

Dr. José Luis León de la Luz

Dr. Pedro Peña Garcillán

Dr. Pedro Peña Garcillán

Dr. Pedro Cruz Hernández

Dr. Jorge Hugo Cota-Sánchez

SUPLENTES

Dr. Gustavo Alberto Arnaud Franco

Dra. María del Carmen Blázquez Moreno

1. RESUMEN

Pachycereus pringlei es un cactácea columnar que ofrece un excelente modelo para realizar estudios morfológicos, ecológicos y evolutivos. Presenta un sistema de reproducción excepcional y un amplio rango de distribución en el noroeste de México. Los objetivos de este estudio fueron: 1. investigar la morfología floral, 2. Identificar los factores bióticos y abióticos que determinan la distribución de los sistemas de reproducción, y 3. Determinar el patrón filogeográfico, la diversidad genética y su relación con los cambios climáticos del último máximo glacial (UMG) y los sistemas de reproducción.

Se obtuvieron flores de 45 sitios de muestreo, abarcando todo el rango de distribución de la especie. Se empleó microscopia electrónica para identificar diferencias morfológicas de las flores. Se empleó modelación de nicho y análisis multivariados para investigar la asociación de los sistemas de reproducción con variables climáticas. Se analizaron 10 microsátélites por medio de distintos estadísticos (asilamiento por distancia, bayesiano, análisis de varianza) para determinar el patrón filogeográfico y diversidad genética y su relación con la distribución al UMG y con los sistemas de reproducción.

La morfología de las flores unisexuales sugiere una diferenciación temprana a partir de flores bisexuales. Se confirmó el patrón geográfico de distribución de los sistemas de reproducción. El sistema trioico (hembras, machos y hermafroditas) está determinado por la abundancia de polinizadores, así como por ambientes de recursos limitados (baja precipitación).

Los análisis con microsátélites revelaron una correlación entre la distancia geográfica y genética, un aumento de la diversidad hacia el norte y una zona de refugio al sur de la Península de Baja California durante el UMG. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de colonización post-Pleistocénica de la flora xérica del desierto de Sonora. Se identificaron cinco poblaciones genéticas, que muestran a su vez diferencias en sus sistemas de reproducción. Las poblaciones Norte y Sur presentaron un sistema principalmente ginodioico y trioico, respectivamente, la diferenciación genética de estas poblaciones podría explicarse por habilidades diferenciales de colonización de los sexos y la consecuente variación geográfica en la tasa de autofecundación. Además se observaron dos poblaciones hermafroditas en las Islas Cerralvo y Catalana y otra población trioica con alta frecuencia de machos (63%) en Cabo San Lucas. Las diferencias genéticas de estas poblaciones podrían ser explicadas por aislamiento geográfico y distintos niveles de ploidía (en el caso de las islas), así como por presiones selectivas locales en el caso de Cabo San Lucas.

La identificación de los procesos históricos y contemporáneos que determinan el patrón genético de variación de esta especie es fundamental no solo para conocer nuestros recursos sino que además para priorizar los esfuerzos de conservación.

Palabras clave: *Pachycereus pringlei*, sistemas de reproducción, filogeografía.

ABSTRACT

Pachycereus pringlei is a columnar cactus that provides an excellent model for morphological, ecological and evolutionary studies. This species have an exceptional mating system and a wide range of distribution in the Mexican portion of the Sonoran Desert. The objectives of this study were: 1. To investigate the floral morphology, 2. To Identify the biotic and abiotic factors that determine the distribution of mating systems, and 3. To determine the phylogeographic pattern and genetic diversity and its relation to historical climatic changes and reproductive systems.

Flowers were obtained from 45 collecting sites, covering the entire range of distribution of *P. pringlei*. Electron microscopy was used to identify morphological differences of flowers. Niche modeling and multivariate analysis was used to investigate the association of mating systems to climatic variables. A total of ten microsatellites were analyzed using different statistical methods (isolation by distance, Bayesian analysis, molecular analysis of variance) to determine the phylogeographic pattern and genetic diversity and its relationship to the geographic distribution to the last maximum glacial (LGM) and spatial distribution of mating systems.

Morphological traits of unisexual flowers suggest an early differentiation from bisexual flowers. The geographic distribution of mating systems was confirmed and it was concluded that the trioecious populations (male, female and hermaphrodite) is determined by the pollinator's abundance as well as by environments with limited resources (low rainfall).

Microsatellite analysis revealed a significant correlation between geographic and genetic distances, northward increasing of diversity and southern Baja California refugia during the LGM. These results are consistent with the hypothesis of post-Pleistocene colonization of xeric flora of the Sonoran Desert. Five genetic populations with differences in their mating systems were identified. The northern and southern populations showed mainly gynodioecy and trioecy mating system, respectively. Genetic differentiation of these populations could be explained by differential abilities of colonization of the gender and the consequent geographical variation in selfing rate. In addition, two hermaphroditic populations in Cerralvo and Catalan Islands and other trioecy populations with high frequency of males (63%) in Cabo San Lucas were observed. Genetic differences in these populations could be explained by geographic isolation and differences in ploidy levels (in the case of islands) as well as by local selective pressures in the case of Cabo San Lucas.

This study demonstrates the relative importance of long-term environmental fluctuations and life history traits in the evolution of *P. pringlei*. The identification of historical and contemporary processes affecting the genetic pattern of variation of this species is critical not only to understand the biology of the species but also to prioritize conservation efforts.

2. **Keywords:** *Pachycereus pringlei*, mating systems, phylogeography.

DEDICATORIA:

A mi familia y a mi esposo:

*Son mi más grande ejemplo
de lucha y perseverancia
para lograr mis metas*

AGRADECIMIENTOS

Al CIBNOR como institución receptora de los estudios de posgrado y al CONACyT por la beca otorgada bajo el número de registro CVU 165851 durante este periodo.

A los miembros del comité tutorial:

Al Dr. Dr. Francisco Javier García de León por darme la oportunidad de unirme a su equipo de trabajo y desarrollar esta investigación como parte del PROYECTO DE FILOGEOGRAFIA COMPARADA DEL NOROESTE. Agradezco tus incansables consejos para desarrollarme como una investigadora competitiva.

Al Dr. José Luis León de La Luz. Su pasión por la flora de la península y su gran experiencia en campo hicieron de las recolectas una aventura muy grata. Recorrer la península y las islas del Golfo de California será una experiencia inolvidable.

Al Dr. Pedro Cruz Hernández por su disponibilidad en todo momento y sus consejos valiosos en análisis moleculares y métodos de laboratorio. Siempre buscando técnicas alternativas para sacar el mejor provecho de mis datos

Al Dr. Pedro Peña Garcillán por escuchar pacientemente mis ideas y ayudarme a aterrizarlas en preguntas concretas de investigación.

Al Dr. Jorge Hugo Cota Sánchez por brindarme la oportunidad de realizar una estancia de investigación en su laboratorio a través del programa de becas del gobierno de Canadá “Emerging Leaders in the Americas Program” (ELAP). Por tu entusiasmo y apoyo para presentar esta investigación a la comunidad botánica.

A los miembros del laboratorio

Taniux, Adriano, Emimendez, Miguelo, Fausto, Cris, Caro, Ricards, David, Leo, Paulina, Ilse, Sharis. Tremendo apoyo en todo momento.

A todos los que contribuyeron con las recolectas

José Luis León, Raimundo Domínguez, Alfonso Medel, Adrian Lozano, Tania Valdivia, Adal Gómez, Emiliano Méndez

A mis compañeros de la U of S

Hugo Dewey, Wook, y Denver por el invaluable apoyo en Canadá, especialmente agradezco a Denver mi estancia no hubiese sido lo mismo sin tu apoyo.

CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
CONTENIDO	v
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABLAS	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Especie de estudio	4
2.2 El noroeste de México	5
2.3 Pirosecuenciación	12
2.4 Modelación de Nicho	14
2.5 Diferencias morfológicas de flores	16
2.6 Sistemas de reproducción	18
2.7 Conceptos básicos de genética poblacional y filogeografía	24
2.8 Patrón filogeográfico	25
2.9 Sistemas de reproducción y patrón genético de variación	28
3. OBJETIVOS	31
4. HIPÓTESIS	32
5. JUSTIFICACIÓN	33
6. MÉTODOS	35
6.1 Área de estudio	35
6.2 Trabajo de campo	35
6.3 Caracterización morfológica y morfométrica de flores	37
6.4 Sistemas de reproducción	39
6.5 Patrón filogeográfico	41
6.5.1 Obtención, diseño y caracterización de microsatélites	41

6.5.2	Control de calidad, obtención de genotipos	45
6.5.3	Niveles de ploidía.....	47
6.5.4	Diversidad genética e hipótesis de refugio	48
6.5.5	Estructura genética poblacional	50
6.6	Sistemas de reproducción y patrón genético de variación.....	53
7.	RESULTADOS	54
7.1	Caracterización morfológica y morfométrica de flores	54
7.2	Sistemas de reproducción	57
7.3	Patrón filogeográfico	67
7.3.1	Diseño y caracterización de loci microsatelitales	67
7.3.2	Nivel de ploidía	71
7.3.3	Diversidad genética e hipótesis de refugio	74
7.3.4	Estructura genética poblacional	79
7.4	Sistemas de reproducción y patrón genético de variación.....	87
8.	DISCUSIÓN	90
8.1	Caracterización morfológica y morfométrica de flores	90
8.2	Sistemas de reproducción	94
8.3	Patrón filogeográfico	106
8.3.1	Niveles de poliploidia	106
8.3.2	Diversidad genética e hipótesis de refugio	108
8.3.3	Estructura genética poblacional	112
8.4	Sistemas de reproducción y patrón genético de variación.....	116
8.5	implicaciones para la conservación y recomendaciones futuras.....	118
9.	CONCLUSIONES	119
10.	BIBLIOGRAFÍA	122
11.	ANEXOS	140

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Cardón columnar *Pachycereus pringlei* del noroeste de México. (A). Flor típica en forma de campana (B). Fruto inmaduro (C) y maduro (D)..... 5
- Figura 2.** Regiones fitogeográficas descritas para la península de Baja California. Modificado de Garcillán et al. (2012)..... 10
- Figura 3.** Esquema representativo del proceso de pirosecuenciación 454-Roche. Imagen modificada de (Owen-Hughes y Engeholm, 2007). A) Formación de librerías de ADN donde el ADN es fragmentado y luego se le unen adaptadores (extremos verdes y rojos). B) Emulsificación y PCR. Los fragmentos de ADN con los adaptadores y las microesferas con las partes complementarias a los adaptadores se introducen a gotas de aceite con los componentes necesarios para realizar la PCR, al final de este proceso quedan varias clonas unidas a cada microesferas. D) Pirosecuenciación, donde cada microesfera se introduce a una placa de fibra óptica, los nucleótidos unidos a pirofosfatos se van agregando de manera secuencial (pequeñas esferas rojas dentro de placa) y cada vez que uno se adhiere a la hebra de ADN emite un haz de luz que es detectado por la cámara CCD..... 14
- Figura 4.** Distribución geográfica de especies de cactáceas dimórficas. La distribución fue inferida de: Leuenberger, 1986; Hoffman, 1992; Areces-Mallea, 1996; Negrón-Ortiz y Strittmatter, 2004; Valiente-Banuet et al., 1997; Strittmatter, 2002; Scobell y Schultz, 2005; Baker, 2006; Del Castillo y Trujillo Argueta, 2009; New York Botanical Garden (NYBG), Arizona State University Vascular Plant Herbarium (ASU); University of California, Riverside Plant Herbarium (UCR); University of Arizona Herbarium (ARIZ)..... 20
- Figura 5.** Sistemas de reproducción del cardón *P. pringlei* en el noroeste de México, reportados en la literatura (Fleming et al., 1996; 1998; Molina-Freaner et al., 2003; Medel-Narvaez, 2008). Trioico = machos, hembras y hermafroditas, Ginodioico = hembras y hermafroditas..... 21
- Figura 6.** El área de estudio incluye todo el rango de distribución de *Pachycereus pringlei* (Turner et al., 1995) la cual pertenece, en su mayoría a la provincia denominada desierto de Sonora (imagen superior derecha). En la imagen se muestran los sitios de recolecta. Para detalles de las abreviaciones ver TABLA III..... 36
- Figura 7.** Esquema representativo del corte transversal de una flor de cardón y las mediciones realizadas para los análisis morfométricos. Longitud total de la flor (*L_t*), diámetro de la corola (*D_c*), diámetro basal a la altura de la cámara ovárica (*D_b*), longitud promedio de estambres (*L_e*), longitud de la cámara

ovárica (*Lc*), diámetro de la cámara ovárica (*Dco*), longitud del pistilo (*Lp*), longitud del nectario (*Ln*) y longitud de pétalos (*Lpe*)..... 38

Figura 8. Imágenes digitales (ABC) y electrónicas de barrido de las estructuras reproductivas de flores pistiladas (A, D, G, J, M), hermafroditas (B, E, H, K, N) y masculinas (C, F, I, L, O) de *Pachycereus pringlei*. (A) Disección longitudinal y funículo ovárico de flores pistiladas, (B) flores hermafroditas y (C) flores estaminadas. La cámara ovárica de la flor pistilada (D) y hermafrodita (E) muestran una gran cantidad de tejido funicular (Fu) y óvulos (Ov); mientras que la cámara ovárica de la flor estaminada (F) no presenta óvulos, o escasos óvulos de tamaño reducido (C). (G) Óvulo maduro de flor pistilada y (H) de flor hermafrodita. (I) Parte distal de funículos de flores estaminadas en la cual el óvulo no se ha podido diferenciar. (J) Anteras de cuatro sacos polínicos o tetraesporángias de flor pistilada (J), en la cual se observan algunos granos de polen inmaduros (Ip). (K y L) Anteras dehiscentes de flor hermafrodita y estaminada, respectivamente, mostrando granos de polen (Po). (M) Polen posiblemente inmaduro de flor pistilada. (N y O) Granos de polen tricolpados (formado por tres tecas) de flores hermafroditas y estaminadas, respectivamente..... 55

Figura 9. Frecuencia relativa de sexos de *P. pringlei* en Baja California Sur (BCS), Baja California Norte (BCN), Sonora (SON) e Islas del Golfo de California. El asterisco representa diferencia significativa..... 60

Figura 10. Correlación entre la frecuencia relativa de machos y hermafroditas del cardón *P. pringlei* en el noroeste de México..... 60

Figura 11. Distribución de los sistemas de reproducción hermafrodita, ginodioico (presencia de hermafroditas y hembras) y trioicos (presencia de machos, hembras y hermafroditas) del cardón *P. pringlei* en el noroeste de México. Para el sistema trioico se indican tres clases dependiendo de la frecuencia de machos. Ver TABLA II para información sobre las abreviaciones de las localidades..... 62

Figura 12. Relación entre los sistemas de reproducción del cardón *P. pringlei* en el noroeste de México, y el potencial forrajeo del murciélago *L. curasoae*, determinado por una área de influencia de 30 a 60 Km (verde y amarillo, respectivamente) de distancia de sus cuevas maternidad. Los datos sobre la presencia de cuevas de maternidad de *L. curasoae* son de Fleming et al. (1998) y Molina-Freaner et al. (2003) y los recolecta del murciélago se tomaron de Rojas-Martínez et al. (1999)..... 64

Figura 13. Modelación de nicho al presente del cardón *P. pringlei* en el noroeste de México, empleando las diecinueve variables climáticas de Worldclim (Hijmans et al., 2005). A) Modelación del rango de distribución

potencial para todos los registros de la especie. B) modelación de la distribución potencial de los sitios de muestreo que presentaron un sistema de reproducción trioico, expresado en probabilidad de presencia de las condiciones óptimas. Las imágenes fueron representadas sobre un mapa de elevación del noroeste de México (INEGI, <http://www.inegi.org.mx/geo>). Los datos empleados para la modelación de nicho fueron obtenidos de este estudio y de estudios previos (Fleming et al., 1994; 1998; Molina-Freaner et al., 2003; Medel-Narvaez, 2008)..... 66

Figura 14. Análisis discriminante entre sistemas de reproducción de *P. pringlei* del noroeste de México, empleando las variables ambientales del Worldclim que resultaron en < 90% de correlación. (Wilks'Lambda = 1.24, p < 0.01)..... 67

Figura 15. Distribución de frecuencias de las razones de áreas de individuos bi-alélicos en seis loci microsatelitales de *P. pringlei* en el noroeste de México. Los genotipos asignados fueron: ABBB (verde), AABB (azul) y ABBB (rojo). En blanco genotipos que no fueron consistentes con las razones esperadas en tetraploides (Ver criterios para asignación de genotipos y razones teóricas en la parte superior de la figura)..... 73

Figura 16. Conteo de cromosomas en dos sitios de muestreo de *P. pringlei* con distinto sistema de reproducción en el noroeste de México. A) Isla Cerralvo con sistema de reproducción hermafrodita (2n = 22); B) Cabo San Lucas con sistema de reproducción trioico (2n = 44), y C) Puente Querétaro con sistema de reproducción ginodioico (2n = ~44)..... 74

Figura 17. Análisis de aislamiento por distancia calculado a partir de distancias genéticas de Nei (Nei, 1987) entre pares de sitios de muestreo de *Pachycereus pringlei*, en el noroeste de México. A) Dentro de los cardones de los sitios de muestreo de en la región Norte y considerando una ruta de colonización de las localidades de Sonora a través de la isla San Esteba (IST). B) Dentro de los cardones de los sitios de muestreo del Sur considerando solamente los sitios peninsulares..... 76

Figura 18. Patrón latitudinal de la diversidad genética (heterocigosidad observada) en *Pachycereus pringlei* en el noroeste de México. A) representación geográfica de la variación de la diversidad realizada a partir de la interpolación de los valores de diversidad para cada sitio de muestreo. B) Diminución de la diversidad genética conforme aumenta la latitud (r = 0.66, p < 0.01). Los triángulos y los círculos representan sitios de muestreo de las regiones norteñas y sureña, respectivamente..... 77

Figura 19. Modelación de nicho de <i>P. pringlei</i> al último máximo glacial (~21,000 años) de acuerdo al método de máxima entropía (MAXENT, Phillips et al., 2006), empleando el modelo paleoclimático de de “The Paleoclimate Modelling Intercomparison Project 2 (PMIP; https://pmip2.lsce.ipsl.fr/ ; Braconnot et al. 2007) y datos compilados de campo (este estudio) así como de la literatura (Fleming et al., 1998; Molina-Freaner et al., 2003; Medel-Narváez, 2008).....	78
Figura 20. Patrón filogeográfico de <i>P. pringlei</i> , en el noroeste de México, revelado por análisis Bayesiano (STRUCTURE, Pritchard et al., 200), usando diez microsátélites. A) Proporción de la ancestría individual correspondiente a los clusters Norte (azul) y Sur (verde). B) Subestructura genética y porción de la ancestría identificada al interior de los clusters Norte y Sur.	80
Figura 21. Análisis discriminante de componentes principales (DAPC) de 522 cardones y diez loci microsatelitales de <i>P. pringlei</i> en el noroeste de México. A) Los componentes principales uno y dos separaron a los clusters Norte y Sur (no incluye ICE, ICA ni CBS) e Isla Catalana con 97% de asignación a su sitio de origen. B) El tercer componente principal separó a Isla Cerralvo y Cabo San Lucas (81 y 87% de asignación).....	82
Figura 22. Fenograma consenso de Neighbor-Joining calculado a partir de cien matrices de distancias genéticas de Nei (1987) para los sitios de muestreo de <i>Pachycereus pringlei</i> noroeste de México. Azul Fuerte = sitios del sur de la península de Baja California, azul claro = sitios de la parte media de la península, verde claro = sitios del norte de la península, verde fuerte = sitios del Sonora. En Amarillo y Rojo se indican los sitios con sistema de reproducción hermafroditas de Isla Cerralvo (ICE) e Isla Catalana (ICA), respectivamente. Las líneas gruesas indican valores de bootstrap > 50%.....	84
Figura 23. Patrón filogeográfico de <i>P. pringlei</i> en el noroeste de México, revelado por cinco métodos analítico (STRUCTURE, Análisis discriminante de componentes principales (DAPC), coeficientes de diferenciación genética, Análisis molecular de varianza (AMOVA) y fenograma. La población Norte (en azul) y Sur (en verde) se encuentran separadas por la línea punteada y el cambio gradual del color representa el coeficiente de pertenencia o ancestría individual, determinado por STRUCTURE. Las otras tres poblaciones constituyen sitios individuales de muestreo: Isla Catalana (ICA, verde claro), Isla Cerralvo (ICE, verde oscuro) y Cabo San Lucas (CBS, amarillo). El rango de distribución de <i>P. pringlei</i> fue determinado por modelación de nicho al presente en MAXENT, empleando 88 datos de presencia de la especie obtenidos en este estudio y de la literatura (Fleming et al., 1998; Molina-Freaner. et al., 2003; Medel-Narvaez, 2008).....	85

Figura 24. Ancestrías individuales de *Pachycereus pringlei* del noroeste de México para $K = 2$, realizadas a partir de diez loci microsatelitales en el programa STRUCTURE (Pritchard *et al.* 2000), empleando solamente individuos hermafroditas (A) e individuos unisexuales machos y hembras (B) 88

Figura 25. Valores promedio y su desviación estándar de diversidad genética e índices de diferenciación genética en poblaciones con distinto sistema de reproducción para *P. pringlei* en el noroeste de México. A) H_O , heterocigosidad observada y H_E heterocigosidad esperada. B) Coeficientes de diferenciación genética estimados como el promedio de diferencias pareadas entre sitios de muestreo, asumiendo patrón de herencia diploide (F_{ST}) y patrón de herencia desconocido (Φ_{PT}). Diferente..... 89

Figura 26. Sistemas de reproducción identificados en este estudio (círculos) y en estudios previos (cuadros) realizados por Fleming *et al.* (1998), Molina-Freaner *et al.* (2003) y Medel-Narvaez (2008). Los círculos mayores representan un distancia de 50 Km a la redonda de los sitios de muestreo de este estudio en los cuales se describió un sistema de reproducción distinto en estudios previos..... 96

Figura 27. Distribución de los sistemas de reproducción del cardon *Pachycereus pringlei* en el noroeste de México y su asociación con variables derivadas de la precipitación y la temperatura. Los sistemas de reproducción son: ginodioico (hembras y hermafroditas) en rosa, hermafroditas en amarillo y trioicos (hembras machos y hermafroditas) en distintas intensidades de azul. Azul claro (<10% machos), azul cielo (10-30%) y azul fuerte (>30% machos)..... 105

LISTA DE TABLAS

TABLA I. Valores promedios de las variables morfométricas empleadas para describir las estructuras reproductivas en flores pistiladas, estaminadas y hermafroditas y su significancia de acuerdo a análisis de varianza (ANOVA).....	56
TABLA II. Sitios de recolecta, ubicación geográfica, tamaño de muestra (N), número y frecuencia de flores hermafroditas (H, H%), pistiladas (P, P%), estaminadas (E, E%) y estériles (E, E%). Sistema de reproducción (SR), (NG) tamaño de muestra empleado para los análisis con microsatélites. Los sistemas de reproducción son: T = trioico, G = Ginodioico, H = Hermafrodita	58
TABLA III. Resultado de dos corridas de pirosecuenciación (454-Roche con la química GS FLX de Titanium) realizadas para <i>Pachycereus pringlei</i>	68
TABLA IV. Características de 10 microsatélites desarrollados por medio de pirosecuenciación (454-Roche con la química GS-FLX de Titanium) para el cardón <i>Pachycereus pringlei</i> del noroeste de México. Ta = temperatura de alineamiento.....	69
TABLA V. Diversidad genética de los diez loci microsatelitales desarrollados para <i>Pachycereus pringlei</i> . N_a = número de alelos por locus; A_l = número individual de alelos por locus; H_o = heterocigosidad observada; H_e = heterocigosidad esperada; n = tamaño de muestra.....	70
TABLA VI. Frecuencia de genotipos con tres (P_3) y cuatro (P_4) alelos, número máximo de alelos encontrado en al menos un individuo (A_{MAX}) y nivel de ploidía sugerido por medio de métodos indirectos (i.e. A_{MAX} y MC-PR) y conteo de cromosomas (*) a lo largo de los sitios de muestreo estudiados en <i>P. pringlei</i> en el noroeste de México.....	72
TABLA VII. Diversidad genética a lo largo de los sitios de muestreo de <i>Pachycereus pringlei</i> en el noroeste de México, estimadas a partir de diez loci microsatelitales. N = tamaño de muestra, A = número de alelos por locus, H_o = heterocigosidad observada, H_E = heterocigosidad esperada.....	75
TABLA VIII. Análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado para diferentes niveles jerárquicos de <i>Pachycereus pringlei</i> , a partir de una base de	

datos diploide (F_{ST}) y otra de ploidía desconocida (presencia/ausencia, Φ_{ST}). 83
En rojo se indican los porcentajes más altos de varianza obtenidos.....

TABLA IX. Diversidad genética, sistemas de reproducción y frecuencia de machos por sitio de muestreo para las cinco poblaciones genéticas del cardón *P. pringlei* en el noroeste de México, identificadas a partir de diez loci microsatelitales. N= tamaño poblacional, A = número promedio de alelos por locus, Ap = número total de alelos privados, Ho = heterocigosidad observada, He = heterocigosidad esperada..... 87

TABLA X. Valores promedio de diversidad e índices de diferenciación genética para *P. pringlei* con distintos sistemas de reproducción en el noroeste de México. Heterocigosidad observada (H_O) y esperada (H_E). Coeficientes de diferenciación genética estimados como el promedio de diferencias pareadas entre sitios de muestreo, asumiendo patrón de herencia diploide (F_{ST}) y patrón de herencia desconocido (Φ_{PT}). Sistemas de reproducción (SR). Valores entre paréntesis es la probabilidad de la desviación estándar..... 89

1. INTRODUCCIÓN

El noreste de México, un área con una compleja historia geológica y climática, así como amplia heterogeneidad ambiental contemporánea, es el escenario en el cual se distribuye el cardon, *Pachycereus pringlei* (S. Watson) Britton & Ross (Turner et al., 1995). Esta es una cactácea columnar excepcional. Presenta dimorfismo de géneros (machos, hembras y hermafroditas) y tres sistemas de reproducción, tales como: hermafroditismo (hermafroditas), ginodioico (hermafroditas y hembras) y trioico (hermafroditas, machos y hembras; Medel-Narváez, 2008). El amplio rango de distribución en un ambiente heterogéneo, así como el dimorfismo de géneros y el polimorfismo de sistemas de reproducción, convierten a *P. pringlei* en una especie modelo para realizar estudios morfológicos, ecológicos y de filogeografía.

A la fecha, los estudios morfológicos de flores de cactáceas son escasos. La determinación del sexo se ha basado principalmente en la identificación de óvulos y/o polen, dejando a un lado las diferencias estructurales del ginoecio (cámara ovárica, óvulos, pistilo) y androecio (estambres y polen). Las técnicas de alta resolución, como lo es la microscopía electrónica de barrido podrían ayudar no solo a identificar el grado de especialización hacia una función sexual; sino a indagar sobre los mecanismos responsables de la esterilidad masculina y femenina de flores unisexuales.

Una vez que los unisexuales se han originado, varios estudios ecológicos se han enfocado a evaluar las presiones selectivas que permitieron su establecimiento en una población hermafrodita. Entre estas, se han sugerido factores biológicos (polinizadores) y ambientales (precipitación, temperatura, nutrientes). Por ejemplo, Fleming et al. (1998) sugirió que el establecimiento de machos del cardón es favorecido por la presencia del murciélago *Leptonycteris curasoae* (Phyllostomidae). De acuerdo a la teoría de redistribución de recursos (Charnov et al., 1982), la pérdida de una función sexual en los machos les permite incrementar la fertilidad del sexo funcional con respecto a los hermafroditas. Entonces, la gran capacidad de

dispersión del polen por parte de *L. curasoae* incrementaría el éxito reproductivo de los machos del cardón con respecto a los hermafroditas permitiendo así su establecimiento. Alternativamente, estudios realizados en otras plantas (Barrett, 1992; Sakai y Weller, 1999) han puesto en evidencia la importancia de la heterogeneidad ambiental en la determinación de los sistemas de reproducción. Los machos se asocian comúnmente con sitios más secos y/o estresantes mientras que las hembras y los hermafroditas se asocian a ambientes más húmedos y de mayor disponibilidad de recursos. Esto se explica porque el menor costo de la función sexual de machos (no invierten en producción de frutos), les permite redistribuir recursos hacia funciones vitales, tales como tolerancia a la sequía.

Por otro lado, los sistemas de reproducción han mostrado tener gran influencia sobre el repertorio genético de las plantas (Duminil et al., 2009). Sin embargo, los estudios moleculares en cactáceas columnares del noroeste de México son escasos. Los pocos estudios realizados se han enfocado a investigar el efecto de eventos históricos vicariantes y climáticos sobre el patrón de estructura y diversidad. La disminución gradual de la diversidad hacia el norte, reportado para la pitahaya agria, *Stenocereus gummosus* (Engelm.) A. Gibson & K.E. Horak (Clark-Tapia y Molina-Freaner, 2003) y la senita *Lophocereus schottii* (Engelm) Britton & Ross (Nason et al., 2002) son consistentes con una expansión del rango de distribución en la misma dirección, posiblemente asociada al aumento gradual de la temperatura durante el Holoceno (<10,000 años). Solo en el caso de *L. schottii*, las poblaciones genéticamente diferenciadas, apoyaron la hipótesis de que los eventos vicariantes como la formación del Golfo de California (~3-5 m. a.) y un canal transpeninsular al sur de la península (< 3.2 m. a.), fueron las mejores explicaciones para el patrón de diferenciación genética observado. Mientras que el único estudio molecular (con aloenzimas) realizado en el cardón, sugirió panmixia y no se evaluó la hipótesis de expansión del rango de distribución (Fleming et al., 1998). Un factor limitante ha sido sin duda la falta de marcadores moleculares con polimorfismo suficiente a nivel intraespecífico. La pirosecuenciación, es una técnica reciente que permite obtener

cientos de miles de secuencias. Estas técnicas pueden emplearse para el diseño de microsatélites en un tiempo relativamente corto, comparado con los métodos tradicionales de clonación. Los microsatélites no solo permiten investigar si las señales genéticas de eventos vicariantes han sido borradas, o si el patrón filogeográfico del cardón es consistente con la hipótesis de refugio al sur de la PBC; sino que además permiten investigar la influencia relativa de los sistemas de reproducción en el patrón de variación genética del cardón.

Aunque no se ha evaluado el efecto de los sistemas de reproducción sobre el repertorio genético en cactáceas, en otras especies con polimorfismo de géneros se ha observado que el aumento en la tasa de autofecundación disminuye del flujo genético y el tamaño efectivo poblacional, promoviendo la diferenciación genética y disminución de la diversidad (Onge et al., 2011). Si el aumento en la frecuencia de los hermafroditas del cardón es reflejo de un aumento en la tasa de autofecundación; esto debería reflejarse en mayor estructuración genética y menor diversidad de localidades hermafroditas, ginodioicas y trioicas, respectivamente.

En este estudio se emplean técnicas novedosas y de alta resolución para contribuir al conocimiento morfológico, ecológico y genético del cardón *P. pringlei*. A partir de morfometría y microscopía electrónica de barrido se investigaron las diferencias entre morfos sexuales de las flores. Por medio de análisis multivariados, sistemas de información geográfica y modelación de nicho ecológico (MNE) del sistema trioico se investigó la asociación de polinizadores y condiciones ambientales con la distribución geográfica de los sistemas de reproducción. Además, como parte del proyecto integral de “Filogeografía comprada del noroeste de México” en este estudio se diseñaron microsatélites a partir de pirosecuenciación y se empleo MNE al pasado para investigar la influencia relativa de eventos vicariantes, climáticos, y sistemas de reproducción en el patrón de estructura genética y filogeográfico del cardón.

2. ANTECEDENTES

2.1 Especie de estudio

El Cardón, *Pachycereus pringlei*, es una cactácea columnar perteneciente a la tribu Pachycereeae que a su vez forma parte de la familia Cactaceae (Cota y Wallace, 1997). Esta especie posee un amplio rango de distribución en la porción mexicana del Desierto de Sonora. La podemos encontrar en la mayor parte de la península de Baja California (PBC), las islas del Golfo de California y la costa de Sonora, asociada principalmente a suelos aluviales, laderas rocosas e inmediaciones de suelos salitrosos (Turner et al., 1995). Esta cactácea de tallo succulento se caracteriza por presentar tronco bien definido y de 11 a 17 costillas. Son organismos longevos y voluminosos que pueden llegar a vivir de dos a tres siglos, alcanzar hasta los 20 metros de altura (promedio entre 8 y 9 m) con 1 a 27 brazos y biomasa de hasta dos toneladas (Bravo-Hollins y Sánchez-Mejorada, 1978; Medel-Narváez et al., 2008). Su etapa reproductiva va de Marzo a Agosto. Las flores son de forma de campana, con simetría radial, y ovario inferior (receptáculo) que deriva de la modificación del tallo. Las flores presentan síndrome de quiropterofilia o co-evolución con murciélagos. Son flores blancas de gran tamaño, alto contenido de néctar y anthesis nocturna (Figura 1). Las flores abren con la puesta del sol y permanecen abierta por varias horas de la mañana del día siguiente permitiendo el acceso a polinizadores diurnos tales como aves e insectos (Medel-Narváez, 2003; Fleming et al., 1994; 1996). Esta especie se caracteriza por presentar dimorfismo de géneros con individuos hembras, machos y hermafroditas (o bisexuales) y no hay evidencia de cambio de sexo a lo largo de su vida (Fleming et al., 1994; León de la Luz Com. Per.). Estudios de fecundación manual sugieren que es una especie autocompatible (Fleming et al., 1994) con una tasa de autofecundación de $s = 0.65$, de acuerdo a estimaciones con aloenzimas (Murawski et al., 1994).



Figura 1. Cardón columnar *Pachycereus pringlei* del noroeste de México. (A). Flor típica en forma de campana (B). Fruto inmaduro (C) y maduro (D).

2.2 El noroeste de México

a) Historia geológica

Estudios estratigráficos, paleontológicos y basados en la teoría de tectónica de placas han puesto en evidencia la compleja historia geológica del noroeste de México (Carreño y Smith, 2007; Gastil y Jensky, 1973; Gastil et al., 1983; Mulcahy y Macey, 2009). En general estos estudios sugieren que la península se encontraba unida al macizo continental antes del Mioceno temprano (22-18 m. a.; Carreño y Smith, 2007; Mulcahy y Macey, 2009). Posteriormente, movimientos tectónicos de subducción desplazaron la placa de Farallón por debajo del borde occidental de

Norte América. Este movimiento ocasionó la fragmentación de la placa de Farallón en tres placas menores (Juan de Fuca, Rivera y Cocos) provocando el choque entre las placas Norteamericana y Pacífico. El choque de éstas dos placas y su subsecuente desplazamiento en direcciones opuestas resultaron en lo que hoy conocemos como falla de San Andrés y provocaron la transferencia de la PBC hacia la placa Pacífico. Desde entonces la PBC se ha estado separando gradualmente del macizo continental con un desplazamiento en dirección noroeste (Valencia-Moreno y Ortega-Rivera, 2011).

Por otro lado, estudios geológicos sugieren que la PBC no siempre fue una franja continua de tierra (Aguirre et al., 1999; Hausback, 1984). Los datos isotópicos y geoquímicos, así como depósitos marinos de diatomeas sugieren la existencia de canales transpeninsulares que unieron el océano Pacífico con el Golfo de California en distintos periodos de tiempo y en distintas latitudes de la PBC. Los canales transpeninsulares con evidencia geológica sólida sugeridos hasta el momento son: 1) un canal medio transpeninsular en la parte que va de la Laguna de San Ignacio a Santa Rosalía durante el Mioceno-Plioceno tardío (~7 m. a.; Dokka y Merriam, 1982; Helenes y Carreño, 1999; Oskin y Stock, 2003), así como un canal al sur de la península, conocido como el Istmo de La Paz que separó la región de los Cabos, B.C.S del resto de la PBC entre el Mioceno medio y plioceno medio (14-3.2 m. a.; Curray y Moore, 1984; Murphy y Aguirre-León, 2002; Oskin y Stock, 2003).

Por su parte las islas del Golfo de California se formaron por depósitos deltaicos del río Colorado (en el caso de las islas del norte del Golfo de California), actividad volcánica y/o movimientos en los sistemas de fallas y desprendimientos de la costa que resultaron de la separación de la PBC. Dependiendo de su relación con el macizo continental las islas se clasifican en: oceánicas, continentales profundas y continentales puentes terrestres. Las islas oceánicas pudieron haber sido el resultado del levantamiento de la corteza terrestre o depósitos volcánicos del fondo oceánico y nunca estuvieron unidas al macizo continental. Las islas continentales

profundas, tales como las islas Cerralvo y Catalana, estuvieron en algún momento de su historia conectadas a la parte continental pero actualmente se encuentran relativamente lejos de la costa. Las islas continentales de puente terrestre son el tipo más común en el Golfo de California, son islas relativamente jóvenes que resultaron de la fragmentación de la zona costera, se encuentran relativamente cerca del macizo continental y probablemente deben su condición de islas a la elevación del nivel del mar durante el último periodo interglacial (Carreño y Helenes, 2002; Soulé y Sloan, 1966).

a) El Desierto de Sonora, clima y vegetación

A excepción de la región de los Cabos y una pequeña porción ubicada al noroeste de la PBC, el noroeste de México forma parte de la provincia denominada Desierto de Sonora. Se cree que el Desierto de Sonora resultó de la tendencia de sequía del Mioceno medio (8-15 m. a.) cuando la PBC aún se encontraba unida al macizo continental (Axelrod, 1975). El cambio a un clima más seco favoreció el establecimiento de la flora xérica caracterizada por adaptaciones morfofisiológicas a condiciones más áridas, tales como: *Carnegiea gigantea* (Engelm.) Britton & Ross, *Cercidium microphyllum* (Torr.) Ross & I.M. Johnst., *L. schottii*, *P. pringlei* entre otras. Sin embargo, de acuerdo al registro fósil la vegetación del Desierto de Sonora ha sufrido cambios en la abundancia y composición debido a fluctuaciones climáticas más recientes (Van Devender et al., 2002; Nobell, 1989). Durante el Plioceno (1.5 a 5 m. a.) hubo una regresión hacia un clima más tropical que duró hasta el Pleistoceno temprano (2.5 a 4.5 m. a.); esto se ha apoyado con evidencias de fósiles de vertebrados, tales como *Pumilia novaceki* una especie similar a la iguana moderna restringida actualmente a ambientes tropicales al sur de Sinaloa (Norell, 1989). Lo cálido del Plioceno terminó con la entrada del Pleistoceno (2.5 m. a. - 11,000 años), el cual se caracterizó por cambios recurrentes de régimen climático. De acuerdo a estudios isotópicos de núcleos de sedimentos marinos entre 15 y 20 periodos fríos glaciares han alternado con periodos cálidos interglaciares en los últimos 2.4 m. a.

Se estima que los periodos glaciares han tenido una duración de cinco a diez veces más que los 10,000 a 20,000 años de duración de los periodos interglaciares (Caballero et al., 2010; Imbrie e Imbrie, 1979). El cambio en la vegetación en el Desierto de Sonora también ha sido estudiado a partir del registro fósil de materiales de plantas encontrados en nidos de rata coleccionista (*Neotoma sp.*; Van Devender, 1990). Las dataciones de radiocarbono de dichos materiales sugiere que especies afines a climas templados tales como: *Pinus monophylla* Torr. & Frém., *Juniperus sp.* Lemmon, *Quercus turbinella* Greene y *Yucca brevifolia* Engelm dominaban durante el último periodo glacial (~21,000 años), mientras que la expansión de la vegetación xérica actual ocurrió hace menos de 11,000 años, empezando por las especies de mayor tolerancia a condiciones frías como *C. gigantea*, y seguida de especies menos tolerantes al frío tales como *C. microphyllum*, *Olneya tesota* A. Gray, y *Stenocereus thurberi* (Engelm.) Buxb., hace aproximadamente 5,000 a 4,500 años (Van Devender, 2002).

Las condiciones climáticas actuales de la PBC son, en su mayor parte, el resultado de tres factores. 1) la amplia extensión latitudinal (33°N a 23° N) que resulta en la transición de zonas templadas con lluvias de invierno en el norte a zona tropicales con tormentas de verano en el sur; 2) la influencia del Océano Pacífico y del Golfo de California que generan una transición este-oeste con clima frío y neblina del lado del Océano Pacífico a un clima cálido, tipo continental (altas temperaturas en verano y frío en invierno) del lado del Golfo de California; y 3) la compleja geología de la península que incluye una cadena montañosa que recorre de manera latitudinal casi toda la PBC, y que capturan la humedad ascendente, generando mayor precipitación en regiones elevadas (Garcillán et al., 2010). Basados en las características medioambientales y distribución de la flora, Garcillán et al. (2010; 2012) identificaron tres grandes regiones fitogeográficas a lo largo de la Península, incluyendo: 1) la Región mediterránea, 2) la Región de Desiertos y 3) la Región del Cabo. El cardón *P. pringlei* se encuentra solamente en las dos últimas (Turner et al.,

1995). A continuación se describen las regiones en las cuales se encuentra *P. pringlei*.

La Región del Cabo está al sur de la falla de la Paz y marca el límite entre un ecosistema seco tropical con el clima árido que caracteriza a la mayor parte de la PBC. Esta región se caracteriza por altas precipitaciones ocasionadas por tormentas tropicales y ciclones que se forman durante verano y otoño en el Océano Pacífico. Aquí ocurre el único bosque deciduo tropical de la PBC y posee alto endemismo y riqueza específica (Garcillán et al., 2012). En las partes bajas de la región se estima un promedio de 200-400 mm de precipitación anual y temperatura promedio de 22–24° C, aquí se puede encontrar a *P. pringlei* acompañado de matorral sarcocaulé y vegetación característica de ambientes tropicales, tales como árboles perenes de tronco leñoso. La “Región de los Desiertos” es una amplia área de transición entre el clima mediterráneo del norte y el clima tropical de la región de los Cabos, la cual ha sido a su vez dividida en cinco sub-regiones. En la parte noreste está la sub-región denominada “Cuenca inferior del río Colorado” que son extensos terrenos arenosos donde la temperatura puede alcanzar los 50°C y las sequías pueden prolongarse de 3 a 7 años. En contraste, la sub-región del “Desierto Central”, que limita al oeste con el océano Pacífico, recibe precipitaciones invernales relativamente predecibles. Hacia la parte central de la península la sub-región montañosa de “La Giganta” separa por un lado, a la sub-región del “Desierto central del Golfo de California” y por el otro a las sub-regiones “Desierto de Vizcaíno” y las “Planicies de Magdalena”. El Desierto Central del Golfo, el cual incluye además a las islas medias del Golfo de California y la costa de Sonora, está formado por pendientes rocosas y el clima es árido y cálido con precipitaciones principalmente provenientes de tormentas de verano. Por su parte, el Desierto de Vizcaíno son planicies menores a los 100 m con suelo salitroso y clima frío y húmedo debido a la influencia de la nubosidad y de neblinas provenientes del Océano Pacífico. Finalmente, las Planicies de Magdalena, que conforman los corredores de drenaje de la Sierra de la Giganta, tiene la

influencia tanto del Océano Pacífico así como la influencia de condiciones tropicales más sureñas (Garcillán et al., 2012; Figura 2).

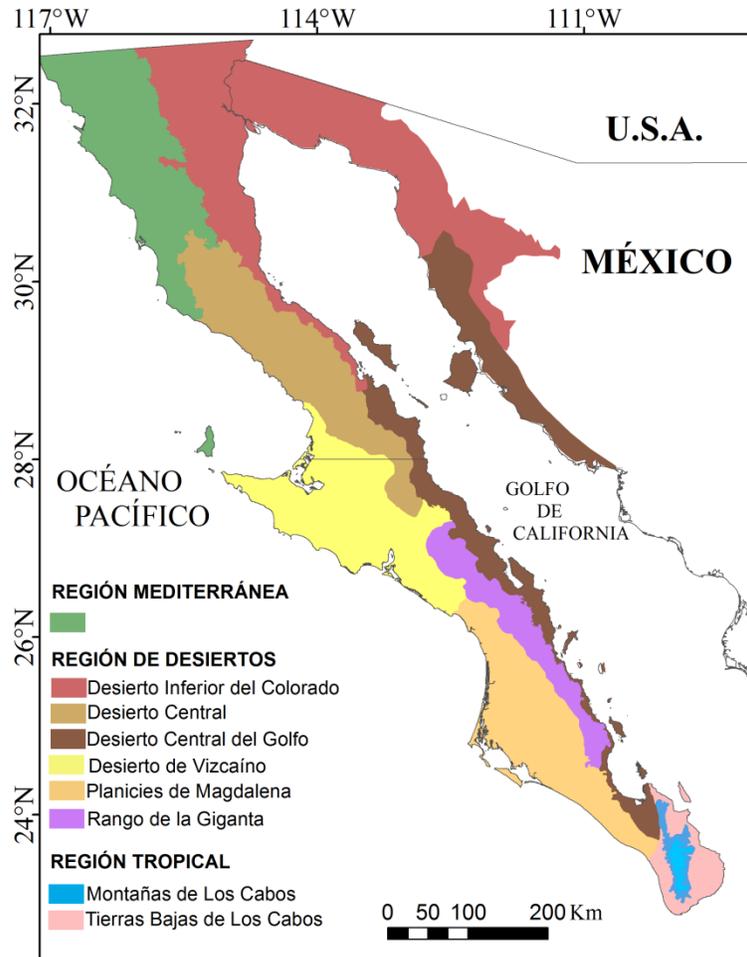


Figura 2. Regiones fitogeográficas descritas para la península de Baja California. Modificado de Garcillán et al. (2012).

A lo largo de la región de “Los Desiertos” la vegetación está dominada por matorral sarcocaulé y leguminosas tales como: *Agave shawii* var. *Goldmaniana* (Trel.) Gentry, *Bursera microphylla* A. Gray, *Opuntia cholla* F.A.C. Weber., *Cyrtocarpa edulis* (Brandegge) Standl., *Fouquieria columnaris* (Kellogg) Kellogg ex Curran, *F. diguetii* (Tiegh.) I.M. Johnst, *Jatropha cinerea* (Ortega) Müll. Arg., *J. cuneata* Wiggins & Rollins, *L. schottii*, *Lysiloma candidum* Brandegge, *Pachycormus*

discolor Coville ex Standl., *Parkinsonia florida* (Benth. Ex A. Gray) S. Watson, *Prosopis glandulosa* var. *Torreyana* (L.D. Benson) A.E. Murray, *S. gummosus*, *Yucca valida* Brandegee, entre otras. Sin embargo, la composición varía entre sub-regiones. Por ejemplo, *Stenocereus eruca* (Brandegee) A.C. Gibson & K.E. Horak (chirinola) es endémica de las planicies de Magdalena, mientras que en el Desierto de Vizcaíno dominan arbustos bajos o postrados tolerantes a la sal, tales como *Atriplex* sp L., *Bahiopsis deltoidea* (A. Gray) E.E. Schill. & Panero, *Encelia farinosa* A. Gray ex Torr. Por su parte, en la cuenca inferior del Río Colorado la vegetación está compuesta principalmente por arbustos resistentes a la sequía, tales como: *Agave deserti* Engelm., *Ambrosia dumosa* (A. Gray) W.W. Payne, y *Fouquieria splendens* Engelm., *Larrea tridentata* (Sessé & Moc. Ex DC.) Coville.

No hay información detallada sobre la abundancia del cardón, específicamente para cada una de estas fitoregiones. El único estudio realizado sobre la distribución de *P. pringlei* asoció variaciones en la densidad y la morfología con la latitud; en donde se observó una disminución de la densidad en dirección sur a norte; mientras que la longitud y el grosor del tallo aumentaron en dirección opuesta (Medel-Narváez, 2008). En la región de Los Cabos la densidad del cardón es relativamente alta (248 \pm 45 ind/ha) pero los individuos son de menor talla y más delgados; mientras que hacia la región del Desierto Central la densidad del cardón es relativamente baja (de 55 a 31 ind/ha) pero los cardones son más altos y robustos.

En el caso de las islas del Golfo de California, hay poca información pero dada su cercanía con el macizo continental se cree que sus condiciones climáticas y ambientales son similares a las regiones adyacentes de la PBC o de la costa de Sonora (Cody et al., 2012). El cardón se encuentra en todas las islas del Golfo de California (Turner et al., 1995), aunque no se conoce de qué marea varía su densidad a lo largo de estas. A partir de las densidades estimadas para las Islas Catalana (201 \pm 57 ind/ha) y Cerralvo (442 \pm 51 ind/ha), Medel-Narváez (2008) sugiere que la densidad insular es mayor que la observada en sitios adyacentes de la península.

2.3 Pirosecuenciación

Los microsatélites se están empleado cada vez más para estudios genéticos poblacionales y de filogeografía debido a que proveen de alta resolución a escalas finas espaciales y temporales (Selkoe y Toonen, 2006). Los microsatélites son secuencias repetitivas en tándem de 1 a 6 pares de bases, definidos por sus regiones flanqueantes conservadas (iniciadores). Son marcadores co-dominantes, generalmente no codificantes y de herencia biparental que gracias a su relativamente alta tasa mutacional (10^{-3} y 10^{-6} mutaciones / locus / generación; Schlötterer 2000) resultan en altos niveles de polimorfismo que provee de resolución estadística a niveles intra-específicos. Los alelos de los microsatélites están determinados por las diferencias en el número de unidades repetitivas (motivos) que los conforman. Las distintas tallas de los alelos se pueden identificar por medio de electroforesis vertical, empleando iniciadores marcados fluorescentemente y para ser detectados mediante un laser en un secuenciador automático (Ellegren, 2004).

Hasta hace poco, el aislamiento y caracterización de marcadores microsatelitales era un factor limitante debido al alto costo y tiempo requerido para obtenerlos por medios tradicionales de clonación. Con el advenimiento de nuevas técnicas de secuenciación masiva, tales como la pirosecuenciación 454-Roche, ahora es posible la obtención de cientos de miles de fragmentos, secuenciados de manera aleatoria a lo largo del genoma en cuestiones de horas y a un costo relativamente bajo. La información obtenida de la pirosecuenciación puede ser empleada para identificar las secuencias que contengan fragmentos repetitivos y diseñar primer *de novo*, empleado herramientas bioinformáticas. De manera general la pirosecuenciación consisten en tres pasos:

1. **Preparación de una librería**, donde el ADN de un solo individuo es fragmentado y se le adhieren adaptadores (secuencias cortas similares) a los extremos (Figura 3A).

2. **Emulcificación y PCR**, donde cada fragmento con los adaptadores se incorpora a una gota de aceite (emulsión) que contiene los elementos necesarios para realizar la PCR, incluyendo agua, iniciadores o primers, dNTPs, polimerasa y microesferas con las secuencias complementarias a uno de los adaptadores unidas en su exterior. En cada una de las gotas de aceite ocurre una reacción de PCR (Figura 3B).

3. **Secuenciación masiva**, donde las microesferas con los fragmentos amplificados se cargan en una placa de fibra óptica con 96 pozos de ~44Um de diámetro. En cada pozo cabe una sola microesfera y además contiene la enzima luciferasa. La secuenciación inicia cuando los nucleótidos (A, G, C, T) con pirofosfatos se van inyectando de manera secuencial a través de la placa y cada vez que un nucleótido es adherido a la hebra complementaria la luciferasa libera un haz de luz que es detectado por la cámara de CCD (por su siglas en ingles: "Change-coupled device"). Entre cada inyección de nucleótidos se agrega la enzima aspirasa que degrada los nucleótidos no adheridos. Este proceso se repite varias veces hasta agotar los reactivos (Owen-Hughes y Engeholm, 2007; Figura 3C).

Las técnicas de secuenciación masiva se han venido desarrollando de manera acelerada en los últimos años, actualmente se emplean técnicas alternativas a la pirosecuenciación de 545, tales como SOLiD de Applied Biosystems y Ion Torrent de Life technology.

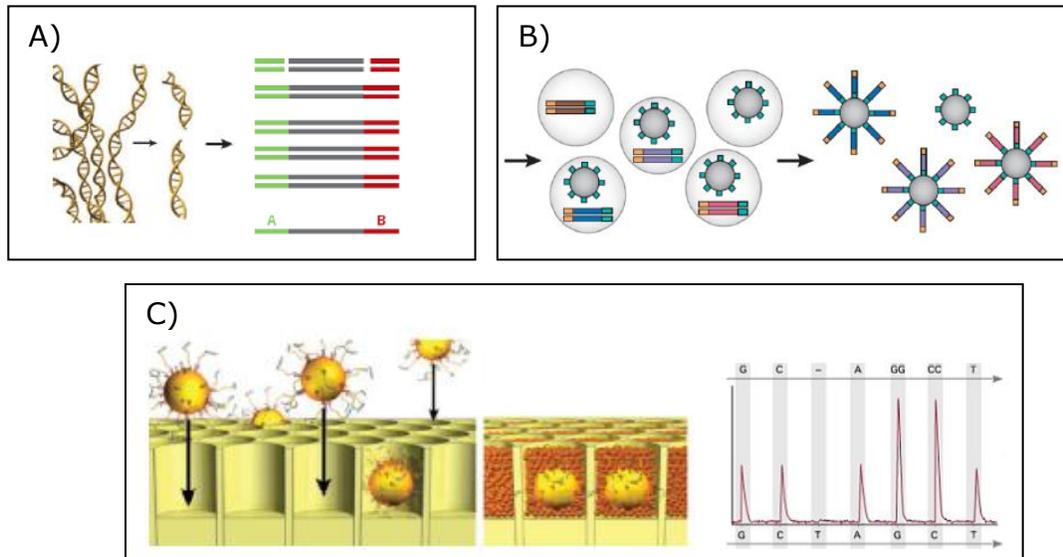


Figura 3. Esquema representativo del proceso de pirosecuenciación 454-Roche. Imagen modificada de (Owen-Hughes y Engeholm, 2007). A) Formación de librerías de ADN donde el ADN es fragmentado y luego se le unen adaptadores (extremos verdes y rojos). B) Emulsificación y PCR. Los fragmentos de ADN con los adaptadores y las microesferas con las partes complementarias a los adaptadores se introducen a gotas de aceite con los componentes necesarios para realizar la PCR, al final de este proceso quedan varias clonas unidas a cada microesferas. D) Pirosecuenciación, donde cada microesfera se introduce a una placa de fibra óptica, los nucleótidos unidos a pirofosfatos se van agregando de manera secuencial (pequeñas esferas rojas dentro de placa) y cada vez que uno se adhiere a la hebra de ADN emite un haz de luz que es detectado por la cámara CCD.

2.4 Modelación de Nicho

La modelación de nicho permite obtener la distribución geográfica potencial de la especie en función de las variables medioambientales (Kearner y Porter, 2009). La información sobre la presencia de la especie se obtiene de campo, a partir de datos georreferenciados de avistamientos o recolectas de los individuos. Por su parte las variables predictoras o medioambientales consisten en capas digitalizadas derivadas de temperatura y precipitación, modelos de elevación, tipo de suelo, cobertura vegetal, etc. obtenidas de sensores remotos en base de datos disponibles en la web.

Existen distintos métodos para realizar la modelación de nicho, de los cuales el más empleado es el algoritmo de máxima entropía o MAXENT debido a varias ventajas, por ejemplo: 1) solo requiere datos de presencia, 2) permite el empleo de

variables continuas y categóricas, y 3) emplea un algoritmo que permite obtener la distribución de probabilidad más óptima (máxima entropía) (Phillips et al., 2006). Este método determina las distribuciones de las variables ambientales para el área de estudio especificada así como para los registros de presencia. El programa, determina el área potencial de presencia de la especie tratando de igualar las medias de dichas distribuciones y maximizando la entropía (es decir que la distribución sea lo más plana u homogénea posible). El resultado es un modelo continuo, el cual permite identificar distintos grados de ambientes óptimos para la presencia de la especie. Los resultados también se pueden presentar en forma de modelo binario de presencia y ausencia, lo cual es adecuado para determinar el rango de distribución potencial de la especie (Phillips et al., 2006).

El nicho fundamental de la especie es el rango de condiciones medioambientales en los cuales la especie puede existir (Hutchinson, 1957). Por su parte el nicho realizado es el área que la especie ocupa actualmente. Dado que MAXENT emplea datos de presencia, la modelación de nicho resultante es una aproximación del nicho realizado de la especie. Esta aproximación es generalmente mayor al nicho realizado debido a que, de manera natural, distintos factores impiden la distribución de las especies en toda el área que potencialmente puede ocupar, tales como; interacciones entre especies (competencia intra e interspecífica y depredación), barreras geográficas, influencia humana, factores históricos de colonización y capacidad de dispersión de los individuos (Anderson y Martínez-Meyer, 2004; Peterson et al., 1999).

Una vez identificado el modelo de nicho potencial de la especie, este puede ser proyectado a diferentes regiones, o bien, si existen las proyecciones de las variables ambientales al pasado y al futuro, la modelación de nicho potencial de la especie también puede ser proyectada a distintos periodos de tiempo.

El la modelación de nicho se asume que los datos de ocurrencia son resultado de los recursos del hábitat y no del producto de la inmigración de alguna población

fuente; que todas las variables medioambientales tienen el mismo peso predictivo de la presencia de la especie y en el caso de la modelación de nicho al pasado o al futuro asume que no existe cambio del nicho fundamental ni de la capacidad de dispersión de la especie (Peterson, 2011).

La modelación de nicho ha sido empleada recientemente en estudios de filogeografía para evaluar sitios de refugio, asociando la distribución potencial de las especies al último máximo glacial con la diversidad genética (Garrick, 2013; Jezkova et al., 2014; Knowles y Alvarado-Serrano, 2010); para identificar el nicho potencial de linajes cercanamente emparentados (Leaché et al., 2009; Worth et al., 2015) y su asociación a presiones selectivas (Freedman et al., 2010; Manel et al., 2010); para caracterizar preferencias y tolerancias ambientales (Wooten y Gibbs, 2012) entre otras aplicaciones. Aunque no ha sido evaluado en especies con distintos sistemas de reproducción, la modelación de nicho también podría ser de utilidad para identificar la segregación espacial de sexos asociada a condiciones medioambientales diferenciales.

2.5 Diferencias morfológicas de flores

En cactáceas, la identificación de sexos se ha determinado principalmente a partir de observaciones de campo (i.e. producción de frutos) y de la observación directa de óvulos y granos de polen en las flores. En menor medida, se han realizado estudios morfológicos y/o morfométricos detallados de las estructuras reproductivas. En general, estos estudios han mostrado que en flores bisexuales el androecio (estambres, anteras y polen) y el ginoecio (pistilo, cámara ovárica y óvulos) están bien desarrollados, mientras que las flores unisexuales presentan cierto grado de degeneración en las estructuras del sexo no funcional (Anexo 1). A continuación se describen algunas de las principales diferencias morfológicas de las flores pistiladas y estaminadas de cactáceas.

En el caso de las flores pistiladas (femeninas), estas se caracterizan principalmente por la ausencia de granos de polen (Del Castillo y Argueta, 2009; Del Castillo y González-Espinoza, 1988; Leuenberger, 1986; Orozco-Arroyo et al., 2012; Anexo 1); aunque en algunos casos como *Opuntia quimilo* (Díaz y Cocucci, 2003), *Echinocereus yavapaiensis* (Baker, 2006) y *Mammillaria dioica* (Bemis et al., 1972, en Parfitt, 1985) se reportó la producción ocasional de granos de polen “inmaduros”, “falsos”, o “malformados”. Otra característica de las flores pistiladas es la presencia de anteras indehiscentes; es decir, no se abren lateralmente para permitir la expulsión de granos de polen (Bemis et al., 1972 en Parfitt, 1985; Brandegeee, 1897; Strittmatter et al., 2006; 2008).

Para el caso de las flores estaminadas de cactáceas, éstas exhiben diferentes grados de especialización hacia la función masculina. La producción de óvulos y funículos (estructuras filiformes que derivan de la pared de la cámara ovárica y se diferencian en óvulos en su extremo distal) varía ya sea desde: la ausencia total de óvulos y funículos (Negrón-Ortiz y Strittmatter, 2004), la presencia de funículos desarrollados y óvulos ocasionales de talla reducida e inviábiles (Orozco-Arroyo et al., 2012), hasta la presencia de abundantes funículos y óvulos bien desarrollados que pueden resultar en frutos (Strittmatter et al., 2006; 2008).

En el caso del cardón la diferenciación de sexos se ha basado únicamente en la presencia/ausencia de polen y granos de polen (Medel-Narvaez, 2003; 2008; Fleming et al., 1994). En el caso de las flores estaminadas se reportó la presencia de dos morfos de flores estaminadas: Dichos morfos se diferenciaron por la ausencia y presencia ocasional de óvulos.

Además de las diferencias morfológicas, las flores unisexuales presentan diferencias morfométricas. Se ha reportado mayor producción de óvulos en el caso de flores pistiladas con respecto a flores bisexuales (Del Castillo y Trujillo Argueta, 2009; Baker, 2006; Hoffman, 1992; Fleming et al., 1994; 1998; Medel-Narváez, 2003; 2008; Scobell y Schultz, 2005). También se reportaron flores y anteras más grandes

y mayor cantidad de polen en flores estaminadas con respecto a flores bisexuales (Del Castillo y Trujillo Argueta, 2009; Días y Cocucci, 2003). Para el cardón Fleming et al. (1994), reportó mayor cantidad de óvulos en flores pistiladas y mayor cantidad de polen en flores estaminadas.

La presencia de características morfológicas y morfométricas similares a lo largo de distintas especies de cactáceas (Anexo 1), sugiere que mecanismos similares están controlando la expresión sexual y favoreciendo mayor fertilidad de unisexuales sobre las flores bisexuales. Los análisis morfológicos y morfométricos detallados de flores permitirán corroborar si los morfos florales del cardón presentan características similares a los reportados previamente para esta y otras cactáceas.

2.6 Sistemas de reproducción

A diferencia de los animales en los cuales la reproducción es principalmente sexual, en plantas la reproducción sexual y asexual son ampliamente distribuidas. Dentro de la reproducción sexual podemos encontrar especies hermafroditas (ambos sexos en un mismo individuo) y especies con dimorfismo de géneros (individuos con sexos separados; Richards, 1997). Al igual que en las angiospermas, la gran mayoría de las cactáceas son hermafroditas; aunque el dimorfismo de géneros se ha reportado en 30 (~2%) de las 1,845 especies reportadas por Anderson (2001). La mayoría de los hermafrodita han desarrollado mecanismos que promueven la reproducción entre individuos diferentes o xenogamia (i.e. dicogamia¹, hercogamia², monoicismo³ y auto-incompatibilidad; Richards, 1997) aunque en algunos casos los hermafroditas pueden ser autocompatibles, como se ha sugerido para *P. pringlei* (Fleming et al., 1996). Por su parte, el dimorfismo de géneros es sin duda el mecanismo más efectivo para garantizar la xenogamia. El dimorfismo de género implica individuos con funciones sexuales diferentes. Plantas hembra producen

¹ Dicogamia. Separación espacial de las anteras y estigma dentro de flores bisexuales

² Hercogamia. Separación temporal en la maduración de granos de polen y óvulos

³ Monoicismo. Producen flores pistiladas y estaminadas en un mismo individuo

únicamente flores pistiladas; mientras que plantas macho producen únicamente flores estaminadas (con algunas excepciones donde flores estaminadas pueden producir óvulos viables, Strittmatter et al., 2006; 2008). Los machos, hembras y hermafroditas se combinan de distintas formas para dar origen a los sistemas de reproducción. Estos son: ginodioico (hembras y hermafroditas), androdioico (machos y hermafroditas), subdioico (hembras, hermafroditas y machos que ocasionalmente producen frutos viables), y trioico (machos, hembras y hermafroditas). Todos los sistemas de reproducción se han reportados en la familia Cactaceae. De acuerdo a una revisión bibliográfica realizada en este estudio, aproximadamente el 33% de las cactáceas con dimorfismo de géneros ocurren en la PBC. Las islas del Caribe también presentan alto porcentaje de especies dimórficas (39%), lo cual podría sugerir que la condición de aislamiento es un factor importante para promover la separación de sexos. Por otro lado, el cambio de presiones también podrían ser importantes ya que las tres especies con mayor rango de distribución en norte América, incluyendo a *Echinocereus coccineus*, *Opuntia robusta* y *Pachycereus pringlei*, presentan más de un sistema de reproducción (Medel-Narváez, 2008; Hoffman, 1992; Scobell y Schultz, 2005; Del Castillo y Trujillo Argueta, 2009; Figura 4).

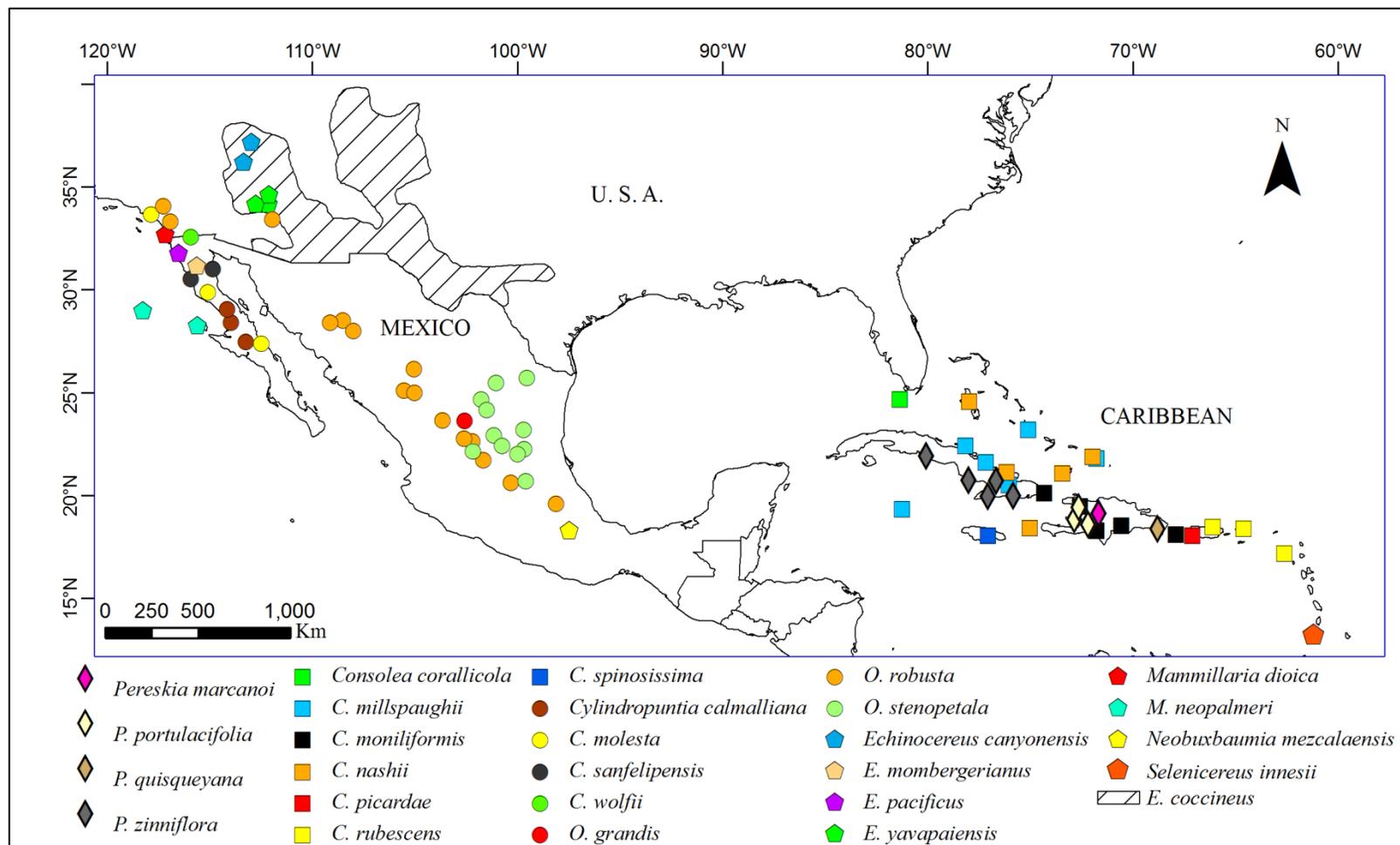


Figura 4. Distribución geográfica de especies de cactáceas dimórficas. La distribución fue inferida de: Areces-Mallea, 1996; Baker, 2006; Del Castillo y Trujillo Argueta, 2009; Hoffman, 1992; Leuenberger, 1986; Negrón-Ortiz y Strittmatter, 2004; Scobell y Schultz, 2005; Strittmatter, 2002; Valiente-Banuet et al., 1997; New York Botanical Garden (NYBG), Arizona State University Vascular Plant Herbarium (ASU); University of California, Riverside Plant Herbarium (UCR); University of Arizona Herbarium (ARIZ).

Los sistemas de reproducción del cardón fueron descritos por Fleming et al. (1994; 1996), Molina-Freaner et al. (2003) y Medel-Narváez (2008). Estos autores identificaron tres sistemas de reproducción. 1) Un sistema trioico al centro y sur de la PBC, así como en el norte de la costa de Sonora; 2) un sistema ginodioico principalmente al norte de la PBC; y 3) un sistema hermafrodita en dos islas del sur del Golfo de California, Isla Catalana e Isla Cerralvo (Figura 5).

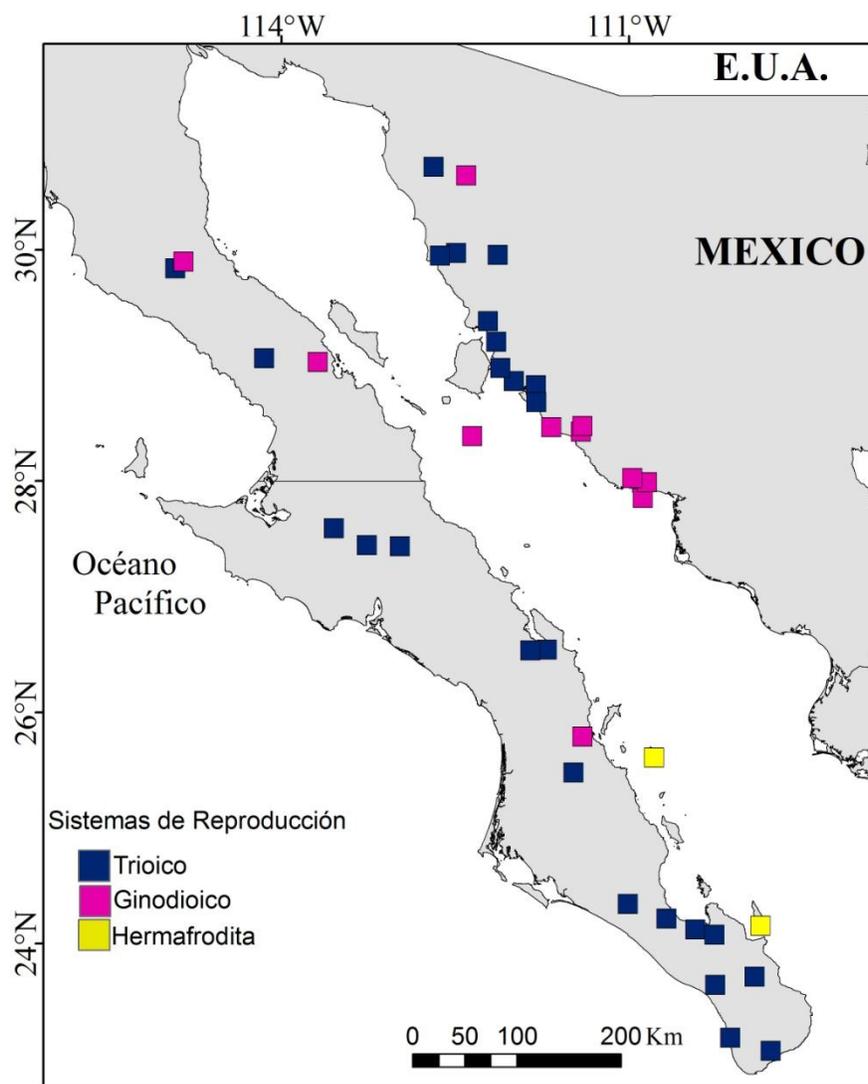


Figura 5. Sistemas de reproducción del cardón *P. pringlei* en el noroeste de México, reportados en la literatura (Fleming et al., 1996; 1998; Medel-Narváez, 2008; Molina-Freaner et al., 2003). Trioico = machos, hembras y hermafroditas, Ginodioico = hembras y hermafroditas.

La presencia de distintos sistemas de reproducción ha llamado la atención de biólogos evolutivos interesados en investigar las presiones selectivas que determinan su establecimiento (Charlesworth, 1990; Bawa, 1980; Lloyd, 1972). Entre los principales factores que regulan cada sistema de reproducción se ha sugerido a los polinizadores y a las condiciones medioambientales, las cuales afectan la tasa de autofecundación, la fertilidad y la sobrevivencia de los morfos sexuales.

En el caso de los factores ecológicos, el murciélago *Leptonycteris curasoae* ha sido considerado como el factor principal para el sistema trioico en el cardón (Fleming et al., 1998; Molina-Freaner et al., 2003). Este polinizador es altamente efectivo (89% de fijación de frutos; Fleming et al., 1994) y posee gran capacidad de dispersión (20-30 Km de forrajeo, Sahley, 1993). Considerando que los machos producen, en promedio, más polen que los hermafroditas (1.6 veces más polen que los hermafroditas); Fleming et al. (1998) proponen que la presencia de este polinizador incrementa el éxito reproductivo de los machos con respecto a los hermafroditas. Esto se debe, no solo al transporte efectivo del polen, sino además al aumento en la disponibilidad de óvulos. Sin embargo, en un estudio más reciente en el cual se incluyeron más sitios de observación de *P. pringlei* y nuevos registros de cuevas de maternidad de *L. curasoae*, Molina-Freaner et al. (2003) indican que la presencia de este murciélago no es suficiente para explicar el patrón geográfico de los sistemas de reproducción del cardón. Las áreas geográficas donde hay poblaciones trioicas y ginodioicas pueden ser sitios con baja y alta abundancia del murciélago

Alternativamente, Molina-Freaner et al. (2003) suponen que el patrón geográfico de sistemas de reproducción del cardón podría ser el resultado histórico de una colonización hacia el norte, o bien podría estar afectado por otros factores, tal como la heterogeneidad ambiental. Este factor puede afectar la distribución y abundancia de los polinizadores; o bien, directamente sobre la fertilidad y sobrevivencia de los morfos sexuales. Scobell y Schultz (2005) sugirieron que los sistemas de reproducción de la cactácea columnar *Echinocereus coccineus* están determinados

por el cambio de polinizadores a lo largo de un gradiente altitudinal y de precipitación. Sitios elevados con alta precipitación favorecen la presencia de colibríes. Estos polinizadores de gran capacidad de dispersión reducen la tasa de autofecundación y depresión por endogamia, favoreciendo el establecimiento de un sistema hermafrodita. En contraste, en sitios bajos y de poca precipitación, los polinizadores principales son las abejas. La poca capacidad de dispersión de las abejas incrementa la tasa de autofecundación y la depresión por endogamia, favoreciendo el establecimiento de un sistema dioico (machos y hembras). Seguramente la temperatura es un factor que limita la distribución del murciélago *L. curasoae*. A pesar de que éste murciélago es un mamífero homeotermo, su distribución está restringida a zonas tropicales y subtropicales, posiblemente por el alto gasto energético que requiere el vuelo, no le permiten mantenerse en sitios con temperaturas frías (Valiente-Banuet et al., 1996). Sin embargo, a diferencia de la alta depresión por endogamia estimada para *E. coccineus* ($d = 0.99$), estudios basados en la producción y germinación de semillas en *P. pringlei*, revelaron un efecto despreciable de depresión por endogamia (i.e. $d = 0$; Fleming et al., 1998). Es posible que el cambio en la tasa de autofecundación promovido por el cambio de polinizadores, el cual ha resultado, a su vez, del cambio de condiciones climáticas, no parece ser un factor importante para determinar el sistema de reproducción del cardón.

El efecto directo de la heterogeneidad ambiental sobre los sistemas de reproducción se ha demostrado en varias especies de plantas (Arroyo y Squeo, 1990; Ashman, 1999; Barrett, 1992; Costich, 1995; Delph, 1990; Hart, 1985; Sakai y Weller, 1999; Webb, 1979). De manera general, estos estudios proponen que en condiciones estresantes o de recursos limitados la tendencia es hacia la separación de funciones sexuales; mientras que condiciones más óptimas, la tendencia es hacia sistemas monomórficos. En *Wurmbea dioica* (R.Br.) F. Muell, una especie de la familia Liliácea que se distribuye en Australia, el sistema de reproducción hermafrodita ocurre en ambientes más húmedos, mientras que el sistema dioico se

encontró preferentemente en sitios más secos (Barrett, 1992). Esto se ha explicado por las diferencias en los costos reproductivos. Los hermafroditas, al poseer dos funciones sexuales requieren recursos suficientes para poder llevar a cabo sus funciones reproductivas, por lo que tienden a estar en sitios donde los recursos no son limitantes. En contraste, los machos, al perder la función sexual de mayor costo (femenina) podrían resultar favorecidos con respecto a los hermafroditas, en condiciones estresantes o de recursos limitados. En el caso de *Wurmbea dioica*, la presencia de machos en sitios más secos fue explicada por redistribución de recursos hacia la producción de raíces más largas que las de los hermafroditas, esto incrementa su capacidad de toma de agua y nitrógeno en sitios con recursos limitantes. Entonces, es posible que en el cardón, los polinizadores junto con las condiciones medioambientales estén determinando el patrón de distribución geográfica de los sistemas de reproducción. La distribución de machos del cardón (y por lo tanto los sistemas de reproducción trioico) podría asociarse a sitios donde se encuentra su principal polinizador debido que éste incrementa su fertilidad relativa a la de los hermafroditas; pero también podría resultar favorecido en sitios de escasos recursos (de menor precipitación anual) donde se espera que los machos sean más eficientes en la captura de recursos que los hermafroditas, debido a su menor costo reproductivo y capacidad de redistribución de recursos para otras funciones vitales.

2.7 Conceptos básicos de genética poblacional y filogeografía

Para fines de este estudio se adoptó el concepto genético de población, la cual se define como un conjunto de individuos de una misma especie que comparten un acervo o “pool” genético, donde todos los miembros pueden aparearse aleatoriamente (Waples y Gaggiotti, 2006). La genética de poblaciones es la rama de la genética que se encarga de cuantificar la diversidad y estructura genética de las poblaciones, así como su cambio a través del tiempo (evolución). La diversidad se refiere a la variabilidad genética y puede ser medida en diferentes formas, tales

como: proporción de loci polimórficos, número de alelos por loci, y heterocigosidad o proporción de individuos heterocigotos (individuos con alelos distintos para mismo loci). Por su parte, la estructura genética se refiere a la distribución de las frecuencias alélicas de las poblaciones, esta puede ser homogénea o discontinua. Un patrón homogéneo de estructura genética sugiere reproducción al azar o panmixia; mientras que un patrón discontinuo sugiere reproducción no aleatoria y acción independiente o diferencial de las fuerzas evolutivas, tales como mutación, migración, deriva genética y selección natural (Templeton, 2006).

El patrón discontinuo de estructura genética (reproducción no aleatoria y acción independiente o diferencial de las fuerzas evolutivas) es promovido por la influencia de eventos históricos tales como la dispersión y vicarianza; así como por la influencia de factores ecológicos tales como: tipo y abundancia de polinizadores, preferencia de hábitat, etc., como de historia de vida tales como sistemas de reproducción (Duminil et al., 2009; Hewitt, 1996).

Cuando la historia evolutiva de las poblaciones se analiza desde la perspectiva de la biogeografía histórica; es decir, buscando explicaciones asociadas a eventos geológicos o climáticos históricos de los patrones espaciales de diversidad genética observados, entonces se habla de filogeografía (Avice, 2000). Los patrones filogeográficos se explican por medio de dos hipótesis: la vicarianza y la dispersión. Los cuales se explican en las siguientes secciones.

2.8 Patrón filogeográfico

La hipótesis de vicarianza predice que el surgimiento de una barrera física (surgimiento de montañas, cuencas, canales, etc.) fragmenta la distribución de las especies y promueve su diferenciación genética. Esto se debe a la ausencia de flujo genético y la acción independiente de las fuerzas evolutivas a ambos lados de la barra. La vicarianza puede reflejarse en el surgimiento de alelos privados, filogenias recíprocamente monofiléticas (los ancestros y descendientes en un mismo clado

para cada población), y con el tiempo suficiente resulta en especiación alopátrica (Avice, 2000).

Como se comentó, el Desierto de Sonora y en particular la PBC es una región caracterizada por una compleja historia geológica, que aunada a los eventos climáticos de escala global, han tenido un profundo efecto sobre el patrón de variación genética de la fauna y flora local (Grismer, 2000). Sin embargo, las investigaciones en la flora xérica son escasas (Clark-Tapia y Molina-Freaner, 2003; Fleming et al., 1998; Nason et al., 2002). Varios estudios realizados en vertebrados e invertebrados de la PBC sugieren que los patrones filogeográficos observados pueden explicarse mediante la hipótesis de vicarianza, siendo tres los eventos vicariantes más ampliamente usados, 1) la formación del Golfo de California durante el Plioceno (que concluyó aproximadamente hace 3-5 m. a., Crews y Hedin, 2006; Lindell et al., 2008; Riddle et al., 2000; Upton y Murphy, 1997; Whorley et al., 2004); 2) un canal transpeninsular que separó temporalmente la región de Los Cabos y La Paz, al sur de Baja California Sur, el cual comunicó temporalmente el Golfo de California con el Océano Pacífico hace aproximadamente 3 m. a. (Riddle et al., 2000; Upton y Murphy, 1997) y 3) un canal medio transpeninsular a la altura del Desierto de Vizcaíno hace aproximadamente 1 a 1.6 m. a. (Crews y Hedin, 2006; Upton y Murphy, 1997). A pesar de la importancia relativa de los eventos geológicos históricos en la arquitectura genética de la fauna local de la PBC, dichos eventos vicariantes parecen haber tenido poco impacto en las cactáceas del Desierto de Sonora. Por ejemplo, los dos primeros eventos geológicos fueron apoyados por un estudio aloenzimático realizado en la senita, *Lophocereus schottii* (Nason et al., 2002); mientras que no hay señales genéticas asociadas a un canal medio transpeninsular para esta u otras especie de cactáceas columnares para las cuales se han realizado estudios moleculares, incluyendo la pitahaya agria, *Stenocereus gummosus* (Clark-Tapia y Molina-Freaner, 2003) y la especie objeto de este estudio, el cardón *Pachycereus pringlei* (Fleming et al., 1998).

Lo anterior podría explicarse en parte porque las cactáceas son organismos de origen tropical que posteriormente se adaptaron a condiciones cálidas y áridas de los desiertos. La intensificación de las heladas y la disminución de las lluvias de verano durante los periodos fríos glaciales debieron reducir el rango de distribución de las cactáceas (Shreve, 1964; Van Devender, 1990), borrando las señales genéticas que pudieron haber dejado los eventos vicariantes históricos.

La hipótesis alternativa a la vicarianza es la dispersión, la cual predice que el patrón filogeográfico de las especies es el resultado de la expansión del rango de distribución, atravesando barreras físicas pre-existentes. El cambio de régimen climático provocado por los eventos glaciales e interglaciales que caracterizaron al Pleistoceno a menudo resultan en la contracción y expansión del rango de distribución de las especies. En el escenario más simple, donde la contracción del rango de distribución ocurre hacia una sola zona de refugio, seguido de una expansión unidireccional, se espera que los valores de diversidad genética más altos se localicen en la zona de refugio, seguido de una reducción gradual en dirección a la ruta de dispersión (Hewitt, 1996). Si además el flujo genético es restringido, se espera encontrar un patrón de aislamiento por distancia donde las relaciones de parentesco entre poblaciones decrecen conforme aumenta la distancia; así como una filogenia de clados anidados donde los linajes más recientes evolutivamente se anidan y derivan sucesivamente de linajes más ancestrales (Wright, 1943). El patrón de aislamiento por distancia, la filogenia de clados anidados y la disminución gradual de la diversidad genética hacia el norte, sugieren la extinción de las poblaciones norteñas de senita (*L. schottii*) como consecuencia de la disminución de la temperatura durante el Último Máximo Glacial (UMG, ~21,000) seguido de una expansión post-Pleistocénica del rango de distribución hacia el norte de la península (Nason et al., 2002). Esta hipótesis fue apoyada también por el patrón latitudinal de la diversidad genética observado en la pitahaya agria *S. gummosus*, a partir de estudios aloenzimáticos y microsateles (Clark-Tapia y Molina-Freaner, 2003; Lozano-Garza, 2013).

Si las cactáceas del desierto de Sonora compartieron una misma historia climática, entonces es posible que el patrón filogeográfico de *P. pringlei* sea consistente con una zona de refugio al sur de la península, seguido de una expansión reciente. Esto encubriría las señales genéticas que pudieron haber dejado los eventos vicariantes más antiguos.

2.9 Sistemas de reproducción y patrón genético de variación

Como mencionamos anteriormente, además de los eventos históricos vicariantes y de la dispersión, un patrón genético discontinuo puede deberse a la influencia de factores ecológicos y de historia de vida. El sistema de reproducción, es con mucho el principal rasgo de historia de vida que afecta el patrón genético de variación en plantas. Sin embargo, este tema ha sido pobremente estudiado en cactáceas debido, principalmente, a la ausencia de especies con variación geográfica clara en los sistemas de reproducción.

Estudios realizados en otras especies son consistentes con que el aumento en la tasa de autofecundación reduce el flujo genético entre poblaciones y aumenta el efecto de la deriva genética dentro de poblaciones, lo cual se traduce en una mayor diferenciación genética entre poblaciones y menor diversidad dentro de poblaciones en especies hermafroditas autocompatibles, con respecto a especies xenogámicas obligadas (entrecruzamiento entre individuos diferentes; Duminil et al., 2009).

Hamrick y Godt (1989) en un estudio aloenzimático de varias especies de plantas, observaron que en especies hermafroditas, el 51% de la variabilidad ocurrió entre poblaciones mientras que en poblaciones xenogámicas la mayor variabilidad ocurrió dentro de las poblaciones y menos del 10% entre éstas. Por su parte, en una revisión bibliográfica de los valores de diferenciación genética (F_{ST}), coeficientes de endogamia (F_{IS}) y tasa de entrecruzamiento (t_m) reportados para 263 especies de plantas, Duminil et al. (2009) identificó que el sistema de reproducción predice

consistentemente el grado de diferenciación genética. Como lo había notado anteriormente Hamrick y Godt (1996), conforme el sistema de reproducción favorece la autofecundación, se incrementa el grado de diferenciación genética entre poblaciones. Esto lo explicaron porque la autofecundación disminuye el flujo genético entre poblaciones (ocasionada porque el polen empleado para la autopolinización no contribuye al flujo genético) y aumenta la depresión por endogamia, la cual reduce el tamaño efectivo poblacional e incrementa la deriva genética dentro de las poblaciones.

El único estudio en cactáceas que sugiere un efecto del sistema de reproducción sobre el patrón genético, es el realizado por Nassar et al. (2001) para la cactácea globosa Venezolana *Melocactus curvispinus* Pfeiff. En este estudio Nassar et al. (2001) propusieron que tanto la dispersión limitada mediada por animales, así como la presencia de un sistema de reproducción mezclado (i.e. con variación geográfica de la tasa de autofecundación a lo largo del rango de distribución) podrían ser los principales factores responsables de la menor diversidad genética dentro de poblaciones y la mayor diferenciación genética entre poblaciones en *Melocactus curvispinus* Pfeiff, comparados con los valores descritos en cactáceas columnares con reproducción xenogámica obligada y polinizadores que poseen amplia capacidad de dispersión del polen.

Alternativamente, un estudio más reciente (Onge et al., 2011) indican que tanto los sistemas de reproducción como los eventos demográficos históricos juegan un papel importante en el patrón contemporáneo de estructuración genética de las especies. La menor diversidad genética fue observada en *Capsella rubella*, una especie autocompatible (90 - 94% de autofecundación), comparado con *C. grandiflora*, una especie cercanamente emparentada con reproducción cruzada. Pero además, los patrones de estructuración de cada especie sugieren la influencia de eventos históricos. *C. rubella* derivó de un proceso de especiación reciente a partir de *C. grandiflora*, posiblemente por varios eventos fundadores independientes. Mientras que *C. grandiflora* mostró evidencia de eventos recurrentes de contracción

y expansión, así como aislamiento por distancia, posiblemente asociados con cambios climáticos recurrentes (eventos glaciales).

El cardón es una especie con una marcada diferencia en los sistemas de reproducción. Si el aumento en la frecuencia de los hermafroditas del cardón es reflejo de un aumento en la tasa de autofecundación. Entonces, de acuerdo a lo observado en otras especies, se esperaría que las localidades hermafroditas presentaran menor grado de diversidad genética y mayor grado de estructuración genética comparado con las poblaciones trioicas donde la presencia de los unisexuales favorecería un aumento en la tasa de entrecruzamiento y de flujo genético.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Contribuir al conocimiento de la morfología floral, la ecología de los sistemas de reproducción y la estructura genética de las poblaciones del cardón *Pachycereus pringlei* a lo largo de sus distribución geográfica.

3.2 Objetivos particulares

1. Identificar las diferencias morfológicas y morfométricas de flores pistiladas, estaminadas, y hermafroditas del cardón *P. pringlei* en una localidad ubicada al sur de La Paz, Baja California Sur.
2. Corroborar el patrón geográfico de los sistemas de reproducción de *P. pringlei*, reportado en estudios previos, así como su relaciones con la distribución de su principal polinizador (*Leptonycteris curasoae*) y variables medioambientales derivadas de la temperatura y precipitación.
3. Determinar la estructura genética y patrón de la diversidad del cardón *P. pringlei*.
4. Evaluar la concordancia con la presencia de una zona de refugio al sur de la península, y verificar la ocurrencia de una reciente de expansión demográfica hacia el norte.
5. Determinar si los eventos vicariantes (i.e. Golfo de California, canal medio transpeninsular e Istmo de La Paz) sugeridos en la literatura para explicar los patrones filogeográficos observados en animales y plantas de la PBC se cumplen en el cardón.

6. Determinar la relación de los patrones de distribución geográfica de los sistemas de reproducción y la estructura genética del cardón en la PBC.

4. HIPÓTESIS

Hipótesis 1

Dado que estudios anteriores han revelado características morfológicas similares que se asocian con la esterilidad masculina (hembras) y femenina (machos) de flores pistiladas y estaminadas para la familia cactaceae. En este estudio se espera observar flores pistiladas con anteras indehiscentes, sin producción de polen o polen malformado; así como distintos niveles de especialización de las flores estaminadas, incluyendo distintos grados de diferenciación de funículos y posiblemente la presencia de óvulos.

Hipótesis 2

Dado que el éxito reproductivo de los machos del cardón está determinado por la dispersión del polen a través de polinizadores y que los cardones, al perder la función sexual de mayor costo (femenina) pueden redistribuir recursos hacia otras funciones vitales permitiéndoles una mejor optimización de recursos en ambientes pobres, tales como baja precipitación. En este estudio se espera encontrar regiones geográficas con poblaciones trioicas con presencia de *L. curasoe* y/o con menor precipitación anual.

Hipótesis 3

Dada la vulnerabilidad de las plantas del desierto a las condiciones frías y alto régimen de precipitación en invierno, asociados con periodos glaciales; así como al patrón de aislamiento por distancia y área refugio en el extremo sur de la Península de Baja California, sugeridos para otras cactáceas columnares del Desierto de Sonora. En este estudio se espera un gradiente latitudinal de diversidad genética, aislamiento por distancia y una zona de refugio al sur de la península, así como una ausencia de señales genéticas asociadas a eventos vicariantes históricos.

Hipótesis 4

Dado que la limitación del polen debido a la tasa de autofecundación aumenta la diferenciación genética y disminuye la diversidad dentro de poblaciones; se espera observar un mayor grado de diferenciación genética y menor diversidad en sistemas de reproducción hermafrodita y ginodioico, comparado con el sistema trioico.

5. JUSTIFICACIÓN

El cardón, *P. pringlei* junto con otras cactáceas columnares tales como el sahuaro (*Carnegiea gigantea*), la senita (*Lophocereus schottii*), y la pitahaya agria (*Stenocereus gummosus*) forma parte de la tribu *Pachycereeae*, la cual es de gran importancia para México ya que de las 58 especies que la integran, 54 se encuentran en el país y 47 son especies endémicas (Arias-Montes et al., 1997). En el noroeste de México, las cactáceas columnares dominan el paisaje y constituyen un elemento clave del ecosistema. Su gran biomasa, longevidad e inversión en estructuras reproductivas, proveen de refugio, protección y alimento a una gran variedad de vertebrados e invertebrados. A pesar de su importancia ecológica, aun se conoce muy poco sobre los factores ecológicos, medioambientales y de historia de vida que están determinado su establecimiento y promoviendo su evolución.

Realizar estudios biológicos, ecológicos y evolutivos del cardón no solo resulta interesante por sus características excepcionales de amplia distribución y polimorfismo de sistemas de reproducción, sino que además son fundamentales para entender su papel en el ecosistema y contribuir con el conocimiento de la riqueza específica de México. A la fecha los estudios ecológicos del cardón se han limitado a pocas localidades (Bahía Kino, SON; Comitán, B.C.S.); mientras que los estudios moleculares de cactáceas columnares en general, se han visto limitados por la falta de marcadores de alta resolución. Esto ha impedido identificar patrones de estructuración genética a escalas finas e identificar el papel de factores ecológicos o de historia de vida en el repertorio genético de las especies. Es necesario realizar estudios integrales que incorporen aspectos biológicos, ecológicos y genéticos, empleando nuevas herramientas de alta resolución, poder de análisis y de inferencia. Esto va a permitir tener un panorama amplio de los procesos que están determinando la distribución geográfica y evolución de las especies a macro y micro escala. Además, investigaciones futuras podrán sacar ventaja de la delimitación genética de poblaciones y del patrón filogeográfico encontrado en esta especie para direccionar preguntas de investigación minimizando esfuerzos de recolecta.

Este estudio forma parte de un proyecto integral de filogeografía comparada del noroeste de México el cual incluye otra especie de cactácea (*S. gummosus*), dos especies de cianobacterias (*Microcoleus vaginatus* y *Microcoleus chthonoplastes*), dos crustáceos (*Triops longicaudatus*, *Streptocephalus dorotheae*), y dos invertebrados (*Pardosa sierra* y *Pardosa litoralis*). Este megaproyecto permitirá identificar los efectos que han dejado los eventos vicariantes antiguos (Mioceno) y cambios climáticos recientes (Pleistoceno) sobre la estructura genética y filogeografía de la biota del noroeste de México. Así mismo permite explorar sobre explicaciones alternativas a dichos eventos geológicos y climáticos históricos dependiendo de la historia de vida de cada especie.

6. MÉTODOS

6.1 Área de estudio

El área de estudio comprende el rango de distribución de *P. pringlei* (Turner et al., 1995). Esta área ocupa gran parte de la PBC, algunas islas del Golfo de California y costa de Sonora, todos ubicados al noroeste de México. Con excepción de la región del Cabo, el rango de distribución de *Pachycereus pringlei* forma parte de la provincia florística denominada “Desierto de Sonora” (Figura 6).

6.2 Trabajo de campo

Con la ayuda de un estadal, el cual consiste de un tubo extensor con un pequeño saco de tela en su extremo distal para evitar que las flores recolectadas caigan al suelo, se recolectaron 1,826 flores de individuos diferentes de *Pachycereus pringlei* durante Marzo a Julio del 2010 y 2011. En total se visitaron 45 localidades, distribuidas a lo largo de todo el rango de distribución del cardón, incluyendo 29 localidades de Baja California Sur (5 Islas), 7 localidades de Baja California Norte, y 9 de Sonora (3 Islas) (Figura 6, TABLA III). De cada sitio se registró la ubicación geográfica con un GPS. Posteriormente, cada flor se etiquetó y se guardó en una bolsa de plástico dentro de una hielera hasta su procesamiento en laboratorio.

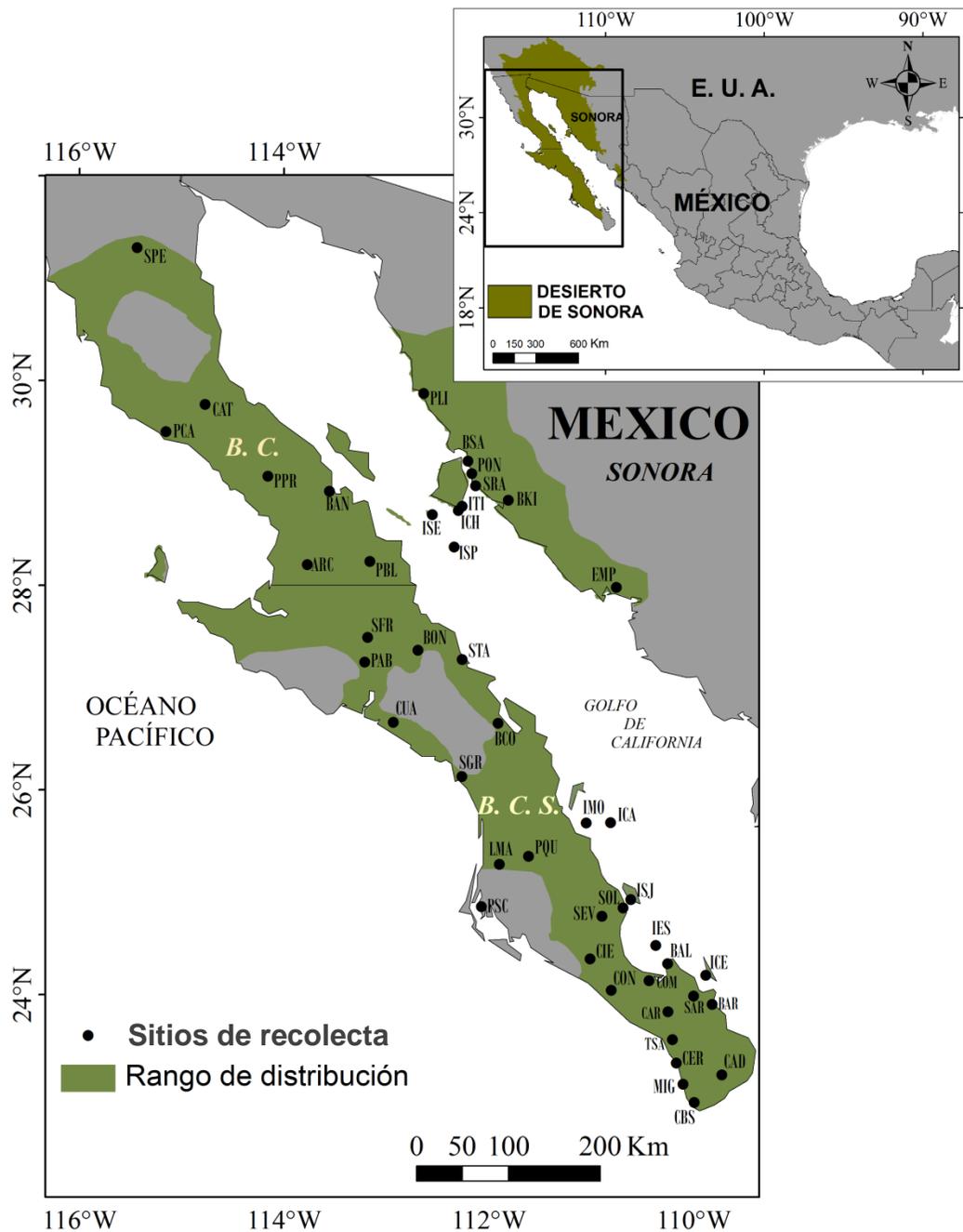


Figura 6. El área de estudio incluye todo el rango de distribución de *Pachycereus pringlei* (Turner et al., 1995) la cual pertenece, en su mayoría a la provincia denominada desierto de Sonora (imagen superior derecha). En la imagen se muestran los sitios de recolecta. Para detalles de las abreviaciones ver TABLA III.

6.3 Caracterización morfológica y morfométrica de flores

Una vez en laboratorio, las 1,826 flores se cortaron por la mitad de manera transversal con un bisturí y se determinó el sexo con la ayuda de un microscopio estereoscopio con aumentos de 4x y 10x. La ausencia de polen en las anteras se consideró como carácter diagnóstico para las hembras o de flores pistiladas (P); la ausencia de óvulos en la cámara ovárica se consideró como carácter diagnóstico para los machos o flores estaminadas (E); la presencia de óvulos y polen se consideró como carácter diagnóstico para hermafroditas (H) o flores bisexuales; mientras que las flores que no presentaron polen ni óvulos se consideraron estériles (S). Después de la identificación del sexo, se cortó una porción de tejido de la pared del nectario (~200 mg) de cada flores y se preservó en alcohol etílico 96° para los análisis moleculares subsecuentes.

Para la caracterización morfológica y morfométrica se estudiaron seis individuos de cada sexo previamente identificados. Primero se obtuvieron imágenes del corte transversal de un individuo de cada sexo con una cámara digital Nikon D100 (NIKON®), así como imágenes de las estructuras funiculares a 6.5X aumentos con una cámara ajustada al estereoscopio. Posteriormente, se realizaron análisis morfométricos. Se tomaron distintas medidas de la flor y de las estructuras reproductivas, incluyendo: el diámetro de diez óvulos (D_o) y de diez granos de polen (D_p) por flor, empleando el programa implementado en el microscopio electrónico de barrido Joel JSM-6010 InTouchScope™ (JEOL USA, Inc. Peabody, MA, EUA). Además, se empleó un vernier para determinar la longitud total de la flor (L_t), diámetro de la corola (D_c), diámetro basal a la altura de la cámara ovárica (D_b), longitud promedio de 30 estambres de la parte más externa de cada flor (L_e), longitud de la cámara ovárica (L_c), diámetro de la cámara ovárica (D_{co}), longitud del pistilo (L_p), longitud del nectario (L_n) y longitud de diez pétalos por flor (L_{pe}). Además se cuantificó el número de estambres por cm^2 (N_e) y el número total de óvulos (N_o) (Figura 7). Las diferencias entre sexos fueron evaluadas estadísticamente por medio de análisis de varianza en el programa STATISTIA v8.0 (StatSoft).

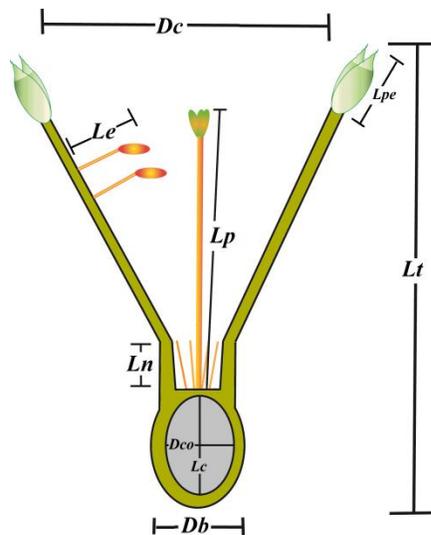


Figura 7. Esquema representativo del corte transversal de una flor de cardón y las mediciones realizadas para los análisis morfométricos. Longitud total de la flor (L_t), diámetro de la corola (D_c), diámetro basal a la altura de la cámara ovárica (D_b), longitud promedio de estambres (L_e), longitud de la cámara ovárica (L_c), diámetro de la cámara ovárica (D_{co}), longitud del pistilo (L_p), longitud del nectario (L_n) y longitud de pétalos (L_{pe}).

Posteriormente, se realizó la identificación más detallada de las diferencias morfológicas entre sexos con ayuda de un microscopio electrónico de barrido Joel JSM-6010 InTouchScope™ (JEOL USA, Inc. Peabody, MA, EUA). Se capturaron imágenes de distintas estructuras reproductivas de cada sexo, incluyendo: cámara ovárica, óvulos, estambres y granos de polen. Para mejorar la resolución de las imágenes electrónicas, se realizó un tratamiento de deshidratación gradual con etanol a distintas concentraciones (i.e. 30%, 50%, 80%, 100%), seguido de un cambio gradual de etanol a acetona (etanol:acetona a 70:30, 50:50 y 30:70, y 100% acetona), secado con CO_2 en una cámara de Punto Crítico Polaron E3000 Series II (Quorum Technologies Ltd, Sussex, UK), y recubrimiento con polvo de oro en una cámara Sputter Coater Edwards S150B (Edwards, Sanborn, NY, USA) siguiendo las instrucciones de los proveedores.

6.4 Sistemas de reproducción

Primeramente, para cada sitio de muestreo se estimó la proporción de sexos y el sistema de reproducción. Las localidades sin machos ni hembras se consideraron como localidades con sistema de reproducción hermafrodita (H), las localidades con hermafroditas, al menos una hembra pero ausencia de machos se consideraron ginodioicas (G); por su parte las localidades con hermafroditas, hembras y al menos un macho se consideraron trioicas (T). Los distintos sistemas de reproducción se representaron en un mapa del noroeste de México (CONABIO, <http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/>) empleando el programa ARCGIS 9.3 (ESRI, 2009). En el caso de los sistemas de reproducción trioicos se hicieron tres clases dependiendo de la frecuencia de machos (ocurrencia de machos en 10%, 30% y >30%) con la finalidad de visualizar la posible contribución reproductiva de estos a lo largo de los sitios de muestreo. Se evaluaron las diferencias de sexos entre grupos por medio de análisis de varianza (ANOVA) en el programa STATISTICA v8.0 (StatSoft). Las regiones evaluadas fueron: Baja California Sur, Baja California Norte, Sonora e Islas del Golfo de California. También se identificó la correlación entre las frecuencias de sexos.

Posteriormente se determinó la asociación entre las cuevas de maternidad y los datos de captura del murciélago *L. curasoae* con la distribución espacial de los sistemas de reproducción. Para esto, se obtuvieron registros de captura (Rojas-Martínez et al., 1999) y la de ubicación geográfica de cuevas de maternidad de *L. curasoae* de la literatura (Fleming et al., 1998; Molina-Freaner et al., 2003). Estos datos se representaron sobre el mapa de distribución de sistemas de reproducción de *P. pringlei* diseñado previamente. De acuerdo a la literatura, la capacidad de forraje del murciélago es de 20-30 Km (Sahley et al., 1993), por lo que se calculó un área potencial de forrajeo de los murciélagos a 30 y 60 Km a la redonda de cada cueva. Para ello se empleó la herramienta de “buffer” de ARCGIS (ESRI, 2009). Con el mismo programa (ARCGIS, ESRI, 2009) se estimó la distancia de cada localidad a la cueva de maternidad de murciélagos más cercana y se evaluó su asociación con

los sistemas de reproducción por medio de un análisis de varianza en el programa STATISTICA v8.0 (StatSoft).

La asociación de las variables climáticas con el patrón espacial de sistemas de reproducción se analizó por medio de modelación de nicho y análisis discriminante. La modelación del nicho potencial para toda la especie y posteriormente para el sistema de reproducción trioico se realizó empleando el algoritmo de máxima entropía en el programa MAXENT v. 3.3.3 (Phillips et al., 2006). Para la modelación de nicho de toda la especie se emplearon en total 88 registros de presencia, obtenidos de campo (este estudio) y de la literatura (Molina-Freaner et al., 2003; Fleming et al., 1994; 1998; y Medel-Narvaez, 2008; Anexo 2). En el caso de la modelación de nicho del sistema trioico, se emplearon solamente aquellos sitios con tamaño de muestra >20 y frecuencia relativa de machos >30%. Las capas de variables climáticas derivadas de la precipitación y temperatura fueron obtenidas de la base de datos del WorldClim (Hijmans et al., 2005, Anexo 3) a una resolución de 30 segundos de arco (~1 Km). El área de estudio y las coberturas bioclimáticas se cortaron en ARCGIS v9.3 (ESRI, 2009) para incluir solamente la porción noroeste de México (i.e. PBC, Sonora y parte de Sinaloa). Los datos se dividieron aleatoriamente para ser empleados en puntos de entrenamiento (70%) y de validación (30%) del modelo (Phillips et al., 2006). Se utilizó un umbral de convergencia de 10^{-5} con 1,000 iteraciones, 10 réplicas para cada modelo y se tomó como corte de la distribución potencial el umbral de presencia mínima (Anderson et al., 2004). La capacidad predictiva del modelo fue medida por medio del valor de AUC (área bajo la curva) que toma valores de 0 a 1, donde uno representa total predicción del nicho. El modelo final que resultó del promedio de las diez réplicas se convirtió a datos binarios en ARCGIS v9.3 (2009) en el caso de la modelación de nicho para toda la especie; mientras que se dejó en términos de probabilidad de presencia para el caso de la modelación del sistema trioico.

El análisis discriminante se empleó para identificar qué variables climáticas de precipitación y temperatura separan mejor a los distintos sistemas de reproducción

del cardón. Las variables categóricas fueron: hermafroditas, trioicos y ginodioicos de acuerdo al sistema de reproducción determinado previamente para cada localidad. Las localidades con frecuencias relativas de machos menores al 10% se consideraron dentro del grupo “ginodioico” ya que es probable que la contribución del polen de los machos a la siguiente generación sea mínima comparada con la contribución de los hermafroditas que son mucho más abundantes y teóricamente son autocompatibles (Fleming et al., 1994). Las variables ambientales se obtuvieron a partir de la extracción de la información climática de cada una de las 19 variables del WorldClim correspondientes a cada localidad de muestreo (Anexo 3). Para ello se empleó el programa ARCGIS v9.3 (ESRI, 2009). Todas las variables climáticas que resultaron con $\geq 90\%$ de correlación lineal entre ellas se excluyeron del análisis. El análisis de correlación de variables, así como el análisis discriminante se realizaron en el programa STATISTICA v8.0 (StatSoft).

6.5 Patrón filogeográfico

6.5.1 Obtención, diseño y caracterización de microsatélites

Dado que no existían marcadores microsatélites especie específicos en el cardón, se diseñaron a partir de la técnica de pirosecuenciación.

Se realizaron diez extracciones de ADN de corteza fresca de un mismo individuo de *Pachycereus pringlei*, recolectado en El Comitán, La Paz, B. C. S. (23.985°N, 110.187°W) siguiendo el protocolo de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), modificado para plantas mucilaginosas (Cota-Sánchez et al., 2006; De la Cruz et al., 1997; Anexo 4). Los productos se resuspendieron en 25 μL de agua MiliQ® (Milipore, Billerica, MA., E.U.A.) y se determinó la cantidad y pureza en un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, EUA). Las extracciones que resultaron con alta pureza (i.e. razón 260/280 > 1.8) se juntaron y se trataron durante 30 min a 37°C con ARNasa (4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), agregando 2 μL

de ARNs por cada 100 μ L de producto de ADN. Aproximadamente \sim 5 μ g totales de ADN se enviaron a The Genome Sequencing Center de The University of California, Santa Cruz, E. U. A. para la secuenciación aleatoria de regiones del genoma (pirosecuenciación) con la plataforma 545 de Roche y la química GS-FLX Titanium (Roche diagnostic, Basel, Switerland). La pirosecuenciación se realizó bajo las condiciones del prestador de servicio en una placa, junto con otras siete especies, cada una con un código de secuencia identificadora. Una flor del individuo pirosecuenciado se depositó en el Herbario HCIB del CIBNOR; con número JLLL11726, HCIB28440). Debido al bajo éxito de pirosecuenciación, se realizó una corrida adicional. Se emplearon herramientas bioinformáticas, disponibles en la red para su análisis. Primero los archivos “.sff” obtenidos del pirosecuenciador se unieron, se eliminaron los adaptadores específico y se transformaron a archivos de secuencias (“.fasta”) y de calidad (“.qual”) con el software “sff_extract” (http://bioinf.comav.upv.es/sff_extract/index.html). Posteriormente, se obtuvieron datos descriptivos de las lecturas, tales como número y longitud de las secuencias, empleado líneas de comandos (“scripts”) disponibles en la página del SCRIPTOME de la Universidad de Harvard, E. U. A. (<http://sysbio.harvard.edu/csb/resources/computational/scriptome/Windows/>). Se estimaron estadísticos generales tales como promedio y desviación estándar del número y longitud de secuencias con el uso de Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). La identificación de lecturas con potenciales microsatélites perfectos (\geq 5 motivos para di-nucleótidos y \geq 4 motivos para tri- tetra-, penta- y hexa-nucleótidos) se realizó con el programa MSATCOMMANDER (Faircloth, 2008). Los archivos de secuencias (“.fasta”) y de calidad (“.qual”) resultantes del MSATCOMMANDER se importaron a Excel, en donde se filtraron aquellas lecturas con presencia de microsatélites potenciales. A partir de éste archivo con loci microsatelitales potenciales se diseñaron iniciadores mediante el programa PRIMER3 (Rozen y Skaletsky, 2000) incluido en el programa iQDD (Meglécz et al., 2010). Las condiciones especificadas para el diseño de iniciadores fueron: 1) la temperatura de alineamiento entre 50-70° C con un máximo de 2° C de diferencia

entre cada par de iniciadores, 2) los productos de PCR entre 90 y 320 pares de bases de longitud, 3) el contenido de GC > 40%, 4) la longitud de iniciadores entre 17 y 27 nucleótidos, y 5) los parámetros por defecto de PRIMER3 para auto-complementariedad de los iniciadores y complementariedad entre cada par de iniciadores.

Posteriormente, se seleccionaron 38 pares de iniciadores para probar su amplificación, patrón de bandeo y polimorfismo en 10 muestras de “El Comitán” (COM). Las extracciones de ADN se realizaron como se explicó anteriormente. Se realizaron diluciones de trabajo a concentraciones de ADN de $\sim 100\text{ng}/\mu\text{L}$ en agua MiliQ® (Milipore, Billerica, MA., E.U.A.). Se probaron tres temperaturas (la temperatura sugerida por el proveedor $\pm 2^\circ\text{C}$) y dos concentraciones de cloruro de magnesio (i.e. 1.5 mM y 2.0 mM) para cada par de iniciadores. Se realizaron reacciones de PCR de 10 μL , usando un termociclador ICycler (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA). Cada reacción consistió en 50 ng de DNA, 0.2 mM de cada dNTP (#18427-088, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0.4 μM de cada primer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), 1 \times PCR buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, a pH 8.4), 1–2.5 mM MgCl_2 , 0.4 U *Taq* DNA polimerasa (#11615-010, Invitrogen) y 0.1 mg mL^{-1} de albúmina de suero bovina (#B90015, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). El perfil de termociclado consistió en: 1) una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, 2) 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 45 s a la temperatura de anillamiento ($\pm 2^\circ\text{C}$ la temperatura sugerida por el proveedor) y una extensión a 72 °C por 1 min; y 3) una extensión final a 72 °C por 25 min. Los productos de PCR se visualizaron por medio de tinción de plata en geles de poliacrilamida 6% (Bio-Rad Laboratories), empleando una escalera de 10 pb (Invitrogen), 1800 volts y 45 watts por ~ 1 hora. Se seleccionaron los diez microatélites que resultaron con el menor número de “stutters” (bandas fantasmas) y que amplificaron consistentemente a lo largo de los 10 individuos empleados y se diseñaron iniciadores forwards marcados fluorescentemente en su extremo 5' (FAM, NED, PET y VIC de Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Para cada microsatélite se identificaron los motivos de

repetición, temperaturas de alineamiento, longitudes y números de acceso de GenBank. En la sección de resultados se muestran solamente los pares de iniciadores empleados en este el estudio, el resto de marcadores se agregaron como Anexo 5.

Los diez microsatelites optimizados y marcados con fluoróforos se caracterizaron en 80 individuos provenientes de dos localidades: El Comitán (L01) y Punta Prieta (L22). Las extracciones de ADN se realizaron como se explicó anteriormente y se emplearon diluciones de trabajo de $\sim 100\text{ng}/\mu\text{L}$ de ADN. Se realizaron reacciones de PCR con las condiciones y perfil de termociclado optimizados previamente, aunque en este caso se sustituyó el iniciador forward por el iniciador marcado. Los productos de PCR se agruparon de acuerdo al tamaño y color del fluoróforo en dos reacciones de secuenciación. MIX1: *FAM-Ppri01*, *NED-Ppri02*, *VIC-Ppri03*, *PET-Ppri04* y *FAM-Ppri09*; y MIX2: *VIC-Ppri05*, *FAMPpri06*, *VIC-Ppri07*, *NED-Ppri08*, *FAM-Ppri10*. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en $10\ \mu\text{L}$ de volumen total, consistentes en $9\ \mu\text{L}$ de Hi-Di™ formamida (Applied Biosystems), $1\ \mu\text{L}$ de 1:1 MIX: MiliQ H₂O, $1\ \mu\text{L}$ escalera LIZ 600 (Applied Biosystems). Los tamaños de alelos fueron detectados por laser en un secuenciador automático (Gene Analyzer, ABI 310, Applied Biosystems) y analizados con GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems). Finalmente, se estimaron diferentes parámetros de diversidad como número promedio de alelos por locus (A), número máximo de alelos por individuo (A_i) y heterocigosidad observada (H_o , como el número de individuos con al menos dos alelos diferentes) en Excel (Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA). La Heterocigosidad esperada (H_E) se estimó en ATETRA, un programa diseñado para especies tetraploides que toma en cuenta todas las posibles combinaciones de alelos en poblaciones con heterocigotos parciales (Van Puyvelde et al., 2010)

6.5.2 Control de calidad, obtención de genotipos

Para los análisis poblacionales se seleccionaron 21 sitios de muestreo de los 45 visitados, la selección de estos sitios se hizo tratando de cubrir todo el rango de distribución del cardón. La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo de bromuro de cetiltrimetilamonio (Cota-Sánchez et al., 2006; De la Cruz et al., 1997; Anexo 4). Los productos de PCR se mezclaron de acuerdo a su tamaño y color de fluoróforo en las reacciones MIX1 y MIX2 descritos anteriormente. Los productos PCR fueron analizados en un secuenciador automático (Gene Analyzer, ABI 310, Applied Biosystems). Los tamaños de alelos se determinaron en el software GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems) empleando la escalera LIZ 600 (Applied Biosystems).

Para el control de calidad se consideró lo siguiente:

1. La intensidad mínima de >100 unidades relativas de fluorescencia (RFU, relative fluorescence units) del pico principal en el electroferograma
2. Los tamaños consistentes con múltiplos de los motivos repetitivos. Para esto se construyó un alelograma por locus para identificar el patrón y en caso necesario se corrigió el corrimiento de lectura (i.e. $\pm 1\text{pb}$).
3. Todos los individuos con menos de 9 loci amplificados se excluyeron de análisis moleculares.
4. Al menos el 5% de los tamaños de alelos se corroboró empleando reacciones de PCR independientes.

Para la obtención de los genotipos se tomó en cuenta la posibilidad de observar hasta un máximo de cuatro picos, dado que estudios basados en el conteo de cromosomas (Pinkava et al., 1973) y el patrón de bandeo de aloenzimas (Murawski et al., 1992; Fleming et al., 1998) en el cardón, insinúan un nivel tetraploide, en al menos en una localidad de Sonora (Bahía Kino, 28° 50' N, 112° 05' W). Esto resultó

problemático porque las configuraciones alélicas de heterocigotos parciales (ABBB, AABB, AAAB, donde A y B son alelos de un locus) no se pueden identificar de manera directa, ya que tanto los genotipos AABB y AAAB producen electroferogramas de dos picos, pico A y pico B. Además de que no se pueden usar estadísticos convencionales, los cuales son diseñados para especies diploides. De manera teórica se espera que las razones de áreas entre los picos A y B (i.e. áreas obtenidas GeneMapper 4.1, Applied Biosystems) de un heterocigoto parcial bi-alélicos sean: 0.33, 1 y 3 para los genotipos ABBB, AABB y AAAB, respectivamente; mientras que las razones de áreas esperadas para los dos primeros picos (i.e. A y B) de los heterocigotos parciales tri-alélicos sean 0.5 y 2 para los genotipos ABB y AAB, respectivamente. Teniendo en cuenta las razones de área esperadas en individuos tetraploides, la determinación de los tamaños alélicos se realizó de la siguiente manera:

1. Los electroferogramas con dos picos se consideraron como individuos bi-alélicos verdaderos si el área del pico secundario (el de menor intensidad) fue $\geq 0.33\%$; el área del pico primario (pico de mayor intensidad), independientemente de su posición a la derecha (menor longitud de pares de bases) o a la izquierda (de mayor longitud de pares de bases) con respecto al pico primario.
2. Los electroferogramas que mostraron tres picos se consideraron como heterocigotos tri-alélicos verdaderos si el pico secundario presentaba una área $\geq 50\%$ al del área del pico primario, independientemente de su posición con respecto al pico primario
3. Los electroferogramas con tres picos en los cuales el pico secundario presentó un área mayor entre 30 y 50% al del área del pico primario, se consideraron como genotipos bi-alélicos, y el pico de menor intensidad se eliminó.

4. Los electroferogramas de cuatro picos se consideraron como genotipos tetra-alélicos verdaderos si al menos el pico secundario y terciario presentaron intensidades $> 60\%$ al del área del pico primario.
5. Los electroferogramas de cuatro picos donde ninguno de los picos secundarios presentaron intensidades $\geq 60\%$ al área del pico primario, se consideraron genotipo tri-alelico y se eliminó el pico de menor intensidad.
6. Los electroferogramas de cuatro picos donde los picos secundarios presentaron intensidades entre 30 y 50% al del área del pico primario se consideraron como genotipos bi-alélicos y se eliminaron los dos picos de menor intensidad
7. Los electroferogramas de cuatro picos se consideraron como genotipos tetra-alélicos verdaderos si al menos el pico secundario y terciario presentaron intensidades $> 60\%$ el área del pico primerio
8. Los electroferogramas de cuatro picos donde ninguno de los picos secundarios presentaron intensidades $\geq 60\%$ el área del pico primario, se consideraron genotipo tri-alelico y se eliminó el pico de menor intensidad.
9. Los electroferogramas de cuatro picos donde los picos secundarios presentaron intensidades entre 30 y 50% el área del pico primario se consideraron como genotipos bi-alélicos y se eliminaron los dos picos de menor intensidad

6.5.3 Niveles de ploidía

En un esfuerzo por determinar el nivel del ploidía de los distintos sitios de muestreo se emplearon dos métodos indirectos y otro directo. Entre los métodos indirectos, primero se determinó el nivel de ploidía por localidad de acuerdo al número máximo de alelos observado en al menos un individuo, usando el paquete POLYSAT en R (R Core Development Team, 2008). El segundo método indirecto empleado fue MAC-PR (por sus siglas en inglés "*Microsatelite DNA allele counting-peak area ratios*"), desarrollado por Esselink et al. (2004) para determinar el nivel de

ploidía por locus. Para éste último se determinó las razones de áreas entre los picos de individuos bi-alélicos y posteriormente se construyó una gráfica de distribución de las razones observadas para cada locus, esperando observar agrupaciones consistentes con las razones teóricas esperadas para tetraploides (alrededor de 0.33, 1 y 3, para los genotipos ABBB, AABB y AAAA, respectivamente). La posible presencia de genotipos ABBB, AABB y AAAA se infirieron a partir de las razones de áreas menores a 0.5, entre 0.5 y 1.5, y mayores a 2.5, respectivamente.

El método directo consintió en el conteo de cromosomas en tres sitios de muestreo con sistema de reproducción diferente: Cabo San Lucas (trioico), Puente Querétaro (ginodioico) e Isla Cerralvo (hermafrodita). De las dos primeras se recolectaron 10 frutos de individuos diferentes, mientras que de Isla Cerralvo solamente se pudieron conseguir tres frutos. Los frutos se mantuvieron frescos hasta su procesamiento en laboratorio, donde se extrajeron todas las semillas, después se enjuagaron con hipoclorito al 10%, se dejaron secar a temperatura ambiente, se envolvieron en papel secante a 4°C hasta su procesamiento. De cada fruto se hidrataron 90 semillas con agua destilada durante 24 horas. Posteriormente, las semillas se colocaron en cajas Petri con papel filtro húmedo a temperatura ambiente. Después de aproximadamente dos semanas, se recolectaron las raíces de varias plántulas (5-20 raíces) provenientes de un mismo fruto en un tubo Eppendorf® de 1.5mL con *Colchicina* 0.2% y se siguió el protocolo de tinción de cromosomas con fulgen y squash modificado de Singh (2003; Anexo 6). Las laminillas se fijaron en medio de Hoyer y se observaron a 100x en un microscopio Axio Imager Z1 (Carl Zeiss Microscopy, Alemania).

6.5.4 Diversidad genética e hipótesis de refugio

La base de datos tetraploide (incluyendo el tercer y cuarto alelos de los genotipos) se empleó para estimar la diversidad genética y otros estadísticos generales por sitio de muestreo. La diversidad se evaluó en términos de número de

alelos por locus (A), heterocigosidad esperada (H_E) y heterocigosidad observada (H_O). Este último se calculó en Excel (Microsoft) como la frecuencia de individuos que presentaron al menos dos alelos diferentes, mientras que el resto de los parámetros de diversidad se calcularon en el programa GENODIVE (Meirmans y Tienderen, 2004). Este programa permite analizar individuos poliploides con configuraciones alélicas desconocidas de heterocigotos parciales, para los cuales asigna los alelos faltantes, basado en las frecuencias alélicas de la población de origen. Estos índices de diversidad genética se emplearon para evaluar la correlación entre los datos genéticos con la hipótesis de refugio al sur de la península y reciente expansión hacia el norte de la flora xérica en el Desierto de Sonora propuesta por Van Devender (2002). Se realizaron tres análisis: 1) Se probó un aislamiento por distancia, 2) se buscó la presencia de un patrón latitudinal de la diversidad y 3) se realizó la modelación de nicho ecológico al pasado. La prueba de aislamiento por distancia permite conocer si el grado de diferenciación genética entre las localidades se asocia con la distancia geográfica que las separa. Este análisis se realizó dentro de cada población identificada con STRUCTURE para ello se usó el programa IBDW v. 3.16 (Isolation by Distance Web Service, Jensen et al., 2005). Para evaluar la significancia de este análisis se emplearon 10,000 permutaciones. Las distancias geográficas fueron estimadas como distancias euclidianas en kilómetros, obtenidas con ayuda de ARCGIS v9.3 (ESRI, 2009) y como distancias genéticas se emplearon las distancias de Nei (1972) calculadas en GENODIVE a partir de frecuencias alélicas (Meirmans y Tienderen, 2004). Para este análisis se emplearon solamente los sitios de muestreo peninsulares (BCO, CBS, CAR, CIE, COM CUA, SOL y LMA, STA, SGR, CAT, PBL, PPR, y SPE). Posteriormente se realizó el mismo análisis para probar dos escenarios de colonización de la península hacia Sonora. En el primer escenario, se agregaron las localidades de Sonora (BKI y BSA) y las distancias entre la península y Sonora se estimaron asumiendo una ruta de migración terrestre, por el delta del río Colorado. En el segundo escenario, se incluyó además la Isla San Esteban (IST) y las distancias entre la península y Sonora se calcularon asumiendo una ruta de colonización a través de esta isla.

El análisis espacial de diversidad genética permite identificar gradientes de diversidad y por tanto las zonas de mayor diversidad y con ellos es posible determinar potenciales zonas de refugio en el pasado. Éste se llevó a cabo en el programa STATISTICA (StatSoft) por medio de regresiones lineales simples entre la latitud e índices de diversidad tales como: heterocigosidad observada (H_O), heterocigosidad esperada (H_E) y número de alelos por locus (A). Además, en el caso de la heterocigosidad observada (H_O) se realizó un mapa para visualizar la variación de la heterocigosidad observada, mediante una interpolación de los valores de diversidad en ARCGIS v9.3 (ESRI 2009).

Por su parte, se realizó la modelación de nicho ecológico al último máximo glacial (~21,000) para detectar potenciales cambios históricos de la distribución geográfica, que pudiera influenciar los niveles de diversidad genética. Se procedió de la misma manera como se explicó anteriormente para la modelación de nicho al presente, pero en este caso se agregó además un modelo paleoclimático (“The Paleoclimate Modelling Intercomparison Project 2”; PMIP; <https://pmip2.lsce.ipsl.fr/>; Braconnot et al., 2007) diseñado por la Comunidad de Sistemas de Modelación Climática (“The Community Climate System Model”; CCSM3, <http://www.cesm.ucar.edu/>; Kiehl y Gent, 2004).

6.5.5 Estructura genética poblacional

Se empleó la base de datos tetraploide (incluyendo el tercer y cuarto alelos de los genotipos) para evaluar el grado de estructuración poblacional. Se usaron cinco métodos para determinar la estructura genética; un análisis bayesiano implementado en STRUCTURE (Pritchard et al., 2000), un análisis discriminante de componentes principales (DAPC) el uso de coeficientes de diferenciación genética (F_{ST} y Φ_{PT}), análisis de varianza molecular (AMOVA) y el uso de fenogramas mediante distancias genéticas.

El análisis bayesiano se empleó para asignar cada individuo a los K clusters inferidos. El programa se corrió de $K = 1$ a 10, con diez replicas cada una, usando un periodo de ensayo (“burn-in”) y de 10^5 y 10^6 cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC). Se asumió un modelo de mezcla y frecuencias alélicas correlacionadas. Se empleó el algoritmo desarrollado por Falush et al. (2007) para generar los genotipos apropiados dada la ambigüedad de marcadores co-dominantes de especies tetraploides. El número óptimo de cluster se determinó por medio de la segunda derivada de las probabilidades (ΔK) con el programa STRUCUTURE HARVESTER (Evanno et al., 2005; Earl et al., 2011; <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>). Posteriormente, se realizó unión óptima de las diez réplicas de cada K en el programa CLUMPACK server 1.1.2 (Jakobsson y Rosenberg, 2007; <http://clumpak.tau.ac.il/index.html>). Además de la gráfica de ancestría de STRUCTURE, los resultados se representaron geográficamente por medio de la interpolación de los valores de pertenencia individual con ayuda de ARCGIS v9.3 (ESRI, 2009). La imagen resultante fue ajustada al rango de distribución sugerido por la modelación de nicho al presente (ver más adelante). Posteriormente, se valoró la posibilidad de encontrar una subestructura dentro de cada uno de los clusters determinados por STRUCTURE mediante corridas independientes variando en el número de clusters ($K = 1$ a 6) y los tiempos de entrenamiento y de MCMC (20^5 y 20^6 , respectivamente).

El análisis discriminante de componente principales (DAPC) se realizó en el paquete ADEGENET de R (Jombart, 2008) para asignar los individuos al número de clusters identificados previamente por STRUCTURE. Este método combina la ventaja del análisis de componentes principales al no asumir equilibrio de Hardy-Weinberg o desequilibrio de ligamiento (Jombart et al., 2009; Patterson et al., 2006) con la ventaja del análisis discriminante de maximizar la separación entre clusters predefinidos. Además se empleó una matriz de datos calculada especialmente para individuos tetraploides, la cual toma en cuenta tanto las diferencias en frecuencias alélicas como las distancias mutacionales entre las variantes alélicas (tallas alélicas).

La matriz de distancias ente pares de individuos empleada para el DAPC se calculó en el paquete POLYSAT (R Core Development Team 2008; Clark y Jasieniuk, 2011) de acuerdo a Bruvo et al. (2004).

También se realizaron comparaciones pareadas entre sitios de muestreo (F_{ST} y Φ_{PT}) y análisis de varianza molecular AMOVA para estimar la partición de la varianza molecular dentro y entre grupos a distintos niveles jerárquicos. Por un lado se probaron los modelos de estructura que pudieran haber dejado los diferentes escenarios vicariantes sugeridos en la literatura (formación del Golfo de California, del canal medio transpeninsular y del canal del Istmo de La Paz), y por el otro lado, se probaron los clusters sugeridos por STRUCTURE. Para estos análisis se asumió poliploidía desconocida y patrón de herencia diploide. En el primer caso la base de datos tetraploide original se transformó a una base de datos de presencia / ausencia para cada alelo y para cada individuo, usando el programa POLYSAT (Clark y Jasieniuk, 2011, R Development Core Team, 2008). Este método elimina la varianza intra-individual por lo que es adecuado para realizar análisis en especies con niveles desconocidos de ploidía. En el segundo caso, se asumió diploidía, eliminando el tercer y cuarto alelos de los individuos con más de dos picos. Los alelos eliminados fueron aquellos con los niveles más bajos de unidades de fluorescencia relativa (RFU) identificados por GENEMAPPER. Los análisis con la base de datos de presencia / ausencia se realizaron en el programa GenAlex 6.5 (Peakall y Smouse, 2012); mientras que los análisis con la base de datos diploide se realizaron en el programa ARLEQUIN v3.5 (Excoffier et al., 2005).

Se identificaron las relaciones de similitud genéticas entre sitios de muestreo con un árbol de Neighbor-Joining. Este análisis permite visualizar por medio de un fenograma el grado de similitud genética entre los cardones recolectados en los diferentes sitios de muestreo. El fenograma consenso se construyó en el programa PHYLLIP a partir de 100 matrices de distancias genéticas de Nei (1972) entre pares de sitios de muestreo. Las matrices de Nei se calcularon en el programa GENODIVE

(Meirmans y Tienderen 2004), permutando los individuos dentro de los sitios de muestreo para cada caso.

Una vez determinado el número de poblaciones genéticas del cardón, posteriormente se estimó los índices de diversidad genética (A , H_O , H_E) de la forma anteriormente mencionada. Además se determinó el número de alelos privados (A_P) en Excel (Microsoft), y las frecuencias alélicas con el paquete POLYSAT de R (R Development Core Team, 2008).

6.6 Sistemas de reproducción y patrón genético de variación

Primeramente se evaluó la contribución relativa de los unisexuales y los hermafroditas al patrón general de estructuración genética realizando corridas independientes de STRUCTURE con dos bases de datos parciales: la primera donde solo se incluyen a los individuos hermafroditas (234 individuos) y la segunda donde solo se incluyen a los individuos unisexuales (276 individuos). Se siguieron las mismas condiciones de corrida descritas. Posteriormente se comparó el grado de diferenciación genética y de diversidad entre sistemas de reproducción, las comparaciones de diversidad se realizaron entre poblaciones genéticas identificadas por STRUCTURE. Las diferencias estadísticas se evaluaron por medio de análisis de varianza en el programa STATISTICA (StatSoft), empleando los valores de las comparaciones pareadas (F_{ST} y Φ_{PT}) y de heterocigosidad (H_E , y H_O). Para este análisis, se asignó el sistema de reproducción prevalente a cada población. Todas las localidades con frecuencia de machos <10% se consideraron en la categoría de “Ginodioicas”, las localidades con más de 30% de machos se consideraron en la categoría de “Trioicas”, mientras que las localidades con frecuencia moderada de machos (30%) se excluyeron de los análisis. Esto con la finalidad de incrementar el poder estadístico de la inferencia entre poblaciones con distinto sistema de reproducción.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización morfológica y morfométrica de flores

Las imágenes de microscopía de barrido electrónico permitieron observar de las estructuras reproductivas de las diferentes morfologías sexuales. En flores pistiladas y hermafroditas se observaron varios óvulos sujetos a la parte distal de los funículos (Figuras 8A, 8B, 8D, 8E), mientras que en la cámara ovárica de flores estaminadas se observó tejido funicular sin óvulos (Figuras 8F) o escasos óvulos de talla reducida (Figura 8C). En las flores estaminadas y hermafroditas las anteras son bilobuladas (Figuras 8K y 8L), abiertas lateralmente y han expulsado granos de polen, los cuales son tricolpados (tres aberturas laterales) y la teca (capa externa) presenta microperforaciones y espínulas (Figuras 8K, 8L, 8N, 8O). Por su parte, en flores pistiladas las anteras son tetralobuladas (Figura 8J) y, aunque están abiertas lateralmente, no hay evidencia de expulsión de granos de polen. Al interior de las anteras de las flores pistiladas se pudieron observar gránulos conglomerados (Figura 8M), algunos de ellos de tamaño y forma similar a granos de polen, pero con la teca no diferenciada o inmadura (Figura 8M).

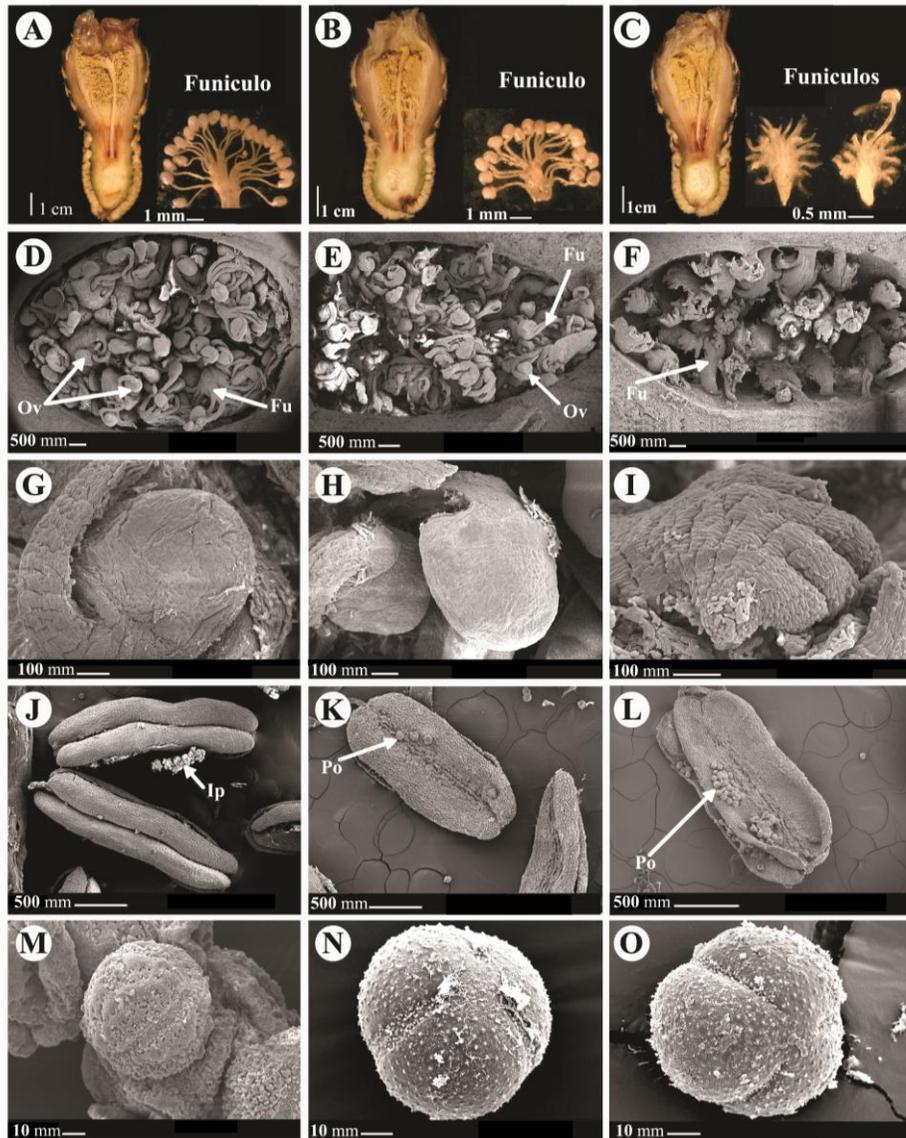


Figura 8. Imágenes digitales (ABC) y electrónicas de barrido de las estructuras reproductivas de flores pistiladas (A, D, G, J, M), hermafroditas (B, E, H, K, N) y masculinas (C, F, I, L, O) de *Pachycereus pringlei*. (A) Disección longitudinal y funículo ovárico de flores pistiladas, (B) flores hermafroditas y (C) flores estaminadas. La cámara ovárica de la flor pistilada (D) y hermafrodita (E) muestran una gran cantidad de tejido funicular (Fu) y óvulos (Ov); mientras que la cámara ovárica de la flor estaminada (F) no presenta óvulos, o escasos óvulos de tamaño reducido (C). (G) Óvulo maduro de flor pistilada y (H) de flor hermafrodita. (I) Parte distal de funículos de flores estaminadas en la cual el óvulo no se ha podido diferenciar. (J) Anteras de cuatro sacos polínicos o tetraesporángias de flor pistilada (J), en la cual se observan algunos granos de polen inmaduros (Ip). (K y L) Anteras dehiscentes de flor hermafrodita y estaminada, respectivamente, mostrando granos de polen (Po). (M) Polen posiblemente inmaduro de flor pistilada. (N y O) Granos de polen tricolpados (formado por tres tecas) de flores hermafroditas y estaminadas, respectivamente.

Las flores estaminadas (machos) fueron significativamente más grandes ($F = 8.81$, $p < 0.01$) y presentaron estambres más largos ($F = 6.56$, $p < 0.01$) en comparación con flores hermafroditas y pistiladas. Por su parte, las flores pistiladas mostraron una producción ($F = 6.4$, $p = 0.01$) y tamaños de óvulos ($F = 4.6$, $p < 0.01$) significativamente mayor que las flores hermafroditas y estaminadas. En ninguna otra de las mediciones se observó diferencia significativa (TABLA I).

TABLA I. Valores promedios de las variables morfométricas empleadas para describir las estructuras reproductivas en flores pistiladas, estaminadas y hermafroditas y su significancia de acuerdo a análisis de varianza (ANOVA).

Clave	Variables	Pistiladas	Hermafroditas	Estaminadas
<i>Lt</i>	Longitud total (mm)	71.9	70.4	77.8*
<i>Dc</i>	Diámetro corola (mm)	31.6	31.6	34.2
<i>Db</i>	Diámetro basal (mm)	18.4	18.0	18.9
<i>Ne</i>	Número de estambre (cm ²)	275.3	172.0	198.3
<i>Le</i>	Longitud estambres (mm)	9.0	10.0	11.2*
<i>No</i>	Numero óvulos	608.0*	364.0	12.0
<i>Lc</i>	Longitud cámara ovárica (mm)	9.8	9.8	10.6
<i>Dco</i>	Diámetro de cámara ovárica	6.2	5.6	6.7
<i>Lp</i>	Longitud pistilo (mm)	26.6	30.7	31.4
<i>Ln</i>	Longitud nectario (mm)	10.6	9.6	11.4
<i>Do</i>	Diámetro óvulos (µm)	523*	394	267
<i>Dp</i>	Diámetro polen (µm)	58	57	58
<i>Lpe</i>	Longitud pétalos	20.0	19.2	20.2

*Diferencia significativa ($p < 0.05$)

7.2 Sistemas de reproducción

7.2.1 Patrón de distribución de sexos y de los sistemas de reproducción

De las 1,826 flores para las cuales se determinó el sexo, 832 (46%) fueron flores hermafroditas (H), 608 (33%) flores pistiladas o de plantas “hembras” (P), 357 (19%) flores estaminadas o de plantas “macho” (E) y 29 (2%) flores estériles o neutras (TABLA II).

Los sexos mostraron una distribución espacial heterogénea a lo largo del área de estudio. La frecuencia relativa de machos varió de 0 a 63% (promedio 19%) con respecto a los otros sexos; aunque se observó mayor presencia de éstos en Baja California Sur ($F = 5.43$, $p = 0.003$), especialmente en la región de Los Cabos y a lo largo de la costa del Pacífico. En contraste, la frecuencia relativa de hermafroditas varió de 11 a 100% con respecto a los otros sexos a lo largo de las localidades; sin embargo, tuvieron mayor presencia en Baja California Norte, Sonora e Islas del Golfo ($F = 7.44$, $p = 0.0005$), extendiéndose hacia el sur, principalmente por la costa del Golfo de California. Por su parte, la frecuencia relativa de hembras varió de 0 a 52% (promedio de 33%) y su distribución fue más homogénea comparada con la distribución de machos y hermafroditas, por ejemplo, no se observó diferencia significativa ($F = 0.32$, $p = 0.72$) de éstas a lo largo de Baja California Sur, Baja California Norte, Sonora e Islas (Figura 9).

TABLA II. Sitios de recolecta, ubicación geográfica, tamaño de muestra (N), número y frecuencia de flores hermafroditas (H, H%), pistiladas (P, P%), estaminadas (E, E%) y estériles (S, S%). Sistema de reproducción (SR), (NG) tamaño de muestra empleado para los análisis con microsatélites. Los sistemas de reproducción son: T = triico, G = Ginodioico, H = Hermafrodita.

No	ID	Localidad	Latitud	Longitud	H	%H	P	%P	E	%E	S	%S	N	SR	NG
BAJA CALIFORNIA SUR															
1	BCO	Bahía Concepción, BCS	26.648861	-111.906872	22	0.44	16	0.32	12	0.24	0	0.00	50	T*	20
2	BAL	Balandra, BCS	24.301306	-110.251250	4	0.11	16	0.44	15	0.42	1	0.03	36	T	NA
3	BON	Bonfil, BCS	27.363460	-112.692170	20	0.63	12	0.38	0	0.00	0	0.00	32	G	NA
4	CBS	Cabo San Lucas, BCS	22.943781	-109.990575	12	0.23	7	0.13	32	0.63	0	0.00	52	T	31
5	CAD	Caduaño, BCS	23.300708	-109.769588	17	0.34	19	0.38	10	0.20	4	0.08	50	T*	NA
6	CER	Cerritos, BCS	23.329456	-110.165372	1	0.13	4	0.50	3	0.38	0	0.00	8	T	NA
7	CON	Conquista Agraria, BCS	24.041630	-110.802870	8	0.24	14	0.42	11	0.33	0	0.00	33	T	NA
8	CAR	El Carrizal, BCS	23.830250	-110.247890	10	0.20	17	0.33	24	0.47	0	0.00	51	T	32
9	CIE	El Cien, BCS	24.346583	-111.007639	17	0.33	12	0.24	21	0.41	1	0.02	51	T	32
10	COM	El Comitán, BCS	24.133240	-110.431716	13	0.18	30	0.42	28	0.39	0	0.00	71	T	49
11	CUA	El Cuarenta, BCS	26.657390	-112.932360	7	0.23	6	0.20	16	0.53	1	0.03	30	T	7
12	SAR	El Sargento, BCS	23.984703	-109.997928	19	0.37	21	0.41	11	0.22	0	0.00	51	T*	NA
13	ICA	Isla Catalana, BCS	25.683010	-110.794554	50	1.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	50	H	29
14	ICE	Isla Cerralvo, BCS	24.185983	-109.890944	36	1.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	36	H	16
15	IES	Isla Espíritu Santo, BCS	24.478223	-110.365908	17	0.34	16	0.32	17	0.34	0	0.00	50	T	26
16	IMO	Isla Montserrat, BCS	25.674520	-111.047070	28	0.56	21	0.42	0	0.00	1	0.02	50	G	NA
17	ISJ	Isla San José, BCS	24.923700	-110.631180	37	0.74	12	0.24	1	0.02	0	0.00	50	T**	21
18	SOL	La Soledad, BCS	24.763280	-110.893780	16	0.36	23	0.51	3	0.07	3	0.07	45	T**	38
19	LMA	López Mateos, BCS	25.272600	-111.894220	8	0.16	19	0.38	20	0.40	3	0.06	50	T	12
20	BAR	Los Barriles, BCS	23.859164	-109.765614	7	0.23	8	0.27	12	0.40	3	0.10	30	T	NA
21	MIG	Migriño, BCS	23.121149	-110.101289	6	0.16	13	0.35	18	0.49	0	0.00	37	T	NA

22	PQU	Puente Querétaro, BCS	25.350833	-111.609461	25	0.48	27	0.52	0	0.00	0	0.00	52	G	NA
23	PSC	Puerto San Carlos, BCS	24.858913	-112.069879	5	0.83	0	0.00	0	0.00	1	0.17	6	G	NA
24	PAB	Punta Abrejos, BCS	27.248240	-113.210670	6	0.18	11	0.32	17	0.50	0	0.00	34	T	NA
25	SEV	San Evaristo, BCS	24.844550	-110.687230	18	0.51	17	0.49	0	0.00	0	0.00	35	G	NA
26	SFR	San Francisco, BCS	27.490019	-113.182850	17	0.37	17	0.37	10	0.22	2	0.04	46	T*	NA
27	SGR	San Gregorio, BCS	26.130760	-112.260510	8	0.16	10	0.20	27	0.54	5	0.10	50	T	17
28	STA	Santa Águeda, BCS	27.271769	-112.258920	38	0.76	12	0.24	0	0.00	0	0.00	50	G	28
29	TSA	Todos Santos, BCS	23.559110	-110.205400	12	0.36	9	0.27	12	0.36	0	0.00	33	T	NA
BAJA CALIFORNIA NORTE															
30	BAN	Bahía de los Ángeles, BC	28.942890	-113.555470	31	0.70	13	0.30	0	0.00	0	0.00	44	G	NA
31	CAT	Cataviña, BC	29.765208	-114.769425	32	0.64	18	0.36	0	0.00	0	0.00	50	G	12
32	ARC	El Arco, BC	28.201050	-113.772290	12	0.34	7	0.20	15	0.43	1	0.03	35	T	NA
33	PBL	Piedra Blanca, BC	28.229661	-113.159389	17	0.41	19	0.46	4	0.10	1	0.02	41	T**	31
34	PCA	Puerto Canoas, BC	29.498472	-115.152944	33	0.66	17	0.34	0	0.00	0	0.00	50	G	NA
35	PPR	Punta Prieta, BC	29.063345	-114.155100	23	0.46	25	0.50	2	0.04	0	0.00	50	T**	38
36	SPE	San Pedro, BC	31.297167	-115.434639	29	0.58	21	0.42	0	0.00	0	0.00	50	G	23
SONORA															
37	BKI	Bahía Kino, SON	28.827781	-111.806389	23	0.46	21	0.42	6	0.12	0	0.00	50	T*	14
38	BSA	Bahía Sargento, SON	29.212369	-112.202189	29	0.57	15	0.29	6	0.12	1	0.02	51	T*	27
39	EMP	Empalme, SON	27.975917	-110.750914		0.00	1	1.00	0	0.00	0	0.00	1	G	NA
40	ICH	Isla La Choyuda, SON	28.736492	-112.305908	32	0.64	17	0.34	1	0.02	0	0.00	50	T**	NA
41	ISE	Isla San Esteban, SON	28.688303	-112.551005	36	0.72	13	0.26	1	0.02	0	0.00	50	T**	19
42	ITI	Isla Tiburón, SON	28.771077	-112.257236	13	0.54	10	0.42	0	0.04	1	0.04	24	T**	NA
43	PLI	Puerto Libertad, SON	29.872969	-112.633481	29	0.57	21	0.41	1	0.02	0	0.00	51	T**	NA
44	PON	Punta Onah, SON	29.089488	-112.164084	5	1.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	5	G	NA
45	SRA	Santa Rosa, SON	28.962790	-112.127260	4	0.80	1	0.20	0	0.00	0	0.00	5	G	NA
					832	0.46	608	0.33	357	0.19	29	0.02	1826	522	

*Sistema de reproducción trioico con $\leq 10\%$ de machos

**Sistema de reproducción trioico con $\leq 30\%$ de machos

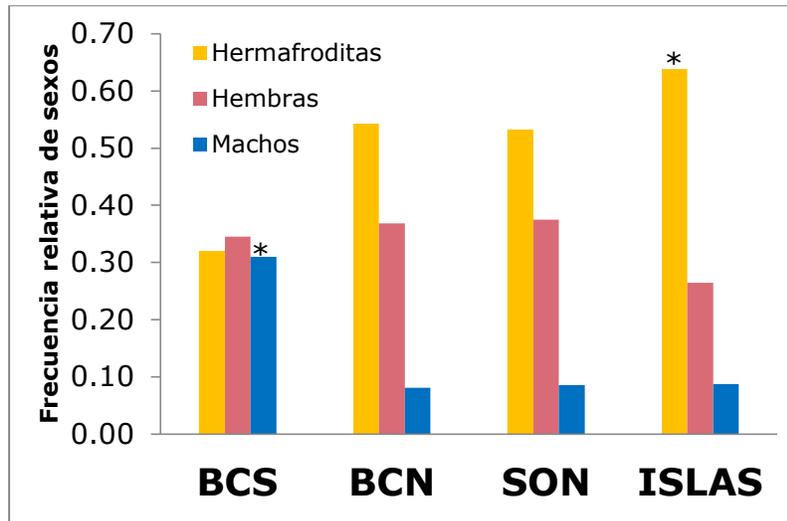


Figura 9. Frecuencia relativa se sexos de *P. pringlei* en Baja California Sur (BCS), Baja California Norte (BCN), Sonora (SON) e Islas del Golfo de California. El asterisco representa diferencia significativa.

La distribución de machos y hermafroditas resultó en una correlación negativa altamente significativa ($r = -0.86$, $p < 0001$; Figura 10). Mientras que no se observó correlación entre las frecuencias de machos y hembras o entre unisexuales ($p > 0.05$).

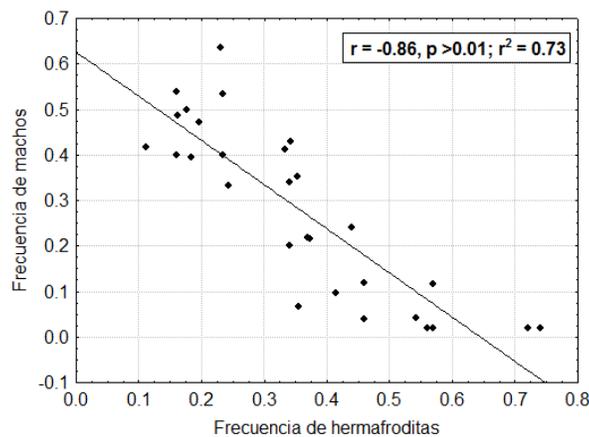


Figura 10. Correlación entre la frecuencia relativa de machos y hermafroditas del cardón *P. pringlei* en el noroeste de México.

El sistema de reproducción trioico fue dominante en la parte sur de la península de Baja California, donde 14 de los 27 (66%) sitios de muestreo, distribuidos principalmente al sur de La Paz y a lo largo de la costa del Pacífico mostraron una frecuencia relativamente alta de machos (>30%); mientras que los sitios de muestreo trioicos ubicados en la costa del Golfo de California presentaron baja (>10%) a moderada (>30%) frecuencia de machos. El sistema trioico también se observó en localidades de Baja California Norte, Sonora y e Islas del Golfo; sin embargo, con excepción de las localidades de El Arco (ARC) e Isla espíritu Santo (IES), la frecuencia de machos fue menor al 12%. El sistema de reproducción hermafrodita fue exclusivo de dos islas del sur del Golfo de California, Isla Cerralvo (ICE) e Isla Catalana (ICA). Por su parte el sistema de reproducción ginodioico se observó principalmente en Baja California Norte, extendiéndose hacia el sur de la península por la costa del Golfo de California (Figura 11).

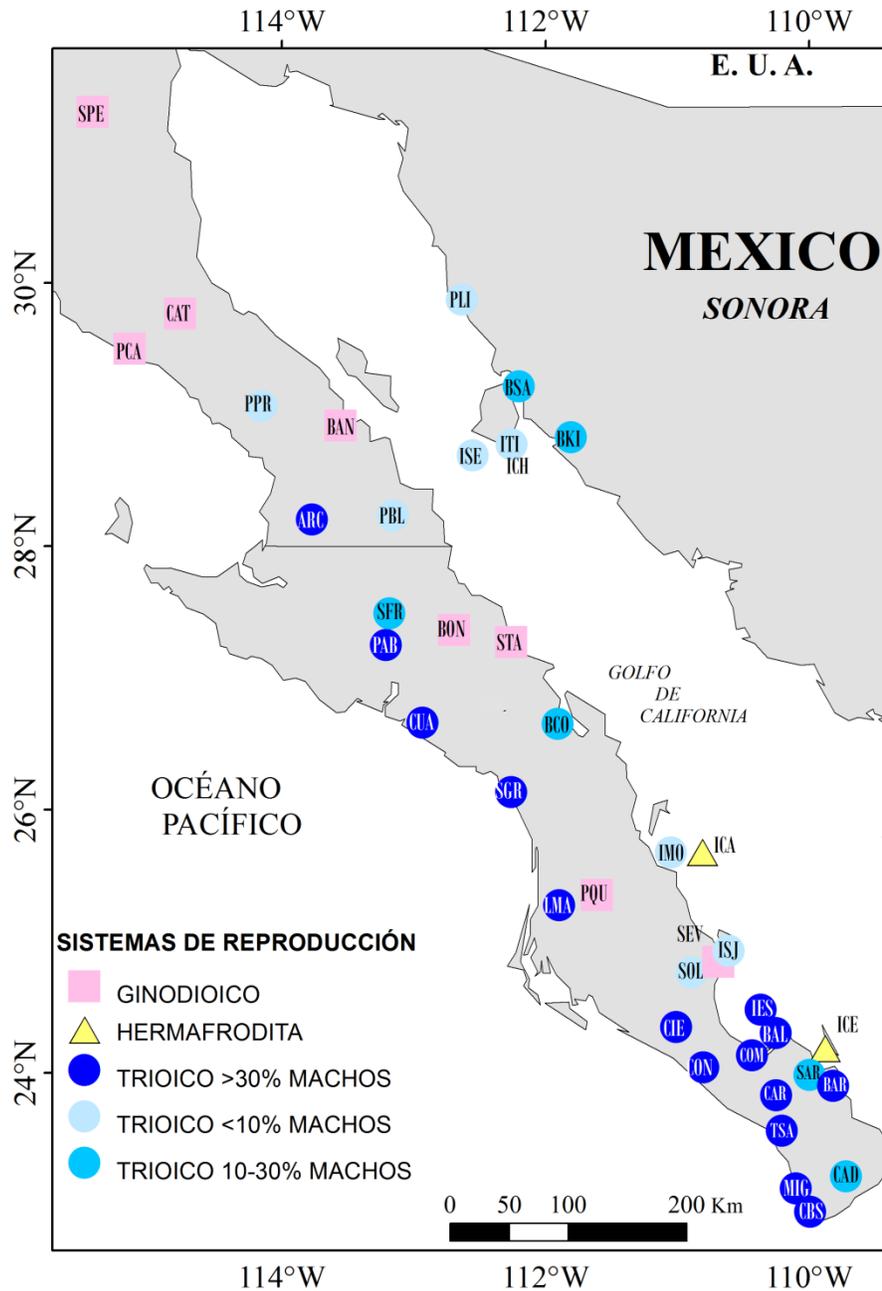


Figura 11. Distribución de los sistemas de reproducción hermafrodita, ginodioico (presencia de hermafroditas y hembras) y trioicos (presencia de machos, hembras y hermafroditas) del cardón *P. pringlei* en el noroeste de México. Para el sistema trioico se indican tres clases dependiendo de la frecuencia de machos. Ver TABLA II para información sobre las abreviaciones de las localidades.

7.2.2 Distribución de los polinizadores y su relación con los sistemas de reproducción

Asumiendo un área de forrajeo del murciélago de 30 hasta 60 Km a la redonda de estas cuevas de maternidad, con excepción de la localidad ginodioica de Santa Águeda (STA) en la costa central del Golfo de California y de Isla Cerralvo, al Sur del Golfo de California, todas las localidades que se ubicaron dentro de esta área, presentaron un sistema de reproducción trioico, con al menos un macho. Sin embargo, aproximadamente el 54% de las localidades (22 de 41 localidades) trioicas, ginodioicas y hermafroditas, quedaron fuera del alcance de la influencia de los murciélagos. De acuerdo a los datos de captura del murciélago, reportados en la literatura, el murciélago *L. curasoae* se ha observado principalmente a lo largo de la costa este de Baja California Sur, donde el sistema de reproducción del cardón fue ginodioico o trioico con baja (<10%) a moderada (<30%) frecuencia de machos. Finalmente, a lo largo de la costa del Pacífico, en la Península de Baja California no hay reportes de cuevas o de recolecta de este murciélago (Figura 12).

Los sitios de muestreo con un sistema trioico presentan, en promedio menor distancia a una cueva de maternidad de murciélago (i.e. 80.88 Km \pm 38.78 Km) con respecto a la distancia de los sitios con un sistema ginodioico (i.e. 143.98 Km \pm 39.84 Km). Sin embargo, la diferencia no fue significativa ($F = 2.65$, $p > 0.084$) (Figura 12).

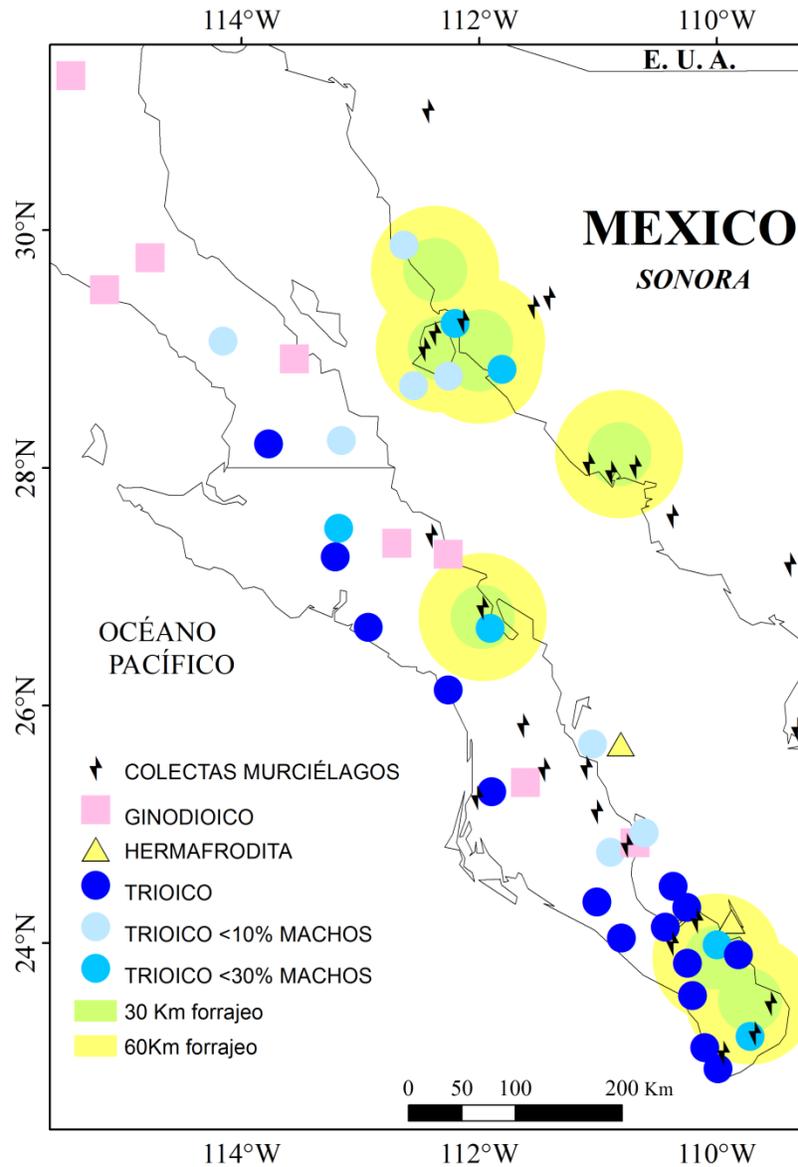


Figura 12. Relación entre los sistemas de reproducción del cardón *P. pringlei* en el noroeste de México, y el potencial forrajeo del murciélago *L. curasoae*, determinado por una área de influencia de 30 a 60 Km (verde y amarillo, respectivamente) de distancia de sus cuevas maternidad. Los datos sobre la presencia de cuevas de maternidad de *L. curasoae* son de Fleming et al. (1998) y Molina-Freaner et al. (2003) y los recolecta del murciélago se tomaron de Rojas-Martínez et al. (1999).

7.2.3 Variables climáticas y su relación con los sistemas de reproducción

Las condiciones de temperatura y precipitación idóneas para *Pachycereus pringlei*, de acuerdo al umbral de corte de 0.145 (AUC = 0.94) en el modelo de nicho para todos los registros conocidos, se encontraron prácticamente a lo largo de toda la PBC con excepción de las zonas frías y elevadas como la costa oeste del Desierto de Vizcaíno, así como en las zonas montañosas que recorren la PBC, incluyendo la Sierra de la Laguna en Cabo San Lucas, Sierras de la Giganta, de Guadalupe y de San Francisco en el centro y norte de Baja California Sur; Sierra La Libertad, La Asamblea y Colombia en la parte sur y centro de Baja California Norte, y Sierras de San Pedro Mártir y Juárez al norte de la península. En la parte continental el rango potencial de distribución del cardón se restringió a la zona costera de Sonora y Sinaloa. Las tres variables bioclimáticas de mayor contribución al modelo fueron: 1) la precipitación del cuatrimestre más seco (BIO 17; 25.2%), 2) la estacionalidad de la temperatura (BIO4; 19.7% y 3) el rango anual de la temperatura (BIO7, 13.3%). Tanto las variables derivadas de la precipitación como las de temperatura contribuyeron de manera similar en el modelo, con un porcentaje de 45.1% y 54.8%, respectivamente (Figura 13A).

En contraste, la modelación de nicho al presente de los sitios de muestreo con un sistema de reproducción trioico indicó un área más restringida, incluyendo prácticamente todo el estado de Baja California Sur y una pequeña porción del sur de Baja California Norte, así como la costa de Sonora (AUC = 0.96, valor de corte = 0.21; Figura 13B) con la mayor contribución de la precipitación del cuatrimestre más seco (39%), la estacionalidad de la temperatura y temperatura del cuatrimestres más frío (11%).

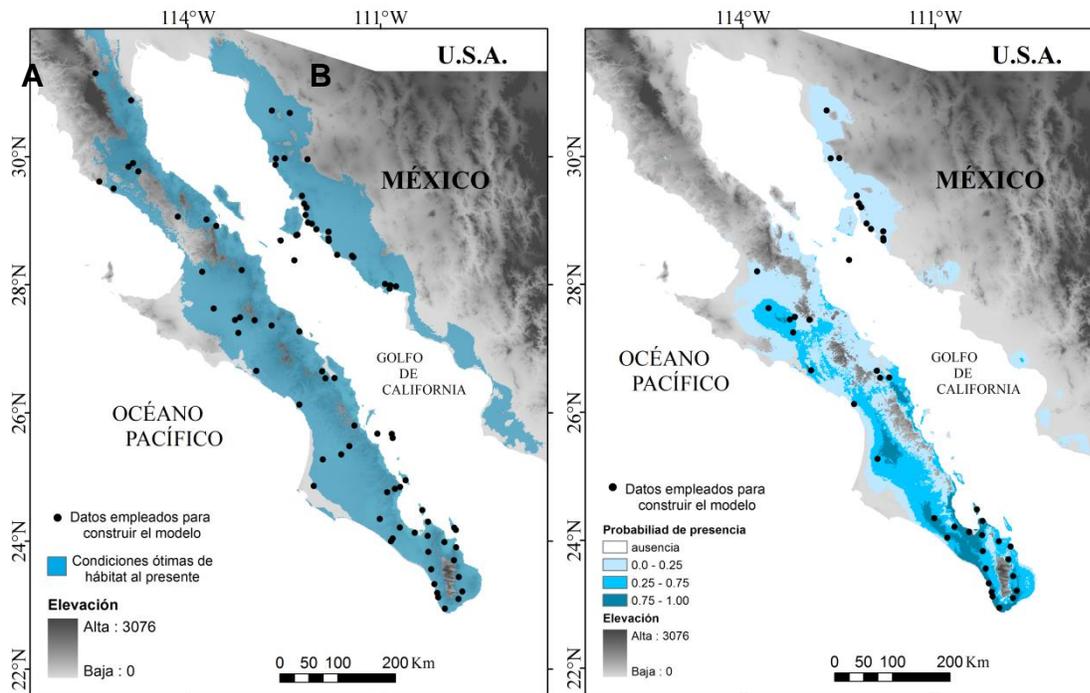


Figura 13. Modelación de nicho al presente del cardón *P. pringlei* en el noroeste de México, empleando las diecinueve variables climáticas de WorldClim (Hijmans et al., 2005). A) Modelación del rango de distribución potencial para todos los registros de la especie. B) modelación de la distribución potencial de los sitios de muestreo que presentaron un sistema de reproducción trioico, expresado en probabilidad de presencia de las condiciones óptimas. Las imágenes fueron representadas sobre un mapa de elevación del noroeste de México (INEGI, <http://www.inegi.org.mx/geo>). Los datos empleados para la modelación de nicho fueron obtenidos de este estudio y de estudios previos (Fleming et al., 1994; 1998; Medel-Narvaez, 2008; Molina-Freaner et al., 2003).

El análisis discriminante fue altamente significativo (Wilks' Lambda = 1.24, $p < 0.01$). La primera función discriminante explicó el 79% de la varianza y separó al sistema de reproducción ginodioico del trioico. Las variables de mayor contribución en esta función discriminante fueron BIO07 (rango anual de la temperatura) y BIO11 (temperatura promedio del cuatrimestre más frío). Por su parte, la segunda función mostró poco poder discriminante (21%) y no fue significativa (Figura 14). En general, estos resultados sugieren que a mayor rango anual de la temperatura y menor temperatura promedio del cuatrimestre más frío el sistema de reproducción es, con

mayor probabilidad, ginodioico. Mientras que a menor rango anual de la temperatura y mayor temperatura promedio del cuatrimestre más frío el sistema de reproducción es, con mayor probabilidad, trioico.

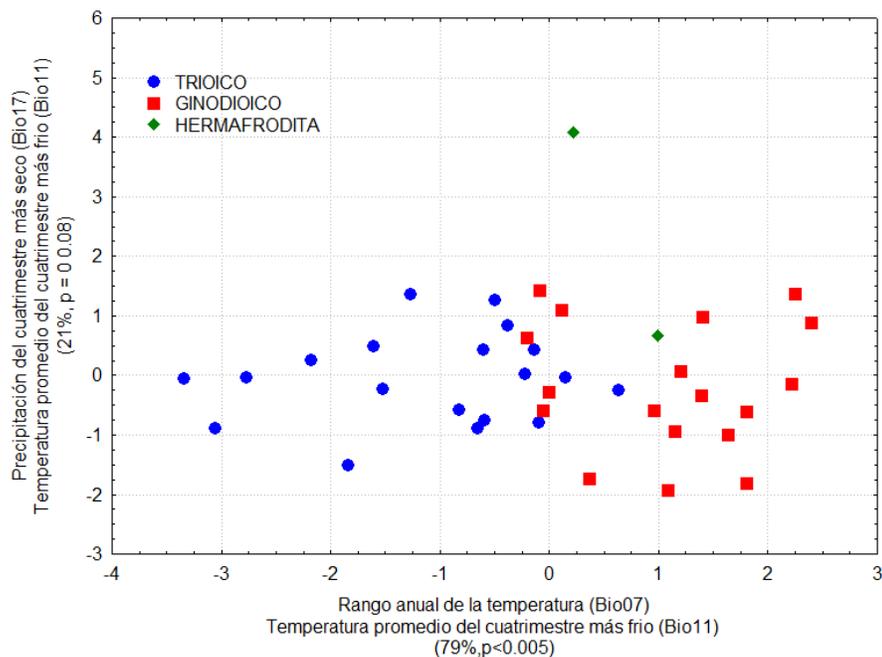


Figura 14. Análisis discriminante entre sistemas de reproducción de *P. pringlei* del noroeste de México, empleando las variables ambientales del WorldClim que resultaron en < 90% de correlación. (Wilks' Lambda = 1.24, $p < 0.01$).

7.3 Patrón filogeográfico

7.3.1 Diseño y caracterización de loci microsatelitales

Las corridas de pirosecuenciación produjeron 398,286 lecturas con una longitud de 28 hasta 829pb y un promedio de 274 pb. Se encontraron microsatélites perfectos (motivos repetitivos consecutivos) en 10,685 (2.6%) lecturas, de los cuales los di-nucleótidos fueron los más abundantes (62%), seguidos de tri-nucleótidos (31%), y tetra-nucleótidos (6%). El diseño de iniciadores fue posible en 282 lecturas (TABLA III).

TABLA III. Resultado de dos corridas de pirosecuenciación (454-Roche con la química GS FLX de Titanium) realizadas para *Pachycereus pringlei*.

Datos Generales	Corrida 1	Corrida 2	Total
Pares de bases amplificadas	63,960,668	12,788,901	76,749,569
Número de fragmentos	357,798	40,488	398,286
Longitud mínima de fragmento (pb)	28	29	28
Longitud máxima de fragmento (pb)	780	829	829
Longitud promedio de fragmento (pb)	178.7	315.8	247.3
Fragmentos con microsatélites perfectos	9,840	845	10,685
Di-nucleótidos	6,206	410	6,616
Tri-nucleótidos	2,910	370	3,280
Tetra-nucleótidos	564	35	599
Penta-nucleótidos	94	14	108
Hexa-nucleótidos	66	16	82
Fragmentos con primers exitosamente diseñado	257	25	282
Di-nucleótidos	130	16	146
Tri-nucleótidos	106	8	114
Tetra-nucleótidos	13	0	13
Penta-nucleótidos	4	1	5
Hexa-nucleótidos	4	0	4

A partir de los 38 pares de iniciadores empleados para su caracterización en acrilamida, un total de diez loci fueron seleccionados para su optimización. Las características de los fragmentos y las temperaturas optimizadas para su amplificación se muestran en la tabla IV.

TABLA IV. Características de 10 microsatélites desarrollados por medio de pirosecuenciación (454-Roche con la química GS-FLX de Titanium) para el cardón *Pachycereus pringlei* del noroeste de México. Ta = temperatura de alineamiento.

Locus	Secuencia primers (5'- 3')	Motivo de repetición	T _a (°C)	Rango de talla (bp)	Acceso GeneBank
<i>Ppri01</i>	F:GCGAGGGTGTCTCAAATGAT R:TAATCCCCTCCCACCTAACC	(CT) ₁₂	58	202–223	KC349892
<i>Ppri02</i>	F:TTCCATCGTCCCCTCACTTA R:CATTACCACCGTGAACACT	(AG) ₁₁	66	115–119	KC349893
<i>Ppri03</i>	F:GGTGTTCCCTCGCTCTCATTC R:CTCGCAAATCCAAGCAAAAT	(CT) ₁₁	65	133–155	KC349894
<i>Ppri04</i>	F:TTCAAATCATTCAATAAAACAAGAGC R:ATGGAGGTCGAGGATCAAGA	(TC) ₁₃	63	96–112	KC349895
<i>Ppri05</i>	F:AAACTGCAGGTGTTTCAGGG R:AATGAAGCGAAAGGAAGCAA	(GTTT) ₈	61	166–186	KC349896
<i>Ppri06</i>	F:GCTCACGTTGGCAGATTTGT R:GGTGATGACAAAAGGTTTTGC	(AAAT) ₆	50	138–146	KC349897
<i>Ppri07</i>	F:TGGACTTCCAAGGGATAATGA R:TCAACTCAAAGTGTCAGTGCTG	(AAAT) ₈	59	127–143	KC349898
<i>Ppri08</i>	F:AATAGCGCATGCCTCAAAGG R:CAATAGTCCAGAAATAGGTCAGGTCA	(CT) ₈ (CTTT) ₂	66	109–126	KC349899
<i>Ppri09</i>	F:AAGAGACAGGCCCTGAGACA R:TCGTAGGTTCCATCACCACA	(TC) ₁₀	68	119–140	KC349900
<i>Ppri10</i>	F:TTCTCGAAGCCCCGCTTAC R:GCACGTCAAAGATGCAAGCA	(GATA) ₆ (GACA) ₃	64	79–107	KC349901

Los diez loci seleccionados para su caracterización fueron polimórficos y mostraron indicios de poliploidia, ya que se observaron de uno a cuatro alelos por genotipo. En los cardones del sitio de muestreo El Comitán (COM) se observó de dos a diez alelos por locus (A) con un promedio de $A = 5.5$; mientras que Punta Prieta (PPR) se obtuvieron de dos a siete alelos por locus y un promedio de $A = 3.7$. Por su parte la heterocigosidad observada promedió fue de $H_o = 0.59$ (0.13 – 0.78) y $H_o = 0.45$ (0.03 – 0.85) para El Comitán y Punta Prieta, respectivamente; mientras que la heterocigosidad esperada fue de $H_e = 0.57$ (0.37 a 0.77) y $H_e = 0.40$ (0.03 – 0.72) para El Comitán y Punta Prieta, respectivamente (TABLA V). La caracterización de los diez loci en una muestra limitada del cardón resultó en una publicación (Gutiérrez Flores et al., 2014, Anexo 9) en la cual se pone en evidencia el potencial de estos marcadores para su empleo en análisis moleculares subsecuentes.

TABLA V. Diversidad genética de los diez loci microsatelitales desarrollados para *Pachycereus pringlei*. N_a = número de alelos por locus; A_l = número individual de alelos por locus; H_o = heterocigosidad observada; H_e = heterocigosidad esperada; n = tamaño de muestra.

Locus	El Comitán (n = 40)				Punta Prieta (n = 40)			
	N_a	A_l	H_o	H_e	N_a	A_l	H_o	H_e
<i>Ppri01</i>	7	1–4	0.67	0.68	3	1–3	0.38	0.35
<i>Ppri02</i>	2	1–2	0.13	0.39	3	1–3	0.85	0.63
<i>Ppri03</i>	10	1–4	0.78	0.77	5	1–4	0.67	0.72
<i>Ppri04</i>	9	1–4	0.77	0.77	7	1–4	0.74	0.68
<i>Ppri05</i>	5	1–3	0.43	0.57	3	1–3	0.31	0.35
<i>Ppri06</i>	3	1–2	0.73	0.45	2	1–2	0.03	0.03
<i>Ppri07</i>	4	1–2	0.75	0.48	3	1–3	0.68	0.58
<i>Ppri08</i>	4	1–2	0.35	0.37	2	1–2	0.03	0.03
<i>Ppri09</i>	5	1–3	0.51	0.61	3	1–2	0.05	0.05
<i>Ppri10</i>	5	1–3	0.74	0.65	6	1–4	0.40	0.54
Mean	5.5		0.59	0.57	3.7		0.41	0.40

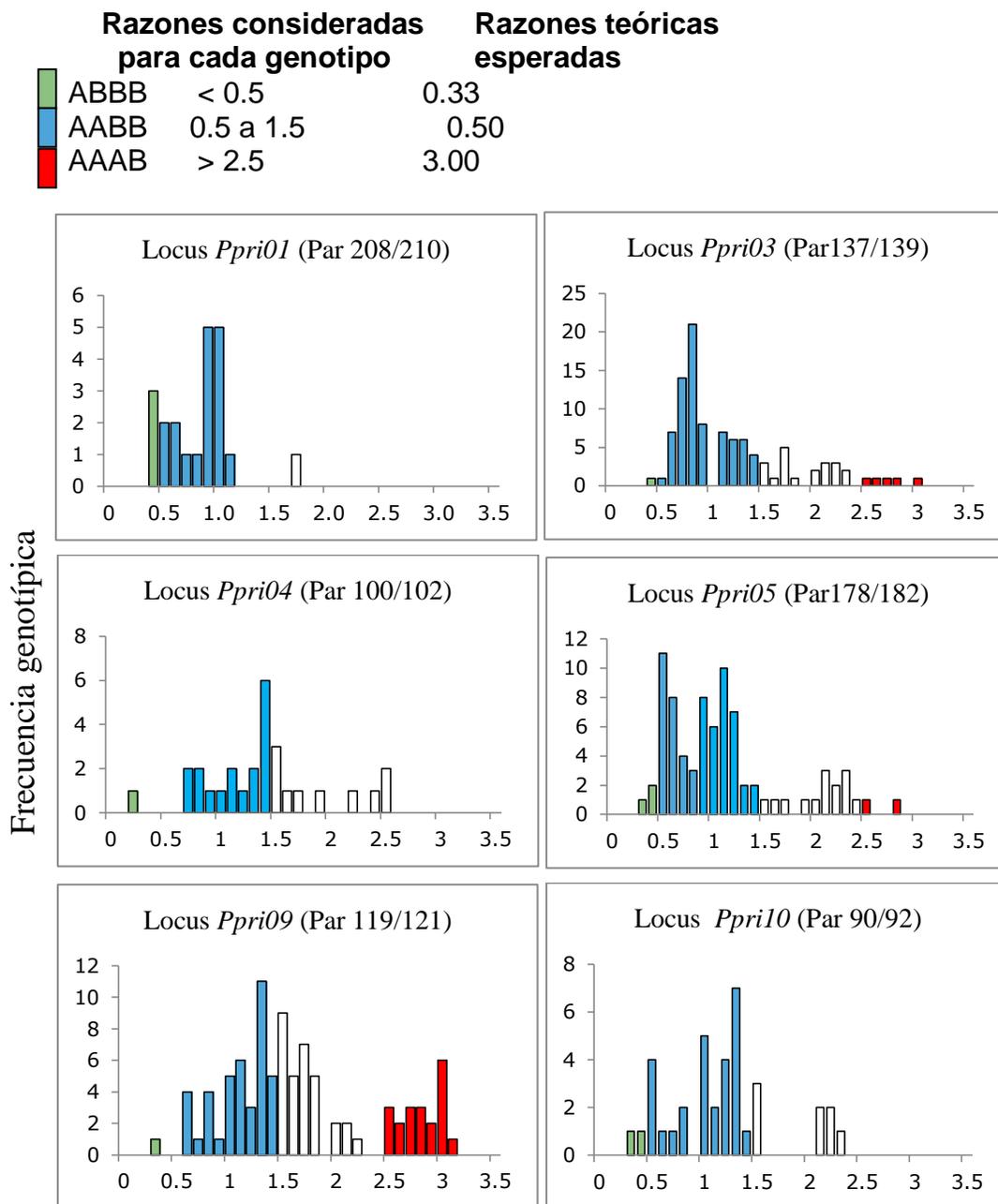
7.3.2 Nivel de ploidía

La presencia de individuos con más de dos alelos fue baja a lo largo de todas las localidades. Solamente el 6% y 1% de los individuos por locus por sitio de muestreo presentaron tres y cuatro alelos, respectivamente, dicha frecuencia fue especialmente baja en las Islas Catalana (ICA) e Isla Cerralvo (ICE), en las cuales solamente un individuo mostró tres alelos (TABLA VI). De acuerdo al primer método indirecto para determinar el nivel de ploidía, los resultados fueron consistente con un patrón tetraploide en nueve de los veintíun sitios de muestreo (43%), las cuales presentaron hasta cuatro alelos en al menos un individuo ($A_{MAX} = 4$; TABLA VI).

El segundo método indirecto, sugirió tetraploidía en todos los loci para los cuales fue posible construir la gráfica de distribución; no obstante, los grupos correspondientes a las razones teóricas esperadas no se separaron claramente en las gráficas. Además, algunos genotipo mostraron razones de áreas que no son consistentes con las esperadas para individuos tetraploides (Figura 15).

TABLA VI. Frecuencia de genotipos con tres (P_3) y cuatro (P_4) alelos, número máximo de alelos encontrado en al menos un individuo (A_{MAX}) y nivel de ploidía sugerido por medio de métodos indirectos (i.e. A_{MAX} y MC-PR) y conteo de cromosomas (*) a lo largo de los sitios de muestreo estudiados en *P. pringlei* en el noroeste de México.

ID	Localidad	N	P_3	P_4	A_{MAX}	Ploidía
BAJA CALIFORNIA SUR						
BCO	Bahía Concepción	20	0.10	0.01	4	tetraploide
CBS	Cabo San Lucas	31	0.07	0.02	4	tetraploide*
ICA	Catalana Island	29	0.01	0.00	3	
ICE	Cerralvo Island	16	0.01	0.00	3	Diploide*
CAR	El Carrizal	32	0.09	0.02	4	tetraploide
CIE	El Cien	32	0.05	0.00	3	
COM	El Comitán	49	0.08	0.04	4	tetraploide
CUA	El Cuarenta	7	0.07	0.00	3	
IES	Espiritu Santo Island	26	0.12	0.01	4	tetraploide
SOL	La Soledad	38	0.08	0.00	3	
LMA	López Mateos	12	0.07	0.01	4	tetraploide
STA	Santa Águeda	28	0.06	0.00	3	
SGR	San Gregorio	17	0.06	0.00	3	
ISJ	Isla San José	21	0.08	0.01	4	tetraploide
		358	0.07	0.01	3.5	
BAJA CALIFORNIA						
CAT	Cataviña	12	0.04	0.00	3	
PBL	Piedra Blanca	31	0.06	0.00	3	
PPR	Punta Prieta	38	0.06	0.00	4	tetraploide
SPE	San Pedro	23	0.04	0.01	4	tetraploide
		104	0.05	0.00	3.25	
SONORA						
BKI	Bahía Kino	14	0.04	0.00	3	
BSA	Bahía Sargento	27	0.05	0.00	3	
IST	Isla San Esteban	19	0.04	0.00	3	
		60	0.05	0.01	3	



Razones de área entre picos de genotipos bi-alélicos

Figura 15. Distribución de frecuencias de las razones de áreas de individuos bi-alélicos en seis loci microsatelitales de *P. pringlei* en el noroeste de México. Los genotipos asignados fueron: ABBB (verde), AABB (azul) y AAAB (rojo). En blanco genotipos que no fueron consistentes con las razones esperadas en tetraploides (Ver criterios para asignación de genotipos y razones teóricas en la parte superior de la figura).

El método directo de conteo de cromosomas reveló distintos niveles de ploidía en *P. pringlei*. El sitio de muestreo con sistema de reproducción trioico Cabo San Lucas, y posiblemente el sitio de muestreo con sistema de reproducción ginodioico de Puente Querétaro presentaron una carga cromosómica tetraploide ($2n = 44$); pero en este último los cromosomas no se separaron bien, varios grupos parecen estar integrados por cuatro cromosomas a manera de tétradas. Por su parte en el sitio con individuos hermafroditas de Isla Cerralvo la carga cromosómica fue diploide ($2n = 22$; Figura 16)

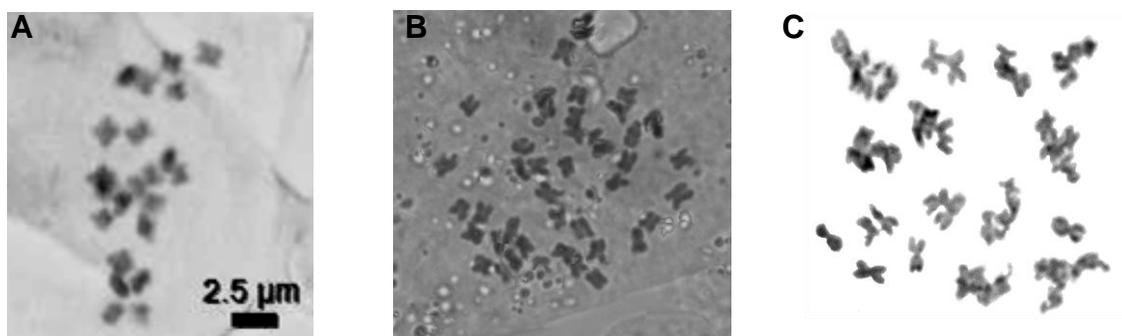


Figura 16. Conteo de cromosomas en dos sitios de muestreo de *P. pringlei* con distinto sistema de reproducción en el noroeste de México. A) Isla Cerralvo con sistema de reproducción hermafrodita ($2n = 22$); B) Cabo San Lucas con sistema de reproducción trioico ($2n = 44$), y C) Puente Querétaro con sistema de reproducción ginodioico ($2n = \sim 44$).

7.3.3 Diversidad genética e hipótesis de refugio

El empleo de diez loci microsatelitales reveló un total de 80 alelos en 522 individuos genotificados a lo largo de todo el rango de distribución de la especie. Todos los loci fueron polimórficos mostrando de tres (*Ppri08*) a trece (*Ppri04*) alelos por locus, y un promedio general de ocho alelos por locus. Se observaron varios alelos de baja frecuencia y pocos alelos de alta frecuencia (Anexo 7). En promedio 63, 85 y 91% del total de las frecuencias alélicas por sitio de muestreo fueron representadas con uno, dos y tres alelos por locus, respectivamente.

La heterocigosidad varió de baja a moderada a lo largo de los sitios de muestreo. El promedio general de heterocigosidad observada fue de $H_O = 0.40$, variando de 0.28 en Isla Cerralvo (ICE) a 0.51 en el Carrizal, BCS (CAR). Por su parte, la heterocigosidad esperada general fue de $H_E = 0.45$ (SD = 0.05), variando de 0.35 en San Pedro, B.C. (SPE) a 0.52 en Bahía Concepción, B.C.S. (BCO; TABLA VII).

TABLA VII. Diversidad genética a lo largo de los sitios de muestreo de *Pachycereus pringlei* en el noroeste de México, estimadas a partir de diez loci microsatelitales. N = tamaño de muestra, A = número de alelos por locus, H_O = heterocigosidad observada, H_E = heterocigosidad esperada.

ID	Localidad	N	A(SD)	H_O (SD)	H_E (SD)
BAJA CALIFORNIA SUR					
BCO	Bahía Concepción	20	4.4(2.1)	0.43(0.17)	0.52(0.21)
CBS	Cabo San Lucas	31	4.5(2.1)	0.38(0.22)	0.46(0.21)
ICA	Isla Catalana	29	4.4(2.4)	0.40(0.25)	0.50(0.25)
ICE	Isla Cerralvo	16	3.0(1.1)	0.28(0.28)	0.40(0.23)
CAR	El Carrizal	32	4.6(2.3)	0.51(0.28)	0.49(0.23)
CIE	El Cien	32	3.9(1.9)	0.47(0.21)	0.49(0.21)
COM	El Comitán	49	5.3(2.7)	0.42(0.24)	0.50(0.22)
CUA	El Cuarenta	7	3.4(1.6)	0.46(0.25)	0.51(0.28)
IES	Isla Espiritu Santo	26	3.9(1.8)	0.46(0.25)	0.49(0.20)
SOL	La Soledad	38	4.3(2.4)	0.39(0.19)	0.45(0.21)
LMA	López Mateos	12	3.4(1.8)	0.50(0.30)	0.50(0.23)
STA	Santa Águeda	28	3.8(1.9)	0.39(0.30)	0.40(0.23)
SGR	San Gregorio	17	4.0(1.6)	0.41(0.23)	0.46(0.23)
ISJ	San José Island	21	4.2(1.6)	0.45(0.12)	0.48(0.14)
	TOTAL	358	4.1(1.9)	0.43(0.24)	0.48(0.22)
BAJA CALIFORNIA					
CAT	Cataviña	12	3.0(1.2)	0.34(0.21)	0.40(0.26)
PBL	Piedra Blanca	31	3.7(1.7)	0.41(0.18)	0.44(0.21)
PPR	Punta Prieta	38	3.7(1.9)	0.35(0.23)	0.37(0.25)
SPE	San Pedro	23	3.3(1.4)	0.32(0.28)	0.35(0.24)
	TOTAL	104	3.4(1.6)	0.36(0.23)	0.39(0.24)
SONORA					
BKI	Bahía Kino	14	2.7(1.3)	0.37(0.26)	0.37(0.28)
BSA	Bahía Sargento	27	3.4(1.6)	0.34(0.29)	0.38(0.26)
IST	Isla San Esteban	19	3.3(1.6)	0.34(0.23)	0.41(0.26)
	TOTAL	60	3.1(1.5)	0.35(0.26)	0.39(0.27)
		522	3.8(1.8)	0.40(0.24)	0.45(0.23)

El patrón de aislamiento por distancia reveló una correlación significativa para los sitios de muestreo de las poblaciones norte ($r_{\text{NORTE_RUTA ISLAS}} = 0.76$; Figura 17A) y sur ($r_{\text{SUR}} = 0.45$; $p < 0.002$; Figura 17B). En el caso de los sitios norteños la correlación aumentó cuando se asumió una ruta de colonización de la península hacia Sonora, a través de la isla San Esteban, que cuando se asumió una ruta de colonización terrestre, en la cual la dispersión ocurriría primero hacia el norte, atravesando el delta del río Colorado y luego bajando hacia la costa de Sonora ($r_{\text{NORTE_NORTE}} = 0.62$).

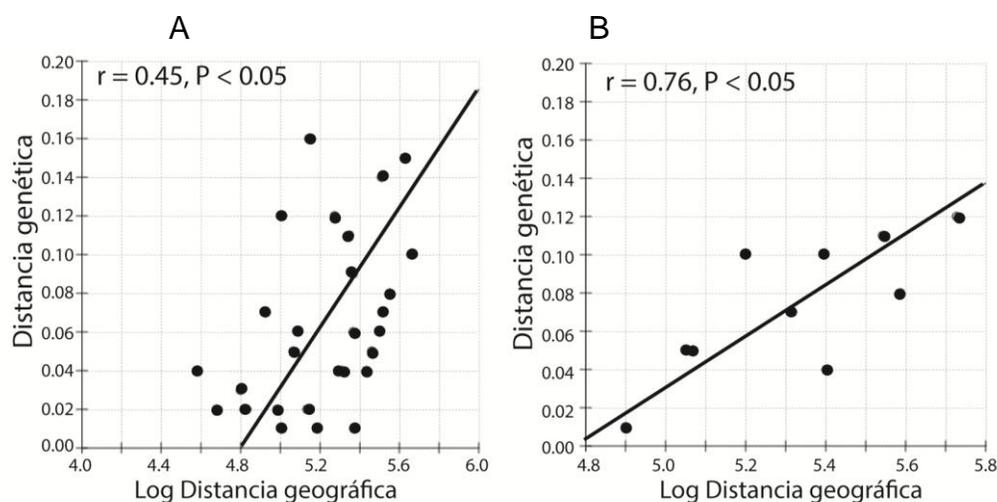


Figura 17. Análisis de aislamiento por distancia calculado a partir de distancias genéticas de Nei (Nei, 1987) entre pares de sitios de muestreo de *Pachycereus pringlei*, en el noroeste de México. A) Dentro de los cardones de los sitios de muestreo de en la región Norte y considerando una ruta de colonización de las localidades de Sonora a través de la isla San Esteban (IST). B) Dentro de los cardones de los sitios de muestreo del Sur considerando solamente los sitios peninsulares.

El patrón genético de diversidad disminuyó significativamente de sur a norte a lo largo de la PBC, incluyendo el número promedio de alelos por locus (A, $r = 0.72$, $p < 0.01$), heterocigosidad esperada (H_E , $r = 0.72$, $p < 0.01$), y heterocigosidad observada (H_O , $r = 0.66$, $p < 0.01$; Figura 18A, B). Sin embargo, tanto el patrón de aislamiento por distancia como el de diversidad fueron más fuertes dentro de los sitios de muestreo de la región norteña.

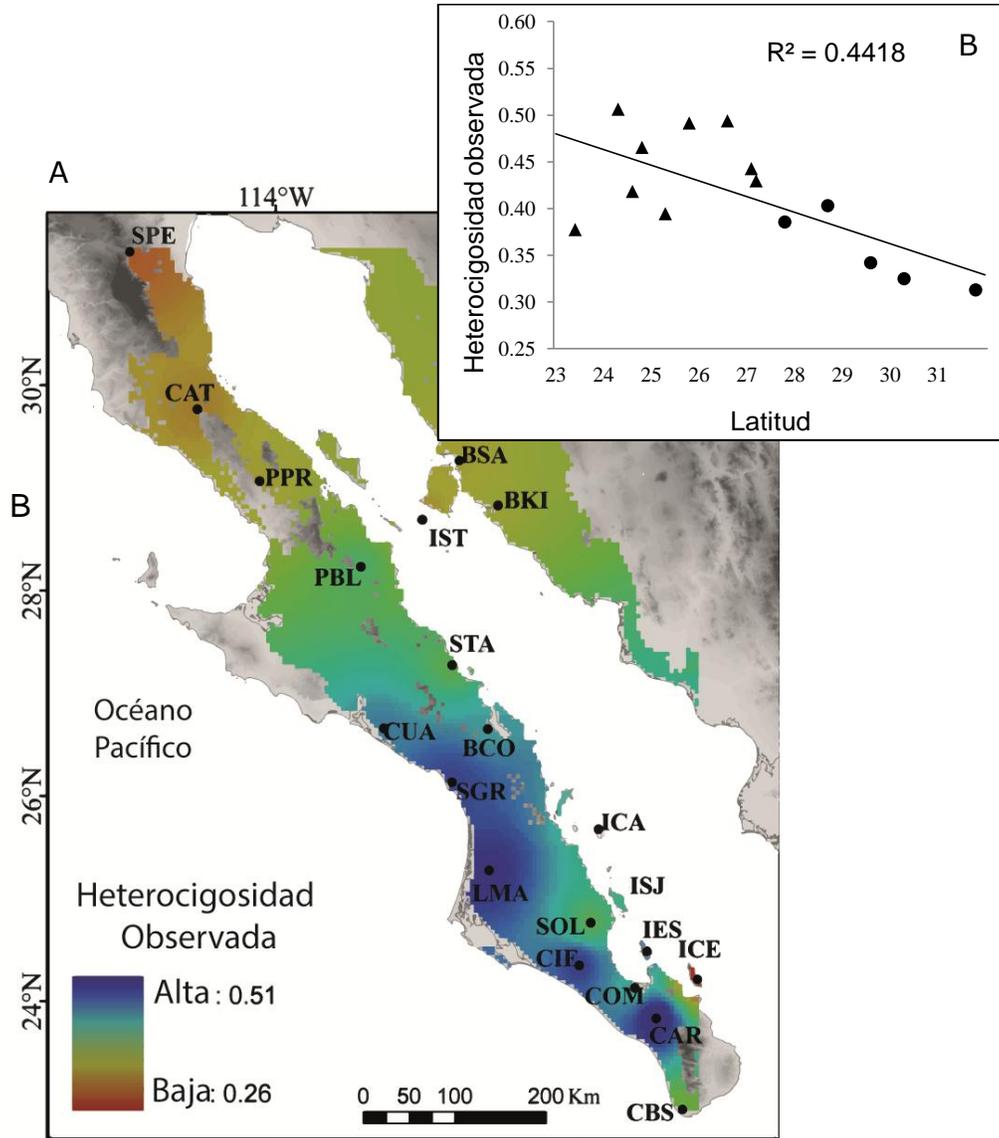


Figura 18. Patrón latitudinal de la diversidad genética (heterocigidad observada) en *Pachycereus pringlei* en el noroeste de México. A) representación geográfica de la variación de la diversidad realizada a partir de la interpolación de los valores de diversidad para cada sitio de muestreo. B) Diminución de la diversidad genética conforme aumenta la latitud ($r = 0.66$, $p < 0.01$). Los triángulos y los círculos representan sitios de muestreo de las regiones norteñas y sureña, respectivamente.

La modelación de nicho al pasado sugirió la presencia de condiciones climáticas potencialmente propicias para permitir la sobrevivencia de esta especie principalmente al sur de la PBC durante el último máximo glacial (~21,000 años), en la región de Cabo San Lucas (CBS), El Comitán (COM), El Carrizal (CAR), Isla Espíritu Santo (IES), y extendiéndose un hacia el norte por la costa del Pacífico, a la altura de López Mateos (LMA; Figura 19).

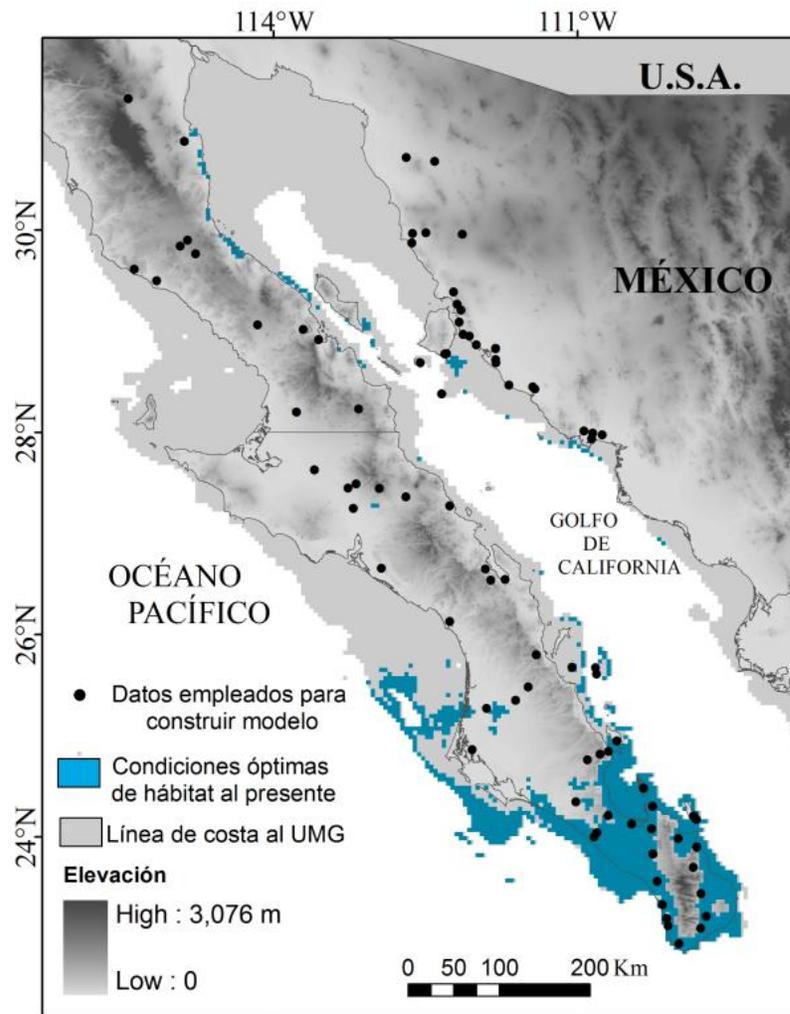


Figura 19. Modelación de nicho de *P. pringlei* al último máximo glacial (~21,000 años) de acuerdo al método de máxima entropía (MAXENT, Phillips et al., 2006), empleando el modelo paleoclimático de “The Paleoclimate Modelling Intercomparison Project 2 (PMIP; <https://pmip2.lsce.ipsl.fr/>; Braconnot et al. 2007) y datos compilados de campo (este estudio) así como de la literatura (Fleming et al., 1998; Medel-Narváez, 2008; Molina-Freaner et al., 2003).

7.3.4 Estructura genética poblacional

El número más probable de clusters determinado por STRUCTURE fue de dos ($K = 2$), con una discontinuidad genética o disminución del flujo genético, ubicada aproximadamente en media península ($26^{\circ} 50' N$ y $27^{\circ} 15' N$; Figuras 20A). A estos clusters se les denominó cluster Norte y Sur. El primero presentó un coeficiente de pertenencia $Q = 0.89$ y lo integraron todos los sitios de muestreo de Baja California, Sonora, y una de Baja California Sur (Santa Águeda (STA), Piedra Blanca (PBL), Punta Prieta (PPR), Cataviña (CAT), San Pedro (SPE), Isla San Esteban (IST), Bahía Kino (BKI), y Bahía Sargento (BSA)). Por su parte, el cluster Sur presentó un coeficiente de pertenencia de $Q = 0.85$ y lo integraron el resto de los sitios de muestreo de Baja California Sur (Bahía Concepción (BCO), San Gregorio (SGR), López Mateos (LMA), La Soledad (SOL), El Cien (CIE), El Carrizal (CAR), Cabo San Lucas (CBS), Isla Catalana (ICA), Isla San José (ISJ), Isla Espíritu Santo (IES), e Isla Cerralvo (ICE)) (Figura 20A).

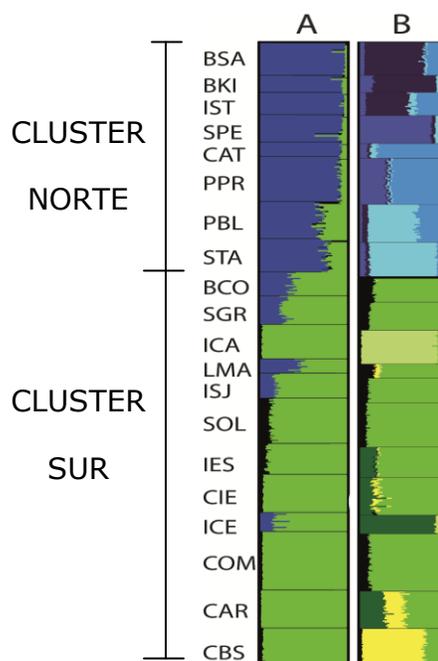


Figura 20. Patrón filogeográfico de *P. pringlei*, en el noroeste de México, revelado por análisis Bayesiano (STRUCTURE, Pritchard et al., 200), usando diez microsátélites. A) Proporción de la ancestría individual correspondiente a los clusters Norte (azul) y Sur (verde). B) Subestructura genética y porción de la ancestría identificada al interior de los clusters Norte y Sur.

Corridas independientes de STRUCTURE revelaron subestructura al interior de cada cluster, con cuatro poblaciones genéticamente diferenciados dentro de cada una. El cluster norteño mostro un grado moderado de mezcla (promedio de coeficiente de pertenencia $Q = 0.77$), mientras que en el cluster sureño, Isla Catalana, isla Cerralvo y Cabo San Lucas se diferenciaron claramente del resto de sitios sureños (BCO, CIE, COM, CUA, IES, SOL, LMA, SGR y CAR). Los coeficientes de pertenencia fueron de $Q = 0.94$, 0.94 , y 0.79 para Isla Catalana, isla Cerralvo y Cabo San Lucas, respectivamente, mostrando su propia identidad genética (Figura 20B).

El análisis discriminante de componentes principales (DAPC) fue consistente con STRUCTURE en separar a los cardones del cluster del sur. Los individuos de Isla Catalana, isla Cerralvo, Cabo San Lucas y el resto de los sitios de muestreo sureños formaron cuatro poblaciones más o menos separados en el espacio tridimensional de

componentes principales. Los dos primeros componente principales separaron a Isla catalana (ICA) del resto, con un 97% de los individuos asignados correctamente a su agrupamiento de origen (Figura 21A), mientras que el tercer componente separó a Isla Cerralvo (ICE) y Cabo San Lucas (CBS) con 81 y 87% de sus respectivos individuos asignados correctamente a su sitio de origen (Figura 21B). Sin embargo, este análisis falló en separar poblaciones distintas dentro de la región Norte.

De acuerdo a las comparaciones F_{ST} pareadas entre sitios de muestreo, Isla Catalana, Isla Cerralvo y Cabo San Lucas fueron altamente diferenciadas, empleando la base de datos diploide ($F_{ST} = 0.18$; 0.28 y 0.17 para ICA, ICE y CBS respectivamente, $p < 0.05$; Anexo 8) y de ploidía desconocida ($\Phi_{ST} = 0.19$; 0.25 y 0.17 para ICA, ICE y CBS respectivamente, $p < 0.05$; Anexo 8). En contraste, el grado de diferenciación entre pares de sitios de muestreo dentro de la región Norte fue moderado (promedio $F_{ST} = 0.07$; $p < 0.05$).

Los Análisis de varianza molecular (AMOVA), en los cuales se asumió diploidía y ploidía desconocida fueron consistentes con el análisis multivariado (DAPC) y con el análisis de comparaciones de F_{ST} pareadas. Aunque todos los modelos jerárquicos fueron significativos. El modelo que explicó mayor porcentaje de varianza fue aquel con cinco poblaciones, 1) Isla Catalana, 2) Isla Cerralvo, 3) Cabo San Lucas, 4) el resto de los sitios de muestreo sureños y 5) una sola población genética norteña, integrado por los sitios de muestreo (CAT, BKI, BSA, IST PBL, PPR y SPE). Los porcentajes de varianza explicada entre grupos fueron 10.6% y 12.5% para $F_{ST} = 0.11$ y $\Phi_{PT} = 0.10$, respectivamente (TABLA VIII).

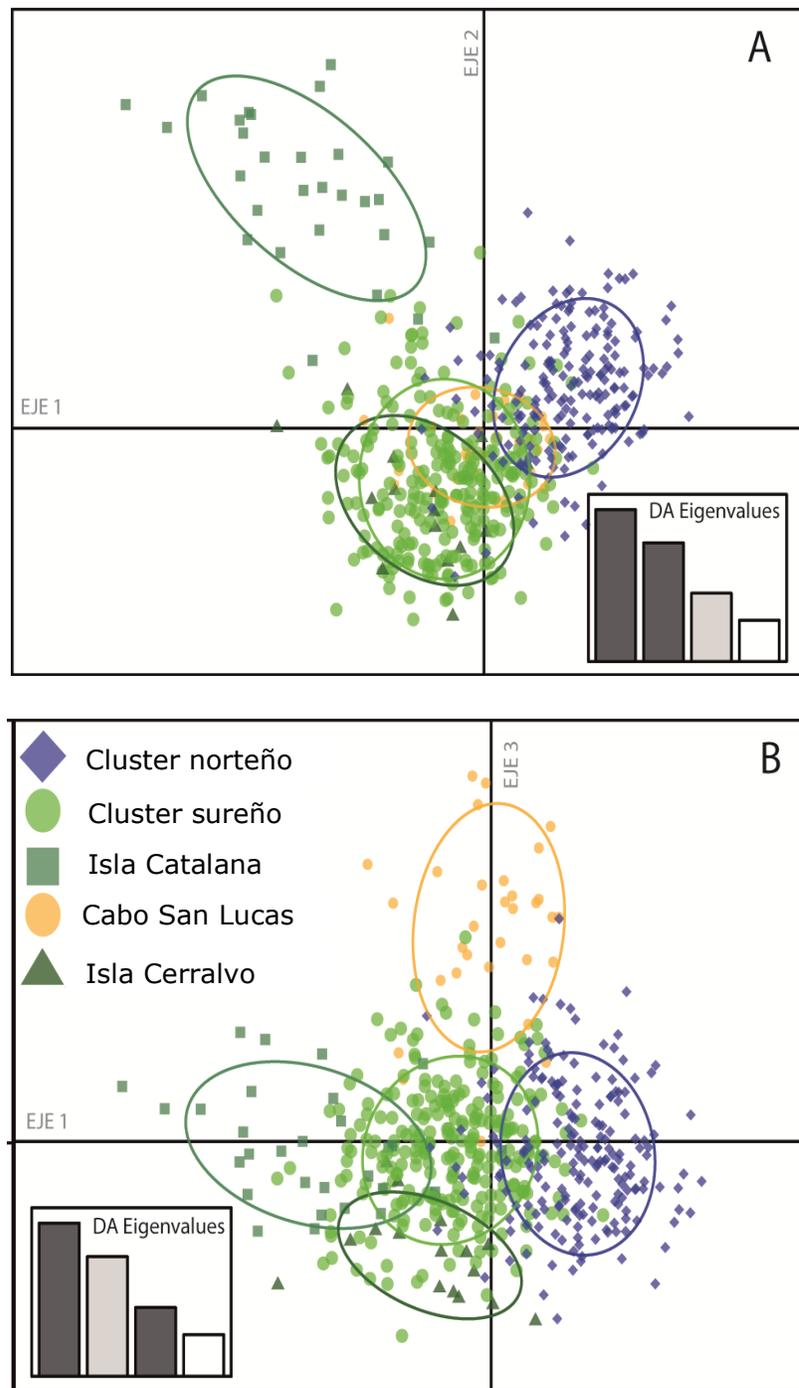


Figura 21. Análisis discriminante de componentes principales (DAPC) de 522 cardones y diez loci microsatelitales de *P. pringlei* en el noroeste de México. A) Los componentes principales uno y dos separaron a los clusters Norte y Sur (no incluye ICE, ICA ni CBS) e Isla Catalana con 97% de asignación a su sitio de origen. B) El tercer componente principal separó a Isla Cerralvo y Cabo San Lucas (81 y 87% de asignación).

TABLA VIII. Análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado para diferentes niveles jerárquicos de *Pachycereus pringlei*, a partir de una base de datos diploide (F_{ST}) y otra de ploidía desconocida (presencia/ausencia, Φ_{PT}). En negrito se indican los porcentajes más altos de varianza obtenidos.

Fuente de varianza	F_{ST}			Φ_{PT}		
	Índice fijación	% de varianza	valor (p)	Índice fijación	% de varianza	valor (p)
Tres eventos vicariantes						
Dentro de sitios de muestreo	83.1	0.17	<0.001	81.4	0.19	<0.001
Entre sitios de muestreo dentro de grupos vicariantes	10.5	0.11	<0.001	11.1	0.12	<0.001
Entre grupos vicariantes	6.4	0.06	<0.001	7.5	0.08	<0.001
Dos clusters de STRUCTURE						
Dentro de sitios de muestreo	84.5	0.15	<0.001	84.5	0.16	<0.001
Entre sitios de muestreo dentro de clusters	8.82	0.95	<0.001	10.2	0.11	<0.001
Entre clusters	6.7	0.07	<0.001	5.4	0.05	<0.001
Cinco clusters de STRUCTURE						
Dentro de sitios de muestreo	84.3	0.15	<0.001	81.3	0.16	<0.001
Entre sitios de muestreo dentro de clusters	5.1	0.06	<0.001	6.0	0.07	<0.001
Entre grupos	10.6	0.11	<0.001	12.5	0.01	<0.001
Ocho clusters de STRUCTURE						
Dentro de sitios de muestreo	85.3	0.15	<0.001	84	0.16	<0.001
Entre sitios de muestreo dentro de clusters	4.3	0.05	<0.001	6.0	0.07	<0.001
Entre clusters	10.4	0.10	<0.001	10	0.01	<0.001

De acuerdo al fenograma la agrupación de localidades de acuerdo a su ubicación geográfica, las localidades del sur de la península se ubicaron en un extremo, seguidas de las localidades de media península; y en el extremo opuesto, por un lado, las localidades del norte de la península y por el otro lado las de Sonora. También se corroboró el alto grado de diferenciación genético de las localidades de Cabo San Lucas (CBS), Isla Catalana (ICE) e Isla Cerralvo (ICE) quienes mostraron

las ramas más largas. Sin embargo los valores de bootstrap fueron, en su mayoría bajos (<50%; Figura 22)

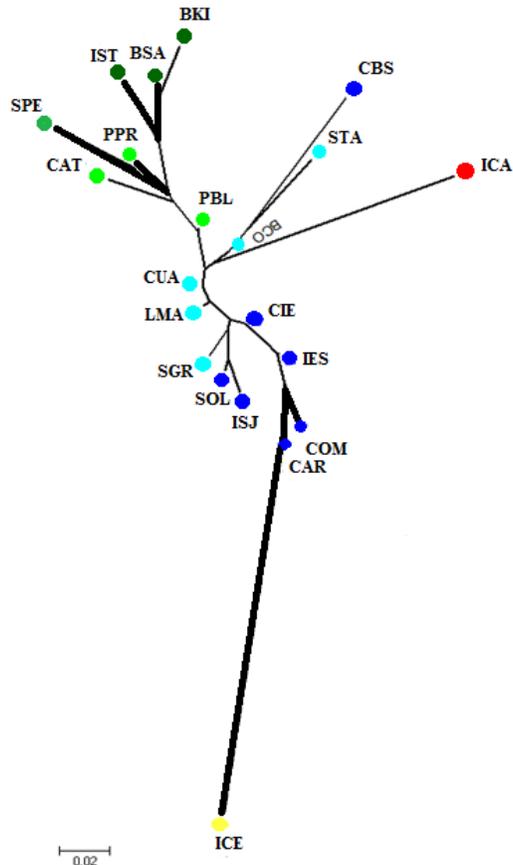


Figura 22. Fenograma consenso de Neighbor-Joining calculado a partir de cien matrices de distancias genéticas de Nei (1987) para los sitios de muestreo de *Pachycereus pringlei* noroeste de México. Azul Fuerte = sitios del sur de la península de Baja California, azul claro = sitios de la parte media de la península, verde claro = sitios del norte de la península, verde fuerte = sitios del Sonora. En Amarillo y Rojo se indican los sitios con sistema de reproducción hermafroditas de Isla Cerralvo (ICE) e Isla Catalana (ICA), respectivamente. Las líneas gruesas indican valores de bootstrap > 50%.

De acuerdo a los resultados de los cinco métodos usados, *Pachycereus pringlei* a lo largo de su distribución está constituido por cinco poblaciones genéticamente diferenciados (Figura 23). Las poblaciones son:

- 1) **Población Norte:** integrada por todas los sitios de muestreo de Baja California y un sitio de Baja California Sur (STA, PBL, PPR, CAT, SPE, IST, BKL, y BSA).
- 2) **Población Sur:** integrado por el resto de sitios de muestreo de Baja California Sur, (BCO, SGR, LMA, SOL, CIE, y CAR).
- 3) **Población de Cabo San Lucas:** integrada por el sitio de muestreo de CBS
- 4) **Población de Isla Catalana:** integrada por el sitio de muestreo ICA
- 5) **Población de Isla Cerralvo:** integrada por el sitio de muestreo de ICE

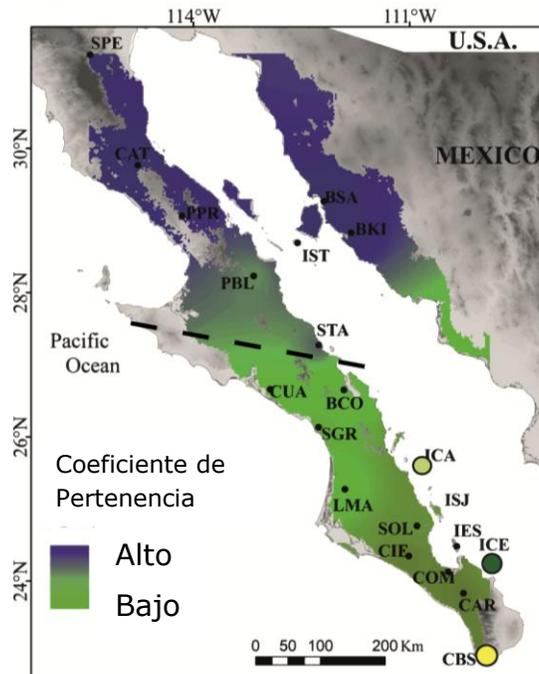


Figura 23. Patrón filogeográfico de *P. pringlei* en el noroeste de México, revelado por cinco métodos analítico (STRUCTURE, Análisis discriminante de componentes principales (DAPC), coeficientes de diferenciación genética, Análisis molecular de varianza (AMOVA) y fenograma. La población Norte (en azul) y Sur (en verde) se encuentran separadas por la línea punteada y el cambio gradual del color representa el coeficiente de pertenencia o ancestría individual, determinado por STRUCTURE. Las otras tres poblaciones constituyen sitios individuales de muestreo: Isla Catalana (ICA, verde claro), Isla Cerralvo (ICE, verde oscuro) y Cabo San Lucas (CBS, amarillo). El rango de distribución de *P. pringlei* fue determinado por modelación de nicho al presente en MAXENT, empleando 88 datos de presencia de la especie obtenidos en este estudio y de la literatura (Fleming et al., 1998; Medel-Narváez, 2008; Molina-Freaner et al., 2003).

Los loci con mayor contribución para la diferenciación genética entre las poblaciones Norte y Sur fueron: *Ppri01*, *Ppri05* y *Ppri06*, respectivamente. Los alelos *Ppri01_210*, *Ppri05_182* y *Ppri06_142* fueron más frecuentes en el Norte (Norte/Sur, 0.80/0.57, 0.70/0.38, and 0.88/0.58, respectivamente); mientras que los alelos *Ppri01_222*, *Ppri05_178* y *Ppri06_138* fueron más frecuentes en el Sur (Sur/Norte: 0.10/<0.01, 0.45/0.15, y 0.41/0.08, respectivamente; Anexo 7). Por su parte, Isla Cerralvo, Cabo San Lucas, e Isla Catalana mostraron frecuencia relativamente alta de al menos un alelo (*Ppri06_138*, *Ppri03_137* y *Ppri10_86*, 93%, 82%, 47% respectivamente, con respecto al promedio en las demás poblaciones: 30, 40 y 10%, respectivamente). Otras diferencias entre las poblaciones fueron los alelos privados y la diversidad. La población Sur mostró 13 alelos privados, Isla Cerralvo y Cabo San Lucas mostraron un alelo privado cada una, Isla Catalana mostró dos alelos privados; mientras que no hubo alelos privados en la población Norte. En el caso de Isla Catalana e Isla Cerralvo los alelos privados presentaron frecuencias relativamente altas (>6%) mientras que la frecuencia de alelos privados del resto de las poblaciones fue menor a 2%. La población Sur presentó valores significativamente mayores de diversidad genética, incluyendo: número promedio de alelos por locus (F=12.3, P <0.0); heterocigosidad observada (F = 10.6, P <0.01), heterocigosidad esperada (F=42.0, P <0.01), mientras que Isla Cerralvo presentó los valores más bajos de diversidad y alelos por locus (Tabla IX).

TABLA IX. Diversidad genética, sistemas de reproducción y frecuencia de machos por sitio de muestreo para las cinco poblaciones genéticas del cardón *P. pringlei* en el noroeste de México, identificadas a partir de diez loci microsatelitales. N= tamaño poblacional, A = número promedio de alelos por locus, Ap = número total de alelos privados, Ho = heterocigosidad observada, He = heterocigosidad esperada.

Poblaciones	N	A	Ap	Ho	He	%machos	Sistema de reproducción
Norte	192	5.6	0	0.35	0.46	4	Ginodioico/Trioico
Sur	254	7.5	13	0.45	0.51	36	Trioico
CBS	31	4.5	1	0.38	0.46	63	Trioico
ICA	29	4.4	2	0.40	0.50	0	Hermafrodita
ICE	16	3.0	1	0.26	0.40	0	Hermafrodita

7.4 Sistemas de reproducción y patrón genético de variación

Las cinco poblaciones presentaron diferencias importantes en sus sistemas de reproducción. Las localidades del grupo Norte fueron principalmente ginodioicas o trioicas con frecuencia de ocurrencia baja de machos (>10% en CAT, PPR, PBL y IST) a moderada (de 0.10 a 30% en BSA and BKI). La Isla Catalana (ICA) e Isla Cerralvo (ICE) fueron las únicas poblaciones con sistema de reproducción hermafrodita. Cabo San Lucas (CBS) fue la población con la mayor frecuencia de machos (63%); mientras que la población del Sur presentó en su mayoría un sistema trioico con alta frecuencia de machos (>30%, TABLA IX).

STRUCTURE mostró que el empleo de bases de datos parciales [solo hermafroditas (plantas hermafroditas de todas los sitios de muestreo; 234 individuos), y solo plantas unisexuales de todas los sitios de muestreo (276 individuos)] resultan en importantes diferencias entre las poblaciones Norte y Sur. Mientras que los hermafroditas exhibieron un patrón de estructuración genético similar al de la base de datos completa (Figura 24A), los unisexuales no mostraron evidencia de

diferenciación genética, el cual se reflejó con un coeficiente de pertenencia de $Q \sim 50$ para ambos machos y hembras (Figura 24B).

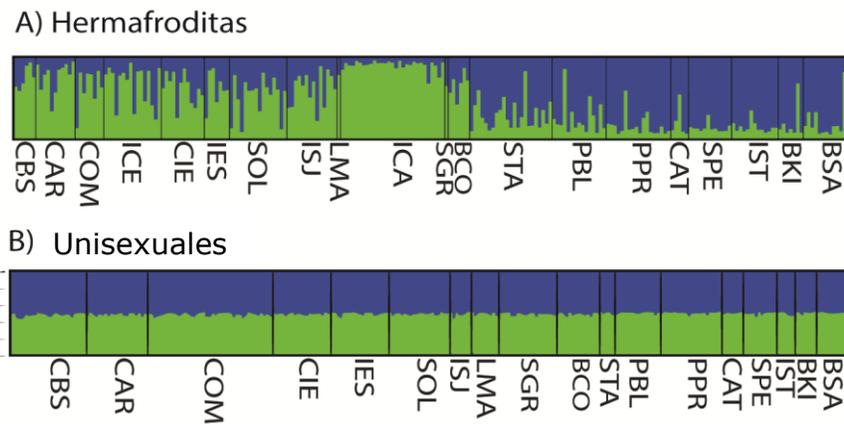


Figura 24. Ancestrías individuales de *Pachycereus pringlei* del noroeste de México para $K = 2$, realizadas a partir de diez loci microsatelitales en el programa STRUCTURE (Pritchard et al., 2000), empleando solamente individuos hermafroditas (A) e individuos unisexuales machos y hembras (B).

Los cardones con sistema de reproducción diferente mostraron una tendencia hacia la disminución de la diversidad genética de un sistema trioico a uno ginodioico a uno hermafrodita (Figura 25A). En el caso de la heterocigosidad observada las diferencias fueron significativas ($F = 31.17$, $p < 0.01$). Por su parte, se observó una tendencia hacia un incremento de los índices de diferenciación genética entre los cardones con un sistema trioico a uno ginodioico a uno hermafrodita (Figura 25B). Las diferencias fueron significativas para las comparaciones pareadas de F_{ST} ($F = 61.22$, $p < 0.01$; Tabla X).

TABALA X. Valores promedio de diversidad e índices de diferenciación genética para *P. pringlei* con distintos sistemas de reproducción en el noroeste de México. Heterocigosidad observada (H_O) y esperada (H_E). Coeficientes de diferenciación genética estimados como el promedio de diferencias pareadas entre sitios de muestreo, asumiendo patrón de herencia diploide (F_{ST}) y patrón de herencia desconocido (Φ_{PT}). Sistemas de reproducción (SR). Valores entre paréntesis es la probabilidad de la desviación estándar.

SR	H_O	H_E	F_{ST}	Φ_{PT}
Trioico	0.46 (0.01)*	0.49 (0.01)*	0.03 (0.01)*	0.03 (0.02)
Ginodioico	0.35 (0.01)*	0.39 (0.01)	0.08 (0.01)*	0.04 (0.02)
Hermafrodita	0.25 (0.03)*	0.36 (0.02)	0.17 (0.01)*	0.20 (0.02)*

*Diferencias significativas

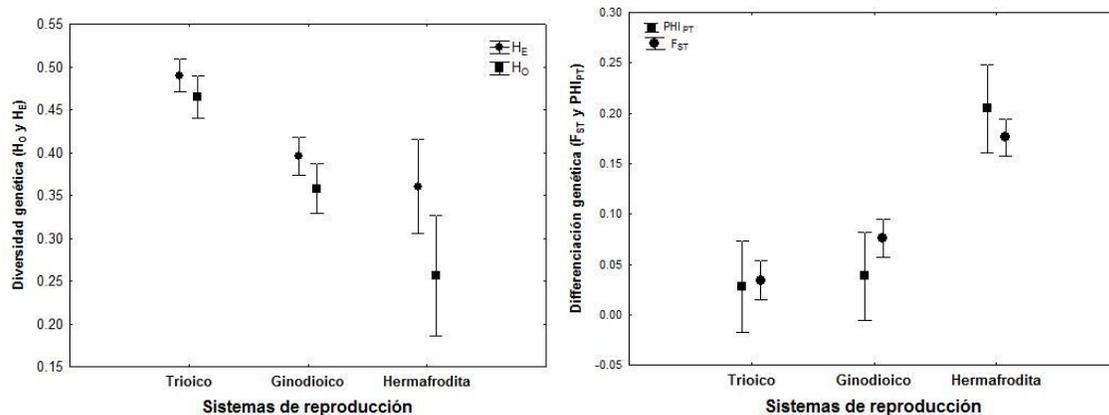


Figura 25. Valores promedio y su desviación estándar de diversidad genética e índices de diferenciación genética en poblaciones con distinto sistema de reproducción para *P. pringlei* en el noroeste de México. A) H_O , heterocigosidad observada y H_E heterocigosidad esperada. B) Coeficientes de diferenciación genética estimados como el promedio de diferencias pareadas entre sitios de muestreo, asumiendo patrón de herencia diploide (F_{ST}) y patrón de herencia desconocido (Φ_{PT}).

8. DISCUSIÓN

8.1 Caracterización morfológica y morfométrica de flores

Las imágenes electrónicas de barrido de este estudio revelaron la presencia de estructuras atrofiadas del sexo no funcional en flores unisexuales del cardón. Estos resultados son consistentes con lo reportado anteriormente para flores unisexuales de otras cactáceas (Baker, 2006; Del Castillo y Trujillo Argueta, 2009; Del Castillo y González-Espinoza, 1988; Leuenberger, 1986; Orozco-Arroyo et al., 2012; Strittmatter et al., 2008) y sugiere una diferenciación hacia las funciones masculina y femenina por la interrupción en el desarrollo o degeneración del ginoecio (cámara ovárica, funículos, óvulos, pistilo) y androecio (estambres, polen anteras) de flores bisexuales primordiales.

Las flores pistiladas del cardón mostraron anteras tetralobuladas (con cuatro sacos poliníferos) e indehiscentes, tal como se ha reportado en especies del Caribe del género *Consolea* sp. (Strittmatter et al., 2008). Esto es sin duda una de las razones por las cuales se ha reportado ausencia de granos de polen para esta especie mediante la observación directa de las flores (Fleming et al., 1994; Medel-Narvaez, 2008). Sin embargo, al observar dentro de las anteras, la microscopía de barrido reveló la presencia de granos de polen “malformados”. Estos presentaron talla similar a los granos de polen de flores estaminadas, pero con la estructura externa indiferenciada (ausencia de microperforaciones y espínulas), y posiblemente inviábiles. La presencia de polen malformado se ha reportado en cactáceas tales como *Opuntia quimilo* (Díaz y Cocucci, 2003), *Echinocereus yavapaiensis* (Baker, 2006) y *Mammillaria dioica* (Bemis et al., 1972, revisado en Parfitt, 1985). Sin embargo no hay estudios detallados sobre los mecanismos que resultaron en la interrupción del desarrollo del polen en estas especies. En cambio, en cactáceas del Caribe del género *Consolea* sp así como en un nopal nativo de Norte América, *Opuntia stenopetala* (Flores-Rentería et al., 2013), las anteras permanecen vacías y

no se ha reportado la presencia de granos de polen inmaduros o malformados. Estas especies (*Consolea sp.* Y *O. stenopetala*) también presentan anteras tetralobuladas y/o indehiscentes (Flores-Rentería et al., 2013; Strittmatter et al., 2008). Estudios embriológicos realizados en estas cactáceas demostraron que la ausencia de granos de polen se debe a la interrupción de la meiosis de las células madre microesporofitas (mmc) en etapas tempranas de maduración de las anteras. Las mmc son células que maduran a granos de polen en anteras funcionales de flores estaminadas. En *Consolea sp.* y en *O. stenopetala* la interrupción en el desarrollo de las mmc es ocasionado, entre otras cosas, por el aplastamiento físico de éstas, cuando las células que la rodean (tapatum) sufren un crecimiento inusual. El crecimiento anómalo de las células del tapetum es acompañado de la forma irregular del núcleo, cromatina fragmentada y condensada; alta vacuolización y citoplasma condesado, lo cual es característico de células que han iniciado un programa de muerte celular (PCD, *progam cell death*). Los PCD's son comunes durante el desarrollo de flores pistiladas (Parish y Li, 2010; Rogers, 2006; Wilson et al., 2011; Wu y Cheung, 2000). Las anteras indehiscentes también han sido asociadas con los PCD's. Strittmatter et al. (2008) sugiere que la indehiscencia de anteras en flores pistiladas de *Consolea sp.*, posiblemente se deba a una mutación que impiden la iniciación de un programa de muerte celular en las capas inter-esporangiales y laterales. En anteras funcionales de flores estaminadas los PCD's se encargan de la degradación de dichas capas permitiendo la expulsión del polen (Wu y Cheung, 2000).

Grados similares de degradación del androecio en flores de distintas especies de cactáceas sugiere que los procesos de diferenciación sexual son parecidos para la familia Cactaceae. En *P. pringlei*, la iniciación de un PCD en etapas tardías del desarrollo de las anteras podría explicar la presencia de granos de polen malformados.

En el caso de las flores estaminadas del cardón, en este estudio se observó una cámara ovárica similar en forma y talla que la de las hembras, la cual además posee

distinto grado de desarrollo de los funículos y presencia ocasional de óvulos de talla reducida. Esto es consistente con los distintos grados de especialización de la función masculina, reportados para cactáceas, aun dentro de una misma especie (Negrón-Ortiz, 2007; Orozco-Arroyo et al., 2012; Strittmatter et al., 2008). Los distintos grados de especialización de flores estaminadas incluyen flores con abundantes óvulos donde algunos pueden resultar en frutos maduros (Strittmatter et al., 2008), a flores con la producción ocasional de óvulos inviables (Del Castillo y González-Espinosa, 1988; Hoffman, 1992; Negrón-Ortiz y Strittmatter, 2004; Orozco-Arroyo et al., 2012; Strittmatter et al., 2008), y flores estaminadas que no producen óvulos (Del Castillo y González-Espinosa, 1988; Díaz y Cocucci, 2003; Leuenberger, 1986; Orozco-Arroyo et al., 2012). Al menos los dos últimos morfos sexuales se pudieron observar para el cardón en este estudio. Distintos grados de especialización de la función masculina de flores estaminadas del cardón se reportaron previamente para las localidades de El Comitán (Medel-Narváez et al., 2006) y Sonora (Fleming et al., 1994; Molina-Freaner et al., 2003). Strittmatter et al. (2008) sugiere que la esterilidad femenina de algunas flores estaminadas de *Consolea sp.*, con abundantes óvulos en distintos niveles de degradación, podría estar asociada a mutaciones que provocan el desfasamiento en los tiempos de maduración de óvulos y antesis de la flor. Por ejemplo, el retraso en la antesis ocasiona que varios óvulos inicien un proceso de degradación antes de que algún tubo polínico pueda polinizarlos ya que la flor aun se encuentra cerrada. En contraste, los morfos sexuales de *O. stenopetala* incluyen distintos niveles de desarrollo de funículos y producción ocasional de óvulos inviables. Orozco-Arroyo et al. (2012) sugiere que la esterilidad masculina en *O. stenopetala*, podría estar asociada a mutaciones que regulan la producción y concentración de hormonas, tales como Auxina ya que en experimentos de laboratorio el aumento de ésta hormona permitió la diferenciación de óvulos. Los distintos morfos de flores estaminadas del cardón fueron más similares a los morfos reportados para *O. stenopetala*. Es posible que mutaciones involucradas en la producción y concentración de hormonas, estén impidiendo el desarrollo de estructuras funiculares y de óvulos en *P. pringlei*.

El empleo de microscopia electrónica de barrido permitió identificar distintos grados de desarrollo de las anteras y de la cámara ovárica de flores pistiladas y estaminadas, los cuales, de acuerdo a estudios embriológicos realizados en otras cactáceas, podrían ser asociados a la iniciación o fallo de programas de muerte celular, así como a mutaciones que interfieren con la producción y/o concentración de hormonas necesarias para el desarrollo durante etapas tempranas de la diferenciación de las flores.

Además de las diferencias morfológicas observadas en flores de *P. pringlei*, en este estudio, también se observaron diferencias morfométricas. Las flores estaminadas fueron significativamente más grandes y presentaron estambres más largos; mientras que las flores pistiladas presentaron mayor cantidad y talla de óvulos. La mayor talla y producción de estructuras reproductivas de los unisexuales comparado con los hermafroditas ha sido reportado en varias especies de cactáceas con sistemas de reproducción no hermafrodita (Del Castillo y Trujillo Argueta, 2009; Días y Cocucci, 2003; Valiente-Banuet et al., 1997), incluyendo individuos de *P. pringlei* de una localidad del sur de La Paz (El Comitán; Medel-Narváez, 2008) y otra de la costa de Sonora (Bahía Kino; Fleming et al., 1994; 1996; Fleming, 2000). Lo anterior se explica por medio de la teoría de “transferencia de recursos”, la cual establece que los unisexuales, al presentar una sola función sexual pueden redistribuir la energía del sexo no funcional hacia otras funciones, incluyendo el incremento en la fertilidad del sexo funcional (Charnov, 1982). La redistribución de recursos tiene consecuencias importantes sobre el éxito reproductivo diferencial de los morfos sexuales. Por ejemplo, flores y estambres de mayor talla en machos de cardón podrían estar relacionados con una mayor producción de granos de polen, tal como se ha estimado para los machos de esta especie (Fleming et al., 1994). También podrían resultar en flores más atractivas para los polinizadores (Bawa y Bench, 1981). Por su parte, mayor producción de óvulos y óvulos de mayor talla de hembras de *P. pringlei* está asociado directamente con el éxito reproductivo.

En resumen, los análisis morfométricos permitieron identificar diferencias cuantitativas de flores unisexuales y bisexuales del cardón. Estas diferencias son consistentes con la teoría de “redistribución de recursos” y podrían tener consecuencias importantes en el éxito reproductivo y establecimiento de los unisexuales.

8.2 Sistemas de reproducción

En el cardón, la segregación espacial de sexos resultó en tres sistemas de reproducción. El sistema de reproducción trioico se observó al sur de la PBC, abarcando un área que va desde la región de Los Cabos en su parte más sureña hasta aproximadamente 28°22' N, a la altura de Santa Águeda en Baja California Norte; así como en la costa de Sonora. Por su parte, las poblaciones ginodioicas se observaron en la porción norteña restante de la PBC; mientras que el sistema de reproducción hermafrodita se restringió a las islas Cerralvo y Catalana al sur del Golfo de California. El patrón espacial de los sistemas de reproducción determinado en este estudio fue muy similar con lo reportado en estudios previos (Fleming et al., 1998; Medel-Narvaez, 2008; Molina-Freaner et al., 2003). Por ejemplo, localidades geográficamente cercanas a las de este estudio (i.e. < 50Km) fueron reportadas con el mismo sistema de reproducción en trabajos previos. Las diferencias encontradas fueron pocas y en algunos casos asociadas a localidades trioicas con baja frecuencias de machos (<10%). Por ejemplo, Medel-Narvéez (2008) reportó un sistema trioico con uno y dos machos en Guatamote, B.C.S. y Cataviña, B.C., respectivamente; mientras que las localidades de Cataviña (CAT) y Puente Querétaro (PQU) de este estudio fueron ginodioicas. Otra diferencia fue entre Bahía Kino (BKI, Trioica en este estudio) con una localidad ginodioica (El Cardonal; Molina-Freaner et al., 2003) ubicada a menos de 43 Km al sur; sin embargo, la localidad de Bahía Kino, que también fue reportada por estos autores, presento el mismo sistema de reproducción identificado en este estudio (Trioico). La mayor diferencia

encontrada fue entre la localidad ginodioica de Bonfil (BON, $n = 32$) de este estudio, con respecto al sistema de reproducción trioico (31% machos, $n = 20$) reportado por Fleming et al. (1998) para una localidad ubicada a 28 Km al oeste (i.e. Oeste de Santa Rosa; Figura 26). En éste último caso, es poco probable que las diferencias sean debido a errores de muestreo ya que el tamaño de muestra se similar (31 para Oeste de Santa Rosa y 32 para Bonfil) y además se requiere de un solo macho para que el sistema sea denominado "trioico". Es también poco probable que se deba a errores de identificación ya que en el caso particular del cardón la función sexual es total, es decir, las hembras producen grandes cantidades de óvulos (1.e. 608 de acuerdo a este estudio) y no producen polen (o al menos no lo expulsan como vimos en este estudio). En contraste los machos presentan grandes cantidades de polen en las anteras y la presencia de óvulos es rara (.e. <12 de acuerdo a este estudio). Entonces, estos resultados sugieren que: 1) la composición de sexos no ha sufrido variaciones importantes en los últimos 17 años; y 2) el sistema de reproducción pueden cambiar a escalas geográficas relativamente cortas (i.e. < 50 Km).

Por otro lado, también es claro que las islas representan un factor importante en el cambio de sistema de reproducción, ya que, a excepción de la Isla Espíritu Santo, al sur del Golfo de California, todas las islas presentaron un sistema de reproducción distinto con respecto a otra isla o regiones costeras adyacentes, ubicadas a menos de 20Km (Figura 26). Esto se discutirá más adelante.

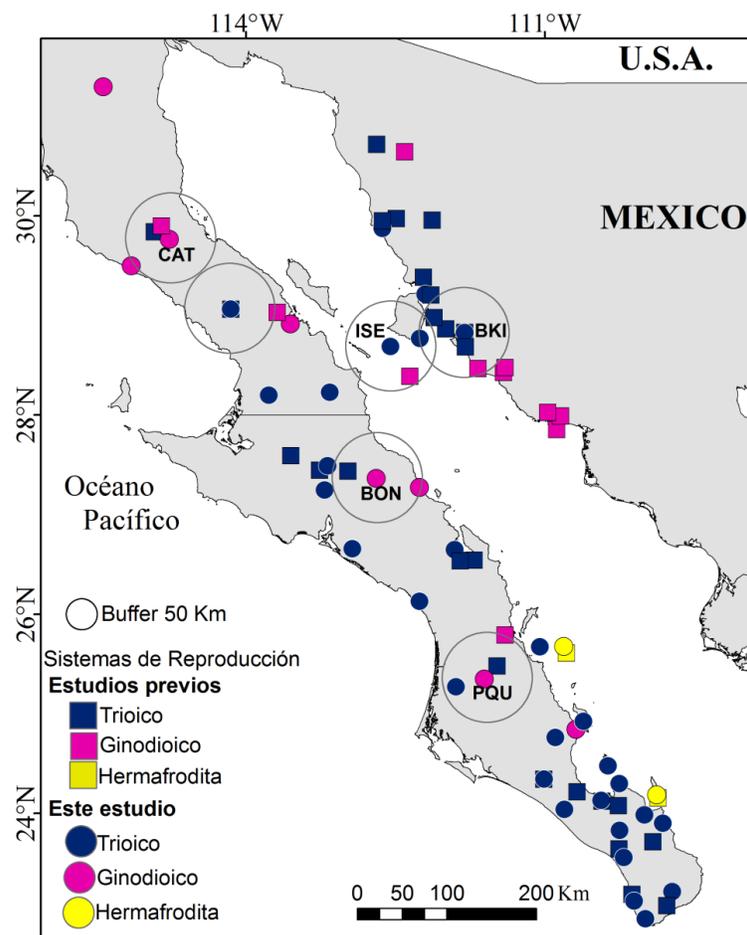


Figura 26. Sistemas de reproducción identificados en este estudio (círculos) y en estudios previos (cuadros) realizados por Fleming et al. (1998), Medel-Narváez (2008) y Molina-Freaner et al. (2003). Los círculos mayores representan una distancia de 50 Km a la redonda de los sitios de muestreo de este estudio en los cuales se describió un sistema de reproducción distinto en estudios previos.

El segundo objetivo de este estudio fue determinar la asociación del sistema trioico con la presencia de su principal polinizador, el murciélago *L. curasoae*, así como con variables medioambientales. De manera general, nuestros resultados no apoyan la presencia de *L. curasoae* como el único factor responsable del establecimiento de sistemas trioicos. Además se observó un importante efecto de la heterogeneidad ambiental asociado al establecimiento de los machos, así como de la distancia geográfica con respecto a la PBC, en el caso de las islas.

Factores bióticos: Polinizadores

La hipótesis de “abundancia de polinizador nocturno” establecida por Fleming et al. (1998) en la cual sugiere que las localidades trioicas del cardón se encuentran geográficamente cercanas a una cueva de maternidad de *L. curasoe*, no fue apoyada en su totalidad en este estudio. Por ejemplo, esta hipótesis podría explicar la presencia de localidades trioicas con alta frecuencia de machos en la región del Cabo, donde la literatura sugiere la presencia de dos cuevas de maternidad de *L. curasoe*. También podría explicar la baja frecuencia o ausencia de machos en Baja California Norte, donde no hubo registros de *L. curasoe* (Figura 12). Sin embargo, en la parte central de Baja California Sur y en la costa de Sonora se observaron localidades ginodioicas o con baja-moderada frecuencia de machos, a distancias menores de 30 km de cuevas de maternidad o de registros de recolecta de *L. curasoe*, así como localidades trioicas con alta frecuencia de machos a más de 75 Km de registros de *L. curasoe*. Estos sistemas de reproducción no son consistentes con la hipótesis de abundancia de polinizador nocturno”.

La región del Cabo tiene clima y vegetación distintos al resto de la península. La precipitación promedio anual es relativamente alta (200-400 mm) debido a la influencia de tormentas tropicales de verano (Roberts y Ezcurra, 2012). Esto favorece una alta riqueza específica que incluye matorral xérico y bosque deciduo tropical (Garcillán et al., 2012), lo cual, provee de recursos nutricionales a varias especies a lo largo de todo el año. Para esta región se reportó la presencia de dos cuevas de maternidad de *L. curasoe*, donde estos mamíferos forman colonias abundantes y, a diferencia del resto de colonias migratorias de murciélagos del noroeste de México, las colonias de la región del Cabo son residentes (Woloszyn y Woloszyn, 1982). Es probable que las localidades trioicas del sur de la PBC sean favorecidas por las condiciones particulares de la región y presencia de *L. curasoe* de hábitos residentes (Figura 12). Sin embargo, el cardón no es polinizado exclusivamente por *L. curasoe*. A diferencia de la alta dependencia hacia los murciélagos, observado en cactáceas columnares de Sudamérica, las flores de las

cactáceas columnares del noroeste de México, tales como *Carnegie gigantea* y *P. pringlei* permanecen abiertas por varias horas de la mañana siguiente, permitiendo el acceso de polinizadores diurnos (Fleming et al., 1996). Otros polinizadores potenciales del cardón son la paloma de alas blancas (*Zenaida asiática*), el pájaro carpintero (*Melanerpes uropigialis*) y las abejas (*Apis mellifera*; Medel-Narváez, 2003). En la localidad de El Comitán, ubicada dentro de la posible área de influencia de murciélagos de la región del Cabo, el principal polinizador reportado fue la paloma de alas blancas *Zenaida asiática* (Medel-Narváez, 2003). Entonces sugerimos que además de *L. curasoe*, otros polinizadores están contribuyendo al éxito reproductivo de los machos y el establecimiento de sistemas de reproducción trioicos en la región de los Cabos.

En el caso de las localidades ginodioicas de Baja California Norte, la ausencia de *L. curasoe* también podría ser consistente con la hipótesis de abundancia de polinizador nocturno. Sin embargo, Fleming et al. (1996) sugiere que la abundancia de polinizadores potenciales del cardón disminuye hacia latitudes altas. Entonces, los sistemas trioicos podrían ser también explicados por variación en la densidad de todos sus polinizadores, no solo de *L. curasoe*. La densidad poblacional del cardón también disminuye hacia el norte (Medel-Narváez, 2008). La disminución de polinizadores y de la densidad, aumentan la tasa de autofecundación. El aumento en la tasa de autofecundación afecta principalmente a los machos por la disminución en número de óvulos disponibles. En contraste, las hembras no se ven afectadas con el incremento la tasa de autofecundación pues el polen empleado para la autopolinización es despreciable comparado con las grandes cantidades producidas (947:1 polen: óvulos; Fleming et al., 1994). Entonces la disminución en abundancia de *L. curasoe*, así como de otros polinizadores potenciales del cardón podría explicar la ausencia de machos, pero no de hembras, en latitudes altas (Figura 12).

Por otro lado, en la parte central de la PBC, del lado del Golfo de California, se tienen registros de *L. curasoe*, pero las localidades son principalmente ginodioicas. En contraste, del lado oeste, donde no hay reportes de *L. curasoe*, el sistema es

trioico, y además la frecuencia de machos es alta. Del lado este de la PBC, una posible explicación es que los murciélagos de estos sitios están polinizando a otras especies. *L. curasoae* no es un polinizador exclusivo del cardón, otros elementos importantes de su dieta incluye diferentes cactáceas columnares y varias especies del género *Agave sp* (Rojas-Martínez et al., 1999). Las agaváceas son comunes a lo largo del rango de distribución del cardón y además varias de sus especies tienen periodos de floración durante primavera y verano al igual que *P. pringlei* (Valiente-Banuet et al., 1996; Rojas-Martínez et al., 1999). Además el murciélago no es un polinizador confiable en estas regiones ya que es de hábitos migratorios. La migración sugerida es hacia la región de los Cabos durante otoño e invierno donde puede encontrar suficientes recursos en los bosques deciduos tropicales de la región del Cabo, y hacia el norte, a lo largo de Loreto y hasta Bahía Concepción, BCS en primavera-verano donde se alimenta de varias especies de cactáceas columnares y de agaves (Rojas-Martínez et al., 1999). Entonces, dado los hábitos migratorios de éstas colonias de murciélagos, la abundancia podría variar en función de la disponibilidad de recursos nutricionales. En contraste, del lado de Pacífico las localidades trioicas con alta frecuencia de machos deben estar asociadas a factores alternativos a las variaciones en abundancia y comportamiento de los murciélagos, ya que, al menos en cuanto al murciélago no se tienen registros (Figura 12).

Factores abióticos: condiciones medioambientales

En este estudio sugerimos que los cardones machos podrían estar asociados a ambientes con menor precipitación. Esta hipótesis resultó de la evidencia de que los machos, al perder la función sexual de mayor costo (femenina) tienen mayor capacidad de optimizar entre reproducción y funciones vitales (Dawson y Bliss, 1989; Dawson y Ehleringer, 1993; Laporte y Delph, 1999). Consistente con esta predicción, la modelación de nicho del sistema trioico del cardón sugirió que la precipitación del cuatrimestre más seco (BIO 17, 39%) es la variable climática de mayor contribución

al modelo (Figura 27A). Del lado oeste de la península se encuentran las regiones de El Desierto de Vizcaíno y Planicies de Magdalena, de acuerdo a las regiones fitogeográficas identificadas por Garcillán et al. (2012). En estas regiones la precipitación promedio anual es de las más bajas a lo largo de la península (50-100 mm; Figura 27B). La poca precipitación y la influencia del Pacífico resulta en planicies arenosas donde la aridez y suelo salino aumentan conforme nos acercamos a la costa del Pacífico (Garcillán et al., 2012). En varios estudios se ha demostrado la presencia de machos hacia lugares más secos y/o estresantes (Barrett et al., 1992; Dawson y Bliss, 1989; Laporte y Delph, 1996). Los machos al perder la función sexual de mayor costo (femenina) son los que mejor podrían persistir en sitios con recursos limitados. Por ejemplo en *Wurmbea dioica*, los machos invierte mayor energía que las hembras al crecimiento de raíces, lo cual les permite mejorar la captura de agua y de nitrógeno. En contraste, los hermafroditas, al poseer dos funciones sexuales requieren de ambientes con recursos suficientes para poder llevar a cabo sus funciones reproductivas, por lo que tienden a estar en sitios donde los recursos no son limitantes (Barrett et al., 1992; Dawson y Bliss, 1989; Laporte y Delph, 1996). Una posible explicación de la presencia de sistemas trioicos con alta frecuencia de machos al o largo de la costa del Pacífico, aun en ausencia de *L. curasoe*, podría ser su mayor eficiencia en colecta de agua y nutrientes en ambientes de recursos limitantes y/o estresantes, aunque esta hipótesis debe ser probada. En contraste, la distribución de las localidades con baja frecuencia de machos (ginodioicas y trioicas), podrían ser el reflejo de la menor capacidad competitiva de los machos con respecto a los hermafroditas en condiciones no limitantes y baja-moderada abundancia de polinizadores. La dependencia de los hermafroditas a sitios más húmedos se puede ver reflejada en la distribución de las localidades ginodioicas preferentemente en las cercanías de las cadenas montañosas que recorren la península y que se aproximan a la costa este de la PBC en Baja California Sur (Figura 27B).

Por otro lado, la modelación de nicho sugiere que el nicho fundamental de los machos es distinto al de los hermafroditas y hembras. Por ejemplo, no hay condiciones adecuadas en Baja California Norte para su presencia (Figura 13B). El análisis de componentes principales sugirió que las variables con mayor poder discriminante entre los sistemas de reproducción ginodioico y trioico fueron, el rango anual de la temperatura (BIO07), así como la temperatura promedio del cuatrimestre más frío (BIO11). La variación de la temperatura es contrastantes entre Baja California Norte y Baja California Sur, debido a que las temperaturas mínimas son más extremas en Baja California Norte. Por ejemplo el rango de temperatura es mayor en Baja California norte como consecuencia de las temperaturas más frías alcanzadas en invierno ($<15^{\circ}\text{C}$); mientras que en Baja California Sur el rango de temperatura es menor y las temperaturas mínimas son, por lo general, mayores a 15°C (Figuras 27D y C). La temperatura mínima es una de las principales variables ambientales asociada con la distribución de las cactáceas (Nobel, 1980). La temperatura mínima limita el rango de distribución hacia el norte de *Lophocereus schottii*. Esta especie presentar tallo de menor diámetro con respecto a *Carnegie gigantea*, la cual se distribuye a latitudes más altas. Un tallo delgado impide mantener la temperatura mínima requerida en la parte apical meristemática, limitando la distribución en *L. schottii* hacia latitudes altas. Plantas con tallo más robusto también se ha asociado a la función sexual de hembra, esto les permite almacenar recursos suficientes para la producción y maduración de frutos (Delph, 1996). Para el cardón, Medel-Narváez (2008) observó que el grosor del tallo aumenta conforme aumenta la latitud; sin embargo este autor no hizo distinción de géneros. De nuestro estudio y estudios previos se sabe que los machos disminuyen en la misma dirección. Los machos, al no tener que invertir en la producción y maduración de frutos no requieren de tallos robustos; en cambio, esa energía podría ser invertida en otras funciones que incrementen su éxito reproductivo. Una explicación alternativa a la ausencia de machos en altas latitudes debido a la disminución de polinizadores, podría ser solo una consecuencia de la especialización hacia la función masculina. En este estudio, con excepción de la localidad de El Arco (ARC), todas las

localidades trioicas con alta frecuencia de machos se encontraron en sitios donde la temperatura promedio del cuatrimestre más frío no baja de los 15°C. En contraste, las localidades ginodioicas se encontraron en sitios donde la temperatura mínima puede ser inferior a los 10°C (Figura 27C).

Factores abióticos: Las Islas

El efecto de las islas como sitios en los cuales se promueve el cambio de sistemas de reproducción se ha evidenciado en distintas especies. De acuerdo a una revisión bibliográfica realizada en este estudio se estimó que el 39% de las especie dimórficas de cactáceas ocurren en el complejo de islas del Caribe, donde especies dioicas del género *Pereskia sp.* y dioicas y subdioicas del genero *Consolea sp.* son predominantes. El efecto de las islas se ha asociado al cambio en el tipo y abundancia de polinizadores y a la distancia con respecto a la costa (Baker, 1967; Baker y Cox, 1984). En el primer caso, la disminución de polinizadores especialistas (i.e. aves, murciélagos) y el aumento de polinizadores generalistas (i.e. abejas) promueve la separación de sexos en especies con hermafroditas que tienen alto efecto de la depresión por endogamia. Esto se debe a que los polinizadores generalistas, con su poca capacidad de dispersión aumentan la tasa de autofecundación y la mortalidad de progenie de hermafroditas. En el segundo caso, la ley de Baker, las islas alejadas de la costa favorecen el establecimiento de poblaciones hermafroditas porque un solo individuo es necesario para formar una población.

En el primer caso, el cambio de polinizadores especialistas a generalistas y su aumento en la tasa de autofecundación, no es un impedimento para el establecimiento de los hermafroditas del cardón en las islas, pues de acuerdo a estimaciones basadas en germinación y establecimiento de semillas, la depresión por endogamia es despreciable ($d = 0$, Fleming et al., 1996). Una vez que se han establecido los hermafroditas, el aumento en tasa de autofecundación tampoco es un

impedimento para el establecimiento de las hembras, pues, como mencionamos anteriormente el descuento de polen debido a autofecundación es despreciable. En contraste, el establecimiento de machos se ve afectado por la disminución en la disponibilidad de óvulos de hermafroditas y por la competencia por óvulos de hembras. Consistente con esta predicción, a excepción de la Isla Espíritu Santo (IES), al sur de BCS, ninguna isla presento frecuencia de machos mayor al 10%. Sin embargo es necesario conocer un poco más sobre el tipo de polinizadores, dispersores y condiciones particulares de las islas antes de llegar a una conclusión. Por ejemplo, llama la atención de la Isla San José (ISJ) es trioica y la localidad más cercana en la península (La Soledad) es ginodioica, esto implica que condiciones particulares de dicha isla favorecieron la dispersión de la mutación de esterilidad masculina.

En el segundo caso, la “ley de Baker” podría aplicar claramente a las isla Catalana y Cerralvo. Estas islas son del tipo “continental profundas” caracterizadas por ser islas profundas (i.e. 400 y 800, respectivamente), ubicadas relativamente lejos de la costa (25 y 8.7 Km, respectivamente) y de origen más antiguo al de la mayoría de las islas del Golfo de California, denominadas “continentales de puente terrestre”. De acuerdo a la ley de Baker, la distancia es suficiente para explicar presencia de hermafroditas ya que en teoría, una población podría derivar a partir de un solo individuo. Por otro lado, para estas dos islas se reportó bajo número y diversidad de especies, incluyendo plantas, reptiles y mamíferos con respecto a lo reportado para otras islas de Golfo (Cody et al., 2002). Tanto la condición de aislamiento, como la baja calidad de hábitat, comparado con las “islas puente” podrían explicar la presencia de sistemas hermafroditas. Aunque el murciélago *L. curasoae* es, en teoría capaz de realizar vuelos de 20-30 Km en busca de alimento (Sahley et al., 1993); esta especie no ha sido reportada en estas islas (Lawlor et al., 2002), probablemente por pocos estudios realizados en estos sitios alejados, pero también podría deberse a que la visita hacia estas islas es desmotivado por la poca recompensa y el alto costo energético que implica llegar a ellas.

En resumen de esta sección, en este estudio se demuestra que el patrón de distribución de los sistemas de reproducción es más complejo de lo que se pensaba anteriormente. Puede involucrar factores ecológicos, ambientales y geográficos. La presencia del principal polinizador del cardón podría ser importante en algunos sitios (donde éstos son abundantes y las condiciones no son estresantes) pero no es suficiente para explicar la presencia de machos en otros sitios. Nuestros resultados sugieren que condiciones estresantes y/o de bajos recursos también podrían estar asociadas al establecimiento de sistemas de reproducción trioico. Esto podría explicarse por el menor costo reproductivo de la función de machos, aunado a la especialización en su función reproductiva. Finalmente, la condición de aislamiento y distancia geográfica de las islas también son factores importantes para la determinación del sexo. En islas alejadas geográficamente, se favorece el establecimiento de sistemas hermafroditas con bajo efecto de depresión por endogamia. Esto se explica por la mayor probabilidad de establecimiento de individuos que no dependen de polinizadores para su éxito reproductivo.

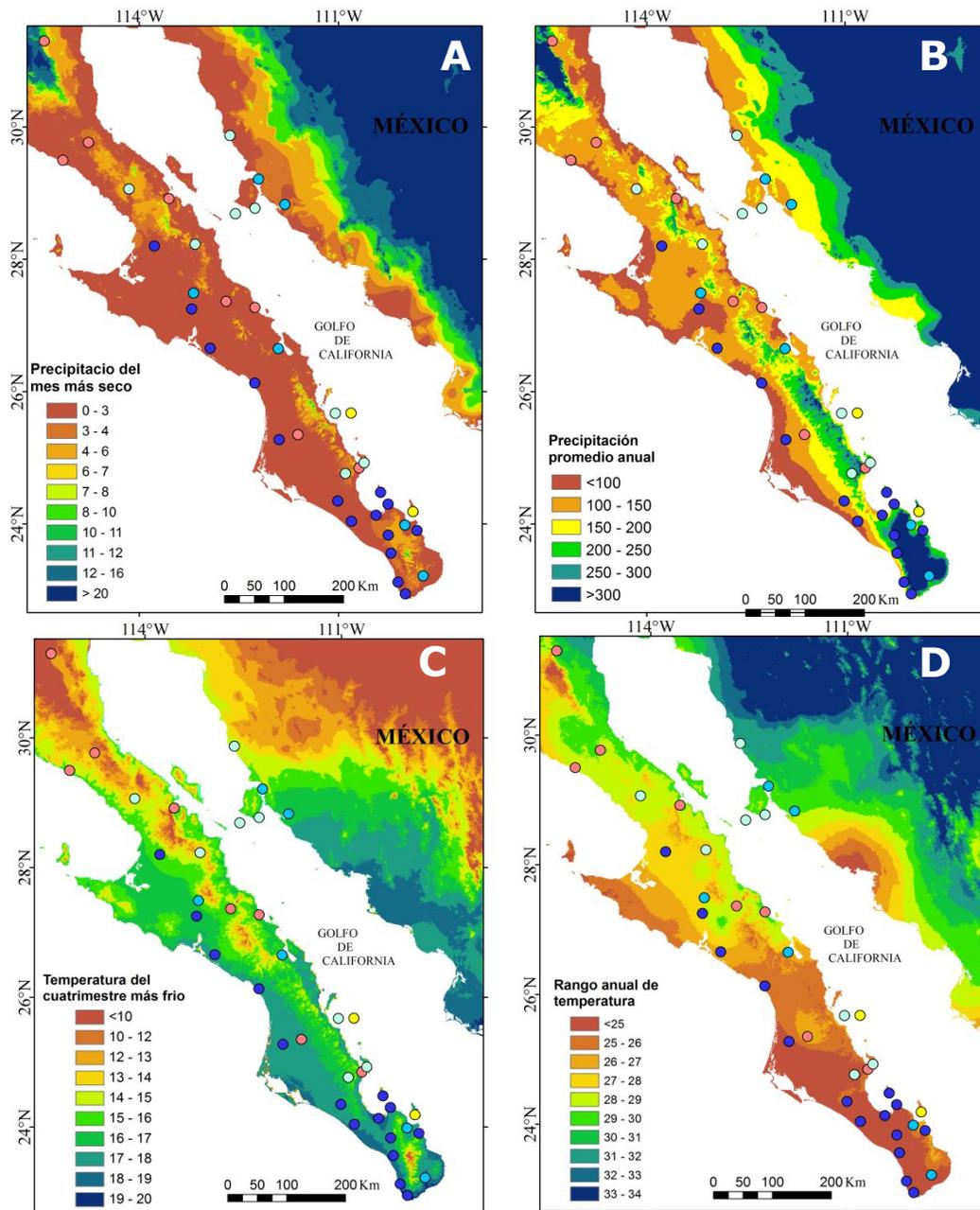


Figura 27. Distribución de los sistemas de reproducción del cardon *Pachycereus pringlei* en el noroeste de México y su asociación con variables derivadas de la precipitación y la temperatura. Los sistemas de reproducción son: ginodioico WorldClim (hembras y hermafroditas) en rosa, hermafroditas en amarillo y trioicos (hembras machos y hermafroditas) en distintas intensidades de azul. Azul claro (<10% machos), azul cielo (10-30%) y azul fuerte (>30% machos).

8.3 Patrón filogeográfico

8.3.1 Niveles de poliploidía

En este estudio se realizó un esfuerzo por identificar el nivel ploidía en diferentes localidades ya que a partir de esto podemos decidir la manera más adecuada de analizar los datos y además puede tener implicaciones importantes en el patrón de estructura genética.

El número base de cromosomas en cactácea es $n = 11$ (Pinkava et al., 1985). Los datos microsatelitales de este estudio sugieren tetraploidía al menos para algunas localidades y loci. Ocho de las veintinueve localidades (38%) incluyendo BCO, CBS, CAR, COM, IES, LMA, ISJ y SPE, exhibieron al menos un individuo con cuatro alelos ($A_{MAX} = 4$; Tabla VI); mientras que las razones de área estimadas en seis loci (50%; a los loci *Ppri01*, *Ppri03*, *ppri04*, *Ppri05*, *Ppri09*, y *Ppri10*) fueron consistentes con las razones esperadas para genotipos tetraploides (0.33, 0.5 y 3 para los genotipos AB³B, A²BB, y AAAB, respectivamente; Figura 15). Estos resultados fueron consistentes con el conteo de cromosomas realizado en este estudio para las localidades de Puente Querétaro y Cabo San Lucas (Figura 16B, C); así como con estudios previos de conteo de cromosomas y patrón de bandeo sugerido por aloenzimas para una localidad de Sonora (Murawski et al., 1994; Fleming et al., 1998). Sin embargo, en este estudio se reveló por primera vez la presencia de polimorfismo en el nivel de ploidía para *P. pringlei*. En Isla Cerralvo el número de cromosomas fue $2n = 22$, lo cual correspondería a un patrón diploide (Figura 16A).

La frecuencia de heterocigotos tri- y tetra-alélicos fue, en general, baja a lo largo de las localidades (i.e. $P_3 = 0.06$, y $P_4 = 0.01$, respectivamente; TABLA VI), especialmente en las islas Catalana y Cerralvo donde un solo individuo presentó más de dos alelos. Como vimos anteriormente, estas dos islas también fueron las únicas con un sistema de reproducción hermafrodita, posiblemente asociado a la condición de aislamiento y pobre calidad de hábitat que han impedido el establecimiento de

unisexuales. Las mismas condiciones que han mantenido un sistema hermafrodita en Isla Cerralvo podrían mantener también un patrón diploide en Isla Catalana, lo cual explicaría la baja frecuencia de individuos con más de dos alelos observado en estas dos localidades, aunque es necesario realizar estudios citológicos para confirmar esta predicción.

En cactáceas, la poliploidia es común, Pinkava et al. (1985) reportó hasta un 27.9% de especies poliploides de las 551 analizadas. Hasta el momento, para las cactáceas, se han reportado especies con niveles de ploidía que van desde triploides [i.e. *Opuntia bigelovii* Engelmann var. *bigelovii* y *Nelloydia intertexta* (Engelmann) Benson var. *dasyacantha* (Engelmann); Benson; Pinkava et al., 1985], hasta dodecaploides [*Consolea rubescens* (Salm-Dyck ex A.P. de Candolle) Lem.; Katagiri, 1952]. Las variaciones se han presentado a nivel intra-genero e intra-específico (Baker et al., 2009; Cota y Philbrick, 1994; Negrón-Ortiz, 2007). Las diferencias citológicas en la carga cromosómica dentro de una misma especie han sido interpretadas como etapas transicionales hacia la evolución de tetraploidía (Baker et al., 2009; Bretagnolle y Thompson, 1995; Ramsey y Schemske, 1998). Uno de los mecanismos que resultan en cambio del nivel de ploidía es el “puente de triploides” (Harlan y DeWet, 1975). Este mecanismo sugiere la fusión de gametos no reducidos ($2n$) con gametos reducidos (n) para dar lugar a individuos triploides. Dependiendo de la viabilidad de los gametos producidos por los individuos triploides durante la meiosis desigual (gametos n y $2n$), éstos pueden originar descendencia tetraploides por autofecundación o por la unión con otro gameto no reducido de un diploide.

La presencia de individuos diploides y tetraploides podría sugerir una etapa de transición hacia la tetraploidía en el cardón. A la fecha no se han reportado individuos triploides. Sin embargo, de acuerdo a las razones de áreas estimadas en este estudio, y al número máximo de cromosomas para un mismo individuo, esta posibilidad no puede ser descartada (Tabla VI). Las variaciones en el número de cromosomas han sido sugeridas como uno de los procesos filogenéticos más

importantes que ha afectado la evolución de las angiospermas, a menudo lleva a la evolución de nuevos linajes (DeWet, 1980; Stebbins, 1971).

La condición de aislamiento, distinto sistema de reproducción y distinto nivel de ploidía de Isla Cerralvo (y posiblemente de isla Catalana) podrían llevar a altos grados de divergencia genética, y subsecuentemente a especiación.

8.3.2 Diversidad genética e hipótesis de refugio

Diversidad

A pesar de la incertidumbre sobre la distribución geográfica de la carga cromosómica en esta especie, los datos microsatelitales proporcionaron resolución y polimorfismo suficiente para realizar estudios de diversidad y del patrón filogeográfico, los cuales fueron contrastados con distintas formas de analizar los datos, ya sea suponiendo tetraploidía, diploidía y ploidía desconocida.

Antes de realizar los análisis filogeográficos se investigó el nivel de diversidad general para la especie.

La diversidad genética de la especie estimada en este estudio para *Pachycereus pringlei* fue mayor ($H_O = 0.40$ y $H_E = 0.45$; Tabla VII) que la reportada en estudios aloenzimáticos previos ($H_E = 0.22$; Fleming et al., 1998). Este resultado no es sorprendente, dado el empleo de marcadores moleculares con mayor tasa mutacional (10^{-3} a 10^{-6} por generación; Schlötterer, 2000; comparado con 1×10^{-6} en aloenzimas; Mukai y Cockerham 1977; Nei 1972; Voelker et al., 1980). La heterocigosidad también fue mayor a los valores reportados para otra cactácea columnar del Desierto de Sonora, la pitahaya agria (*Stenocereus gummosus*; $H_O = 0.24$ and $H_E = 0.33$, Lozano-Garza et al., 2013) que fue evaluada también con

marcadores microsatélites. La baja diversidad genética reportada para la pitahaya podría deberse a su reproducción, principalmente asexual.

En contraste, la heterocigosidad observada y esperada promedio de *P. pringlei* ($H_o = 0.45$) fue menor a los valores reportados en otros estudios usando marcadores microsatelitales en cactáceas columnares diploides y de reproducción exogámica obligada (reproducción cruzada) del Valle de Tehuacán, Cuicatlán, México (*Polaskia chende* Gibson & Horak, $H_E = 0.65$ Contreras-Negrete et al., 2014; *P. chichipe* (Gosselin) Bakeb, $H_E = 0.66$, Otero-Arnaíz et al., 2005; *Stenocereus stellatus* (Pfeiff.) Riccob, $H_E = 0.61$, Cruse-Sanders et al., 2013; *Stenocereus pruinosus* (Otto ex Pfeiff.) Buxb, $H_E = 0.72$, Parra et al., 2010). La menor diversidad de *P. pringlei* con respecto a otras cactáceas diploides contradice al alto nivel de polimorfismo reportado comúnmente en especies poliploides, el cual se asocia a la duplicación del material genético (Moody et al., 1993; Ness et al., 1989; Ronfort et al., 1998). Sin embargo, Hamrick et al. (2002) mencionan que la heterocigosidad aloenzimática de *P. pringlei* fue similares a los valores reportados en otras cactáceas columnares diploides del Desierto de Sonora (*Carnegiea gigantea*, $H_E = 0.13$; *Lophocereus schottii*, $H_E = 0.21$; *Stenocereus gummosus*, $H_E = 0.21$; *S. thurberi*, $H_E = 0.20$). En contraste, la cactácea columnar tetraploide de Perú, *Weberbauerocereus weberbaueri* (K. Schum. Ex Vaupel) Backeb. presentó mayor heterocigosidad aloenzimática que las especies diploides del Desierto de Sonora ($H_E = 0.27$; Hamrick et al., 2002).

Una posible explicación a los valores relativamente bajos de diversidad de *P. pringlei* podrían ser su condición autocompatible, como se ha reportado para otras especies con altos niveles de autofecundación (Duminil, 2009; Onge et al., 2011). El rompimiento de la incompatibilidad es la alteración más común reportada en especies, después de una duplicación cromosómica (Levin, 1983). Tanto *P. pringlei* como *W. weberbaueri* (Fleming et al., 1994; Sahley, 1996) son cactáceas tetraploides autocompatibles, mientras que el resto de cactáceas diploides son auto-incompatibles (Ross, 1981). Sin embargo una diferencia importante de *W.*

weberbaueri con *P. pringlei*, es que la primera presenta un estigma que sobresale más allá de los estambres en la mayoría de sus flores. Esta característica morfológica posiblemente decrece la posibilidad de autopolinización (Sahley, 1996) y por lo tanto conduce a una disminución de la heterocigosidad por endogamia. Después del rompimiento de la auto-incompatibilidad en *P. pringlei*, no hay nada en la morfología de las flores bisexuales que impida la autopolinización. El estigma está a la misma altura que las numerosas anteras (Fleming et al., 1994) y los granos de polen se liberan aun antes de la antesis de las flores (com per. León de la Luz). Consistente con estas observaciones una tasa de autogamia tan alta como el 64% fue estimada a partir de datos aloenzimáticos (Murawski et al., 1994).

Los microsatélites revelaron un nivel moderado de diversidad genética, comparado con otras cactáceas columnares diploides auto-incompatibles. Una reciente transición hacia la tetraploidía de *P. pringlei*, así como la auto-compatibilidad y morfología floral en la cual no se separan espacialmente las anteras del estigma, son algunos de los factores que posiblemente estén asociados con los niveles de heterocigosidad relativamente bajos, reportados para esta cactácea.

Hipótesis de refugio

El tercer objetivo de este estudio fue evaluar la posible asociación con la hipótesis de refugio al sur de la PBC y subsecuente colonización hacia el norte sugerido para otras cactáceas columnares del desierto de Sonora.

Los análisis de aislamiento por distancia y el patrón latitudinal de la diversidad genética fueron consistentes con una expansión hacia el norte. Por ejemplo, el grado de diferenciación genética entre pares de localidades fue correlacionada significativamente con la distancia geográfica que las separa y la diversidad aumentó de sur a norte (Figura 17 y 18). Estos resultados son consistentes con el patrón de colonización hacia el norte sugerido previamente a partir de estudios aloenzimáticos

realizados en otras cactáceas columnares (Clark-Tapia y Molina-Freaner, 2003; Lozano-Garza, 2013; Nason et al., 2002) así como con dataciones de radiocarbono de materiales encontrados en nidos de rata coleccionista (*Neotoma sp.*), los cuales sugieren que especies afines a climas templados tales como: *Pinus monophylla*, *Juniperus sp.* *Quercus turbinella* y *Yucca brevifolia* dominaban durante el último periodo glacial (~21,000 años), mientras que la expansión de la vegetación xérica actual ocurrió hace menos de 11,000 años, empezando por las especies de mayor tolerancia a condiciones frías como *Carnegiea gigantea*, y seguida de especies menos tolerantes al frío tales como *Ceridium microphyllum*, *Olneya tesota*, y *Stenocereus thurberi*, hace aproximadamente 5,000 a 4,500 años (Van Devender, 2002).

La modelación nicho ecológico (ENM) al pasado confirmó el profundo impacto de las condiciones medioambientales de Pleistoceno en las cactáceas columnares del desierto de Sonora, reduciendo el hábitat potencial del cardón al sur de la PBC; además proveyó de evidencia independiente sobre la función de éstas áreas como posible refugio de *P. pringlei* durante condiciones adversas (Figura 18).

Por otro lado, el patrón de aislamiento por distancia que resultó en una mayor correlación fue obtenido cuando se consideró a la isla San Esteba como puente entre las localidades de la península y de Sonora. Varias islas de la parte central del Golfo, incluyendo Ángel de La Guarda, San Lorenzo, San Esteban e Isla Tiburón pudieron haber funcionado como “puente” a través del cual los cardones peninsulares colonizaron la costa de Sonora. La mayor distancia entre estas islas es de 15 Km. El cardón se ha reportado en todas las islas y además, se han reportado desplazamientos de hasta 30Km de su polinizador *L. curasoe* entre Sonora y la Isla Tiburón (Sahley, 1993), donde tienen sus cuevas de maternidad. La hipótesis de colonización a través de islas es consistente con la invasión sugerida en varias especies de plantas, incluyendo *S. gummosus* (Clark-Tapia y Molina-Freaner, 2003; Cody et al., 1983).

En resumen nuestros datos de patrón de diversidad genética, aislamiento por distancia y modelación de nicho al pasado apoyan la hipótesis de refugio al sur de la PBC y reciente expansión hacia el norte. Además de una ruta de colonización que va de la península hacia la costa de Sonora empleando las islas medias del Golfo de California como puente.

8.3.3 Estructura genética poblacional

Otro objetivo de este estudio fue identificar si existe diferenciación genética poblacional y si esta es consistente con eventos históricos citados frecuentemente en la literatura para explicar las discontinuidades genéticas en distintas especies de vertebrados.

A diferencia del estudio aloenzimático realizado previamente para esta especie, el análisis de 522 individuos de *Pachycereus pringlei* y diez microsatélites a lo largo de 21 localidades revelaron diferenciación genética a nivel intra-específico. Los distintos métodos (STRUCTURE, DAPC, AMOVA) y escenarios de ploidía (diploide, tetraploide y ploidía desconocida) empleados en este estudio coincidieron con la presencia de cinco poblaciones genéticamente diferenciadas para *P. pringlei*. Tres poblaciones estuvieron representadas por una sola localidad: 1) Isla Catalana, 2) Isla Cerralvo, y 3) Cabo San Lucas; mientras que las otras dos poblaciones estuvieron integradas por varias localidades con correspondencia geográfica: 4) Población Norte, integrada por todas las localidades de Sonora, Baja California Norte y una localidad de Baja California Sur (STA); y 5) Población Sur: integrada por el resto de localidades de Baja California Sur (Figura 23).

Las poblaciones Norte y Sur presentaron una discontinuidad genética o reducción de flujo genético ubicada alrededor de los 27° 20' y 28° 20' grados de latitud norte (Figura 23). Esta discontinuidad genética coincide con el evento vicariante del canal

medio-península, altamente recurrido en la literatura para explicar la concordancia filogeográfica observada en varias especies del Desierto de Sonora (Crews y Hedin, 2006; Lindell et al., 2006; Riddle et al., 2000; Upton y Murphy, 1997; Whorley et al., 2004). Es relevante mencionar que la mayoría de los estudios filogeográficos realizados para apoyar esta hipótesis emplearon secuencias del ADN mitocondrial, y los tiempos de divergencia que se han estimado con esas secuencias van del Mioceno tardío (7 m. a.; Lindell et al., 2005) al Pleistoceno temprano (1 m. a.; Upton y Murphy, 1997). Dada la alta tasa mutacional que caracteriza a los microsatélites (i.e. 10^{-2} a 10^{-6} por generación; Schlötterer, 2000), la mayor resolución que podríamos tener es hasta 1 m. a. Sin embargo, la existencia de éste canal ha sido cuestionado por varios autores debido a la falta de evidencia geológica a lo todo lo ancho de la península en esta región, al menos en el último millón de años (Hafner y Riddle, 2005). Aunado a lo anterior las poblaciones Norte y Sur no son consistente con dos grupos genéticos que permanecieron aislados por alguna barrera física al flujo genético. Todos los alelos privados se encontraron solo en la población del Sur, además todas las estimaciones de diversidad fueron mayores en esta población, incluyendo número promedio de alelos por locus, heterocigosidad esperada y heterocigosidad observada (Tabla IX). Estos resultados sugieren una historia evolutiva más larga de la población sureña, permitiendo que se acumule un mayor número de variantes alélicas y diversidad genética (Nei et al., 1975; Dlugosch y Parker, 2008). El patrón de estructura es consistentes con la reciente expansión hacia el norte sugerida en este estudio a partir del patrón latitudinal de la diversidad, la prueba de aislamiento por distancia y modelación de nicho.

Una historia climática común podría causar patrones espaciales y temporales de contracción y expansión del rango de distribución, promoviendo patrones genéticos concordantes en distintos taxa Hewitt (1996). Si la historia demográfica de *P. pringlei* es similar a historia sugerida para la flora xérica del desierto de Sonora a partir de estudios moleculares (Clark-Tapia y Molina-Freaner et al., 2003; Lozano-Garza, 2013; Nason et al., 2002) y del registro fósil (Van Devender, 2002), entonces la señal

genética dejada por un evento vicariante tan antiguo como lo es el canal medio transpeninsular pudo haber sido borrada por eventos más recientes de contracciones y expansiones del rango de distribución ocurridas durante el Pleistoceno (Clark-Tapia y Molina-Freaner, 2003; Nason et al., 2002).

Algunos autores mencionan que las discontinuidades genéticas observadas en varias especies podría ser explicadas sin tener que recurrir a la vicarianza, por ejemplo, la misma señal pudo haber sido consecuencia de la fragmentación temporal de poblaciones durante periodos glaciales (Hugall et al., 2002; Schneider et al., 1998), cambio abrupto en condiciones medioambientales (Grismer, 2002; Grismer et al., 2000), comportamiento y rasgos de historia de vida particulares de cada especie (Leaché et al., 2007; Loveless y Hamrick, 1984; Riddle y Hafner, 2006; Ross y Markov 2006;); así como, debido a condiciones aleatorias asociadas a poca capacidad de dispersión y bajo número efectivo poblacional (Irwin, 2002; Neigel y Avise, 1986). Los rasgos de historia de vida, en particular los sistemas de reproducción podrían tener gran influencia en el patrón de estructura de *P. pringlei*, las cinco poblaciones mostraron diferencias importantes en los sistemas de reproducción. En la siguiente sección se explica el efecto de los sistemas de reproducción en el repertorio genético.

Por otro lado, las Isla Catalana (ICA), Isla Cerralvo (ICE) y Cabo San Lucas (CBS) mostraron coeficientes de pertenencia relativamente altos ($Q = 0.96, 0.94,$ y 0.77 , respectivamente). Estas poblaciones también resultaron altamente diferenciadas de acuerdo a las distancias genéticas de Nei (1987), reflejándose en ramas especialmente largas en el fenograma (Figura 22). En el caso de las islas, la alta diferenciación genética podría ser consecuencia del flujo genético restringido asociado tanto al tipo de isla (“Continental profunda”) así como la baja calidad de hábitat que mantiene un bajo número y diversidad de especies, incluyendo plantas, reptiles y mamíferos con respecto a lo reportado para otras islas de Golfo (Cody et al., 2002). En el caso de Isla Cerralvo, el conteo de cromosomas reveló un nivel de ploidía distinto. Este factor también podría promover la divergencia genética por la

desventaja de la progenie “triploide” que resulta de la fusión de un gameto haploide y uno diploide. Los individuos triploides se pueden encontrar en desventaja sobre los diploides por la producción de gametos no balanceados durante la meiosis (Ramsey y Schemske, 1998; 2002).

En el caso de los cardones de la población de Cabo San Lucas, éstos habitan en un clima excepcional que alberga mayor diversidad y densidad de especies, así como la única población residente de *L. curasoe* (Rojas-Martínez et al., 1999; Woloszyn y Woloszyn, 1982). Es posible que el alto grado de diferenciación de esta población esté asociada a un reducido flujo genético con otras poblaciones adyacentes, promovido por hábitos de forrajeo más restringidos de los polinizadores. Como mencionamos anteriormente, la abundancia de polinizadores podría explicar la alta frecuencia de machos de cardón al sur de la península. Si la abundancia de machos es reflejo de mayor tasa de entrecruzamiento, entonces también deberíamos observar los valores más altos de heterocigosidad en Los Cabos; sin embargo, el valor estimado para esta población fue relativamente bajo ($H_0=0.38$). Es posible que la diferenciación genética de los cardones de Los Cabos, además de ser promovida por la presencia de poblaciones residentes de murciélagos, podría estar siendo afectada por otros factores, los cuales a su vez actúan en contra de la diversidad, por ejemplo la competencia intra-e inter-específica. En este sitio el cardón coexiste con una mayor diversidad de especies, incluyendo la única población del cardón columnar *P. pecten-aboriginum* (Engelm. ex S. Watson) Britton & Rose de la península, con tiempos de floración similar a los del cardón. Durante la recolecta de flores en la región de Los Cabos se observaron algunos individuos con características similares a ambas especies, sugiriendo, la posibilidad de hibridación. El éxito reproductivo de los machos, en esta población podría ser también favorecido por interferencia del polen de *P. pringlei* con el polen de *P. pecten-aboriginum*, lo cual explicaría la frecuencia relativamente alta de machos sobre los otros géneros del cardón sin que sea reflejado necesariamente en aumento de diversidad para la especie. Sin embargo esta explicación es basada solamente en observación y

experiencia en campo, es necesario realizar estudios correspondientes para evaluar si este fenómeno está ocurriendo realmente.

El análisis de estructura poblacional con microsatélites reveló que *P. pringlei* está lejos de ser una especie panmictica aunque el patrón de estructura no fue consistente con los eventos vicariantes sugeridos en la literatura. Las diferencias genéticas podrían estar asociadas a condiciones de aislamiento, distintos niveles de ploidía y presiones selectivas locales restringiendo el flujo del polen. Así mismo, las cinco poblaciones muestran diferencias importantes en los sistemas de reproducción que también podrían tener implicaciones importantes en el repertorio genético.

8.4 Sistemas de reproducción y patrón genético de variación

En el último objetivo se investigó la relación de los patrones de distribución geográfica de los sistemas de reproducción y la estructura genética del cardón.

El patrón de estructuración genética mostro una alta correspondencia con la heterogeneidad espacial de los sistemas de reproducción del cardón. La población Norteña fue principalmente ginodioicas (4% de machos en promedio), mientras que la población Sureña fue principalmente trioicas (36% de machos en promedio). Además las poblaciones de Isla Catalana e Isla Cerralvo que fueron altamente diferenciadas fueron las únicas poblaciones con sistema de reproducción hermafrodita; mientras que la población de Cabo San Lucas fue la localidad trioica con mayor frecuencia de machos (63%; Tabla IX). Dado que el sistema de reproducción determina la manera que el arreglo genético actual se hereda a la siguiente generación (Foxe et al., 2010; Hamrick y Godt, 1989; Loveless y Hamrick, 1984; Nybom, 2004), la heterogeneidad espacial de los sistemas de reproducción puede tener una fuerte influencia sobre la estructuración genética de las poblaciones debido a la contribución diferencial de la autogamia y exogamia a lo largo de las poblaciones. La autopolinización reduce el tamaño efectivo poblacional (N_e) y el flujo

de genes entre poblaciones, lo que incrementa la probabilidad de fijación de alelos, disminuye la diversidad genética intrapoblacional e incrementa el grado de diferenciación genética entre poblaciones (Loveless y Hamrick, 1984).

Las corridas independientes de STRUCTURE revelaron que los hermafroditas fueron responsables de la mayor, si no es que toda la diferenciación genética observada entre las poblaciones Norte y Sur ($Q_{\text{NORTH_HERMAPHRODITES}} = 0.79$ contra $Q_{\text{SOUTH_HERMAPHRODITES}} = 0.80$). En contraste, los unisexuales fueron similares a lo largo de las localidades, incluyendo la Península de Baja California y costa de Sonora ($Q_{\text{NORTH_UNISEXUALS}} = 0.50$ versus $Q_{\text{SOUTH_UNISEXUALS}} = 0.52$; Figura 25). Este patrón de estructuración genética puede explicarse por la capacidad diferencial de colonización de sexos, que a su vez es el resultado de distintos requerimientos fisiológicos y dependencia hacia polinizadores, asociados con su éxito reproductivo (Bierzychudek y Eckhart, 1988; Delph, 1999; Lloyd y Webb, 1977). Durante un evento de expansión demográfico, se espera que los hermafroditas sean favorecidos sobre los unisexuales, ya que estos no dependen de los polinizadores para lograr su establecimiento y, en teoría, un solo individuo puede derivar en una población (Baker, 1967; Stebbins, 1957). El establecimiento más temprano de los hermafroditas hacia el norte de la península y una mayor tasa de autofecundación con respecto a las localidades sureñas, que son principalmente trioicas, pudo haber promovido la diferenciación genética de los grupos norte y sur (Barrett y Husband, 1990; Guo et al., 2009). Después de un evento fundador, la tasa de autofecundación es favorecida por la pérdida estocástica de variantes alélicas implicadas en el sistema de reconocimiento del organismo (genes "S", asociados con el sistema de auto-incompatibilidad que tiene que ver esos genes S Glover y Barrett, 1987; Bechsgaard et al., 2006; Guo et al., 2009). Así mismo la mayor tasa de autofecundación en la población Norteña también podría ser favorecida por la disminución en la densidad poblacional y en la abundancia de polinizadores potenciales (Eppley y Pannell, 2007; Igic et al., 2008; Pannell y Barret, 1998). La disminución en la densidad poblacional así como disminución en la abundancia de polinizadores hacia latitudes altas fueron

reportados en estudios previos para esta especie (Medel-Narváez, 2006; Molina-Freaner et al., 2003).

Consistente con las predicciones del efecto de los sistemas de reproducción reportados en otras especies (Hamrick y Godt, 1996; Nassar et al., 2001; Onge et al., 2011) en la estructura filogeográfica, en este estudio se observó un patrón general de disminución de la diversidad de población las localidades trioicas de la población Sur, segundo de las localidades ginodioicas de la población Norte, y la menor diversidad observada fue entre las poblaciones hermafroditas. En el caso del grado de diferenciación genética, el patrón fue el opuesto. Las poblaciones hermafroditas mostraron el mayor grado de diferenciación genética, seguido las localidades ginodioicas dentro de la población Norte, y menor grado de diferenciación entre las localidades trioicas dentro de la población Sur. Un efecto similar de los sistemas de reproducción sobre el patrón de estructura y de diversidad genética fue reportado a nivel intraespecífico para *Echhornia paniculata* (Pontederiaceae; Barret y Husband, 1990), así como entre especies cercanamente emparentadas de cactáceas (Nassar et al., 2001; Onge, 2011).

8.5 implicaciones para la conservación y recomendaciones futuras

Este es el primer estudio que investiga la relación de los factores abióticos con el sistema de reproducción, así como el patrón genético de variación a partir de marcadores moleculares altamente polimórficos. La información que ha resultado de esta investigación será sin duda de utilidad para direccionar investigaciones futuras de esta especie con conocimiento previo de la existencia de poblaciones genéticamente diferenciadas, sus niveles de diversidad y patrón filogeográfico. Además será de utilidad para priorizar esfuerzos de investigación a ciertas áreas que resultan de gran importancia evolutiva para esta, y otras especies afines (otras cactáceas columnares) por ser sitios de mayor diversidad genética y/o que promueven la divergencia entre poblaciones. En vista el rápido crecimiento

poblacional y sus efectos secundarios, tales como: el desmonte de áreas naturales para la construcción de zonas urbanas, desarrollos turísticos y carreteras, las investigaciones enfocadas a determinar los patrones filogeográficos y de diversidad de la biota, así como los principales factores promotores del cambio evolutivo resultan cruciales para identificar áreas prioritarias para la conservación.

Este trabajo forma parte de un proyecto integral de filogeografía comparada del noroeste, el cual junto con otras siete especies busca identificar la respuesta que organismos tan distintas como bacterias, reptiles, aves y plantas pueden tener a una misma historia geológica y climática. Para investigaciones futuras en el caso del cardón se recomienda incluir marcadores moleculares de tasa mutacional más lenta que la de los microsatélites, tales como cpDNA para indagar sobre los procesos vicariantes históricos. Especial cuidado se debe poner en la selección de los marcadores cloroplásticos ya que por experiencia propia éstos han mostrado bajo éxito de amplificación y/o polimorfismo. Esto podría deberse, en parte al empleo de marcadores diseñados para otras especies, y en parte al bajo polimorfismo del cpDNA que caracteriza a las cactáceas.

Este trabajo demostró que en esta especie, además del polimorfismo en sistemas de reproducción y heterogeneidad genética existe polimorfismo en la carga cromosómica. Es necesario realizar estudios citológicos en diferentes sitios para poder obtener el patrón general de distribución geográfica de ploidía. Esta información es relevante ya que el cambio en carga cromosómica es uno de los principales mecanismos que llevan a la especiación alopátrica en plantas.

9. CONCLUSIONES

1. Las flores de los distintos sexos del cardón muestran diferencias morfológicas y morfométricas similares a los reportados en otras cactáceas. Las flores pistiladas son más grandes con mayor producción de óvulos y de mayor tamaño, las anteras son indehiscentes y los granos

de polen “malformados”; y flores pistiladas son más grandes, los estambres más largos y muestran distintos niveles de especialización hacia la función de machos (presencia/ausencia de óvulos). La especialización hacia la función femenina podría estar asociada al fallo o iniciación temprana de programas de muerte celular; mientras que la especialización hacia la función de machos podría estar asociado a mutaciones que controlan la producción y concentración de hormonas tales como la auxina. Las diferencias morfométricas en las flores son consistentes con la teoría de redistribución de recursos donde los unisexuales al perder una función sexual pueden redistribuir recursos a la función sexual en turno.

2. El cardón presentó tres sistemas de reproducción (hermafroditas, ginodioicos y trioicos) determinados por factores ecológicos, ambientales y geográficos. El establecimiento de machos podría verse favorecido en sitios con altas abundancia de polinizadores ya que incrementan su éxito reproductivo. Los machos también podrían resultar favorecidos sobre los hermafroditas en sitios estresantes (baja precipitación) por el menor costo reproductivo de su función sexual.
3. Se observó un patrón de aislamiento por distancia y aumento gradual de la diversidad hacia latitudes altas; así como una modelación de nicho al pasado que sugiere que el cardón se refugió en el sur de la PBC durante el último máximo glacial. Posteriormente, el cardón recolonizó gradualmente la región norte.
4. El patrón filogeográfico mostró la presencia de cinco poblaciones genéticamente diferenciadas y consistentes con diferencias importantes en los sistemas de reproducción. Este patrón no fue consistente con los eventos vicariantes sugeridos comúnmente en la literatura para diversas especies del noroeste de México. Este patrón filogeográfico puede ser explicado por: 1) Condición de islas y distinto nivel de ploidía en el caso de

las poblaciones de Isla Cerralvo e Isla Catalana, 2) presiones selectivas locales que restringe el flujo de polen en el caso de la población de Cabo San Lucas y 3) capacidades diferenciales de colonización de los distintos sexos durante su recolonización hacia el norte en el caso de las poblaciones Norte y Sur.

5. Es indudable que el polimorfismo en el sistema de reproducción del cardón tienen una gran influencia sobre su patrón filogeográfico y de diversidad genética. La diferencia entre poblaciones Norte y Sur podrían deberse a tasas diferenciales de autofecundación y entrecruzamiento asociadas a distintas frecuencias de hermafroditas. Además el aumento en la autofecundación sugerida por el patrón heterogéneo de sistemas de reproducción fue consistente con el aumento del grado de diferenciación genética entre poblaciones hermafroditas y disminución de la diversidad dentro de estas; mientras que los sitios con sistemas trioicas presentaron menor grado de diferenciación entre éstas y mayor diversidad comparado con las poblaciones hermafroditas.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, L.G, D.J. Morafka, y R.W. Murphy. 1999. The peninsular archipelago of Baja California: a thousand kilometers of tree lizard genetics. *Herpetológica*. 55(3):369-381.
- Anderson, E.F. 2001. *The cactus family*. Timber, Portland.
- Anderson, R.P., y E. Martínez-Meyer. 2004. Modeling species' geographic distributions for preliminary conservation assessments: an implementation with the spiny pocket mice (*Heteromys*) of Ecuador. *Biological Conservation*. 116:167-179.
- Areces-Mallea, A. 1996. New taxa of *Consolea lemaire* (Cactaceae: Opuntioideae) from Cuba. *Brittonia*. 48(2):224-236.
- Arias-Montes, S., S. Gama-López, y L.C. Guzmán. 1997. Cactaceae. En: Dávila P., J. Villaseño, R. Medina (eds.) *Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F.
- Arroyo, M.T.K., y F. Squeo. 1990. Relationship between plant breeding systems and pollination. En: S. Kawano (ed.). *Biological approaches and evolutionary trends in plants*. Academic Press, London, 205-227p.
- Ashman, T. 1999. Determinants of sex allocation in a gynodioecious wild strawberry: implications for the evolution of dioecy and sexual dimorphism. *Journal of Evolutionary Biology*. 12(4):648-661.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press, Londres. 228p.
- Axelrod, D.I. 1975. Evolution and Biogeography of Madrean-Tethyan Sclerophyll Vegetation. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 62(2):280.
- Baker, H. G. 1967. Support for Baker's law-as a rule. *Evolution* 21:853-856.
- Baker, M. 2006. A new florally dimorphic hexaploid, *Echinocereus yavapaiensis* sp. nov. (section *Triglochidiatus*, Cactaceae) from central Arizona. *Plant Systematics and Evolution*. 258(1-2):63-83.
- Baker, H. G., y P. A. Cox. 1984. Further thoughts on dioecism and islands. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 71:244-253.

- Baker, M.A., J.P. Rebman, B.D. Parfitt, D.J. Pinkava, y A.D. Zimmerman. 2009. Chromosome numbers in some cacti of western North America-VIII. *Haseltonia* 15: 117-134.
- Barrett, S. 1992. Gender variation and the evolution of dioecy in *Wurmbea dioica* (Liliaceae). *Journal of Evolutionary Biology*. 5:423-444.
- Barrett, S.C.H. y B.C. Husband. 1990. Variation in outcrossing rate in *Echhornia paniculata*. *Plant Species Biology*. 5:41-55.
- Bawa, K.S. 1980. Evolution of dioecy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 11:15–39.
- Bawa, K. y J. Beach. 1981. Evolution of sexual systems in flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 68(2):254-274.
- Bechsgaard, J.S., V. Castric, D. Charlesworth, X. Vekemans, y M.H. Schierup. 2006. The transition to self-compatibility in *Arabidopsis thaliana* and evolution within S-haplotypes over 10 Myr. *Molecular biology and evolution*. 23(9):1741-50.
- Bemis, W.P., J.W. Berry, y A.J. Deutschman. 1972. Observations on male sterile Mammillariae. *Cactus Succulent Journal*. 44:256.
- Bierzzychudek, P. y V. Eckhart. 1988. Spatial segregation of the sexes of dioecious plants. *American Society of Naturalist*. 132(1):34-43.
- Braconnot, P., S. Harrison, S. Joussaume, J. Peterchmitt, y M. Crucifix. 2007. Results of PMIP2 coupled simulations of the Mid-Holocene and Last Glacial Maximum – Part 1: experiments and large-scale features. *Climate of Past*. 3:261-277.
- Brandege, K. 1897. Notes on cactae. I Cactae of Baja California. *Erythea*. 5:111-123.
- Bravo-Hollins, H. y H. Sánchez-Mejorada. 1978. *Las Cactáceas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 743p.
- Bretagnolle, F. y J.D. Thompson. 1995. Gametes with the somatic chromosome number: mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytologist*. 129(78):1-22.
- Bruvo, R., N.K. Michiels, T.G. D'Souza, y H. Schulenburg. 2004. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Molecular Ecology*. 13(7):2101–2106.

- Caballero, M., S. Lozano-García, L. Vázquez-Selem, y B. Ortega. 2010. Evidencias de cambio climático y ambiental en registros glaciales y en cuencas lacustres del centro de México durante el último máximo glacial. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*. 62(3):359-377.
- Charlesworth, D. 1990 . Theories of the evolution of dioecy. En: M.A. Geber, T.E. Dawson, L.F. Delph (eds.). *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*. Springer. Berlin, Alemania. 33-60p.
- Charnov, E.L. 1982. *The theory of sex allocation*. Princeton University Press, Princeton, NJ, EUA. 355p.
- Carreño, A.L. y J. Helenes. 2002. Geology and ages of the Islands. En: Case T.J., Cody M.L. y Ezcurra, E. (eds.). *A new Island Biogeography of the Sea of Cortez*. Oxford University Press, Oxford, NY, EUA. 14-40p.
- Carreno, L. y J.T. Smith. 2007. Stratigraphy and correlation for the ancient Gulf of California and Baja California peninsula, Mexico. *Bulletins of American Paleontology*. 371:7-139.
- Clark, L.V. y M. Jasieniuk. 2011. POLYSAT: an R package for polyploid microsatellite analysis. *Molecular Ecology Resources*. 11(3):562-6.
- Clark-Tapia, R. y F. Molina-Freaner 2003. The genetic structure of a columnar cactus with a disjunct distribution: *Stenocereus gummosus* in the Sonoran desert. *Heredity*. 90(6):443-50.
- Cody, M. Moran, R. Rebmnan, y J.P. Thompson. 2002. Plants. En: Case T.J., Cody M.L. y Ezcurra, E. (eds.). *A new Island Biogeography of the Sea of Cortez*. Oxford University Press, Oxford, NY, EUA. 63-111p.
- Cody, M.L., R. Moran, y H. Thompson. 1983. The plants. En: Case, T.J., M.L. Cody (eds.). *A new Island Biogeography of the Sea of Cortez*. Oxford University Press, Oxford, NY, EUA. 49-97p.
- Contreras-Negrete, G., M.E. Ruíz-Durán, D. Cabrera-Toledo, A. Casas, O. Vargas, y F. Parra. 2014. Genetic diversity and structure of wild and managed populations of *Polaskia chende* (Cactaceae) in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Central Mexico: insights from SSR and allozyme markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 62:85-101.
- Costich, D. 1995. Gender specialization across a climatic gradient: experimental comparison of monoecious and dioecious *Echallium*. *Ecology*. 76(4):1036-1050.

- Cota-Sánchez, J.H., K. Remarchuk, y K. Ubayasena 2006. Ready-to-Use DNA Extracted with a CTAB Method Adapted for Herbarium Specimens and Mucilaginous Plant Tissue. *Plant Molecular Biology Reporter*. 24:161-167.
- Cota, J.H. y R.S. Wallace. 1997. Chloroplast DNA evidence for divergence in *Ferocactus* and its relationships to North American columnar cacti (Cactaceae: Cactoideae). *Systematic Botany*. 22(3):529-542.
- Cota, J.H. y C. Philbrick. 1994. Chromosome number variation and polyploidy in the genus *Echinocereus* (Cactaceae). *American Journal of Botany*. 81(8):1054-1062.
- Crews, S.C., y M. Hedin. 2006. Studies of morphological and molecular phylogenetic divergence in spiders (Araneae: Homalonychus) from the American southwest, including divergence along the Baja California peninsula. *Molecular Phylogenetic and Evolution*. 38:470-487.
- Cruse-Sanders, J.M., K.C. Parker, E.A. Friar, D.I. Huang, S. Mashayekhi, L.M. Prince, A. Otero-Arnaiz, y A. Casas. 2013. Managing diversity: Domestication and gene flow in *Stenocereus stellatus* Riccob. (Cactaceae) in Mexico. *Ecology and evolution*. 3(5):1340-55.
- Curry, J.R. y D.G. Moore. 1984. Geologic history of the mouth of the Gulf of California. En: Crouch, J.K., S.B. Bachman (eds). *Tectonics and sedimentation along the California margin*. Pacific Section, Society of Economic Paleontologists and Mineralogists. Los Angeles, CA, EUA. 17– 36p.
- Dawson, T.E. y L.C. Bliss. 1989. Patterns of water use and the tissue water relations in the dioecious shrub, *Salix arctica*: the physiological basis for habitat partitioning between the sexes. *Oecologia*. 79:332-343.
- Dawson, T.E. y J.R. Ehleringer. 1993. Gender-specific physiology, carbon isotope discrimination and habitat distribution in boxelder *Acer negundo*. *Ecology*. 74(3):798-815.
- De la Cruz, M., F. Ramírez, y H. Hernández. 1997. "DNA isolation and amplification from cacti." *Plant Molecular Biology Reporter*. 15(4):319–325.
- Del Castillo, R.F. y S. Trujillo Argueta. 2009. Reproductive implications of combined and separate sexes in a trioecious population of *Opuntia robusta* (Cactaceae). *American Journal of Botany*. 96(6):1148-58.
- Del Castillo, R.F. y M. González-Espinosa. 1988. Una interpretación evolutiva del polimorfismo sexual de *Opuntia robusta* (Cactaceae). *Agrociencia*. 71: 185-196.

- Delph, L.F. 1990. Sex-ratio variation in the gynodioecious shrub *Hebe strictissima* (Scrophulariaceae). *Evolution*. 44(1):134-142.
- Delph, L.F. 1999. Sexual dimorphism in life history. En: Geber, M.A., T.E. Dawson, L.F. Delph (eds.). *Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants*. Springer Berlin. Alemania. 149-173p.
- DeWet. J.M.J. 1980. Origins of polyploids. En: Lewis, W.H. (ed.). *Polyploidy, biological relevance*. Plenum Press. New York, EUA. 3-16.
- Díaz, L. y A.A. Cocucci 2003. Functional gynodioecy in *Opuntia quimilo* (Cactaceae), a tree cactus pollinated by bees and hummingbirds. *Plant Biology*. 5(5):531-539.
- Dlugosch, K.M. y I.M. Parker. 2008. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular ecology*. 17(1):431-49.
- Dokka, R.K. y R.H. Merriam. 1982. Late Cenozoic extension of Northeastern Baja California, Mexico. *Geological Society of America Bulletin* 93:371-378.
- Duminil, J., O.J. Hardy, y R.J. Petit. 2009. Plant traits correlated with generation time directly affect inbreeding depression and mating system and indirectly genetic structure. *BMC Evolutionary Biology*. 9:177-191.
- Earl, D.A. y B.M. Von Holdt. 2011. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. 4(2):359-361.
- Ellegren, H. 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews. Genetics*. 5(6):435-45.
- Eppley, S.M., y J.R. Pannell. 2007. Density-dependent self-fertilization and male versus hermaphrodite siring success in an androdioecious plant. *Evolution*. 61:2349-2359.
- Esselink, G.D., H. Nybom, y B. Vosman 2004. Assignment of allelic configuration in polyploids using the MAC-PR (microsatellite DNA allele counting-peak ratios) method. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*. 109(2):402-8.
- Evanno, G., S. Regnaut, y J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 14(8):2611-20.

- Excoffier, L., G. Laval, y S. Schneider. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online*. 1:47-50.
- Falush, D., M. Stephens, y J.K. Pritchard. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology notes*. 7(4):574-578.
- Faircloth, B.C. 2008. MSATCOMMANDER: detection of microsatellite repeat arrays and automated, locus-specific primer design. *Molecular Ecology Resources*. 8:92-94.
- Fleming, T.H., S. Maurice, S.L. Buchmann, y M.D. Tuttle. 1994. Reproductive biology and relative male and female fitness in a trioecious cactus, *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *American Journal of Botany*. 81(7):858-867.
- Fleming, T.H., M.D. Tuttle, y M.A. Horner. 1996. Pollination biology and the relative importance of nocturnal and diurnal pollinators in three species of Sonoran Desert columnar cacti. *The Southwestern Naturalist*. 41(3):257-269.
- Fleming, T.H., S. Maurice, y J.L. Hamrick. 1998. Geographic variation in the breeding system and the evolutionary stability of trioecy in *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *Evolutionary Ecology*. 12(3):279-289.
- Fleming, T. 2000. Pollination of Cacti in the Sonoran Desert. When closely related species vie for scarce resources, necessity is the mother of some pretty unusual evolutionary inventions. *American Scientist*. 88:432-439.
- Flores-Rentería, L. 2013. Programmed cell death promotes male sterility in the functional dioecious *Opuntia stenopetala* (Cactaceae). *Annals of Botany*. 1-2.
- Foxe, J.P., M. Stift, A. Tedder, A. Haudry, S.I. Wright, y B.K. Mable. 2010. Reconstructing origins of loss of self-incompatibility and selfing in North American *Arabidopsis lyrata*: a population genetic context. *International journal of organic evolution*. 64(12):3495-510.
- Freedman, A.H., H.A. Thomassen, W. Buermann, y T.B. Smith. 2010. Genomic signals of diversification along ecological gradients in a tropical lizard. *Molecular Ecology*. 19(17):3773-88.
- Garcillan, P., C. González-Abraham, y E. Ezcurra. 2010. "The cartographers of life: Two centuries of mapping the natural history of Baja California." *Journal of the Southwest* 52(1):1-40.

- Garcillan, P., C. González-Abraham, y E. Ezcurra. 2012. Phytogeography, Vegetation and Ecological Region. En: Rebman, J.P. Roberts, N.C. (eds.). Baja California Plant Field Guide. San Diego Natural History Museum Publications. San Diego, CA, EUA. 23-34p
- Garrick, R.C., J.D. Nason, J.F. Fernández-Manjarrés, y R.J. Dyer. 2013. Ecological coassociations influence species' responses to past climatic change: an example from a Sonoran Desert bark beetle. *Molecular Ecology*. 22(12):3345–3361.
- Gastil, G., y W. Jensky. 1973. Evidence of strike-slip displacement beneath the Trans- Mexican Volcanic Belt. En: (Kovach, R., Nur, A. (eds.) Proceedings, Conference on Tectonic Problems of the San Andreas Fault System. Stanford University Publications, Geological Sciences. Stanford, California. 171–180p.
- Gastil, G., J. Minch, y R.P. Phillips. 1983. "The geology and ages of islands." En: Case, T.J., Cody, M.L. (eds.). A new island biogeography of the Sea of Cortez. Oxford University Press, Oxford, NY, EUA. 13-25p.
- Glover, D.E. y S.C.H. Barrett. 1987. Genetic variation in continental and island populations of *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). *Heredity*. 59:7-17.
- Grismer, L.L. 2000. Evolutionary biogeography on Mexico's Baja California peninsula: A synthesis of molecules and historical geology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(26):14017-14018.
- Grismer, L. 2002. A re-evaluation of the evidence for mid-Pleistocene Mid-peninsular seaway in Baja California: a reply to Riddle *et al.* *herpetological reviews*, 33:15-16.
- Guo, Y.L., J.S. Bechsgaard, T. Slotte, B. Neuffer, M. Lascoux, D. Weigel, y M.H. Schierup. 2009. Recent speciation of *Capsella rubella* from *Capsella grandiflora*, associated with loss of self-incompatibility and an extreme bottleneck. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(13):5246-51.
- Gutiérrez-Flores, C., O.A. Lozano-Garza, J.L. León de la Luz, y F.J. García de León. 2014. Development and Characterization of 10 Microsatellite Loci in the Giant Cardon Cactus, *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *Applications in Plant Sciences*. 2(2):1300066.
- Hafner, D.J. y B.R. Riddle 2005. Mammalian phylogeography and evolutionary history of northern Mexico's deserts. En: J.L.E. C. et al. (eds.) Biodiversity, Ecosystems, and Conservation in Northern Mexico. Oxford University Press, Oxford, UK. 225–245p.

- Hamrick, J.L. y M.J.W. Godt. 1996. Effects of Life History Traits on Genetic Diversity in Plant Species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 351:1291-1298.
- Hamrick, J.L., J.D. Nason, T.H. Fleming, y J.M. Nassar. 2002. Genetic diversity in columnar cacti. In: *Columnar cacti and their mutualists: Evolution, Ecology, and Conservation*. Fleming, T.H., A. Valiente-Banuet (eds.). University of Arizona Press, Tucson, AZ. EUA. ,122-133p.
- Harlan, J.R., y J.M.J. Dewet. 1975. On O.Winge and a prayer: the origins of polyploidy. *Botanical Review*. 41:361-390.
- Harth, J. 1985. Peripheral isolation and the origin of diversity in *Lepechinia* sect. *Parviflorae* (Lamiaceae). *Systematic Botany*. 10:134-136.
- Hausback, B.P. 1984. Cenozoic volcanic and tectonic evolution of Baja California Sur, Mexico. *Geology of the Baja California Peninsula*. En: Frizzell, V.A. Jr (ed.). Pacific Section, Society of Economic Paleontologists and Mineralogists. Los Angeles, CA, EUA, 219-236p.
- Helenes, J., y A.L. Carreno. 1999. Neogene sedimentary evolution of Baja California in relation to regional tectonics. *Journal of South American Earth Sciences* 12:589-605.
- Hewitt, G.M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*. 58:247-276.
- Hijmans, R.J., S.E. Cameron, J.L. Parra, P.G. Jones, y A. Jarvis. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*. 25(15):1965–1978.
- Hoffman, M.T. 1992. Functional dioecy in *Echinocereus coccineus* (Cactaceae): Breeding system, sex ratios, and geographic range of floral dimorphism. *American Journal of Botany*. 79(12):1382–1388.
- Hugall, A., C. Moritz, A. Moussalli, y J. Stanisic. 2002. Reconciling paleodistribution models and comparative phylogeography in the Wet Tropics rainforest land snail *Gnarosophia bellendenkerensis* (Brazier 1875). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99:6112-6117.
- Hutchinson, E.G. 1957. Concluding remarks. *Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology*. 22:415-427.

- Igic, B., R. Lande, y J.R. Kohn. 2008. Loss of Self-Incompatibility and Its Evolutionary Consequences. *International Journal of Plant Sciences*. 169(1):93-104.
- Imbrie, J. y K.P. Imbrie. 1979. *Ice Ages, Solving the Mystery*. Harvard University Press. Cambridge, MA, EUA, 244p.
- Irwin, D.E. 2002. Phylogeographic breaks without geographic barriers to gene flow. *Evolution*. 56(12):2383-94.
- Jakobsson, M. y N. Rosenberg. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*. 23(14):1801-6.
- Jensen, J.L., A.J. Bohonak, y S.T. Kelley. 2005. Isolation by distance, web service. *BMC genetics*. 6:13.
- Jezkova, T., B.R. Riddle, D.C. Card, D.R. Schield, M.E. Eckstut, y T.A. Castoe. 2014. Genetic consequences of post-glacial range expansion in two co-distributed rodents (genus *Dipodomys*) depend on ecology and genetic locus. *Molecular Ecology*. 83-97.
- Jombart, T. 2008. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 24(11):1403-5.
- Jombart, T., S. Dray, y A. B. Dufour. 2009. Finding essential scales of spatial variation in ecological data: a multivariate approach. *Ecography*. 32(1):161-168.
- Katagiri, S. 1952. Studies on the chromosome number in some Cactaceae species. *Cactus and Succulent Journal* 1: 233-236.
- Kearney, M. y W. Porter. 2009. Mechanistic niche modelling: combining physiological and spatial data to predict species' ranges. *Ecology Letters*. 12(4):334-50.
- Kiehl, J.T., y P.R. Gent. 2004. The community climate system model, version 2. *Journal of Climate*, 17:3666-3682.
- Knowles, L.L. y D.F. Alvarado-Serrano. 2010. Exploring the population genetic consequences of the colonization process with spatio-temporally explicit models: insights from coupled ecological, demographic and genetic models in montane grasshoppers. *Molecular Ecology*. 19(17):3727-45.
- Laporte, M.M., y L.F. Delph. 1996. Sex-specific physiology and source-sink relations in the dioecious plant *Silene latifolia*. *Oecologia*. 106: 63-72.

- Lawlor, T.E., D. J. Hafner, B.R. Riddle, y S.T. Alvarez-Castañeda.T. 2002. The mammals. En: Case, T.J., M.L. Cody, E. Ezcurra. A New Island Biogeography in the Sea of Cortéz. Oxford University Press, Oxford, UK.326-361.
- Leaché, A.D. y D.G. Mulcahy. 2007. Phylogeny, divergence times and species limits of spiny lizards (*Sceloporus magister* species group) in western North American deserts and Baja California. *Molecular ecology*. 16(24):5216-33.
- Leaché, A.D., M.S. Koo, C.L. Spencer, T.J. Papenfuss, R.N. Fisher, y J.A. McGuire. 2009. Quantifying ecological, morphological, and genetic variation to delimit species in the coast horned lizard species complex (*Phrynosoma*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(30):12418–23.
- Leuenberger, B. 1986. *Pereskia* (Cactaceae). *Memoirs of the New York Botanical Garden*. 41:1-141.
- Levin, D.A. 1983. Polyploidy and novelty in flowering plants. *American Naturalist* 122: 1-25.
- Lindell, J., F. Méndez de la Cruz, y R. Murphy. 2005. Deep genealogical history without population differentiation: discordance between mtDNA and allozyme divergence in the zebra-tailed lizard (*Callisaurus draconoides*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 36:682-694.
- Lindell, J., A. Ngo, y R.W. Murphy. 2006. Deep genealogies and the mid-peninsular seaway of Baja California. *Journal of Biogeography*. 33(8):1327-1331.
- Lindell, J., F.R. Méndez de La Cruz, y R.W. Murphy 2008. Deep biogeographical history and cytonuclear discordance in the black-tailed brush lizard (*Urosaurus nigricaudus*) of Baja California. *Biological Journal of the Linnean Society*. 94(1):89-104.
- Lloyd, D.G. 1972. Breeding systems in *Cotula* L. (Compositae, Anthemideae). *New Phytologist*. 71:1181-1194.
- Lloyd, D.G. y C.J. Webb. 1977. Secondary sex characters in plants. *The Botanical Review*. 43(2):177-216.
- Loveless, M.D. y J.L. Hamrick. 1984. Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 15:65-95.
- Lozano-Garza, O.A. 2013. Análisis de la estructura genética poblacional de la pitahaya agria (*Stenocereus gummosus*) en el desierto de sonorenses. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Tesis de Maestría.

- Manel, S., B.N. Poncet, P. Legendre, F. Gugerli, y R. Holderegger. 2010. Common factors drive adaptive genetic variation at different spatial scales in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Ecology*. 19(17):3824–35.
- Mulcahy, D.G. y J.R. Macey. 2009. Vicariance and dispersal form a ring distribution in nightsnakes around the Gulf of California. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 53(2):537-546.
- Medel-Narváez, A. 2003. Biología floral y estructura poblacional del cardón [*Pachycereus pringlei* (S. Wats.) Britton & Rose (Cactaceae)] en el Comitán, Baja California Sur. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., Tesis de Maestría.
- Medel-Narváez, A. 2008. Estudio Ecológico y Genético del Cardón (*Pachycereus pringlei*) en el Desierto Sonorense. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., Tesis de Doctorado.
- Medel-Narvaez, A., J.L. León de la Luz, F. Freaner-Martínez, y F. Molina-Freaner. 2006. Patterns of abundance and population structure of *Pachycereus pringlei* (Cactaceae), a columnar cactus of the Sonoran Desert. *Plant Ecology*. 187(1):1-14.
- Megléczy, E., C. Costedoat, V. Dubut, A. Gilles, T. Malausa, N. Pach, y J.F. Martin. 2010. QDD: A user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinformatics*. Oxford, England. 26: 403-404.
- Meirmans, P.G., y P.H. Van Tienderen. 2004. genotype and genodive: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Molecular Ecology Notes*. 4:792-794.
- Molina-Freaner, F., M. Cervantes-Salas, S.L. Morales-Romero, D. Buchmann, y T.H. Fleming 2003. Does the pollinator abundance hypothesis explain geographic variation in the breeding system of *Pachycereus pringlei*? *Journal of Plant Sciences*. 164:383-393.
- Moody, M.E., L.D. Muellert, y E. Douglas. 1993. Genetic Variation and Random Drift in Autotetraploid Populations. *Genetics*. 134:649-657.
- Mukai, T. y C.C. Cockerham. 1977. Spontaneous mutation rates at enzyme loci in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 74(6):2514-2517.

- Murawski, D.A., T.H. Fleming, y K. Ritland. 1994. Mating system of *Pachycereus pringlei*: an autotetraploid cactus. *Seven*. 72:86-94.
- Murphy, R.W. y G. Aguirre-León. 2002. Nonavian reptiles; origins and evolution. A new island biogeography of the Sea of Cortez. Oxford University Press, Oxford, NY, EUA. 181-220p.
- Nason, J.D., J.L. Hamrick, y T.H. Fleming. 2002. Historical vicariance and postglacial colonization effects on the evolution of genetic structure in *Lophocereus*, a Sonoran Desert columnar cactus. *Evolution*. 56(11):2214-26.
- Nassar, J., J.L. Hamrick, y T.H. Fleming 2001. Genetic variation and population structure of the mixed-mating cactus, *Melocactus curvispinus* (Cactaceae). *Heredity*. 87(1):69-79.
- Negrón-Ortiz, V. 2007. Chromosome numbers, nuclear DNA content, and polyploidy in *Consolea* (Cactaceae), an endemic cactus of the Caribbean Islands. *American Journal of Botany*. 94(8):1360-1370.
- Negrón-Ortiz, V. y L.I. Strittmatter. 2004. Embryology of floral dimorphism and gender system of *Consolea corallicola* (Cactaceae), a rare species of the Florida Keys. *Haseltonia*. 10:1-10.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American naturalist*. 106(949):283-292.
- Nei, M., T. Maruyama, y R. Chakraborty. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*. 29:1-10.
- Neigel, J.E., y J.C. Avise. 1986. Phylogenetic relationships of mitochondrial DNA under various demographic models of speciation. En: Karlin, S., E. Nevo. (eds.). *Evolutionary processes and theory*. Academic Press, Orlando, FL. EUA. 515-534p.
- Ness, B.D., D.E. Soltis, y P.S. Soltis. 1989. Autopolyploidy in *Heuchera micrata* (Saxifragaceae). *American Journal of Botany*. 76(4):614-626.
- Nobel, P. 1980. Morphology, surface temperatures, and northern limits of columnar cacti in the Sonoran Desert. *Ecology*. 61(1):1-7.
- Norell, M. A.1989. Late Cenozoic lizard of the Anza Borrego desert, California. *Natural History Museum of Los Angeles. County contributions in Science* 414:1-31.

- Nybom, H., G.D. Esselink, G. Werlemark, y B. Vosman 2004. Microsatellite DNA marker inheritance indicates preferential pairing between two highly homologous genomes in polyploid and hemisexual dog-roses, *Rosa L. Sect. Caninae DC.* *Heredity*. 92(3):139-50.
- Onge, K.R., T. Källman, T. Slotte, M. Lascoux, y A.E. Palmé. 2011. Contrasting demographic history and population structure in *Capsella rubella* and *Capsella grandiflora*, two closely related species with different mating systems. *Molecular Ecology*. 20(16):3306–20.
- Orozco-Arroyo, G.S. Vázquez-Santana, A. Camacho, J.G. Dubrovsky, y F. Cruz-García. 2012. Inception of maleness: auxin contribution to flower masculinization in the dioecious cactus *Opuntia stenopetala*. *Planta*. 236(1):225-38.
- Oskin, M. y J. Stock 2003. Marine incursion synchronous with plate-boundary localization in the Gulf of California. *Geology*. 31(1):23.
- Otero-Arnaiz, A., A. Casas, J.L. Hamrick, y J. Cruse-Sanders. 2005. Genetic variation and evolution of *Polaskia chichipe* (Cactaceae) under domestication in the Tehuacán Valley, central Mexico. *Molecular ecology*. 14(6):1603-11.
- Owen-Hughes, T. y M. Engeholm. 2007. Pyrosequencing positions nucleosomes precisely. *Genome Biology*. 8(6): 217-217.4.
- Pannell, J.R. y S.C.H. Barrett. 1998. Baker's law revisited: reproductive assurance in a metapopulation. *Evolution* 52: 657–668.
- Parra, F., A. Casas, J.M. Peñaloza-Ramírez, A.C. Cortés-Palomec, V. Rocha-Ramírez, y A. González-Rodríguez. 2010. Evolution under domestication: ongoing artificial selection and divergence of wild and managed *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) populations in the Tehuacan Valley, Mexico. *Annals of botany*. 106(3):483-96.
- Parish, R.W., y S.F. Li. 2010. Death of a tapetum: a programme of developmental altruism. *Plant Science*. 178:73-89.
- Parfitt, B.D. 1985. Dioecy in the North american cactaceae: a review. *SIDA*. 11(January):200-206.
- Patterson, N., A.L. Price, y D. Reich 2006. Population structure and eigenanalysis. *PLoS genetics*. 2(12):e190.

- Peakall, R. y P.E. Smouse. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics*. 28(19):2537-2539.
- Peterson, A.T. 2011. Ecological niche conservatism: a time-structured review of evidence. *Journal of Biogeography*. 38(5):817–827.
- Peterson, A.T., J. Soberón, y V. Sánchez-Cordero 1999. Conservatism of ecological niches in evolutionary time. *Science*. 285(5431):1265-7.
- Phillips, S.J., R.P. Anderson, y R.E. Schapire. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*. 190(3-4):231-259.
- Pinkava, D., M.G. McLeod, A.L. McGill, y R.C. Brown. 1973. Chromosome numbers in some cacti of western North America-II. *Brittonia*. 25:2-9.
- Pinkava, D., M. Baker, B.D. Parfitt, y M. Mohlenbrock. 1985. Chromosome numbers in some cacti of western North America - V. *Systematic Botany*. 10(4):471-483.
- Pritchard, J.K., M. Stephens, y P. Donnelly 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155:945–959.
- Ramsey J., y D.W. Schemske. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Reviews in Ecology and Systematic*. 29:467-501.
- Ramsey, J. y D.W. Schemske. 2002. Neopolyploidy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 33(1):589-639.
- Richards, A.J. 1997. *Plant Breeding Systems*. Chapman y Hall, London, UK. 529p.
- Riddle, B.R., D.J. Hafner, L.F. Alexander, y J.R. Jaeger. 2000. Cryptic vicariance in the historical assembly of a Baja California peninsular desert biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(26):14438-43.
- Riddle, B. y D. Hafner. 2006. A step-wise approach to integrating phylogeographic and phylogenetic biogeographic perspectives on the history of a core North American warm deserts biota. *Journal of Arid Environments*. 66:435-461.
- Roberts N., y E. Ezcurra. 2012. *Phytogeography, Vegetation and Ecological Region*. En: Rebman, J.P. Roberts, N.C. (eds.). *Baja California Plant Field Guide*. San Diego Natural History Museum Publications. San Diego, CA, EUA. 1-21p.

- Rogers, H. 2006. Programmed cell death in floral organs: how and why do flowers die?. *Annals of Botany*. 97:309-315.
- Rojas-Martínez, A., A. Valiente-Banuet, M. Del Coro Arizmendi, A. Alcantara-Eguren, y H.T. Arita. 1999. Seasonal distribution of long-Nosed bat (*Leptonycteris curasoae*) in North America. *Journal of Biogeography*. 26(5):1065-1077.
- Ronfort, J., E. Jenczewski, y T. Bataillon. 1998. Analysis of Population Structure in Autotetraploid Species. *Genetics*. 150:921-930.
- Ross, R. 1981. Chromosome counts, cytology, and reproduction in the Cactaceae. *American Journal of Botany*. 68(4):463-470.
- Ross, C.L. y T.A. Markow. 2006. Microsatellite variation among diverging populations of *Drosophila mojavensis*. *Journal of Evolutionary Biology*. 19:1691-700.
- Rozen, S. y H.J. Skaletsky. 2000 . Primer3 WWW for general users and for biologist programmers. En: Misener, S., S.A. Krawetz (eds.). *Methods in molecular biology. Bioinformatics methods and protocols*, Humana Press, Totowa, NJ, USA. 365-386p.
- Sahley, C., M. Horner, y T. Fleming. 1993. Flight speeds and mechanical power outputs of the nectar-feeding bat, *Leptonycteris curasoae* (Phyllostomidae: Glossophaginae). *Journal of Mammalogy*. 74(3):594-600.
- Sahley, C.T. 1996. Bat and Hummingbird Pollination of an Autotetraploid Columnar Cactus, *Weberbauerocereus weberbaueri* (Cactaceae). *American Journal of Botany*. 83(10):1329–1336.
- Sakai, A. K., y S. G. Weller. 1999. Gender and sexual dimorphism in flowering plants: a review of terminology, biogeographic patterns, ecological correlates, and phylogenetic approaches. En: M.A. Geber, T.E. Dawson, L.F. Delph, (eds.). *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*. Springer. Berlin, Alemania. 1–31p.
- Schlötterer, C. 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*. 109(6):365-371.
- Schneider, C.J., Cunningham, M. y C. Moritz. 1998. Comparative phylogeography and the history of endemic vertebrates in the Wet Tropics rainforests of Australia. *Molecular ecology*. 7:487-498.
- Scobell, S. y S. Schultz 2005. GIS and path analysis: examining associations between the birds, the bees, and plant sex in *Echinocereus coccineus*

- (Cactaceae). En: Gottfried, G.J., B.S. Gebow, L.G. Eskew, C.B. Edminister (eds.) Connecting mountain islands and desert seas: biodiversity and management of the Madrean Archipelago. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Colorado, CO: EUA. 438-443p.
- Selkoe, K.A. y R.J. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters*. 9:615-629.
- Shreve, F. 1964. Vegetation of the Sonoran desert. En: Shreve F., I. Wiggins I. (eds.). *Vegetation and Flora of the Sonoran Desert*. Oxford University Press, CA, EUA. 3-186p.
- Singh, R.L. 2003. The handling of Plant chromosomes. En: *Plant Cytogenetics*. CRC Press. Washington, D.C. EUA. 465p.
- Soulé, M., y A. Sloan. 1966. Biogeography and distribution of the reptiles and amphibians on islands in the Gulf of California, Mexico. *Transactions of the San Diego Society of Natural History*. 14(11):137-156.
- StatSoft. Inc. 2007 STATISTICA. Data analysis software. Version 8.0. <http://www.statsoft.com>.
- Stebbins, G.L. 1957. Self-fertilization and population variability in the higher plants. *American Naturalist*. 41:337-354.
- Stebbins, G.L. 1971. *Chromosomal Evolution in Higher Plants*. Addison-Wesley, Reading, MA. EUA.
- Strittmatter, L. 2002. Subdioecy in *Consolea spinosissima* (Cactaceae): breeding system and embryological studies. *American Journal of Botany*. 89(9):1373-1387.
- Strittmatter, L.I. 2006. Cryptic dioecy in *Consolea* (Cactaceae): sex determination and evolutionary implications. Miami University. Tesis de Doctorado.
- Strittmatter, L.I., R.J. Hickey, y V. Negrón-Ortiz 2008. Heterochrony and its role in sex determination of cryptically dioecious *Consolea* (Cactaceae) staminate flowers. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 156(2):305-326.
- Templeton, A.R. 2006. Population genetics and microevolutionary theory. Library of Congress, Estados Unidos de América. 713p.
- Turner, R.M., J.E. Bowers, y T.L. Burgess. 1995. *Sonoran Desert Plants*. University of Arizona Press. Tucson, AZ, USA. 504p.

- Upton, D.E. y R.W. Murphy. 1997. Phylogeny of the side-blotched lizards (Phrynosomatidae:Uta) based on mtDNA sequences: support for midpeninsular seaway in Baja California. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 8(1):104-13.
- Valencia-Moreno, M. y A. Ortega-Rivera. 2011. Cretácico Tardío-Eoceno Medio en el noroeste de México, evolución del arco magmático continental y su contexto geodinámico (orogenia Laramide). En: Calmus T. (eds.). *Panorama de la geología de Sonora, México*. Universidad Nacional Autónoma de México, 1-26p.
- Valiente-Banuet, A. y M. Arizmendi. 1996. Ecological relationships between columnar cacti and nectar-feeding bats in Mexico. *Journal of Tropical*. 12(1):103-119.
- Valiente-Banuet, A., A. Rojas-Martínez, C. Arizmendi, y D. Patricia. 1997. Pollination biology of two winter-blooming giant columnar cacti in the Tehuacan Valley, central Mexico. *Journal of Arid Environments*. 37:331–341.
- Van Devender, T.R. 1990. Late Quaternary vegetation and climate of the Sonoran Desert, United States and Mexico. En: Betancourt, J.L., Van Devender T.R., Martin P.S. (eds.). *Packrat middens: the last 40,000 years of biotic change*. University of Arizona Press, Tucson, AZ, EUA. 134-165p.
- Van Devender, T.R. 2002. Environmental history of Sonoran Desert. En: Fleming, T.H. y Valiente-Banuet A. (eds.). *Columnar cacti and their mutualists: evolution, ecology, and conservation*. University of Arizona Press., Tucson, AZ, EUA. 3-24p.
- Van Puyvelde, K. , A. Van Geert, y L. Triest. 2010. ATETRA, a new software program to analyse tetraploid microsatellite data: Comparison with TETRA and TETRASAT. *Molecular Ecology Resources*. 10: 331-334.
- Voelker, R., H. Schaffer, y T. Mukai. 1980. Spontaneous allozyme mutations in *Drosophila melanogaster*: rate of occurrence and nature of the mutants. *Genetics*. 94:961–968.
- Waples, R.S. y O. Gaggiotti. 2006. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular Ecology*. 15(6):1419-39.
- Webb, C.J. 1979. Breeding Systems and the Evolution of Dioecy in New Zealand *Apioid Umbelliferae*. *Evolution*. 33(2):662-672.
- Whorley, J.R., S.T. Alvarez-Castañeda, y G.J. Kenagy. 2004. Genetic structure of desert ground squirrels over a 20-degree-latitude transect from Oregon through the Baja California peninsula. *Molecular Ecology*. 13(9):2709-2720.

- Wilson, Z.A., J. Song, B. Taylor, y C. Yang. 2011. The final split: the regulation of anther dehiscence. *Journal of Experimental Botany*. 62:1633-1649.
- Woloszyn, D., y B.W. Woloszyn. 1982. Los mamíferos de la Sierra de la Laguna, Baja California Sur. CONACYT, México.
- Wooten, J.A. y H.L. Gibbs. 2012. Niche divergence and lineage diversification among closely related *Sistrurus rattlesnakes*. *Journal of Evolutionary Biology*. 25(2):317-28.
- Worth, J.R.P., y G.J. Williamson, S. Sakaguchi, P.G. Nevill, y G.J. Jordan. 2014. Environmental niche modelling fails to predict Last Glacial Maximum refugia: niche shifts, microrefugia or incorrect palaeoclimate estimates?. *Global Ecology and Biogeography*. 23:1186-1197
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*. 28:114-138.
- Wu, H. y A.Y. Cheung. 2000. Programmed cell death in plant reproduction. *Plant molecular biology* 44: 267-281.

ANEXOS

ANEXO1. Características morfológicas de flore unisexuales de cactáceas. SR = Sistema de reproducción. SH = superficialmente hermafrodita, LM = “leaky male”, FP = flor primaria, FS = flor secundaria. Talla relativa de flores: P = pistiladas, E = estaminadas, H = hermafrodita. Nivel de ploidía: 2x = diploide, 4x = tetraploide, 6x = hexaploide, 8x = octaploide, 10x = decaploide. SI = auto-incompatible, SC = auto-compatible, D = depresión por endogamia, entre paréntesis los valores estimados de autocompatibilidad y depresión por endogamia.

Especies	SR	Ginoecio de flor estaminada	Androecio de flor pistilada	Talla relativa de flores	P	SC/SI/D	References
Pereskioideae							
<i>Pereskia marcanoi</i>	D	Estilo vestigial, lóbulos filiformes	Estambres estériles cortos	M>F			Areces-Mallea, 1992
<i>P. portulacifolia</i>	D	Estilo reducido, pocos lóbulos estigmáticos sin papilas. No óvulos	Estambres cortos, anormales. No polen	F>M			Leuenberger, 1986
<i>P. quisqueyana</i>	D	Estilo reducido, pocos lóbulos estigmáticos. Óvulos aberrantes					Leuenberger, 1986
<i>P. zinniiflora</i>	D	Estilo reducido, lóbulos filiformes. Óvulos aberrantes o ausente	Estambres cortos, anormales. No polen	F>M	2x		Leuenberger, 1986
Opuntioideae							
<i>Consolea corallicola</i>	S/D	2 machos, SH, LM. PF: estilo, óvulos viable SF: no estilo no ovario	No hembras		6x	SI	Negrón-Ortíz, 2007; Negrón-Ortíz y Strittmatter, 2004;
<i>C. millspaughii</i>	D	SH. Bien desarrollado con estilo y estigma. Óvulos inviables	Estambres cortos, torcidos, anteras indehiscentes. No polen		6x		Strittmatter et al., 2006; 2008
<i>C. moniliformis,</i> <i>C. nashii,</i> <i>C. picardae,</i> <i>C. spinosissima</i>	S/D	2 machos, SH, LM. Bien desarrollado con estilo y estigma. Pocos óvulos viables	Estambres cortos, torcidos, anteras indehiscentes. No polen		6x		Negrón-Ortíz, 2007; Strittmatter et al., 2006; 2008;
<i>C. rubescens</i>	D	SH: Bien desarrollado con estilo y estigma. Óvulos inviables	Estambres cortos, torcidos, anteras indehiscentes. No polen		8x, 10x		Negrón-Ortíz, 2007; Strittmatter et al., 2006; 2008
<i>Cylindropuntia calmalliana,</i>	G		Polen estéril		6x		Pinkava et al., 1998; Pinkava et al., 2009;

<i>C. sanfelipensis</i> <i>C. wolfii</i>							Rebman, 1998; ASU0054450, ASU0054471, ASU0058936,
<i>C. molesta</i>	G						Rebman, 1998
<i>Opuntia grandis</i>	D	Estilo y cámara ovárica reducidos. No óvulos					Backeberg, 1958 in Diaz and Cocucci, 2003; Parfitt, 1985
<i>O. quitensis</i>	D	Estilo y cámara ovárica reducidos. No óvulos			2x		Backeberg, 1958 in Diaz and Cocucci, 2003; Parfitt, 1985; ASU0058682
<i>O. quimilo</i>	G	No machos	Pocos estambres. Polen falso	H>F		SC (0.30) D (~0)	Backeberg, 1958 en Diaz and Cocucci, 2003
<i>O. robusta</i>	H, D,T	Ovario reducido, estigma atrofiado. No/ocasional óvulos inviables	Estambres cortos No polen	M>F	4x	SC (0.60) D (~0)	Del Castillo, 1986; Del Castillo y Gonzalez- Espinosa, 1988; Del Castillo y Argueta, 2009; Sosa and Acosta, 1966
<i>O. stenopetala</i>	D	3 machos. Estilo reducido, ovario reducido/ausente. No/ocasional óvulos inviables	Estambres cortos, anteras colapsadas. No polen	M>F	2x		Orozco-Arroyo et al., 2012; Parfitt, 1985; Pinkava et al., 1977
Cactoideae							
<i>Echinocereus canyonensis</i>	D	SH: Ovario, estigma y estilo similar a hembras. No desarrollan frutos	Estambres reducidos	M>F	4x		Baker, 2006
<i>E. coccineus</i>	D, H	SH: Ovario y estilo similar al de hembras. Ocasional óvulos inviables	Estambres reducidos, anteras retorcidas. No polen	M>F	4x	SC	Baker, 2006; Hoffman, 1992; Scobell y Schultz, 2005
<i>E. mombergerianus</i>	T or G?		Anteras abortivas		4x		Rebman, 1989
<i>E. pacificus</i>	D	SH: Ovario, estigma y estilo	Estambres reducidos	M>F	4x		Baker, 2006

		similar a hembras. No desarrollan frutos					
<i>E. yavapaiensis</i>	D	SH: Ovario, estigma y estilo similar al de hembras. No desarrollan frutos	Estambres reducidos. Polen inmaduro	M>F	6x		Baker, 2006
<i>Mammillaria dioica</i>	G or T	Estilo imperfecto/ deforme. Raramente desarrolla frutos	Anteras indehiscentes. Polen malformado puede estar presente	F very small	6x, 4x		Brandege, 1897; Bemis et al., 1972; Ganders and Kennedy, 1978, <i>en</i> Parfitt 1985; Pinkava et al., 1985
<i>M. neopalmeri</i>	G or T	Estilo imperfecto/ deforme. Raramente desarrolla frutos	Anteras abortivas.	F very small			Brandege, 1897; Bemis et al., 1972, <i>en</i> Parfitt, 1985
<i>Neobuxbaumia mezcalaensis</i>	A	Completamente reducido.	No hembras	M=H		SI	Valiente-Banuet, et al., 1997
<i>Pachycereus pringlei</i>	G, T, H	SH: Ovario, estilo y estigma similar a hembras. Óvulos no/ocasional inviados. Rara producción de fruto estéril	Anteras cortas, indehiscentes. Polen malformado	M>H>F M>F>H	4x, 2x	SC (0.65) D (~0)	Fleming et al., 1994; 1998; Medel-Narváez, 2003; 2008; Pinkava et al., 1973; Este estudio
<i>Selenicereus innesii</i>	G or H	No machos	No estambres. Se desconoce si hay producción de frutos				Parfitt, 1985

ANEXO 2. Compilación de localidades de *Pachycereus pringlei* y la frecuencia relativa de sexos calculada para cada sitio. N = tamaño de muestra, H = hermafroditas, F = hembras, M = machos, S = estériles.

Locality	Latitude	Longitude	N	H	F	M	S	Reference
Cardon Forest, SON	28.718440	-111.804894	77	0.49	0.33	0.18	0.03	Fleming <i>et al.</i> 1994
Bahía Kino, SON	28.686458	-111.801174	211	0.28	0.42	0.28	0.02	Fleming <i>et al.</i> 1998
Buena Vista, BCS	23.700616	-109.850316	43	0.56	0.28	0.54	0.02	Fleming <i>et al.</i> 1998
Cabo San Lucas, BCS	23.097764	-109.777243	44	0.10	0.37	0.54	0.00	Fleming <i>et al.</i> 1998
Caborca, SON	30.679086	-112.407870	29	0.56	0.41	0.03	0.00	Fleming <i>et al.</i> 1998
Cataviña, BCN	29.898734	-114.849182	34	0.56	0.44	0.00	0.00	Fleming <i>et al.</i> 1998
Loreto, BCS	25.801464	-111.403116	37	0.70	0.30	0.00	0.00	Fleming <i>et al.</i> 1998
Madrugada, SON	28.949760	-112.065873	47	0.19	0.38	0.43	0.00	Fleming <i>et al.</i> 1998
Playa Cocos, BCS	26.538998	-111.853129	33	0.33	0.36	0.30	0.00	Fleming <i>et al.</i> 1998
Puerto Libertad, SON	29.966624	-112.627089	59	0.25	0.39	0.36	0.00	Fleming <i>et al.</i> 1998
Punta Chueca, SON	29.206005	-112.147539	71	0.47	0.31	0.23	0.00	Fleming <i>et al.</i> 1998
S of La Paz, BCS	24.079811	-110.259853	20	0.05	0.20	0.75	0.00	Fleming <i>et al.</i> 1998
San Carlos, SON	28.011922	-110.928142	43	0.69	0.30	0.00	0.00	Fleming <i>et al.</i> 1998
Isla San Pedro Mártir, SON	28.379523	-112.337577	93	53.8	46.2	0.00	0.00	Fleming <i>et al.</i> 1998
Santiago, BCS	23.439036	-109.774942	16	0.00	31.3	68.7	0.00	Fleming <i>et al.</i> 1998
SE of Guerrero Negro, BCS	27.628289	-113.595306	25	0.16	0.24	0.52	0.08	Fleming <i>et al.</i> 1998
Tastiota Junction, SON	28.450360	-111.439653	48	0.67	33.3	0.00	0.00	Fleming <i>et al.</i> 1998
W of Bahía de Los Ángeles, BCN	29.016675	-113.704915	42	0.83	16.7	0.00	0.00	Fleming <i>et al.</i> 1998
W of La Paz, BCS	24.212127	-110.690655	32	0.03	46.8	0.50	0.00	Fleming <i>et al.</i> 1998
W of Santa Rosalia, BCS	27.445606	-112.955917	35	0.20	42.9	0.31	0.00	Fleming <i>et al.</i> 1998
Bahía Concepción, BCS	26.543333	-111.711944	107	0.56	0.30	0.14	0.00	Medel-Narvaez 2008
Isla Catalana, BCS	25.609210	-110.804281	91	1.00	0.00	0.00	0.00	Medel-Narvaez 2008
Cataviña, BCN	29.840833	-114.920833	96	0.52	0.47	0.01	0.00	Medel-Narvaez 2008
Isla Cerralvo, BCS	24.173180	-109.819200	93	1.00	0.00	0.00	1.00	Medel-Narvaez 2008
Conquista Agraria, BCS	24.000000	-110.830556	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	Medel-Narvaez 2008
Guatamote, BCS	25.481944	-111.481944	90	0.49	0.49	0.02	0.00	Medel-Narvaez 2008
La Ribera, BCS	23.192116	-110.111954	91	0.15	0.38	0.46	0.00	Medel-Narvaez 2008
Puerto Canoas, BCN	29.610556	-115.375278	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	Medel-Narvaez 2008
Punta Estrella, BCN	30.877222	-114.880000	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	Medel-Narvaez 2008
San Evaristo, BCS	24.816944	-110.770000	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	Medel-Narvaez 2008
San Francisco, BCS	27.448333	-113.263889	95	0.23	0.45	0.32	0.00	Medel-Narvaez 2008
San Pedro, BCN	31.095278	31.095278	12	0.75	0.25	0.00	0.00	Medel-Narvaez 2008

Bahía Kino, SON	28.866000	-111.996200	91	0.34	0.35	0.26	0.01	Molina-Freaner <i>et al.</i> 2003
El Alamo, SON	30.717700	-112.689300	90	0.47	0.31	0.11	0.00	Molina-Freaner <i>et al.</i> 2003
El Cardonal, SON	28.466800	-111.672500	67	0.70	0.26	0.00	0.00	Molina-Freaner <i>et al.</i> 2003
El Sacrificio, SON	29.957000	-112.134000	101	0.26	0.40	0.24	0.00	Molina-Freaner <i>et al.</i> 2003
El Sahuaral de Empalme, SON	27.990800	-110.841500	167	0.82	0.18	0.00	0.00	Molina-Freaner <i>et al.</i> 2003
Puerto Arturo, SON	28.428200	-111.416700	98	0.72	0.28	0.00	0.00	Molina-Freaner <i>et al.</i> 2003
Puerto Libertad, SON	29.973300	-112.493000	85	0.38	0.27	0.19	0.01	Molina-Freaner <i>et al.</i> 2003
San Gabriel, SON	29.385500	-112.219500	107	0.10	0.41	0.41	0.01	Molina-Freaner <i>et al.</i> 2003
San Nicolás, SON	28.829700	-111.806200	93	0.44	0.28	0.25	0.00	Molina-Freaner <i>et al.</i> 2003
Isla Tío Ramón, SON	27.936500	-110.853300	76	0.83	0.13	0.00	0.00	Molina-Freaner <i>et al.</i> 2003
Bahía Concepción, BCS	26.648861	-111.906872	50	0.44	0.32	0.24	0.00	Este estudio
Bahía de los Ángeles, BCN	28.916480	-113.554100	44	0.70	0.30	0.00	0.00	Este estudio
Bahía Kino, SON	28.827781	-111.806389	50	0.46	0.42	0.12	0.00	Este estudio
Bahía Sargento, SON	29.264971	-112.187105	51	0.57	0.29	0.12	0.02	Este estudio
Balandra, BCS	24.301306	-110.251250	51	0.31	0.29	0.02	0.37	Este estudio
Bofil, BCS	27.363460	-112.692170	32	0.63	0.38	0.00	0.00	Este estudio
Cabo San Lucas, BCS	22.943781	-109.990575	52	0.23	0.13	0.63	0.00	Este estudio
Caduaño, BCN	23.214793	-109.720482	33	0.58	0.30	0.12	0.00	Este estudio
Isla Catalana, BCS	25.672087	-110.816856	50	1.00	0.00	0.00	0.00	Este estudio
Cataviña, BCN	29.765208	-114.769425	50	0.64	0.36	0.00	0.00	Este estudio
Isla Cerralvo, BCS	24.208112	-109.844351	36	1.00	0.00	0.00	0.00	Este estudio
Cerritos, BCS	23.329268	-110.154603	8	0.13	0.50	0.38	0.00	Este estudio
Conquista Agraria, BCS	24.041630	-110.802870	33	0.24	0.42	0.33	0.00	Este estudio
El Arco, BCN	28.201050	-113.772290	35	0.34	0.20	0.43	0.03	Este estudio
El Carrizal, BCS	23.830250	-110.247890	51	0.20	0.33	0.47	0.00	Este estudio
El Cien, BCS	24.346583	-111.007639	51	0.33	0.24	0.41	0.02	Este estudio
El Comitán, BCS	24.128053	-110.460165	71	0.18	0.42	0.39	0.00	Este estudio
El Cuarenta, BCS	26.657339	-112.932360	30	0.23	0.20	0.53	0.03	Este estudio
El Sargento, BCS	23.984703	-109.997928	49	0.43	0.22	0.35	0.00	Este estudio
Empalme, SON	27.975917	-110.750914	1	0.00	100	0.00	0.00	Este estudio
Isla Espíritu Santo, BCS	24.482354	-110.342045	50	0.34	0.32	0.34	0.00	Este estudio
Isla La Choyuda, SON	28.773067	-112.308195	50	0.64	0.34	0.02	0.00	Este estudio
La Soledad, BCS	24.763280	-110.893780	45	0.36	0.51	0.07	0.07	Este estudio
López Mateos, BCS	25.272600	-111.894219	50	0.16	0.38	0.40	0.06	Este estudio
Los Barriles, BCS	23.901442	-109.816084	30	0.23	0.27	0.40	0.10	Este estudio
Migriño, BCS	23.121815	-110.097120	37	0.16	0.35	0.49	0.00	Este estudio

Isla Monserrat, BCS	25.674519	-111.047069	50	0.56	0.42	0.02	0.00	Este estudio
Piedra Blanca, BCN	28.229661	-113.159389	41	0.41	0.46	0.10	0.02	Este estudio
Puente Querétaro, BCS	25.350833	-111.609461	52	0.48	0.52	0.00	0.00	Este estudio
Puerto Canoas, SON	29.498472	-115.152944	50	0.66	0.34	0.00	0.00	Este estudio
Puerto Libertad, SON	29.872969	-112.633481	51	0.57	0.41	0.02	0.00	Este estudio
Puerto San Carlos, BCS	24.860888	-112.037566	6	0.83	0.00	0.00	0.17	Este estudio
Punta Abrejos, BCN	27.248240	-113.210670	34	0.18	0.32	0.50	0.00	Este estudio
Punta Onah, SON	29.089488	-112.164084	5	1.00	0.00	0.00	0.00	Este estudio
Punta Prieta, BCN	29.063345	-114.155100	50	0.46	0.50	0.04	0.00	Este estudio
Isla San Esteban, SON	28.688303	-112.551005	50	0.72	0.26	0.02	0.00	Este estudio
San Evaristo, BCS	24.844550	-110.687230	35	0.51	0.49	0.00	0.00	Este estudio
San Francisco, BCS	27.490019	-113.182850	46	0.37	0.37	0.22	0.04	Este estudio
San Gregorio, BCS	26.130761	-112.260511	50	0.16	0.20	0.54	0.10	Este estudio
Isla San José, BCS	24.950050	-110.603761	50	0.74	0.24	0.02	0.00	Este estudio
San Pedro, BCN	31.297167	-115.434639	50	0.58	0.42	0.00	0.00	Este estudio
Santa Águeda, BCS	27.271769	-112.258920	50	0.76	0.24	0.00	0.00	Este estudio
Santa Rosa, SON	28.969215	-112.128145	5	80.0	20.0	0.00	0.00	Este estudio
Isla Tiburón, SON	28.779125	-112.291030	24	0.54	0.42	0.04	0.00	Este estudio
Todos Santos, BCS	23.559110	-110.205400	34	0.35	0.26	0.35	0.03	Este estudio

ANEXO 3. Variables climáticas basadas en temperatura, precipitación y estacionalidad empleadas para realizar la modelación de nicho al presente de *Pachycereus pringlei*. Todas la variables se obtuvieron de la base de datos de Worldclim (Hijmans et al. 2005).

BIO1 = Temperatura promedio anual

BIO2 = Rango diario promedio de temperatura

BIO3 = Isotermalidad (BIO2/BIO7) (* 100)

BIO4 = Estacionalidad de la temperatura (Desviación estándar *100)

BIO5 = Temperatura máxima del mes más cálido

BIO6 = Temperatura mínima del mes más frío

BIO7 = Rango anual de temperatura (BIO5-BIO6)

BIO8 = Temperatura promedio del cuatrimestre más húmedo

BIO9 = Temperatura promedio del cuatrimestre más seco

BIO10 = Temperatura promedio del cuatrimestre más cálido

BIO11 = Temperatura promedio del cuatrimestre más frío

BIO12 = Precipitación anual

BIO13 = Precipitación del mes más húmedo

BIO14 = Precipitación del mes más seco

BIO15 = Estacionalidad de la precipitación (Coeficiente de variación)

BIO16 = Precipitación del cuatrimestre más húmedo

BIO17 = Precipitación del cuatrimestre más seco

BIO18 = Precipitación del cuatrimestre más cálido

BIO19 = Precipitación del cuatrimestre más frío

ANEXO 4. Protocolo de extracción de ADN empleado para el cardón *Pachycereus pringlei* (De la Cruz *et al.* 1997; Cota-Sánchez *et al.* 2006)

Reactivos:

1. Buffer de extracción CTAB
 - a. 100mM tris-HCl pH 8.0
 - b. 20 mM EDTA pH 8.0
 - c. 4% CTAB
 - d. 1.5 M NaCl
 - e. 4% PVP40 (poner al momento de usarse)
 - f. 2% 2-Mercaptoetanol (poner al momento de usarse)
 - g. 5% ácido ascórbico (poner al momento de usarse)
 - h. 5% mg de DIECA (poner al momento de usarse)
2. Buffer de extracción STE
 - a. 100 mM Tris-HCl pH 8
 - b. 50 mM EDTA pH 8
 - c. 100 mM NaCl
 - d. 2% 2-Mercaptoetanol
3. 20% SDS
4. 5 M Acetato de Potasio o Cloruro de Sodio
5. Acetato de sodio 3M
6. Buffer TE 1x
 - a. 10 mM Tris
 - b. 1 mM EDTA
7. Isopropanol grado molecular

Método:

1. Cortar aproximadamente 10-20 mg de tejido y colocarlo en tubo Eppendorf de 1.5 mL.
2. Dejar evaporar el alcohol de la muestra (1 a 2 hrs a 55°C).
3. Cortar finamente el tejido con navaja
4. Dejar secar alcohol por una hora más
5. Preparar Buffer de extracción CTAB y STE de acuerdo al número de muestras. Con concentraciones finales de 4% PVP, 5% ácido ascórbico, 5% DIECA y 2% β -mercaptoetanol para el buffer CTAB y de % β -mercaptoetanol para el buffer STE
6. Agregar a cada muestra:

- a. 180 μ L de Buffer de Extracción CTAB 4%
 - b. 675 μ L de Buffer STE
 - c. 60 μ L de SDS AL 20%
7. Incubar a 65°C toda la noche. Si es posible vortexear cada hora.
 8. Agregar 255 μ L de NaCl 5M o acetato de potasio 5M y dejar a -10° C, 10 min. Si no se pone turbio (blanco pastoso) agregar 100 μ L más.
 9. Centrifugar a 14 000 rpm durante 5 minutos.
 10. Transferir sobrenadante a un tubo nuevo Eppendorf.
 11. Agregar 300 μ L de Cloroformo-Alcoholisoamílico 24:1 y mezclar.
 12. Centrifugar a 14 000 rpm, 3 min.
 13. Recuperar sobrenadante y transferir a otro tubo Eppendorf. NO tomar nada de la capa intermedia o inferior
 14. Agregar 500 a 700 μ L de isopropanol absoluto frío, mezclar.
 15. Enfriar a -20°C durante toda la noche (1 hora mínimo).
 16. Centrifugar a 14 000 rpm por 10 min, eliminar sobrenadante por decantación. Tener cuidado de no perder el pellet
 17. Agregar 500 μ L de alcohol etílico al 80% **SIN MEZCLAR**, enfriar a -20°C por 30 minutos (mínimo).
 18. Centrifugar a 14 000 rpm por 1 min.
 19. Retirar el sobrenadante con mucho cuidado para evitar el desprendimiento del pellet.
 20. Secar en termoblock a 45°C hasta eliminar trazas de alcohol (olor).
 21. Resuspender DNA en 50 a 100 μ L de agua mili-Q ó TE.
 22. Almacenar a -20°C.

ANEXO 5. Características de los 28 pares de primers microsatelitales desarrollados para el cardón *Pachycereus pringlei* que no fueron marcados debido a inconsistencias durante la amplificación y/o patrón de multi-bandas en los geles de acrilamida. Ta = temperatura de alineamiento

Locus	Secuencia del primer (5' and 3')	Motivo repetitivo	T _a (°C)	Longitud primer (bp)	Comentarios (numero de bandas observadas)
<i>Ppri11</i>	F: TAAGAGACAGCCGCAAACC R: CCGACACGAAGGAAGAGAGT	(AG) ₁₈	59-63	183	Inconsistente
<i>Ppri12</i>	F: AGGAGTTGCAAAGCCAGTGT R: GGAGGAGGGCTAGATCGTG	(AG) ₁₃	58-62	171	Inconsistente (1-4 bandas)
<i>Ppri13</i>	F: CCATCAAGAGGCTAATCCCA R: TGCTTGAATCTTGAATCGA	(AG) ₁₂	65	166	Multi-bandas (4-8 bandas)
<i>Ppri14</i>	F: ACAGCTGCTAGGTTATCGGC R: AAGGCAGTAAGTCGAACCCA	(GAGACA) ₃ CACA (GA) ₁₀	65	154	Multi-bandas (2-8 bandas)
<i>Ppri15</i>	F: GTTTGCAGGATGTTTCGGTTTT R: TTGACGAACGGGTAGGAGAC	(AG) ₁₀	56-60	137	Inconsistente
<i>Ppri16</i>	F: GGTGTTCCCTCGCTCTCATT R: CTCGCAAATCCAAGCAAAT	(CT) ₁₁	68	115	Multi-bandas (3-6 bandas)
<i>Ppri17</i>	F: AAGAGACAGGGTGGGAGAGG R: TCCTATCACAGAAATGGCCC	(AG) ₁₄	59-63	112	Inconsistente, (>8 bandas)
<i>Ppri18</i>	F: CCGTCTGGTCAGATTCAGT R: TTTGATGTCGTAGGAAAGTATTGTT	(GT) ₁₇	57	110	Multi-bandas (>8 bandas)
<i>Ppri19</i>	F: ATTTCCATGTGAACTGGGGA R: GGTCAATCAACTGCGTCGCTA	(GA) ₁₂	58	111	Multi-bandas (2-6 bandas)
<i>Ppri20</i>	F: GGTGTTCCCTCGCTCTCATT R: CTCGCAAATCCAAGCAAAT	(CT) ₁₁	62	115	Multi-bandas, Inconsistente, (4 bandas)
<i>Ppri21</i>	F: CCTAACCAGATGATTCAAGCC R: GAAAGCCCAAGAATCAACCA	(AAAC) ₁₁	59-63	92	Inconsistente (2-8 bandas)
<i>Ppri22</i>	F: GCTTTTAAAGGGATACGGGC R: GACTTTACAAATGTACCTAAACTTGCA	(ATTT) ₆	62-68	106	Inconsistente
<i>Ppri23</i>	F: TTTGAAATGAGACAAGCCAAAA R: TCCACATGCTGTCTTTATACACA	(TTAA) ₇	56-60	90	Inconsistente (2-4 bandas)
<i>Ppri24</i>	F: GCATTTTCAGCAAACCAAAA R: GCATGACAAATGTTCTAAGTATAGCA	(GA) ₁₄	59	122	Multi-bandas (6-8- bandas)
<i>Ppri25</i>	F: TTGTCATCATATTTCAATGTAATTCTT	(TA) ₁₂	56-60	141	Inconsistente

<i>Ppri26</i>	R: AGTGAGAAATTGCTTGGGACA F: CATATATGAGGATTTGTATATGTTCC R: AAATTAACCAACGACTAACCCG	(TA) ₁₃	59	105	(4- bandas) Multi-bandas (>8 bandas)
<i>Ppri27</i>	F: TGGATAAGGCTTTACCAGC R: CCGTCGAAGATAAGACCTGTC	(CT) ₁₀	61-69	90	Inconsistente
<i>Ppri28</i>	F: AGACAGCGTTCCGACTCACT R: TGTTCAACGAAAAGGTAATAATCA	(GT) ₁₅	56-60	133	Inconsistente (2-4 bandas)
<i>Ppri29</i>	F: CACAATTCACGGAAGTGGAA R: TTGCTTGACCCTGTCTCTTA	(GA) ₁₇	54-64	102	Inconsistente (2-4 bandas)
<i>Ppri30</i>	F: ACGCTGTTACCAAACACGTC R: GCTCACTCAACCTAAAAGTTATGATG	(CT) ₁₂	61-69	90	Inconsistent
<i>Ppri31</i>	F: TCATATTAACAAGCACTAAAATGAA R: TTGCTTGCTCTGACACCACT	(CA) ₁₉	58	103	Multi-bandas (2-6 bandas)
<i>Ppri32</i>	F: GAGACAGAAAACCTATACAGAGTCCGA R: CTCCGTAATCGTCGGTTGAT	(GA) ₁₀	63	119	Inconsistente (2-4- bandas)
<i>Ppri33</i>	F: TGTGTATAGGAGACAGGGACACA R: TGTTGGCAATTTGATGCAAT	(GA) ₁₃	60-67	135	Inconsistente (2-8 bandas)
<i>Ppri34</i>	F: CCCACTTTTAAGCTGCATGTC R: ATAAAAGCAGTTGGACCCGA	(GA) ₁₃	56-60	186	Inconsistente
<i>Ppri35</i>	F: AGATGTGTATAGAGACAGGTATATG R: GTATTCTATTCTATTTATTCTGTGTAA	(TC) ₁₄	53-59	91	Inconsistente
<i>Ppri36</i>	F: CAAGTCATGTACGTGGGCAT R: AGTTCTGGCAGGTGCTGCAC	(TTTA) ₃ TTTC	65	90	Multi-bandas (3-6- bandas)
<i>Ppri37</i>	F: TGTTCCCCAAGAAACACCCC R: GAACTGGATGCCAGGGACTG	(GA) ₁₃	57	95	Multi-bandas (2-4 bandas)
<i>Ppri38</i>	F: TGCAGTACTGAGAACAGGGCA R: ACACATCGAGCAACCAAGGG	(GA) ₈	66	133	Multi-bandas (>8 bandas)

Anexo 6. Protocolo de fijación, tinción y squash para el conteo de cromosomas en *Pachycereus pringlei* (Modificado de Singh, 2003)

Material

1. Colchicine 0.2% (50 ng de Colchicina en 25 ml de agua destilada).
Almacenar a 4°C
2. Solución de Carnoy's I (3:1 etanol 100%: ácido glacial acético). Almacenar a 4°C
3. 1M HCl (Para 100 ml. 8.3 ml de HCL ~37% en 91.7 ml de agua destilada)
4. Fulgen staining
Para preparar 100 ml

Disolver gradualmente 0.5 g de Fuchsin (B D H Laboratory, Canada) en 100 ml de agua destilada hirviendo. Dejar enfriar hasta 50°C y filtrar (Papel filtro Whatman No.1). Posteriormente, agregar 15 ml de HCl 1M y 1.5 g de Metabisulfato de potasio ($K_2S_2O_8$, Fisher Scientific Co. Lawn, New Jersey #P-197). Envolver el frasco en papel aluminio y almacenar a 4°C toda la noche. La solución debe cambiar a un color café claro.

5. Hoyer solution

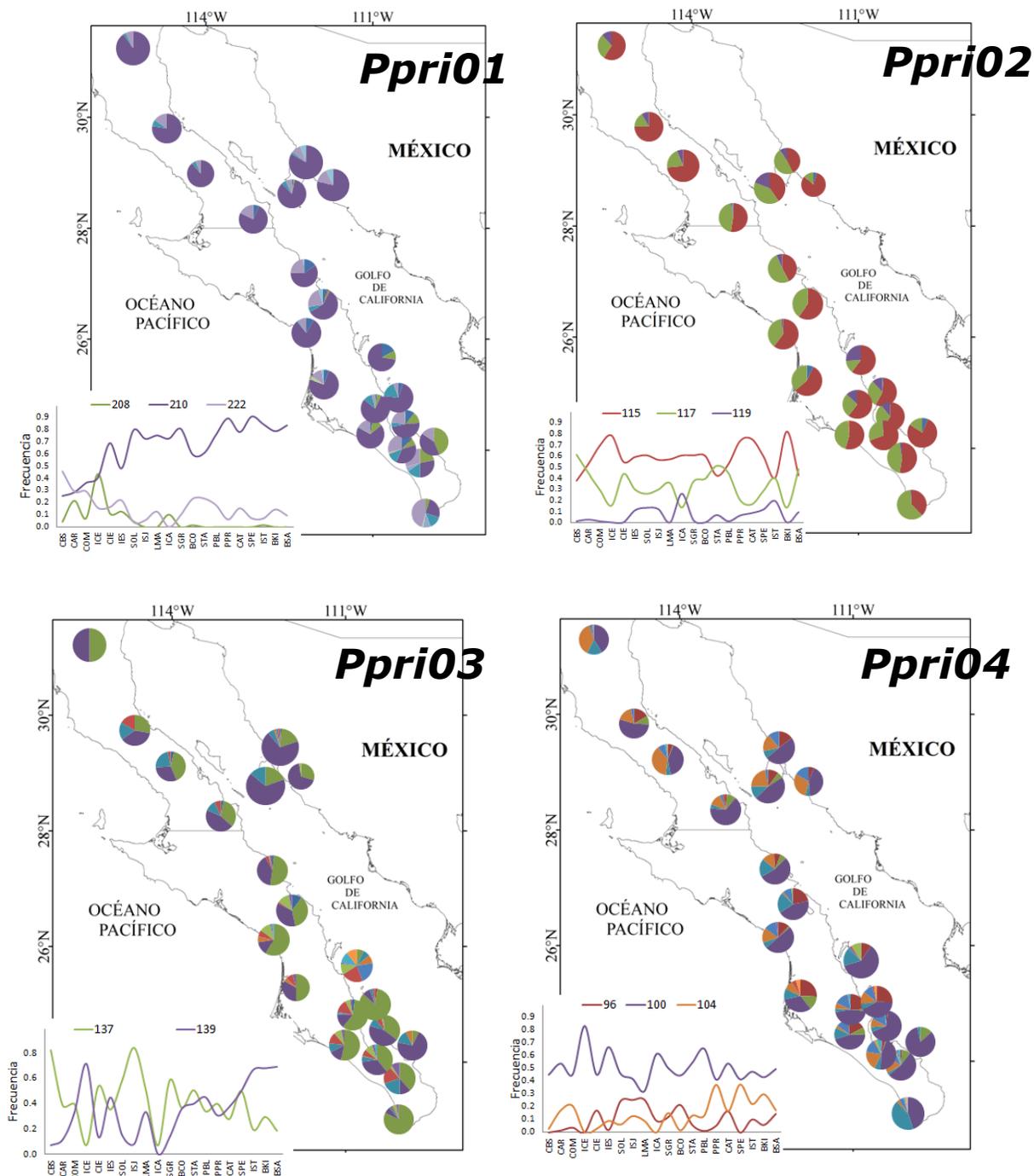
Procedimiento

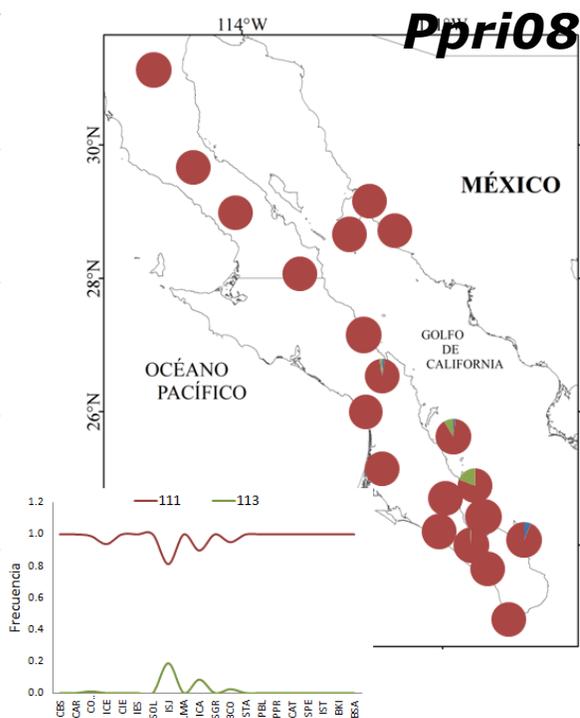
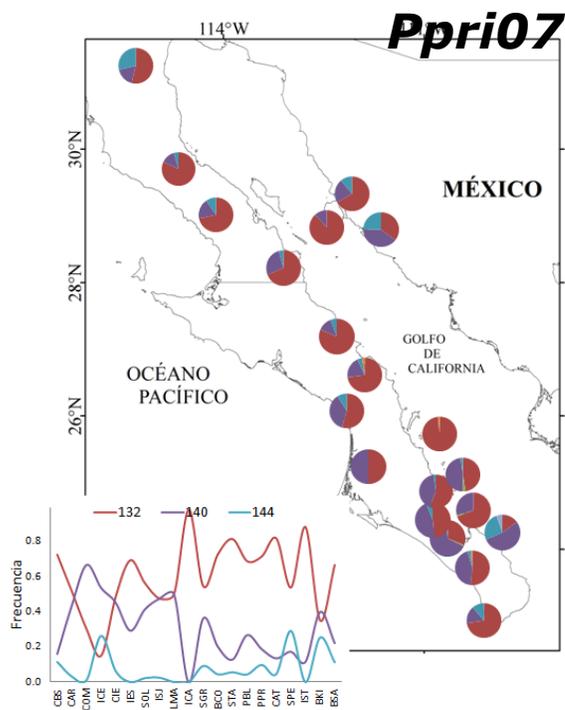
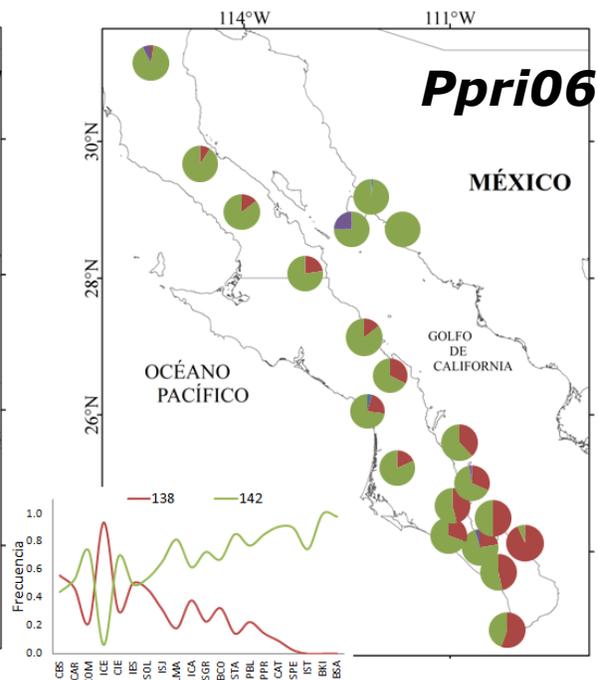
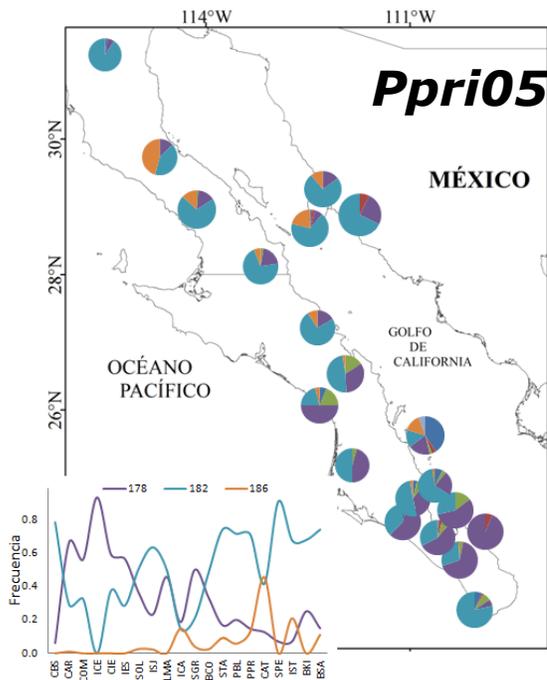
- Colectaron las raíces de varias plántulas (5-20 raíces) provenientes de un mismo fruto en un tubo eppendorf® de 1.5mL que contenga ~200 µL de Colchicina 0.2% y mantener a 4°C de 8 a 12 horas.
- Eliminar la Colchicina, enjuagando las raíces con agua destilada.
- Agregar Solución de Carnoy's e incubar por al menos 8 a 12 horas.
- Enjuagar las raíces con agua destiladas dos veces.
- Incubar en HCL 1M a 40-55 C° por 30 min.
- Enjuagar las raíces con agua destiladas dos a tres veces (el HCL debe ser

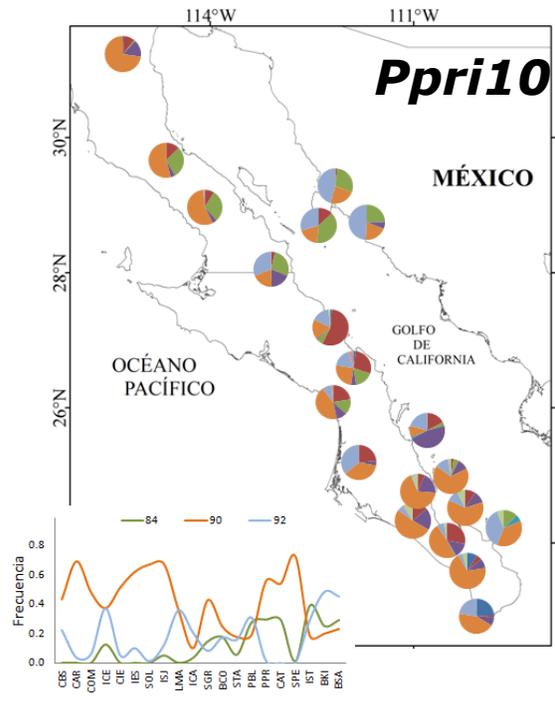
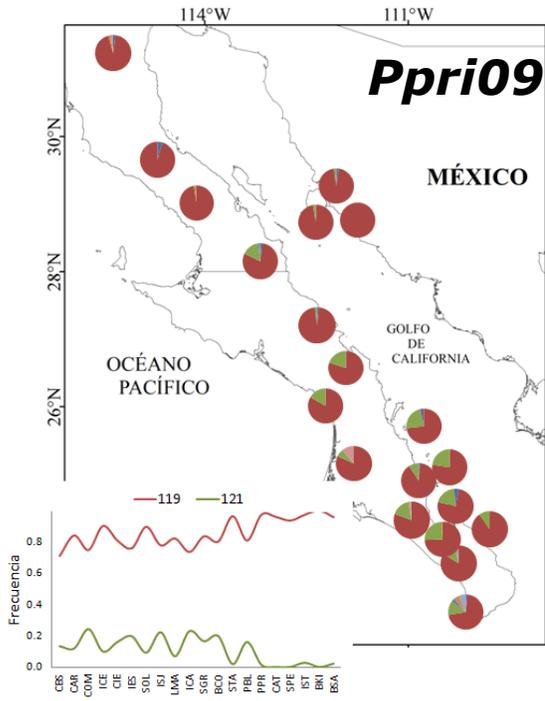
eliminado perfectamente).

- Agregar ~22 μ l de colorante Fulgen, cuidando que todas las raíces queden cubiertas
- Envolver en papel aluminio y dejar teñir por 2 - 4 horas a 4°C
- Enjuagar las raíces con agua destilada o ácido glácil acético. Solamente la punta de la raíz debe quedar teñida de color rosa fuerte, indicando tinción de material cromosómico
- Colocar las raíces en un porta objetos y cortar la fracción teñida con ayuda de una navaja y pinzas o aguja de disección. Eliminar el resto de tejido.
- Cortar finamente las puntas de las raíces con ayuda de una navaja y pinzas o aguja de disección. Este procedimiento se puede realizar bajo un microscopio estereoscópico (i.e 4X) para facilitar el corte. No dejar que las raíces se sequen durante este proceso. Si es necesario agregar gotas de agua o ácido glacial acético.
- Secar cuidadosamente el exceso de agua o ácido glacial acético con la punta de un papel secante y agregar una gota de solución de Hoyer's
- Colocar el cubre objetos tratando de no formar burbujas.
- Golpear (squash) gentilmente con la punta de un borrador de un lápiz para favorecer la separación de las células
- Observar a 40 y 100x en un microscopio. Para el aumento de 100X será necesario usar una gota de aceite de inmersión. Repetir el squash con el borrador del lápiz si es necesario
- Para adquirir una mejor imagen de los cromosomas se recomienda tomar fotos a distintas profundidades (enfoques) y producir una imagen compuesta

ANEXO 7. Distribución de las frecuencias alélicas a lo largo de las localidades de *Pachycereus pringlei* en cada uno de los diez microsatélites empleados para los análisis moleculares. Las gráficas de “pie” muestran la distribución de todos los alelos en cada localidad mientras que las los histogramas muestran las frecuencias de los alelos más abundantes.







ANEXO 8. Comparaciones pareadas entre localidades de *Pachycereus pringlei* determinadas a partir de A) una base de datos diploide (F_{ST}) y B) una base de de datos de presencia ausencia. Las comparaciones pareadas fueron construidas a partir de diez loci microsatelitales. El grado de diferenciación genética aumenta de blanco a azul fuerte

A) Comparaciones pareadas a partir de una base de datos diploide (F_{ST})

	CBS	CAR	COM	ICE	CIE	IES	SOL	ISJ	LMA	ICA	SGR	BCO	STA	PBL	PPR	CAT	SPE	IST	BKI	BSA	Promedio		
CBS																						0.17	
CAR	0.12																						0.12
COM	0.16	0.04																					0.11
ICE	0.32	0.14	0.17																				0.28
CIE	0.12	0.02	0.03	0.19																			0.09
IES	0.13	0.03	0.05	0.12	0.03																		0.10
SOL	0.11	0.06	0.07	0.23	0.02	0.05																	0.10
ISJ	0.10	0.09	0.08	0.29	0.04	0.09	0.02																0.12
LMA	0.14	0.09	0.04	0.23	0.02	0.06	0.05	0.05															0.08
ICA	0.22	0.18	0.19	0.29	0.15	0.14	0.16	0.19	0.15														0.18
SGR	0.15	0.07	0.05	0.23	0.01	0.05	0.04	0.05	0.01	0.13													0.09
BCO	0.10	0.08	0.06	0.20	0.04	0.03	0.06	0.08	0.01	0.11	0.02												0.07
STA	0.14	0.18	0.14	0.37	0.12	0.14	0.13	0.15	0.06	0.19	0.10	0.04											0.13
PBL	0.12	0.13	0.11	0.28	0.07	0.09	0.09	0.10	0.02	0.14	0.08	0.02	0.05										0.09
PPR	0.19	0.17	0.15	0.36	0.10	0.13	0.08	0.11	0.08	0.19	0.09	0.07	0.10	0.05									0.12
CAT	0.20	0.14	0.13	0.34	0.11	0.10	0.10	0.13	0.09	0.14	0.08	0.06	0.11	0.07	0.01								0.12
SPE	0.18	0.18	0.15	0.40	0.12	0.15	0.09	0.11	0.11	0.25	0.13	0.10	0.12	0.08	0.04	0.10							0.14
IST	0.21	0.22	0.19	0.37	0.16	0.16	0.17	0.19	0.09	0.18	0.15	0.07	0.08	0.03	0.08	0.08	0.13						0.14
BKI	0.24	0.19	0.13	0.34	0.13	0.15	0.15	0.16	0.04	0.23	0.13	0.08	0.13	0.04	0.10	0.12	0.11	0.09					0.14
BSA	0.22	0.22	0.19	0.37	0.16	0.17	0.18	0.19	0.08	0.22	0.16	0.08	0.09	0.03	0.09	0.11	0.12	0.02	0.03				0.14

B) Comparaciones pareadas a partir de una base de datos de presencia / ausencia (Φ_{PT})

	CBS	CAR	COM	ICE	CIE	IES	SOL	ISJ	LMA	ICA	SGR	BCO	STA	PBL	PPR	CAT	SPE	IST	BKI	BSA	Promedio		
CBS																						0.17	
CAR	0.13																						0.15
COM	0.14	0.07																					0.11
ICE	0.30	0.22	0.20																				0.25
CIE	0.12	0.05	0.05	0.22																			0.10
IES	0.14	0.04	0.05	0.19	0.05																		0.11
SOL	0.14	0.08	0.08	0.26	0.03	0.04																	0.12
ISJ	0.10	0.11	0.07	0.25	0.04	0.08	0.02																0.10
LMA	0.14	0.12	0.05	0.24	0.04	0.09	0.09	0.05															0.10
ICA	0.23	0.23	0.18	0.25	0.16	0.18	0.17	0.17	0.20														0.19
SGR	0.15	0.09	0.04	0.20	0.00	0.04	0.04	0.03	0.04	0.14													0.09
BCO	0.10	0.12	0.07	0.23	0.05	0.05	0.08	0.08	0.05	0.15	0.03												0.09
STA	0.16	0.21	0.13	0.34	0.14	0.14	0.16	0.15	0.08	0.22	0.12	0.06											0.15
PBL	0.14	0.15	0.10	0.25	0.08	0.10	0.10	0.09	0.05	0.17	0.07	0.05	0.08										0.10
PPR	0.20	0.18	0.13	0.33	0.13	0.14	0.10	0.10	0.14	0.21	0.10	0.11	0.14	0.07									0.13
CAT	0.21	0.19	0.11	0.25	0.13	0.15	0.14	0.11	0.11	0.16	0.10	0.13	0.17	0.07	0.07								0.13
SPE	0.16	0.20	0.12	0.30	0.13	0.15	0.13	0.09	0.10	0.23	0.11	0.14	0.13	0.10	0.09	0.07							0.14
IST	0.19	0.22	0.14	0.25	0.16	0.15	0.16	0.12	0.10	0.16	0.12	0.09	0.08	0.05	0.07	0.05	0.10						0.12
BKI	0.23	0.24	0.14	0.19	0.18	0.18	0.18	0.14	0.11	0.24	0.13	0.12	0.18	0.11	0.12	0.14	0.12	0.08					0.15
BSA	0.19	0.22	0.16	0.29	0.15	0.16	0.18	0.14	0.09	0.22	0.13	0.10	0.12	0.04	0.10	0.10	0.11	0.02	0.09				0.14