



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO.**

FACULTAD DE BIOLOGÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**VARIACIÓN GENÉTICA INTERPOBLACIONAL E INTRAPOBLACIONAL EN
Lupinus elegans H. B. K. CON MARCADORES MOLECULARES (RAPD's).**

TESIS

Que como requisito para obtener el grado de

MESTRO EN CIENCIAS

en Conservación y Manejo de Recursos Naturales

presenta:

NANCY ALEJANDRE MELENA.

Directora de Tesis:

DRA. SABINA IRENE LARA CABRERA.

Morelia, Michoacán, México. Agosto de 2006.



FACULTAD

DE

BIOLOGÍA

C. DR. JAVIER PONCE SAAVEDRA,
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
DE LA FACULTAD DE BIOLOGIA, UMSNH
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis de Grado titulada "**VARIACION GENETICA INTERPOBLACIONAL E INTRAPOBLACIONAL DE *Lupinus elegans* HBK CON MARCADORES MOLECULARES (RAPD's)**", Presentado por la Biol. Nancy Alejandre Melena, estudiante del programa de **Maestría en Conservación y Manejo de Recursos Naturales**, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicada y defendida en Examen Profesional de Grado.

Agradecemos de antemano su atención y reiteramos a Usted nuestra más alta y distinguida estima.

ATENTAMENTE

Morelia, Mich., a 6 de julio de 2006

MIEMBROS DE LA COMISION REVISORA

Sabina I. Lara Cabrera

DRA. SABINA IRENE LARA
CABRERA
DIRECTOR DE TESIS

[Signature]

DR. ROBERTO A. LINDIG CISNEROS
PRESIDENTE

[Signature]

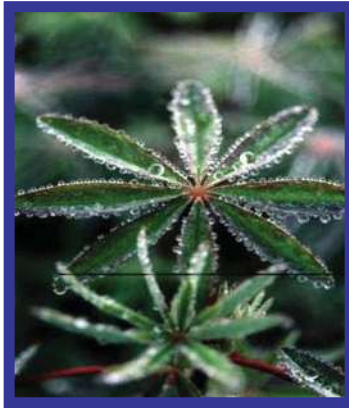
DR. MIGUEL MARTINEZ TRUJILLO
SECRETARIO

Cuahtemoc Saenz R.

DR. CUAUHTEMOC SAENZ ROMERO
VOCAL

Nidia Pérez Nasser

M.C. NIDIA PEREZ NASSER
VOCAL



El éxito se constituye superando debilidades. Cada historia de éxito es la historia de un valor, de un compromiso con algo más elevado.

Frederick Harmon.

DEDICATORIA

A mi esposo:

Rodrigo Hilario Domínguez

Por todo el amor, apoyo y comprensión y por compartir esta etapa tan importante en mi vida.

A mis padres:

Heladio Alejandro Hernández y Enequina Melena López

Los que no solo me dieron la vida sino amor en todo momento, apoyo incondicional, confianza y libertad para tomar mis propias decisiones y con quienes comparto esta otra etapa de mi vida profesional.

A mis hermanos:

Juan Luis, Alejandro, Araceli, Adriana, Elizabeth y Raquel

A quienes agradezco todo el amor, apoyo y la dicha de crecer y aprender con y de ellos cada día.

A mis abuelos y Suegra:

Simón Alejandro y
María Santos Hernández

Manuel Melena+ y
María del Refugio López

Ángela Domínguez.

Por sus consejos y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis fue financiada por el proyecto:

CONACYT (SEMARNAT-2002-C01-0760).

A mi asesora Dra. Sabina Irene Lara Cabrera por haberme permitido formar parte de este proyecto, por su paciencia, comprensión y apoyo en todo momento, con respeto y admiración.

A los integrantes de la comisión revisora Dr. Roberto Antonio Lindig Cisneros, Dr. Miguel Martínez Trujillo, Dr. Cuahutemoc Sáenz Romero, M. C. Nidia Pérez Nasser por sus valiosos comentarios durante las revisiones del manuscrito.

Al Dr. Ken Oyama, por permitirme usar el Laboratorio de Ecología Genética.

De manera muy especial a la M. C. Nidia Pérez Nasser, por la capacitación, conocimiento de las técnicas moleculares y programas empleadas para RAPD.

M. C. Ana Luisa Herrera por ayuda en este trabajo..

A los que en diferentes momentos me apoyaron: Mariela, Esteban, Pedro, Arnulfo, Brenda y Josué.

Al Herbario Nacional de la Universidad Nacional Autónoma de México (MEXU) y a la Dra. Norma Oropeza por su colaboración en la identificación de la especie.

Al Centro de Investigaciones en Ecosistemas de la Universidad Nacional Autónoma de México (campus Morelia).

A la universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, a la Facultad de Biología, por haberme dado la oportunidad de ser Universitaria.

A la Maestría en Conservación y Manejo de Recursos Naturales por aceptarme como alumna y haberme otorgado una beca para realizar esta etapa de superación en mí vida. A cada uno de los profesores presentes en mí formación.

A mis padres y esposo por su apoyo incondicional, por sus consejos y ayuda en todo este tiempo.

A Mariela y Esteban por brindarme su amistad y continuar en otra etapa más.

A José Luis Ábrego Aranda por su apoyo y amistad.

A todos mis compañeros de la Licenciatura de la Facultad de Biología 98-04 y de la maestría 04-06.

A todas y cada una de las personas que estuvieron presentes y que de alguna forma influyeron para la realización de esta importante etapa.

“ Gracias.”

La presente tesis fue realizada en el
Laboratorio de Fisiología Vegetal y Sistemática Molecular
de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
bajo la asesoría de la Dra. Sabina Irene Lara Cabrera.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
I.- INTRODUCCIÓN.....	3
II.- ANTECEDENTES.....	5
2.1. Genética de poblaciones.....	5
2.2. Diversidad genética.....	5
2.3. Marcadores moleculares.....	6
2.3.1. RAPD (polimorfismo del ADN amplificado al azar).....	7
2.3.2. Los RAPD para detectar polimorfismo entre poblaciones.....	8
2.3.3.1. Marcadores moleculares en proyectos de restauración.....	9
2.3.4. Proyecto de restauración de Bosques de Coníferas.....	10
2.3.5. <i>Lupinus elegans</i> HBK.....	10
2.3.6. Distribución.....	12
Hipótesis planteadas.....	13
III.- OBJETIVO GENERAL.....	14
3.1. Objetivos particulares.....	14
IV.- DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.....	15
4.1. Localización de la Comunidad indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro Michoacán México.....	15
4.2. Suelos.....	15
4.3. Clima.....	16
4.4. Tipos de vegetación y composición florística de la comunidad indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro.....	16

V.- METODOLOGÍA.....	18
5.1.1. Colecta de las poblaciones de <i>Lupinus elegans</i> HBK.....	18
5.1.2. Extracción de ADN.....	19
5.1.3. Cuantificación de ADN.....	19
5.1.4. Amplificación de ADN por medio de RAPD.....	19
5.1.5. Electroforesis y fotografiado de las muestras.....	20
5.1.6. Análisis de datos.....	21
5.1.5.1. Interpretación de los geles.....	21
5.1.6.2. Diversidad genética.....	21
5.1.6.3. AMOVA.....	22
5.1.6.4. Distancias genéticas.....	22
VI.- RESULTADOS.....	23
6.1. Análisis genético.....	23
6.2. Diversidad Genética.....	24
6.3. Distancias genéticas.....	26
6.4. AMOVA.....	29
6.5. Prueba de Mantel.....	29
VII.- DISCUSIÓN.....	31
VIII. – CONCLUSIONES.....	33
IX.- LITERATURA CITADA.....	34

Anexo I. Protocolo de extracción del ADN MINI-PREP.....	40
Anexo II. Protocolo de Cuantificación de ADN por espectrofotometría.....	43
Anexo III. Secuencias de oligonucleótidos utilizados.....	44
Anexo IV. Receta para geles de agarosa.....	45

Índice de Figuras.

Figura 1. <i>Lupinus elegans</i> HBK.....	11
Figura 2. Mapa de los sitios más comunes en donde se encuentra <i>Lupinus elegans</i> HBK. para México.....	12
Figura 3. Localización de los sitios de colecta de <i>L. elegans</i> y del sitio a restaurar.....	19
Figura 4. Patrón de bandeo obtenido con los oligonucleótidos F17,F-16,F-01, C-11, B-17, B-3 Operon Technology), con diferentes muestras de las poblaciones San Nicolás, Charapan y Pico de Tancítaro.....	24
Figura 5. Fendograma (UPGMA) basado en las distancias genéticas de Nei de las poblaciones de <i>Lupinus elegans</i>	27
Figura 6. Fenograma (UPGMA) basado en el Coeficiente Simple de Matching con todos los individuos de cada una de las poblaciones.....	28
Figura 7. Correlación entre la distancias geográficas y la distancias genéticas de Nei de <i>Lupinus elegans</i> HBK., Regresión lineal: $y = 0.07809 + 0.00028x$; $r^2 = 0.499$; $P = 0.003$	30

Índice de Cuadros.

Cuadro 1. Descripción de los sitios de colecta de tejido de hoja de <i>Lupinus elegans</i> HBK.....	18
Cuadro 2. Número de bandas polimórficas y monomórficas obtenidas con los 10 oligonucleótidos	23
Cuadro 3. Variación genética de todos los loci por población en el programa POPGEN v 1.31 (Yeh <i>et al.</i> 1999).....	25
Cuadro 4. Identidad Genética y Distancias Genéticas de Nei para las 6 poblaciones obtenidas con el programa POPGEN.	26
Cuadro 5. Análisis de Varianza Molecular y Coeficiente de diferenciación (F_{st}) para las poblaciones de <i>Lupinus elegans</i> HBK.....	29

RESUMEN.

Lupinus elegans HBK. es una especie representativa de la Flora del Centro-Occidente de México. Esta especie se utiliza en proyectos de restauración de bosques de coníferas en la Meseta Purépecha porque crea microambientes para el establecimiento de especies de *Pinus*, además de fijar nitrógeno y mejorar las condiciones del suelo empobrecido. En este estudio se evalúa la variación genética de poblaciones de *L. elegans* por medio de RAPD. Se colectaron un total de 159 individuos en seis poblaciones del estado de Michoacán: Cerro de Pario, Charapan, Pico de Tancítaro, San Nicolás, Villa Madero y Zitácuaro. Los resultados obtenidos muestran una variación genética (H_{ca} 0.20) y porcentaje de loci polimorficos de 60. El AMOVA muestra mayor variación genética dentro de las poblaciones de *Lupinus elegans* (58 %), que entre poblaciones (42 %) probablemente debido al comportamiento de los polinizadores y a condiciones de fragmentación de la vegetación. Los dendrogramas UPGMA generados con el coeficiente de Apareamiento Sencillo (Simple Matching) y en las distancias genéticas de Nei, agrupan a las poblaciones de Pico de Tancítaro, Villa Madero, Cerro de Pario y San Nicolás. Se encontró una correlación marginal entre las distancias genéticas y las distancias geográficas para las seis poblaciones $r = 0.7065$; $P = 0.0670$. Las poblaciones con relativamente mayor variación genética fueron las de Pico de Tancítaro, San Nicolás y Cerro de Pario de las cuales se podría obtener semilla para la restauración ecológica del dosel de bosques de coníferas en la Meseta Purépecha.

SUMMARY

Lupinus elegans HBK. is a common species in the West-Central region of México. *L. elegans* has been used as a species for the restoration of degraded conifer forests in the Meseta Purépecha mainly because it creates a microenvironment suitable for the establishment of *Pinus* species and it also increases the nitrogen conditions of depraved soil. In this study I determined the genetic variation of *L. elegans* populations using RAPD's. I collected a total of 159 individuals in six populations in Michoacán; Cerro de Parí, Charapan, Pico de Tancítaro, San Nicolás, Villa Madero y Zitácuaro. Results indicate genetic variation (H) *ca* 0.20 and 60 % of polymorphism. AMOVA showed higher genetic variation within (58 %) than among (42 %) populations, probably due to pollinator behavior and forest fragmentation. I generated two UPGMA trees, one based in the Simple Matching Coefficient and a second tree based on Nei's genetic distances. Both trees cluster the populations of Pico de Tancítaro, Villa Madero, Cerro de Parí and San Nicolás. A marginal correlation was found between genetic and geographic distances ($r = 0.7065$; $P = 0.0670$). The populations from Pico de Tancítaro, San Nicolás and Cerro de Parí had the highest genetic variation and could be used to obtain seed for the restoration of forests within the Meseta Purépecha.

I.-INTRODUCCIÓN.

Los estudios sobre la variación genética de poblaciones son de suma importancia para tomar decisiones correctas sobre el manejo de los recursos genéticos, ya que la variación sirve como materia prima de la evolución y está relacionada con la habilidad de las poblaciones para adaptarse a cambios ambientales (Fisher, 1930).

La información sobre los niveles y patrones de variación genética juegan un papel muy importante para la conservación y el manejo de los recursos genéticos, además determinan el potencial evolutivo de una especie o población (Furnier, 1995). Los patrones de variación genética se encuentran determinados por los efectos de los procesos evolutivos como es la deriva génica, migración (flujo génico), sistemas reproductivos, mutación, selección natural y factores ecológicos y biogeográficos (Wright, 1951).

Los marcadores moleculares han facilitado los estudios de variación genética en las poblaciones, ya que por medio de estos es posible estimar directa o indirectamente los niveles de flujo génico, la variación genética compartida dentro y entre poblaciones a través del tiempo, usando parámetros como el índice de fijación subpoblacional (F_{st}) (Wright 1951), por medio del cual se estima el porcentaje de endogamia dentro de una población (McKay *et al.*, 2005). Estos parámetros nos dan una idea de cómo se encuentra la población genéticamente, ya que si la variación es baja la población se podría reducir dando lugar a la fijación de alelos deletéreos que la harán más susceptible a enfermedades, parásitos y a la estocasticidad ambiental y demográfica y más pronto llegara a la extinción (Hufford y Mazer, 2003; Frankham, 1995)

La importancia de conocer la variación genética en proyectos de restauración está en evitar la introducción de genotipos foráneos que pueden mermar el éxito de los proyectos a mediano y largo plazo, ya que las poblaciones nativas se encuentran adaptadas a condiciones locales. Es necesario conjuntar esta información con la de otros estudios de morfología y ensayos de jardín común para sugerir poblaciones candidato para restaurar. Es importante conocer qué poblaciones están localmente adaptadas o tienen el potencial adaptativo. Se tienen evidencias donde los genotipos locales expresan fenotipos no óptimos para el desarrollo de las especies en condiciones locales o por el contrario existen especies invasoras que han

demostrado tener genotipos no locales, pero poseen la habilidad de crecer y competir en ambientes nuevos (Hufford y Mazer, 2003; Galloway y Fenster, 2000).

En el presente estudio se plantea hacer recomendaciones encaminadas a la selección de poblaciones de *Lupinus elegans* HBK. para restaurar bosques de coníferas en el rango de distribución de esta especie. Esta decisión será ponderada por diversas evidencias que incluye el presente estudio en donde se pretende conocer la variación genética mediante los marcadores conocidos como RAPD (Polimorfismo de fragmentos de ADN generados al azar) para poblaciones, además paralelamente se realizan estudios de atributos morfológicos importantes para la restauración en condiciones de jardín común.

Los RAPD han sido ampliamente utilizados para conocer la diversidad y distancia genética (Black Samuelsson y Lascoux, 1999; Black Samuelsson *et al.* 1997; Gustafson *et al.* 2002; Crawford, *et al.* 1998; Jayanthi y Mandal, 2001; Bedolla-García y Lara-Cabrera, 2006; Alexander *et al.* 2004) y por primera vez esa información será utilizada en el marco de un proyecto de restauración. Los RAPD, tiene varias ventajas entre las que se destacan, que no requieren del conocimiento previo sobre la secuencia del genoma del taxa, es un marcador hipervariable y requiere de relativamente poca inversión en infraestructura en comparación con otras técnicas (Wolf y Liston, 1999; Williams *et al.* 1990). La información que se obtiene de los RAPD indicará lo diversas que son las poblaciones evaluadas y ayudarán a determinar poblaciones candidato de las que se obtendrá semilla para restaurar bosques de coníferas en la Comunidad de Nuevo San Juan Parangaricutiro.

II.-ANTECEDENTES.

2.1. Genética de poblaciones.

La genética de poblaciones es la disciplina biológica que suministra los principios teóricos de la evolución. En esta ciencia se parte del supuesto de que los cambios evolutivos a pequeña escala, los que se dan en el seno de las poblaciones de las especies, contienen todos los elementos necesarios para explicar toda la evolución, pues la macroevolución, o evolución a gran escala, no sería más que la extrapolación en el espacio y en el tiempo de los procesos básicos de las poblaciones (Dobzhansky, 1975).

Casi todas las especies están formadas por una o más poblaciones de individuos que se cruzan entre sí, formando una comunidad de intercambio genético denominada *población mendeliana*. Esta población es el sustrato básico donde se forja la evolución. En el seno de la población se da el hecho inevitable de que algunos individuos dejan más descendientes que otros. Como el único componente que se transmite de generación en generación es el material genético (los genes), el que un individuo deje más descendientes implica que sus genes estarán mayormente representados en la siguiente generación. De este modo, las frecuencias de los distintos genes cambiarán de una generación a otra, y este cambio será irreversible cuando se considera el conjunto de los genes de la población, pues es muy improbable que se vuelva a una configuración previa en todos los genes. Por tanto, desde el punto de vista de la población, la evolución es en último término un cambio acumulativo e irreversible de las proporciones de las diferentes variantes de los genes, o alelos en las poblaciones (Dobzhansky, 1975)

2.2. Diversidad genética.

Por diversidad genética se entiende la variación de los genes dentro y entre poblaciones de la misma o de diferentes especies. La tasa de cambio evolutivo en una población es proporcional a la diversidad genética disponible, según el teorema fundamental de la selección natural (Fisher, 1930). Cuando la diversidad genética disminuye, también se reduce el potencial evolutivo de la población para responder a cambios ambientales y por lo tanto se reducen las opciones evolutivas en el futuro (Dobzhansky, 1975)

En las poblaciones existe variabilidad debida a causas genéticas o bien debidas a causas ambientales. La variación genética puede medirse obteniendo el polimorfismo o la heterocigosidad.

Existen diferentes tipos de polimorfismo como son:

- polimorfismo referente a variaciones morfológicas. Ej: guisantes lisos/rugoso; verdes/amarillos,
- polimorfismo cromosómico: Ej: número y morfología de los cromosomas,
- polimorfismo inmunológico. Producción de antígenos en vertebrados.
- polimorfismo protéico: Una proteína puede tener diferentes secuencias de aminoácidos (distinta carga neta) (Dobzhansky, 1975).
- polimorfismo del tamaño en pares de bases de fragmentos de ADN amplificados
- polimorfismo en secuencias de ADN

Hasta hace poco tiempo la posibilidad de medir la variación a nivel de proteínas y de ADN no era factible, sin embargo, avances recientes en biología molecular proveen las herramientas para analizarla.

2.3. Marcadores moleculares.

Actualmente, existe un gran número de marcadores moleculares los cuales se definen como biomoléculas que se pueden o no relacionar con un rasgo genético particular y se emplean de acuerdo a lo que se quiera analizar. Cuando algunos loci se asocian indiscutiblemente a un rasgo genético, se dice que constituyen un QTL (loci de rasgos cuantitativos o cuantificables) (Avisé, 1994).

Las biomoléculas que pueden ser marcadores moleculares se pueden clasificar en dos grandes grupos: las proteínas (antígenos e isoenzimas) y el ADN (genes o fragmentos de ADN conocidos o de función desconocida) (Simpson, 1997). Un marcador molecular monomórfico

es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando se presentan diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura o sitios de restricción, se dice que es polimórfico (Awise, 1994).

Un marcador molecular genético se basa en la variación de la secuencia del ADN (Simpson, 1997). Por medio de estos se puede detectar la variación intraespecífica de las poblaciones naturales, permitiendo estudiar directamente el material genético.

Los análisis de ADN por medio de marcadores moleculares nos proporcionan una medición cuantitativa y cualitativa confiable ya que no se ven afectados por el ambiente y carecen de efectos pleiotrópicos. Las aplicaciones de los marcadores moleculares son muy diversas; se han empleado para conocer la diferenciación de individuos, análisis filogenéticos y sistemáticos, mapeos del genoma, cuantificación de variabilidad génica intra e interespecífica, mejoras genéticas, localización de genes de resistencia a enfermedades, análisis de paternidad de individuos de diferentes poblaciones (Zavala *et al.* 2002)

2.3.1. RAPD (polimorfismo del ADN amplificado al azar).

El análisis de RAPD es una técnica implementada por primera vez por William y colaboradores (1990), son marcadores moleculares generados por la amplificación de segmentos aleatorios de ADN. La amplificación se lleva a cabo por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde se utilizan oligonucleótidos (oligos) de 10 pares de bases en ADN genómico. Los oligonucleótidos se acoplan en lugares específicos y sirven como punto de inicio y punto final para la síntesis de la enzima *Taq ADN polimerasa* formándose de esta manera un nuevo segmento de ADN el cual es amplificado. Las bandas son generadas por los múltiples sitios de acoplamiento para cada oligo en particular. Las diferencias en el número de bandas (polimórficas) se deben a los diferentes sitios de acoplamiento con cada oligo utilizado y la ausencia de una banda indica una mutación en el sitio por la inserción o una delección. (Jiménez *et al.* 2000; Wolf y Listón, 1999).

Los fragmentos amplificados son separados por electroforesis en agarosa, son teñidos con bromuro de etidio y son visualizados con luz ultravioleta, es una técnica útil para detectar

altos niveles de polimorfismo genético en diferentes organismos ya que se evalúan numerosos loci en todo el genoma del organismo (Ender *et al.* 1996), además de tener numerosas ventajas enlistadas a continuación.

- No requieren información previa de secuencias o síntesis de oligos específicos.
- Evalúan numerosos loci en todo el genoma del organismo (de 1 a 20 productos amplificados por oligo).
- Son altamente eficientes en la identificación de polimorfismos en todo el genoma.
- Los oligos que se utilizan están ampliamente representados en cualquier genoma.
- Requieren bajas concentraciones de ADN (10ng).
- No se requiere de mucho equipo especializado.
- No involucra radioactividad para su detección.
- Pueden servir como sonda para otras técnicas moleculares como RFLP's.

A pesar de sus ventajas a lo largo de los años se han encontrado algunas desventajas que son importantes de considerar en los estudios para superarlas y tener mayor certeza de los resultados, las principales son dos; la primera es que son marcadores dominantes por lo que los heterocigotos no son detectables. Y la segunda es que la intensidad de las bandas puede variar por factores aún desconocidos por lo que se deben estandarizar las condiciones de amplificación para todo el estudio; esto implica utilizar el mismo lote de reactivos, utilizar el mismo termociclador, las mismas cámaras de electroforesis y asegurarse de la repetibilidad de las bandas obtenidas (Ender *et al.* 1996).

2.3.2. Los RAPD para detectar polimorfismo entre poblaciones.

Los RAPD han sido ampliamente usados para estudios de diversidad genética poblacional en diferentes taxa, a continuación se mencionan algunos: *Vicia pisiiformis* L.(Black-Samuelsson y Lascoux, 1999; Black- Samuelsson *et al.* 1997; Gustafson *et al.* 2002), *Medicago truncatula* Gaertn. (Bonnin *et al.* 2001), *Oryza malampuzhaensis* Krish (Thomas, *et al.* 2001), *Astragalus oniciformis* Barneby. (Alexander *et al.* 2004); *Crotalaria longipes* Raf. (Jayanthi y Mandal, 2001), *Desmodium sumichrastii* (Schinder) Standley. (Bedolla y Lara-Cabrera, 2006) y en relaciones entre especies (González *et al.* 2004; Segarra y Catalán, 2003),

para niveles de diversidad y diferenciación entre poblaciones (Aagaard, *et al.* 1998), variación genética de poblaciones con fines de conservación y manejo (Leimu y Mutikainen, 2005; Jacquemyn, *et al.* 2006).

En el género *Lupinus*, Talhinhos y colaboradores, (2003) realizaron un estudio con diferentes especies de este genero utilizando marcadores moleculares (AFLP, ISSR y RAPD), donde encontraron bajos niveles de similitud genética entre las especies donde *L. pilosus* L. y *L. cosentinii* Guss, *L. mutabilis* Sweet. y *L. polyphyllus* Lindl. y entre *L. luteos* L., *L. hispanicus* Bioss. & Reut. y *L. angustifolius* L., estos resultados los atribuyen a los procesos de divergencia de las regiones no codificadas, que representan una proporción importante del genomas de dichas especies especies.

2.3.3.1. Marcadores moleculares en proyectos de restauración.

En la restauración ecológica es indispensable proponer rangos de colecta en función de la diversidad fenotípica y genética de caracteres -tanto adaptativos como neutrales o casi neutrales a la selección- de las especies del sotobosque con potencial para restauración, para no introducir genotipos fuera de su rango natural de distribución, debido a los problemas de alteraciones en la estructura genética de las poblaciones originales permanentes, de pérdida de diversidad y falta de adaptabilidad que pueden ser ocasionados (Ledig, 1992).

Rice y Emery (2003), indican sobre la importancia que tiene el realizar este tipo de estudios mencionando que la variación genética interviene en la habilidad adaptativa de las poblaciones para enfrentar efectivamente los cambios que ocurren por variaciones climáticas y otros factores naturales, por lo que para hacer restauraciones ecológicas y conservación de los recursos es necesario que los biólogos de la restauración conozcan la arquitectura genética de las poblaciones, para así, incrementar sus posibilidades de éxito.

Expertos en restauración ecológica han planteado la necesidad de conocer el polimorfismo de marcadores moleculares para determinar la variación genética y lograr un proyecto de restauración exitoso a mediano y largo plazo (McKay *et al.* 2005). En este estudio se eligió la técnica de RAPD que ha sido ampliamente utilizada en plantas y en particular en leguminosas en análisis de variación genética en plantas, en las relaciones de parentesco local, identificación de cultivares, estudios de flujo génico y estudios de mapeo genético (Otero *et al.*

1997, Artyukova *et al.* 2004; Black-Samuelsson *et al.* 1997; Bonnín *et al.* 2001; Campos-de-Quiroz y Ortega-Klose 2001; Crawford *et al.* 1998; Gonzalez-Andres y Ortiz 1995; Gustafson *et al.* 2002; Jayanthi y Mandal 2001).

2.3.4. Proyecto de restauración de Bosques de Coníferas.

Este proyecto forma parte de un estudio de restauración del bosque de coníferas de la Comunidad de Nuevo San Juan Parangaricutiro que busca delinear estrategias para la restauración de bosques de coníferas con diferentes niveles de degradación en la Meseta Purhépecha.

A la fecha se tienen avances en varios ámbitos: se ha determinado que *Lupinus elegans* HBK. crea un microambiente para los pinos ya que los pinos que se encuentran cerca de esta especie tienen un mejor desempeño en el ambiente en que se encuentran, además se tienen ya varios estudios de campo y de invernadero entre los que se encuentran métodos de escarificación de semillas, cuantificación de la nodulación, tipo de contenedor para propagación y evaluación de las condiciones ecofisiológicas para el establecimiento de la especie. Además se realiza un experimento de procedencias en el que se evaluaron variables importantes para restauración (área del dosel, altura de la planta, etc.) en las mismas poblaciones colectadas para este estudio, también se colectó semilla para hacer un experimento de jardín común y determinar cuál población tiene mejor rendimiento para las variables cuantificadas y mayor adaptabilidad, que será importante al tomar la decisión de la población tipo para restaurar en el sitio experimental (Aureoles-Celso, 2004; Gómez- Romero, 2004; Medina-Sánchez y Lindig-Cisneros, 2005, Alejandre, 2004)

2.3.5. *Lupinus elegans* HBK.

Lupinus elegans se ha utilizado en este proyecto como especie modelo por tener varias ventajas ecológicas y fisiológicas como, producción abundante de hojarasca, formación de dosel, establecimiento exitoso en condiciones adversas y fijación de nitrógeno entre otras (Gómez- Romero, 2004; Aureoles-Celso, 2004; Gómez- Romero, 2006).

El género *Lupinus sp.*, constituye uno de los grupos más complejos de plantas con aproximadamente 1500 nombres publicados para el Norte y Sudamérica (Rzedowski *et al.* 2001), todas las especies de este género contienen una proporción elevada de alcaloides tóxicos y amargos, salvo unas pocas variedades muy concretas, lo que las hace poco útiles para la alimentación de animales (McVaugh, 1987). Actualmente se maneja el número de especies para el género de 200, distribuidas en la región mediterránea, y las regiones montañosas tropicales de África (Duna, 1979) y América. Sin embargo, la taxonomía del grupo continúa siendo difícil, Smith propuso dos terceras partes de los nombres existentes para las especies, pero nunca completo una monografía o sinopsis regional que habría facilitado el estudio de las especies mexicanas (McVaugh, 1987).

Dada la complejidad taxonómica del género se llevaron a identificar los ejemplares de las localidades colectadas al Herbario Nacional de la Universidad Nacional Autónoma de México (MEXU), donde la C. Dra. Norma Oropeza especialista del grupo nos confirmó que las poblaciones colectadas son todas de *Lupinus elegans* HBK.



Figura 1. *Lupinus elegans* HBK.

2.3.6. Distribución.

Lupinus elegans HBK., se distribuye a una altitud de 1800-3000m. Generalmente se encuentra en bosques de pino o encino y presenta variaciones en poblaciones locales. También conocida de Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos y Zacatecas, reconocida como *L. arboreus* Sims. de California (Figura 2) (Rzedowski *et al.* 2001).



Figura 2. Mapa de los sitios más comunes en donde se encuentra *Lupinus elegans* HBK. para México

Medina y colaboradores (2000), reportan un listado florístico para la Comunidad indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro con la presencia de nueve especies de *Lupinus* en vegetaciones desde bosque de pinos hasta bosques de encino: *L. campestris* Schldl. & Cham., *L. elegans* HBK., *L. exaltatus* Zucc., *L. marshallianus* Sweet., *L. mexicanus* Cerv. Ex Lag., *L. montanus* HBK., *L. persistens* Rose., *L. reflexus* Rose, *L. splendens* Rose y *L. stipulatus* J. Agardh

Hipótesis planteadas:

- Se presentará mayor variación genética entre poblaciones que dentro de poblaciones de *Lupinus elegans*.
- Las poblaciones más cercanas geográficamente serán las más parecidas genéticamente y al contrario las poblaciones más alejadas serán menos parecidas.

III.- OBJETIVO GENERAL.

Determinar la variación entre y dentro de poblaciones de *Lupinus elegans* HBK, con base en el marcador molecular RAPD, en diferentes sitios del estado de Michoacán.

3.1. Objetivos particulares:

- Determinar si hay correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica de las poblaciones.
- Determinar la utilidad de RAPD para estudiar la variación de esta especie.
- Proponer localidades de colecta para estrategias de restauración ecológica en bosques de coníferas de la Meseta Purépecha mediante RAPD.

IV.- DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.

4.1. Localización de la Comunidad indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro Michoacán México.

La Comunidad Indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro se localiza en el estado de Michoacán a 15 Km al occidente de Uruapan, en el extremo suroccidental de la Meseta Purépecha. Su límite meridional está en contacto con la transición fisiográfica a la Depresión del Balsas, con altitudes aproximadas de 1,800 msnm. Las cotas mayores se encuentran en el centro y suroccodiente y son de 3, 000 m en Cerro Prieto y faldas del Cerro Tancítaro, respectivamente. La porción suroccidental está constituida por las laderas de pie de monte del Cerro de Tancítaro, de casi 4,000 msnm, principal elevación del Estado de Michoacán. (Torres, 1998)

La Mesa de Cutzato, se localiza en las coordenadas 19° 30' 42.4" N, 102° 12' 03.0" W, y 2450 msnm, en la Comunidad de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México.

4.2 Suelos.

De acuerdo con el INEGI (1985), existen los siguientes tipos de suelo: Andasol húmico de textura media, Andasol ócrico de textura gruesa, Faeozem háplico de textura media y Regosol dístico de textura gruesa (Delgado, 1992). Bocco *et al.* (1998) identificaron cuatro tipos de suelo: andosol mólico y áplico, regosol concas subdivisiones vítrico y éutrico sobre andosoles, leptosoles líticos sobre derrames lávicos del Parícutin y leptosoles andi-mólicos y líticos, asociados con andoles mólicos y por último, los fluvisoles vítrico y éutrico sobre planicies acumulativas.

Los suelos se forman de manera residual a partir de cenizas volcánicas, que son producto de las erupciones que comprende de los períodos Plioceno – Cuaternario de las

cuales la más reciente fue la del Paricutín que tuvo actividad en 1943 hasta 1952. La mayoría son suelos profundos cubiertos por una capa de arena volcánica (Delgado, 1992).

4.3. Clima.

Los climas de la comunidad son de tipo templado y semifrío, con la siguiente clasificación es: C(w2) (w). En las partes más altas de la comunidad, este tipo de clima es el más húmedo de los templados subhúmedos, con lluvias en verano.

C(m) (w). Templado húmedo con lluvias abundantes en verano, que compensan la sequía de invierno. La temperatura media anual para estos climas oscila entre 12° y 18° C, mientras que la temperatura media del mes más frío, está entre -3° y 18° C.

C (E) (m) (w). Semifrío con abundantes lluvias en verano y temperatura media anual entre 5° y 12° C (Ortiz, 1997).

4.4. Tipos de vegetación y composición florística de la comunidad indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro.

De acuerdo con las clasificaciones de Rzedowski (1978), se reconocieron los siguientes tipos principales de vegetación: bosque de coníferas, el cual incluye bosque de pino que está representado por las especies *Pinus pseudostrobus* Lindl, que se encuentra ampliamente distribuido desde los 1900 hasta 3100 m.s.n.m., asociado con *Pinus leiophylla* Schlecht. & Cham. y en menor proporción con *P. montezumae* Lamb. y *P. douglasiana* Martínez. Otros árboles que se encuentran asociados son *Crataegus mexicana* Moc. & Sessé ex DC., *Quercus rugosa* Mart. & Gal., *Q. laurina* Humb. & Bonpl., *Ternstroemia pringlei* (Rose)Standl, *Alnus jorullensis ssp. lutea* Furlow, *Oreopanax xalapensis* (HBK) Decne. & Planch., y *Salix paradoxa* HBK.

Dentro de los bosques de coníferas de oyamel, el cual se encuentra en manchones, presentándose *Abies religiosa* var. *religiosa* (HBK) Schltdl & Cham. y *A. religiosa* var. *emarginata* Loock & Martínez, los cuales alcanzan alturas hasta 40 m y se asocian con

Quercus laurina Humb. & Bonpl., *Q. rugosa* Mart. & Gal. y *Pinus pseudostrobus* Lindl.; donde hay perturbación del bosque de oyamel, se establecen asociaciones con *Alnus jorullensis* HBK. *ssp. jorullensis*, bosque de oyamel-pino y bosque de pino-oyamel. Existe también bosque de pino-encino, bosque mesófilo de montaña y bosque de encino, el cual se compone de las especies *Quercus conspersa*, *Q. Laurina* Humb. & Bonpl., asociadas con *Alnus jorullensis ssp.lutea* Furlow, y un estrato arbustivo con *Senecio angulifolius* DC. y *Cestrum anagyis* Dunal. (Medina *et al.* 2000).

El pastizal se encuentra en la cima de algunas montañas altas como el cerro La Laguna (3200 m), en donde predominan gramíneas amacolladas como *Muhlenbergia macroura* (HB K.) Hitchc., *Aegopogon cenchroides* Humb. & Bonpl. ex Willd. y *Acaena elongata* L (Rosaceae). Hay una pequeña comunidad de vegetación subacuática, compuesta por *Potamogeton diversifolius* Raf., *Heteranthera limosa* (SW) Willd. y *Rorippa sp.* Scopoli.; algunas asociaciones de vegetación secundaria (Medina *et al.* 2000).

La Mesa de Cutzato (Sitio a restaurar), se localiza en las coordenadas 19° 30' 42.4" N, 102° 12' 03.0" W, a 2450 msnm, en la Comunidad de Nuevo San Juan Parangaricutiro Michoacán, México (Lindig-Cisneros *et al.* 2002). Se caracteriza por estar rodeada de islas de vegetación, dominadas principalmente por *Eupatorium glabratum* HBK. y *Lupinus elegans* HBK., en sustrato de ceniza volcánica, la cual es muy variable en profundidad. Existe un llano dominado por Bosque de *Pinus pseudostrobus* Lindl y encinos escasos; en el extremo suroeste, se localizan algunas de las plantaciones de esta especie.

V.- METODOLOGÍA.

5.1.1. Colecta de las poblaciones de *Lupinus elegans* HBK.

Se colectaron seis poblaciones para el estado de Michoacán en listadas en el Cuadro 1. Las hojas jóvenes de los individuos se congelaron en nitrógeno líquido para su traslado al laboratorio y posterior extracción del ADN.

En la Figura 3, se muestra un mapa con la localización de los sitios de colecta de *L. elegans* HBK. con los cuales se trabajó en el presente estudio.

Cuadro 1. Descripción de los sitios de colecta de tejido de hoja de *Lupinus elegans* HBK.

Sitio	Nº de Colecta.	Nº de individuos colectados.	Localidad	Estado	Coordenadas geográficas	Altitud (M)	Características del sitio.
3	260	30	San Nicolás	Michoacán	19° 24' 60" N 102° 14' 46" W	2850	TA y BP alrededor.
2	261	30	Cerro de Pario	Michoacán	19° 29' 6" N 102° 11' 46" W	2470	BP (suelos cubiertos por ceniza volcánica)
4	259	30	Pico de Tancítaro	Michoacán	19° 22' 13" N 102° 20' 24" W	2343	BPE, BP (suelos pedregosos, cercas de cuerpos de agua)
6	265	30	Charapan	Michoacán	19° 34' 4" N 102° 14' 51" W	2399	BPE (perturbado)
5	264	30	Villa Madero	Michoacán	19° 18' 59" N 101° 21' 52" W	2183	BPE (cerca de cuerpos de agua, suelos pedregosos).
1	258	9	Zitácuaro	Michoacán	19° 21' 33" N 100° 24' 27" W	1800	BPE.

BPE=Bosque de pino encino, BP=Bosque de pino, TA= Tierras agrícolas

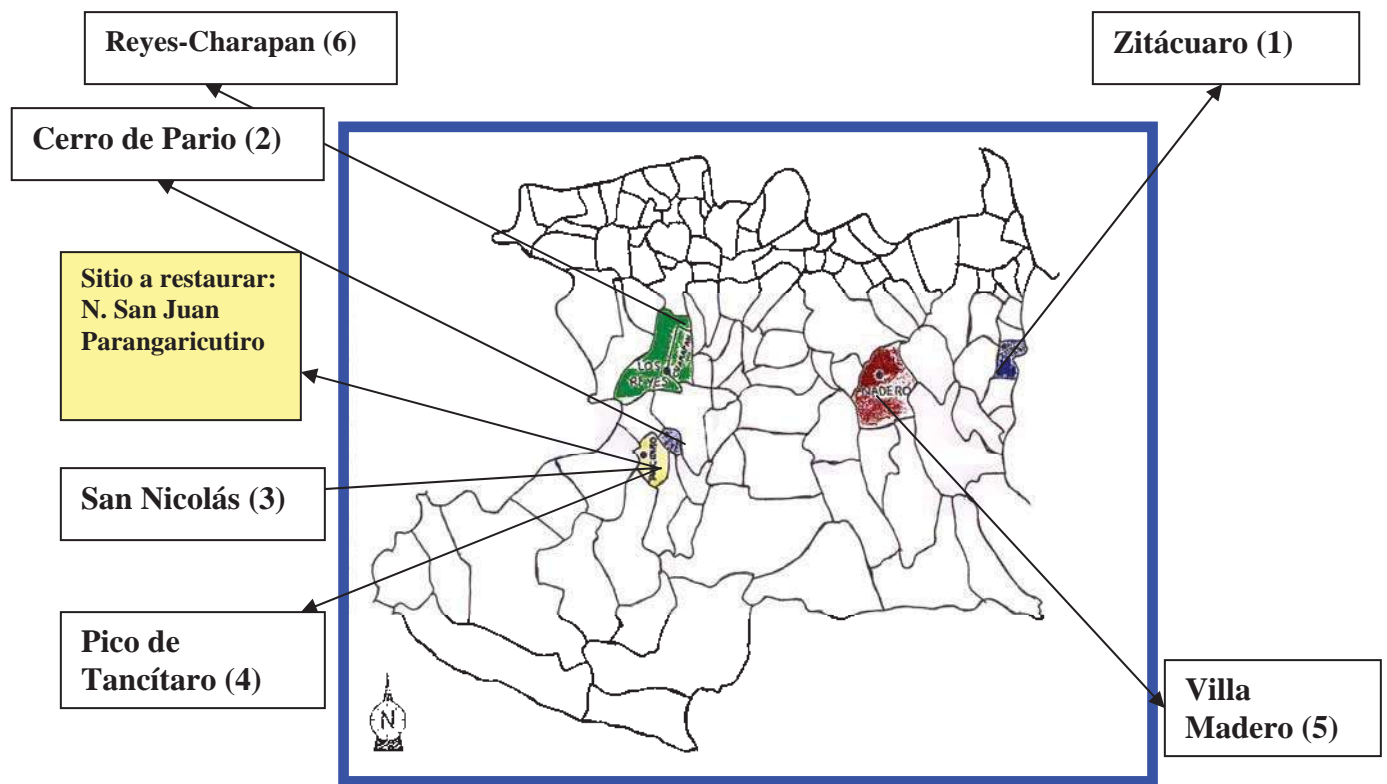


Figura 3. Localización de los sitios de colecta de *L. elegans* y del sitio a restaurar.

5.1.2. Extracción de ADN.

Se extrajo el ADN genómico total de 6 poblaciones de *Lupinus elegans* HBK. La extracción se llevó a cabo siguiendo el protocolo de MINI-PREP de Lefort y Douglas, (1999) (Anexo I).

5.1.3. Cuantificación de ADN.

La cuantificación de ADN se llevó a cabo por espectrofotometría (Espectrofotómetro Jenway Designed modelo 6305), con una concentración de trabajo final de 0.5 µg/ µl.

5.1.4. Amplificación de ADN por medio de RAPD.

La reacción encadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un termociclador (Techne TC-412). La reacción se llevó a cabo en un volumen final por reacción de 25 μ l: 15.5 μ l de agua inyectable, 1 μ l de $MgCl_2$ 50mM, 1.5 μ l de oligonucleótidos (Operon Technology), diluidos a una concentración de 10nm, 1 μ l de BSA a una concentración de 10 mg/ μ l, 0.5 μ l de Taq ADN polimerasa (Invitrogen), 2.5 μ l de Buffer 10X PCR, 2 μ l de dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10mM) y 1 μ l de ADN diluido a 25ng / μ l y 25 μ l de aceite mineral para que no se evapore la solución final.

La amplificación del ADN constó de 44 ciclos: 1 minuto a 94 °C (desnaturalización), 1 minuto a 36 °C (alineación), 2 minutos a 72 °C (extensión) y una extensión final de 7 minutos a 72 °C. Para la amplificación se probaron 30 oligonucleótidos de las series A, B, C, D, F, H y R, de Operon Technology de los cuales se eligieron los más polimórficos: serie A (OPA-01, OPA-02), serie B (OPB-11, OPB-17), serie C (OPC-02), serie D (OPD-20), serie F (OPF-01) y serie H (OPH-03, OPH-13, OPH-15), (Anexo III)

5.1.5. Electroforesis y fotografiado de las muestras.

Los productos obtenidos en la amplificación (PCR) fueron tenidos con bromuro de etidio (0.1 μ g/ml) y se separaron por electroforesis horizontal empleando geles de agarosa 1.5% con buffer TBE 0.5X. (Anexo IV).

Las muestras fueron sometidas a una corriente de 120 Voltios durante 3 horas. Se corrió una muestra de 25 μ l de la reacción PCR mezclada con 3 μ l de colorante tipo III 6XBuffer (azul de bromofenol 625mg, xilencianol 625mg, Glicerol 75ml y agua inyectable 75ml) (Sambrook y Russell, 2001) por carril. Se adicionó un marcador de peso molecular de ADN de 123 pb Ladder (Invitrogene) en dos carriles, en el primero y último utilizados como referencia para el tamaño de las bandas. Los diferentes patrones de bandeado obtenidos se visualizaron con luz ultravioleta a 320nm (Transilluminator UVP-400 Stratagene) y se tomaron fotografías de los geles con un rollo POLAROID modelo 667 para su posterior análisis.

5.1.6. Análisis de datos.

5.1.6.1. Interpretación de los geles.

A partir de las fotografías obtenidas de los geles, se elaboró una matriz binaria de presencia (1) y ausencia (0) de las bandas en cada individuo en el programa Excel. Se realizó una interpretación de los diferentes patrones de bandas presentes en los geles, tomando como referencia el marcador de peso molecular de 123 pb ADN ladder (Invitrogene), donde se asumió que cada banda representa el fenotipo de un simple locus bialélico (Le Corre *et al.* 1997).

5.1.6.2. Diversidad genética.

Los niveles de diversidad genética fueron evaluados a través del índice de Shannon, el cual no supone un equilibrio Hardy-Weinberg (si actúan los procesos de selección, migración, mutación y deriva génica), considera a las bandas de cada individuo como un genotipo distinto, evaluando las similitudes y diferencias con base en la diversidad fenotípica de éstas (Galarza, 2003).

El índice de diversidad de Shannon está dado por H_o o “ I ” = $-\sum (p_i \log_2 p_i)$, donde p_i es la frecuencia de cada una de las bandas amplificadas. El índice de diversidad genética de Nei (H) se estimó de dos formas: diversidad promedio intrapoblacional (H_{pop}) y diversidad total (H_{sp}). La proporción de la diversidad dentro de las poblaciones se evaluó como H_{pop}/H_{sp} , y la proporción de la diversidad entre poblaciones $G_{st} = (H_{sp} - H_{pop})/ H_{sp}$ (Galarza, 2003)

La diversidad genética existente dentro y entre poblaciones se evaluó por medio del porcentaje de loci polimórficos (% P), para lo cual se asumió que cada banda amplificada representa un fenotipo de un locus simple bialélico con un alelo dominante y otro recesivo, donde el dominante es el que se expresa en forma de banda y el recesivo no se expresa, no existe banda, (Le Corre *et al.* 1997,) y mediante el Índice de Diversidad de Shannon, en el programa POPGEN v 1.31 (Yeh *et al.* 1999).

5.1.6.3. AMOVA.

El AMOVA (análisis de varianza molecular) es un análisis estadístico (no paramétrico) propuesto por Schneidler, *et al.* (2000), para estudiar la variación molecular dentro de una especie, es un método ampliamente utilizado para estudiar cómo se distribuye la variación genética dentro y entre poblaciones, empleando marcadores moleculares entre los que se encuentran los RAPD, los datos se analizan a partir de una matriz binaria de 1's y 0's, en donde la presencia de la banda se representa por 1 y la ausencia de la banda por 0, entonces el AMOVA crear una matriz de distancias con estos datos para medir la estructura genética de las poblaciones, por lo cual esta metodología ayuda a conocer la distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones y proporciona un índice de diferenciación genética entre poblaciones (F_{st}).

5.1.6.4. Distancias genéticas.

Con las distancias genéticas obtenidas con el programa POPGEN versión. 1.31 (Yeh *et al.* 1999), y las distancias geográficas de los sitios de colecta, se realizó la prueba de Mantel, que correlaciona estas variables y provee de un valor de significancia. Esta prueba se llevó a cabo en el programa Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) versión 1.3 (Millar, 1997).

Se utilizó el programa NTSYS-PC v. 2.11 (Rohlf, 2001) para agrupar a los individuos de cada población con el Coeficiente de “Simple Matching”, el cual toma en cuenta la ausencia y presencia de bandas compartidas (Peakall, *et al.* 1995). Con los datos crudos obtenidos del patrón de bandeo de las diferentes poblaciones se generó un dendrograma de UPGMA (Unweighted Pair Group with Arithmetic Averages), en este mismo programa.

VI.-RESULTADOS.

6.1. Análisis genético.

Se utilizaron 10 oligonucleótidos con las 6 poblaciones de *Lupinus elegans* HBK. obteniéndose 142 fragmentos amplificados con un promedio de 14 bandas por oligonucleótido (Figura 4), de 159 individuos que corresponden a las poblaciones (Zitácuaro, San Nicolás, de Cerro de Parío, Pico de Tancítaro, Villa Madero y Charapan). El 98 % de las bandas fueron polimórficas y el 2 % monomórficas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Número de bandas polimórficas y monomórficas obtenidas con los 10 oligonucleótidos.

Oligonucleótido	Secuencias	Nº de bandas monomórficas	Nº de bandas polimórficas	Total
OPA-01	5'-CAGGCCCTTC-3'	0	9	9
OPA-02	5'-TGCCGAGCTG-3'	0	14	14
OPB-11	5'-GTAGACCCGT-3'	0	20	20
OPB-17	5'-AGGGAACGAG-3'	0	18	18
OPC-02	5'-GTGAGGCGTC-3'	0	16	16
OPD-20	5'-ACCCGGTCAC-3'	1	10	11
OPF-01	5'-ACGGATCCTG-3'	0	13	13
OPH-03	5'-AGACGTCCAC-3'	0	17	17
OPH-13	5'-GACGCCACAC-3'	0	16	16
OPH-15	5'-AATGGCGCAG-3'	2	6	8
Total		3	139	142

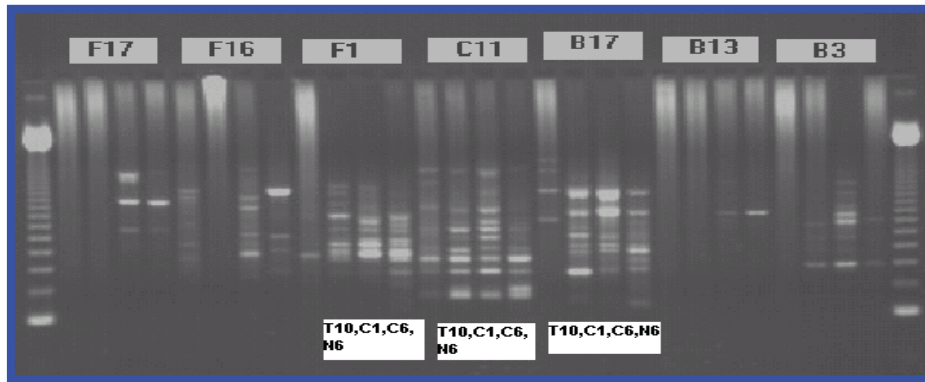


Figura 4. Patrón de bandeo obtenido con los oligonucleótidos F17,F-16,F-01, C-11, B-17, B-3 Operon Technology), con diferentes muestras de las poblaciones San Nicolás, Charapan y Pico de Tancítaro.

6.2. Diversidad genética.

En el análisis producido por el programa POPGEN para conocer la variación genética por población (Cuadro 3) se puede observar que en todas las poblaciones el número de alelos observados fue mucho mayor al número de alelos esperados ($X_{na}= 1.9718$, $X_{ne}=1.2975$). Tanto el índice de diversidad genética de Nei (H), como el índice de Shannon (I), reflejan una mayor diversidad genética en las poblaciones de San Nicolás ($I = 0.2131$), Pico de Tancítaro ($I = 0.2144$) y Villa Madero ($I = 0.2144$). La población con menor índice de diversidad de Shannon es Zitácuaro ($I = 0.1340$).

Cuadro 3. Variación genética de todos los loci por población en el programa POPGEN v 1.31 (Yeh *et al.* 1999).

Poblaciones	Número de alelos observados (na)	Número de alelos efectivos (ne)	Diversidad genética de Nei's (H)	Índice de Shannon (I)	Número de loci polimórficos	Porcentaje de loci polimórficos (%)
1. Zitácuaro	1.29 ± 0.45	1.14 ± 0.28	0.09 ± 0.15	0.13 ± 0.23	41	28.87
2. Cerro de Pario	1.51 ± 0.50	1.20 ± 0.31	0.12 ± 0.17	0.19 ± 0.24	72	50.70
3. San Nicolás	1.56 ± 0.50	1.21 ± 0.30	0.13 ± 0.17	0.21 ± 0.24	80	56.34
4. Pico de Tancítaro	1.54 ± 0.50	1.22 ± 0.33	0.14 ± 0.18	0.21 ± 0.25	77	52.11
5. Villa Madero	1.52 ± 0.50	1.21 ± 0.30	0.14 ± 0.17	0.21 ± 0.25	74	48.59
6. Charapan	1.48 ± 0.50	1.19 ± 0.29	0.12 ± 0.16	0.19 ± 0.24	69	48.59
Entre poblaciones	1.97 ± 0.17	1.30 ± 0.31	0.19 ± 0.16	0.31 ± 0.22	138	97.18

La muestra poblacional total fue de 159 individuos de los cuales se obtuvo una diversidad genética total ($H_{sp} = 0.195; \pm 0.026$), y un promedio de heterocigotos esperada en equilibrio Hardy-Weinberg (HW) dentro de una subpoblación, asumiendo que hay apareamiento al azar ($H_{pop} = 0.122 \pm 0.009$). La proporción de la diversidad genética dentro de las poblaciones se estimó como (H_{pop}/H_{sp}) obteniendo como resultado 0.628. La proporción de la diversidad genética compartida entre las poblaciones ($G_{st} = 0.372$) y una estimación de flujo genético ($N_m = 0.843$) el cual nos indica que por cada generación existe una entrada de flujo de genes de menos de un individuo.

6.3. Distancias genéticas.

El programa POPGEN v 1.31 (Yeh *et al.* 1999) produjo una matriz de identidad genética y distancias genéticas entre poblaciones (Cuadro 4), estas distancias se utilizaron para generar un fenograma en UPGMA basado en las distancias genéticas de Nei (1978). La Figura 5 muestra la división de dos ramas grandes que agrupan a las poblaciones. El nodo 5, separa a la población de Zitácuaro de las otras cinco; esta es la población más alejada geográficamente. El nodo 4 agrupa a las poblaciones de Cerro de Pario, Pico de Tancítaro, Villa Madero, San Nicolás y separa de éstas a la de Charapan. El nodo 3 agrupa a Cerro de Pario, Pico de Tancítaro, Villa Madero y San Nicolás donde la que se separa es San Nicolás. El nodo 2 agrupa a Pico de Tancítaro, Villa Madero y Cerro de Pario. El nodo 1 agrupa a Pico de Tancítaro y Villa Madero como las poblaciones más similares.

Cuadro 4. Identidad Genética y Distancias Genéticas de Nei para las 6 poblaciones obtenidas con el programa POPGEN.

DG/IG	Zitácuaro	Cerro de Pario	San Nicolás	Pico de Tancítaro	Villa Madero	Charapan
Zitácuaro		0.8355	0.8912	0.8704	0.8969	0.8863
Cerro de Pario	0.1797		0.9131	0.9178	0.9212	0.8901
San Nicolás	0.1152	0.0887		0.9251	0.9138	0.9083
Pico de Tancítaro	0.1388	0.0858	0.0779		0.9507	0.9142
Villa Madero	0.1089	0.0821	0.0901	0.0506		0.9214
Charapan	0.1207	0.1164	0.0962	0.0897	0.0819	

La identidad genética de Nei (IG), (más cercanas a 1 son más parecidas y más cercanas a 0 menos parecidas), se presenta arriba de la diagonal y la distancia genética (DG), (más cercanas a 0 son más parecidas y más cercanas a 1 menos parecidas), debajo de la diagonal.

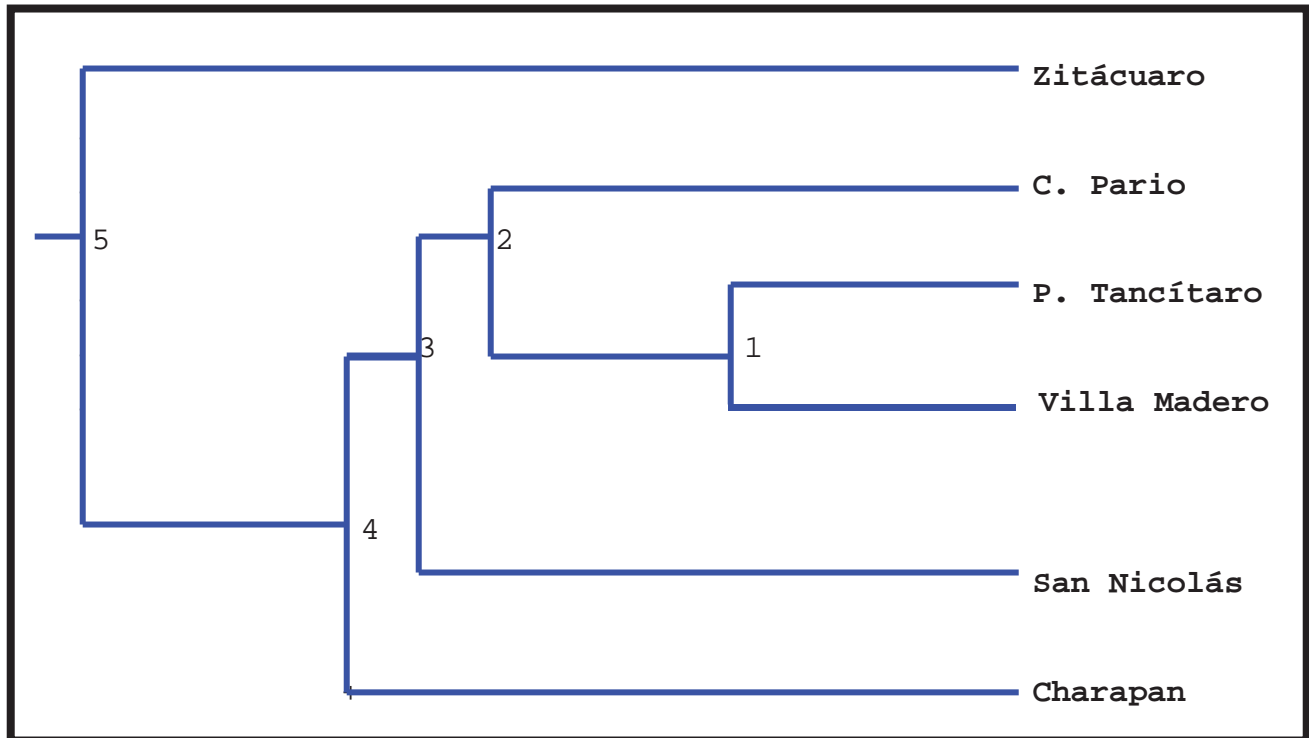


Figura 5. Fenograma (UPGMA) basado en las distancias genéticas de Nei de las poblaciones de *Lupinus elegans*.

El fenograma de UPGMA basado en el índice de Simple Matching (Peakall, *et al.* 1995), (Figura 6) muestra la división de dos ramas grandes que dividen a las poblaciones Zitácuaro y San Nicolás de las poblaciones de Cerro de Pario, Pico de Tancítaro, Villa Madero y Charapan y a su vez estas últimas se subdividen en dos grupos donde se agrupan todos los individuos de las poblaciones de Cerro de Pario, Pico de Tancítaro, Villa Madero y Charapan donde se separan los individuos de la población de Charapan y nuevamente se subdividen las poblaciones de Cerro de Pario, Pico de Tancítaro y Villa Madero y se separa la población de Cerro de Pario y solamente quedan los individuos de las poblaciones de Pico de Tancítaro y Villa Madero que a su vez cada población se separa con cada uno de sus individuos quedando finalmente todas las poblaciones agrupadas con sus individuos pero agrupadas como anteriormente se comentó.

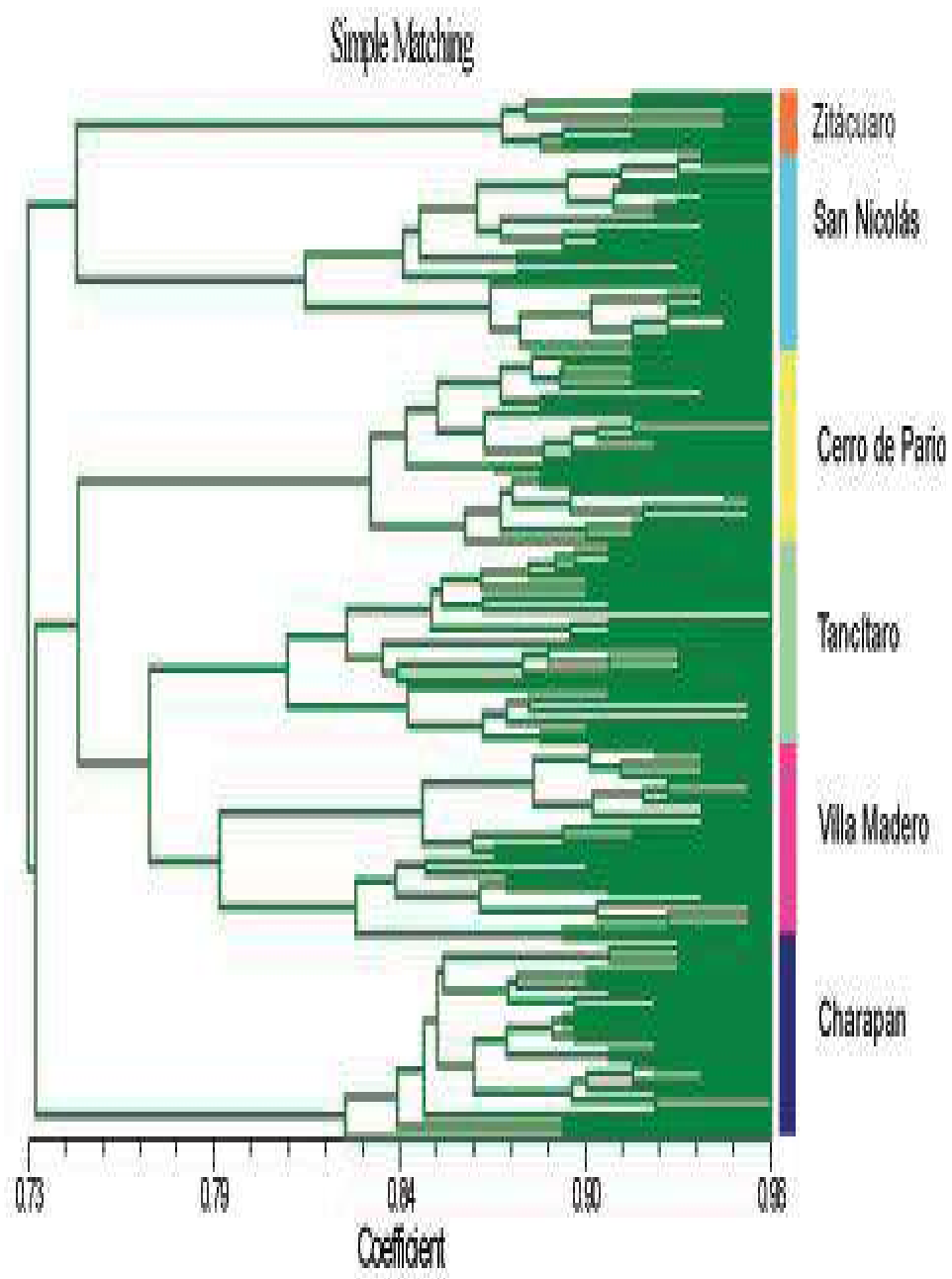


Figura 6. Fenograma (UPGMA) basado en el Coeficiente Simple de Matching con todos los individuos de cada una de las poblaciones.

6.4. AMOVA.

El porcentaje de variación entre las poblaciones (Cuadro 5) fue de 42% y dentro de las poblaciones de 58%, con un índice de fijación subpoblacional (F_{st}) de 0.42, que nos indica que hay una alta diferenciación genética entre las poblaciones.

Cuadro 5. Análisis de Varianza Molecular y Coeficiente de diferenciación (F_{st}) para las poblaciones de *Lupinus elegans* HBK.

Fuente de variación	d. f.	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	P
Entre poblaciones	5	1068.6	7.8	42	<0.00000
Dentro de poblaciones	152	1646.5	10.8	58	<0.00000
Total	157	2715.1	18.7		
Índice de diferenciación F_{st}			0.420		

6.5. Prueba de Mantel.

La prueba de Mantel (Millar, 1997), mostró que existe una relación marginal entre la distancia geográfica y la distancia genética de Nei (1978) obtenidas del (Cuadro 4), con un valor ($r = 0.7065$; $P = 0.0670$). Haciendo una regresión lineal se obtuvo un coeficiente de regresión lineal ($r^2 = 0.49$) con un nivel de significancia de ($P = 0.003$), que nos indica que aproximadamente el 50 % de nuestros resultados si tiende a relacionarse y se puede observar en la (Figura 7).

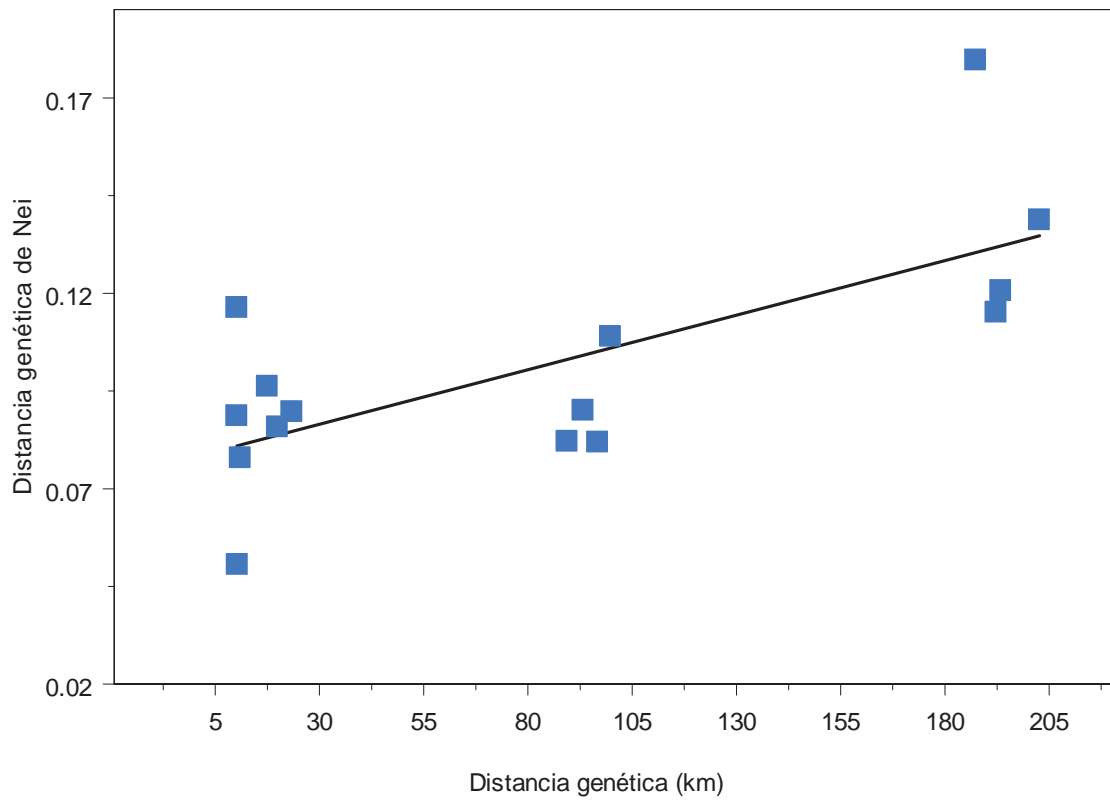


Figura 7. Correlación entre la distancias geográficas y la distancias genéticas de Nei de *Lupinus elegans* HBK., Regresión lineal: $y = 0.07809 + 0.00028x$; $r^2 = 0.499$; $P = 0.003$.

VII.- DISCUSIÓN.

Este es el primer estudio que se realiza con marcadores moleculares RAPD con *Lupinus elegans* HBK., en el cual se encontró que la diversidad genética (H) en las seis poblaciones estudiadas presenta valores semejantes entre si, cercanas a 0.20; similar al observado en *Astragalus oniciformis* Barneby de 0.18 (Alexander *et al.* 2004) y en otras especies de leguminosas como *Desmodium sumichrastii* (Schinder) Standley que reportan una diversidad genética de 0.30 (Bedolla y Lara-Cabrera, 2006). El porcentaje de loci polimórficos obtenido fue *ca* 60% el cual es parecido a los encontrados por Artyukova *et al.* (2004), que reportan un porcentaje de loci polimórficos de 72.9 % y 74.4 %, para cada una de las poblaciones de *Oxytropis chakaensis* Jurtz. y para *Desmodium sumichrastii* se reporta 60 % de loci polimórficos (Bedolla-García y Lara-Cabrera, 2006).

La variación genética encontrada dentro de poblaciones fue mayor (58 %) que la encontrada entre poblaciones (42 %), lo cual no se esperaba según nuestra hipótesis planteada; considerando referencias anteriores que reportan mayor variación entre poblaciones que dentro de poblaciones (Wolf *et al.* 1997; Jesús *et al.*, 2001), se planteó la hipótesis que encontraría mayor variación genética entre poblaciones que dentro de poblaciones. Sin embargo, los valores de la AMOVA son similares a los encontrados en *Desmodium sumichrastii* (Schinder) Standley, el 61 % de la variación genética se encuentra dentro de poblaciones y un 39 % entre poblaciones (Bedolla-García y Lara- Cabrera 2006) donde lo atribuyen al comportamiento de los polinizadores del género *Bombus*, al igual que Backman y Tiainen (2002) para una Scrophulariaceae. En el caso de *Lupinus* también se puede atribuir la mayor variación dentro de las poblaciones al comportamiento errático de los mismos vectores de la polinización y al efecto de las condiciones de perturbación del hábitat (de las 6 poblaciones, 4 estaban severamente perturbadas) que puede afectar el comportamiento de *Bombus* (Severns, 2003).

La diferenciación genética entre las poblaciones fue de ($F_{st} = 0.41$) mayor a las reportadas por Leimu y Mutikainen (2005), para *Vincetoxicum hirundinaria* (Asclepiadaceae) fue de 0.052 y para *Dalea purpurea* (Fabaceae) de 0.042 (Gustafson, *et al.* 2002), es decir que

las poblaciones son diferentes entre sí. Esto se evidencia también por el escaso flujo de genes ($N_m = 0.8428$) (Jacquemyn *et al.* 2006).

La ubicación tanto en los fenogramas como en relación a los valores obtenidos (Diversidad Genética (H), Índice de Shannon (I), Distancia genética de Nei y Identidad Genética) de Villa Madero como más parecida o cercana a Pico de Tancítaro que Pico de Tancítaro a San Nicolás y Cerro de Parío; así como la marginalmente significativa correlación de Mantel ($P=0.067$) de distancias genéticas y geográficas pero se pueden explicar por las condiciones de perturbación, ya que las poblaciones menos perturbadas son las de Pico de Tancítaro y Villa Madero, permitiendo probablemente un comportamiento más “normal” de los polinizadores y de las mismas plantas (Backman y Tiainen 2002; Dramstad *et al.* 2003).

VIII. – CONCLUSIONES.

Este estudio corrobora la baja diversidad genética que se ha encontrado con RAPD para especies de leguminosas. Probablemente debido a la técnica misma de RAPD aunque se necesitarían otros estudios con marcadores más robustos. De las seis poblaciones las que presentaron mayor variación genética (Pico de Tancítaro, San Nicolás y Cerro de Pario) fueron las más cercanas al sitio a restaurar, que fueron afectadas por la erupción del volcán Parícutín en 1943, evento dramático que pudo `acelerar` el proceso de diversificación de la especie debido a la enorme heterogeneidad ambiental de la zona.

Basados en estos resultados para las estrategias de restauración ecológica en bosques de coníferas, se recomienda coleccionar la semilla en la población más cercana al sitio que se pretende restaurar, en el caso de la comunidad indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro, que es la población de San Nicolás. Esta población presentó el mayor porcentaje de polimorfismo y al ser la más próxima se evitaría la contaminación por genes no locales y potencialmente una inadecuada adaptación al sitio (Ledig, 1992; Hufford y Mazer, 2003; Rice y Emery (2003). Las otras dos poblaciones más cercanas (Cerro de Pario y Pico de Tancítaro) también se podrían utilizar por la proximidad y el alto polimorfismo, sin embargo para tomar la decisión final, se deben de tomar en cuenta los resultados de estudios de procedencias de *Lupinus elegans* en jardín común así como la variación morfológica.

IX.-LITERATURA CITADA.

- Aagaard, E. J, K. V. Krutovskii y S. H. Strauss. 1998. RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. Genetical Society of Great Britain, *Heredity* **81**: 69-78.
- Alejandre, M. N. 2004. Estudio sobre el establecimiento de *Pinus pseudostrobus* Lindl en sitios afectados por deposición de ceniza volcánica en las inmediaciones del volcán paricutín, Michoacán, México. Tesis profesional. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich. México. 90 pp.
- Alexander, J. A, A. Liston y S. J. Popovich. 2004. Genetic diversity of the narrowendemic *Astragalus oniciformis* (Fabaceae). *American Journal of Botany* **91** (12): 2004-2012.
- Artyukova, E. V., A. B. Colina, M. M. Kozyrenko y Y. N. Zhuravlev. 2004. Analysis of genetic variation in rare endemic species *Oxytropis chankaensis* Jurtz. (Fabaceae) using RAPD markers. *Russian Journal of Genetics* **40** (7): 710 -716 .
- Aureoles-Celso, E. 2004. Estudios de nodulación en *Lupinus elegans* (Fabaceae) una especie con potencial para ser utilizada en proyectos de restauración ecológica en la Meseta Purépecha. Tesis profesional. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich. México. 50 pp.
- Avise, J. C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman & Hall, London, 511 pp.
- Bedolla-García, B. y Lara-Cabrera, S. 2006. An assesment of genetic diversity in *Desmodium sumichrasti* (Fabaceae) for Central Mexico. *Canadian Journal of Botany*. **84**: 876 – 882
- Backman, J. P. C. y J. Tiainen. 2002. Habitat quality of field margins in a Finnish farmland area for bumblebees (Hymenoptera: *Bombus* and *Psithyrus*). *Agric. Ecosyst. Environ.* **89**: 53 – 68
- BlackSamuelsson S., G Eriksson., L. Gustafsson y P. Gustafsson. 1997. RAPD and morphological analysis of the rare plant species *Vicia pisiformis* (Fabaceae). *Biological Journal of the Linnean Society*. **61** (3):325-343.
- Black-Samuelsson S. y M. Lascoux. 1999. Low isozyme diversity in Nordic and central European populations of *Vicia pisiformis* and *V. dumetorum* (Fabaceae). *Nordic Journal of Botany*. **19** (6):643-652
- Bocco, V., A. Torres, A. Velásquez y C. Siebe. 1998. Geomorfología y recursos naturales en comunidades rurales. El caso de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán. *Geografía y Desarrollo*. **16**: 84.

- Bonnin, I., J. Ronfort, F. Wozniak y I. Oliveri. 2001. Spatial effects and rare outcrossing events in *Medicago truncata* (Fabaceae). *Molecular Ecology* **10** (6): 1731 -1383.
- Campos de Quiroz, H. y F. Klose-Ortega. 2001. Genetic variability among elite red clover (*Trifolium pratense* L.) parents used in Chile as revealed by RAPD markers. *Euphytica*. **122**: 61-67
- Crawford, D. J., E. J. Esselman, J. L. Windus y C. S. Pabin. 1998. Genetic variation in rinning buffalo clover (*Trifolium stoloniferum*: Fabaceae) using random amplified polymorphic DNA markers (RAPDs). *Annals of the Missouri Botanical Garden* **85** (1): 81 – 89
- Delgado, P. 1992. Aspectos biológicos de conos y semillas de tres especies de *Pinus*, en la zona boscosa de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. 3 – 10 pp.
- Dobzhansky, T. 1975. Genética del Proceso Evolutivo. Extemporáneos, S. A. México. D. F. 39 – 191 pp.
- Dramstad, W. E., A. L.G. Fry y J. M. Schaffer. 2003. Bumblebee foraging- is closer really better? *Agric. Ecosyst. Environ.* **95**: 349 – 357
- Ender, A, K. Schwerk, T. Stadler, B. Streit y B. Schierwater. 1996. RAPD identification of microsatellites in *Daphnia*. Blackwell Science. *Molecular Ecology*. **5**: 437-441
- Field, L. D., D. J. Ayre y R. J. Whelan. 2005. The effect of local plant density on pollinator behavior and the breeding system of *Persoonia bargoensis* (Proteaceae). *International Journal of Plant Sciences*; **166** (6): 969 – 977
- Fisher, R. A. 1930. The genetical theory of natural selection. Clarendon Press, Oxford. 272 pp.
- Frankham, R. 1995. Conservation genetic. *Annu Rev. Genet* **29** (3): 5 – 27 pp.
- Furnier, R. G. 1995. Métodos para medir variación genética en las plantas. Departamento de recursos forestales y biología de plantas, Universidad de Minnesota, Minnesota, E. U. A: 23 – 26.
- Galarza, C. S. X. 2003. Diversidad y estructura genética de Materiales Silvestres (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme* Dun.) y Cultivados (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Del Tomate del estado de Sinaloa, México. Tesis de Licenciatura de la Facultad de Biología de la U.M.S.N.H., Morelia, Michoacán. 50 pp.
- Gallaway, F. L. y C. B. Fenster. 2000. Population differentiation in an annual legume: local adaptation. Society for the Study of Evolution. *Evolution*, **54** (4): 1173 – 1181
- Gómez-Romero, M. 2004. Estudio del establecimiento de *Lupinus elegans* y *Eupatorium glabratum* especies nativas para restauración ecológica de Nuevo San Juan

- Parangaricutiro Michoacán, México. Tesis profesional. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich. México. 89 pp.
- Gómez- Romero, M. 2006. Desarrollo del dosel de Leguminosas bajo diversas condiciones de Restauración Ecológica en Bosques de Pino – Encino de Michoacán México. Tesis Maestría. Facultad de Biología División de Estudios de Posgrado. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich. México. 149 pp.
- González-Andres, F. y M. J. Ortiz. 1995. Comportamiento de cinco leguminosas forrajeras como cobertura de áreas fuertemente erosionadas del pie de monte de la cordillera occidental en el valle de Cauca. *Acta Agron.* **35**: 42-51
- Gustafson D. J, J. D. Gibson y D. Nickrent. 2002. Genetic diversity and competitive abilities of *Dalea purpurea*(Fabaceae) from remnant and restored grassland. *International Journal of Plant Sciences.* **163** (6): 979-990.
- Hartl D. L y A. G. Clark. 1997. Principles of populations genetics. 4ed. Sinauer, Sunderland, Massachusetts. 20-25 pp.
- Hufford, K. M. y S. J. Mazer. 2003. Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration. *Trends in Ecology and Evolution* **18**:147-155.
- Jacquemyn, H., R. Brys, O. Honnay, M. Hermy y I. R. Ruiz.2006. Sexual reproduction, clonal diversity and genetic differentiation in patchily distributed populations of the temperate forest herb *Paris quadrifolia* (Triliaceae). *Ecology* **147**: 434 – 444
- Jayanthi, M. y K. P. Mandal. 2001. Low genetic polymorphism in natural populations of *Crotalaria longipes*. *Biol. Plant.* 44: 455 – 457.
- Jesús, F. F., N. V. Solferini, J. Semir y I. P. Prado. 2001. Local genetic differentiation in *Proteopsis argentea* (Asteraceae), a perennial herb endemic in Brazil. *Plant. Sys. Evol.* **226**: 59 – 68
- Jiménez , P. y C, Collada. 2000. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Invest. Agr. Sist. Recur. For.* 237 -248 pp.
- Le Corre, V., S. Dumolin- Lapégue y A. Kremer.1997. Genetic variation at allozyme and RAPD loci in sessile oak *Quercus petrea* (Matt.) Liebl.: the role of history and geography. *Mol. Ecol.* **6**: 519 - 529
- Ledig, F. T. 1992. Human impacts on genetic diversity in forest ecosystems. *Oikos.* 4-8 pp.
- Lefort, F. y C. G. Douglas. 1999. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. *Ann. For. Sci.* **56**: 259 – 263.

- Leimu, R. y P. Mutikainen. 2005. Population History, Mating System, and Fitness Variation in a Perennial Herb With a Fragmented Distribution. *Conservation Biology*, **19** (2): 349 – 356
- Lindig-Cisneros, R., C. Sáenz-Romero, N. M. Alejandre, E. C. Aureoles, S. V. Galindo, M. R. Gómez, R. M. Martínez, E. I. S. Medina. 2002. Efecto de la profundidad de los depósitos de arena volcánica en el establecimiento de vegetación nativa en las inmediaciones del volcán Parícutín, México. *Rev. Ciencia Nicolaita*. Michoacán. México **31**: 47 – 53
- Medina-Sánchez, E. y R. Lindig-Cisneros. 2005. Effect of scarification and growing media on seed germination of *Lupinus elegans* HBK. *Seed Sci. & Technol.* **33**: 237-241.
- Medina C. F; F. Guevara, M. A. Martínez, P. Silva – Sáenz, M. A Chávez –Carvajal y García 2000. Estudio florístico en el área de la comunidad indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. Instituto de Ecología, A.C. *Acta Botánica Mexicana*. **52**: 32-33
- Millar, M. P. 1997. Tools for Population genetic analyses (TFPGA) 1.3 a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data computer software distributed by author.
- McKay, K. J., C. E. Christian, S. Harrison y K. J. Rice. 2005. “How local is local” –A Review of Practical and Conceptual Issues In the Genetics of Restoration. *Society for Ecological Restoration International*. **13** (3): 432 – 440
- McVaugh, R. 1987. Flora Novo-Galiciana : A descriptive account of the vascular plants of western México. *The University of Michigan Press*. USA. **5**: 580-598
- Ortiz, S. G. 1997. Diseño e implantación de un programa de educación ambiental no formal en la comunidad indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán y lineamiento para realizar programas de educación ambiental en comunidades rurales. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. 60 pp.
- Otero, A. A., M. De La Cruz y K., Oyama. 1997. El uso de los RAPD's como marcadores moleculares en plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. **60**: 85-117.
- Peakall, R., E. P. Smouse y D. R. Huff. 1995. Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of deciduous buffalograss *Buchloë dactyloides*. *Mol. Ecol.* **4**: 135 -147
- Rice, J. K. y N. C. Emery. 2003. Managing microevolution: restoration in the face of global change. *Front Eco Environ* **1**(9): 469 – 478
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación de México. Editorial Limusa. México, D. F. 432 pp

- Rzedowski, J. y G. R. de Calderón. 2001. Flora Fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, A. C., CONABIO. Pátzcuaro, Michoacán. 290 – 291 pp.
- Rohlf, F. J. 2001. NTSYSpc, Numerical Taxonomy System, version 2.1 for Windows 95/98/NT/2000/ME/XP. Exeter Software, New York.
- Sambrook, J. y D. W. Russell. 2001. Molecular cloning, a laboratory manual. 3ª ed. Cold Spring Harbor Lab.Press, New York.19-20 pp.
- Schneider, S., D. Roessli, y L. Excoffier. 2000. Arlequín: A software for population genetics data analysis. Ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University Of Geneva. Switzerland.
- Severns, P. 2003. Inbreeding and small population size reduce seed set in a threatened and fragmented plant species, *Lupinus sulphureus* ssp. *Kincaidii* (Fabaceae). *Biological Conservation* **110**: 221 – 222
- Simpson, J. 1997. Molecular markers. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. **60**: 73 – 76
- Talhinhas, P, J. N. Martins y J. Leitão. 2003 . AFLP, ISSR and RAPD markers reveal high levels of genetic diversity among *Lupinus* spp. Blackwell Verlag, Berlin. *Plant Breeding*. **122**: 507 – 510
- Thomas, G., L. Joseph, G. Varghese, Sreejayan, K. Kalyanaraman y P. Kuriachan. 2001 .Analysis of phenotypic and genetic variations among populations of *Oryza malampuzhaensis* show evidence of altitude-dependent genetic changes. Published on the NRC Research Press. Canada. *Web site at [http:// canjbot.ncr.ca](http://canjbot.ncr.ca) on August 29*:1090-1097
- Torres, G. A. 1998. Geomorfología y recursos naturales en comunidades rurales. El caso de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Instituto de Ecología, *Instituto de Geología, y Facultad de Ciencias (UNAM)*. Morelia. **16**: 84 pp.
- Yeh, C. F. y R. Yang. 1999. University of Alberta and Tim Boyle, Centre for International Forestry Research.
- Williams, J. G. K., R. A. Kubelik, J. K. Livak, A. J. Rafalski y V. S. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6531 – 6535
- Wolf, A. D. y A. Liston. 1999. Contribution of PCR-based methods to plant systematic and evolutionary biology. En Soltis, D. E., S. P., Soltis, y J. J., Doyle,(Eds).Molecular systematic of plants II, DNA sequencing. Kluwer Academic Publishers. New York. EUA. 43 – 86 pp.

- Wolff, K, S. El-Akkad, y J. A. Abbott. 1997. Population substructure in *Alkanna orientalis* (Boraginaceae) in the Sinai Desert, in relation to its pollinator behaviour. *Mol. Ecol.* **6**: 365 – 372
- Wright, S. 1951. The genetic structure of populations. *Ann. Eugen.* **15**: 322 – 354.
- Zavala, P. G.; H. C. Cano; J. J. A. Valdez, y J. M., López. 2002. Marcadores moleculares: revisión y aplicaciones prácticas en animales. Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología-FMVZ-UMSNH Morelia, Michoacán. México. *Ciencia Nicolaita* **32**: 99-109.

Anexo I. Protocolo de extracción del ADN MINI-PREP reportado por (Lefort *et al.* 1999).

1. Pesar de 100 a 120 mg de tejido.
2. Moler en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino.
3. Inmediatamente añadir 160 µl de solución CTAB previamente calentado en baño maría a 65°C.
4. Moler bien hasta que se obtenga una consistencia de pasta.
5. Añadir 600 µl de Solución La Porta.
6. moler bien hasta que se obtenga una consistencia homogénea y líquida.
7. Transferir a tubos Eppendorf de 1.5 ml esterilizados y etiquetados.
8. Agregar 100 µl de SDS al 20 %
9. Agitar vigorosamente (con las manos) durante dos minutos.
10. Incubar en baño María a 65°C.
11. A los cinco minutos de incubación agitar vigorosamente los tubos por 1 minuto e incubar otros 5 minutos en baño María.
12. Destapar los tubos y dejar enfriar un poco.
13. Agregar 180 µl de la Solución de Acetato de Potasio 5 M mantenida a -20°C.
14. Agitar los tubos durante 2 minutos.
15. Refrigerar durante 5 minutos a -20°C.
16. Centrifugar durante 20 minutos a 13,000 rpm.
17. Transferir el sobrenadante (aprox. 600 µl) a tubos nuevos.
18. Añadir 600 µl de isopropanol previamente enfriado a -20°C
19. Agitar suavemente los tubos.
20. Incubar a -20°C durante 15 minutos (se pueden quedar toda la noche).
21. Centrifugar a 13,000 rpm durante 20 minutos.
22. Tirar el sobrenadante y escurrir los tubos invirtiéndolos sobre una sanita.
23. Agregar 600 µl de TE y agitar hasta que el pellet se disuelva.
24. Centrifugar durante 10 minutos a 13,000 rpm.
25. Transferir la solución a tubos nuevos.

26. Agregar 600 µl de Isopropanol a -20°C y 60 µl de Acetato de Sodio 3M pH 5.
27. Agitar suavemente los tubos.
28. Incubar a -20°C durante 10 minutos.
29. Centrifugar durante 5 minutos a 13,000 rpm.
30. Tirar el sobrenadante y escurrir los tubos invirtiéndolos sobre una sanita
31. Dejar secar el ADN durante 30 minutos en la estufa a 60°C
32. Resuspender 1 pellet en 100 µl de agua estéril.
33. Una vez disuelto el pellet almacenar el ADN a -20°C .

Solución de la Porta (10 ml)

- 1 ml de TRIS 1M
- 1 ml de EDTA a 0.5 M
- 1 ml de Na Cl 5 M 6.9 ml de H_2O
- 100 µl de mercaptoetanol.

Solución CTAB (10 ml)

- 1 ml de TRIS 1M
- 4.5 ml de dd H_2O
- 200 mg de CTAB
- 2.8 ml de Na Cl a 5 M
- 400 µl de EDTA a 0.5M
- 400 mg de PVP-40
- 50 mg de ácido ascórbico
- 50mg de DIECA
- 100 µl de mercaptoetanol

Solución SDS 20 %

- 200 g. de SDS
- 800 ml de dd H_2O

Acetato de Potasio 5 M

49 g. de Acetato de Potasio (k)

100 ml de dd H₂O

Solución de Acetato de Potasio.

60 ml de acetato de potasio 5 M

11.5 ml de ácido acético

28.5 ml dd H₂O

Acetato de Sodio 3M.

40.8 g Acetato de sodio

100 ml dd H₂O

TE

1 ml de TRIS 1M con un PH de 8

200 µl de EDTA a 0.5 M

Aforar a 100 ml. Esterilizar en autoclave.

Anexo II. Protocolo de Cuantificación de ADN por espectrofotometría.

1. Se prende y se selecciona las unidades deseadas en este caso absorbancia, y se coloca a 260nm con respecto al espectro de rayos ultravioleta.
2. Para calibrar se llena una de las microceldas con un mililitro de H₂O doblemente destilada y se introduce en el espectro y se presiona enter.
3. Una vez que se calibra a 0 de absorbancia se procede a medir las muestras.
4. En la otra microcelda se coloca 1microlitro de ADN concentrado y se le adicionan 999 microlitros de H₂O doblemente destilada, se agita un poco y se introduce al espectro se tapa y directamente da la lectura.
5. Para obtener las unidades se multiplica la absorbancia obtenida x 50mg/ml y después por 1000ng/ml para obtener como unidades ng/ μ l una llegado se aplica una regla de tres según a la concentración deseada para este caso fue de (50ng/ μ l) de la cual so lo se tomo 1 μ l (25 ng/ μ l).
6. Se obtiene la cantidad de ADN concentrado total para igualar a una dilución total de 50ml, para lo cual al valor obtenido de ADN se resta a 50 y el resultado se adiciona de H₂O doblemente destilada para obtener un factor de dilución de 50ml para las reacciones de PCR.

Anexo III. Secuencias de oligonucleótidos utilizados.

Oligonucleótidos	Secuencias
OPA-01	5'-CAGGCCCTTC-3'
OPA-02	5'-TGCCGAGCTG-3'
OPB-11	5'-GTAGACCCGT-3'
OPB-17	5'-AGGGAACGAG-3'
OPC-02	5'-GTGAGGCGTC-3'
OPD-20	5'-ACCCGGTCAC-3'
OPF-01	5'-ACGGATCCTG-3'
OPH-03	5'-AGACGTCCAC-3'
OPH-13	5'-GACGCCACAC-3'
OPH-15	5'-AATGGCGCAG-3'

Anexo IV. Receta para geles de agarosa.

Geles de agarosa al 0.8 % para observar ADN total.

Gel chico 0.16gr de agarosa en 20 ml de buffer TBE 0.5X + 3 μ l de bromuro de etidio.

Gel mediano 0.32gr de agarosa en 40 ml de buffer TBE 0.5X + 4 μ l de bromuro de etidio.

Gel grande 1.6 gr de agarosa en 200 ml de buffer TBE 0.5X + 5 μ l de bromuro de etidio.

Geles de agarosa al 1.5% para PCR- RAPDs.

Gel chico 0.30gr de agarosa en 20 ml de buffer TBE 0.5X + 5 μ l de bromuro de etidio.

Gel mediano 0.60gr de agarosa en 40 ml de buffer TBE 0.5X + 6 μ l de bromuro de etidio.

Gel grande 3.09 gr de agarosa en 200 ml de buffer TBE 0.5X + 8 μ l de bromuro de etidio.