



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas

**Efecto de los cambios climáticos del Cuaternario
Tardío sobre la diversidad y estructura genética
de *Cephalocereus nizandensis* (Cactaceae)**

Tesis que para obtener el grado de
Maestría en Biociencias, presenta:

ALDO ISAAC JUÁREZ MIRANDA

Directores:

DR. CARLOS FABIÁN VARGAS MENDOZA

DRA. AMELIA CORNEJO ROMERO



Ciudad de México, diciembre de 2019



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 13:00 horas del día 27 del mes de noviembre del 2019 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas para examinar la tesis titulada:

Efecto de los cambios climáticos del Cuaternario Tardío sobre la diversidad y estructura genética de *Cephalocereus nizardensis* (Cactaceae)

Presentada por el alumno:

Juárez	Miranda	Aldo Isaac
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)

Con registro:

B	1	7	0	0	6	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de: **Maestría en Biociencias.**

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

LA COMISIÓN REVISORA


Directores de tesis

Dr. Carlos Fabián Vargas
Mendoza

Dra. Amelia Cornejo Romero

Dr. Héctor Omar Mejía Guerrero

Dr. Norberto Martínez Méndez


Dra. Alicia Callejas Chavero

PRESIDENTE DEL COLEGIO


Dr. Gerardo Apaxiño Ozores





INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSTGRADO E
INVESTIGACION

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de México, el día 02 del mes diciembre del año 2019, el que suscribe, **Aldo Isaac Juárez Miranda**, alumno del Programa de **Maestría en Biociencias**, con número de registro **B170066**, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis, bajo la dirección del **Dr. Carlos Fabián Vargas Mendoza** y **Dra. Amelia Cornejo Romero** y cede los derechos del trabajo intitulado “**Efecto de los cambios climáticos del Cuaternario Tardío sobre la diversidad y estructura genética de *Cephalocereus nizandensis* (Cactaceae)**”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: **a.juarezm@live.com.mx**, **carfvargas@yahoo.com** y **ameli.cornejo@gmail.com**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Aldo Isaac Juárez Miranda

Dr. Carlos Fabián Vargas Mendoza
Director de tesis

Dra. Amelia Cornejo Romero
Director de tesis

Resumen

Las fluctuaciones climáticas, glaciales-interglaciales, del Cuaternario Tardío (~ 0.126 Ma.) han modelado la diversidad y estructura genética de diversas especies, debido a que estas cambian su distribución y tamaño poblacional siguiendo las condiciones ambientales más adecuadas, llegando a contraerse en áreas pequeñas denominadas refugios. Estos cambios generan huellas genéticas distintas dependiendo de la etapa del ciclo glacial en la cual ocurre la contracción, dando lugar a las hipótesis contrastantes de refugios glaciales (HRG) e interglaciales (HRI). Se analizó la diversidad genética de *Cephalocereus nizandensis*, una cactácea columnar microendémica de Tehuantepec, cuya distribución se restringe a enclaves rocosos que forman hábitats insulares, donde se desarrollan los matorrales xerófilos más meridionales de Norteamérica, los cuales podrían representar refugios interglaciales de la flora xerófila. Partiendo de la HRI, se esperaba encontrar en *C. nizandensis* diversidad genética elevada, con poca estructura y una huella genética de expansión poblacional en el Último Máximo Glacial (~ 0.029 – 0.018 Ma.). Con la finalidad de inferir los posibles efectos de las fluctuaciones climáticas del Cuaternario Tardío sobre la diversidad y estructura genética de *C. nizandensis*, se analizaron dos secuencias de cloroplasto (*trnT-L* y *rpl32-trnL*) de 40 individuos y cinco ISSRs de 45 individuos pertenecientes a cuatro poblaciones. Se analizó la variabilidad y estructura genética, así como la relación entre haplotipos de ADNcp. Para buscar eventos climáticos que coincidieran con el origen de los haplotipos, se estimó el tiempo de divergencia mediante un reloj molecular y se probó la expansión poblacional. Finalmente, se estimó el comportamiento demográfico histórico de los linajes de ADNcp por medio de un análisis bayesiano de líneas de horizonte (*skyline plots*). La diversidad nucleotídica y haplotípica resultó alta ($\pi = 0.0013$ y $Hd = 0.75$) y la heterocigosidad esperada fue moderada ($H_e = 0.297$), respecto a otras cactáceas. Se encontró diferenciación elevada y significativa con ambos marcadores ($F_{ST} \sim 0.2$ $p < 0.001$). El ADNcp formó dos grupos genéticos, con tiempo de divergencia de 1.37 Ma. (HPD 95%: 2.27-0.686), durante el Pleistoceno. Estos dos grupos han tenido tendencias demográficas distintas, uno de ellos ha mantenido un tamaño poblacional constante desde hace 0.175 Ma, mientras que el otro grupo ha experimentado un incremento poblacional continuo por 0.150 Ma. La alta diversidad de la especie debe su origen a la larga permanencia a través del tiempo y a la expansión poblacional, mientras que la diferenciación poblacional se debe quizá a la especificidad edáfica y a la participación de polinizadores y dispersores con baja movilidad. Los resultados no fueron consistentes con la HRI, las fluctuaciones climáticas del Cuaternario Tardío no parecen haber tenido un efecto determinante en la diversidad y estructuración genética de *C. nizandensis*.

Abstract

The climatic fluctuations of the Late Quaternary (~ 0.126 Ma.), consisting of glacial-interglacial cycles, have modeled the diversity and genetic structure of various species that change their distribution and population size as they follow the most suitable environmental conditions, reaching its maximum contraction into small sites denominated refugia. These changes generate different genetic prints depending on the stage of the glacial cycle in which the contraction occurs, giving rise to the contrasting hypothesis of glacial and interglacial refugia (GRH and IRH). In the present study, the genetic diversity and structure of the columnar cactus *Cephalocereus nizardensis* were analyzed. This cactus is endemic to the Tehuantepec basin in Oaxaca, its distribution is restricted to rocky outcrops that represent insular habitats where the southernmost xerophilous scrublands of North America develop. The floristic evidence suggests that these habitats might be refugia. Starting from the Interglacial Refugia Hypothesis (IRH) it was expected to find high levels of genetic diversity, low interpopulation differentiation and population expansion during the Last Glacial Maximum (~ 0.029 – 0.018 Mya.). Aiming to infer the effect that the Late Pleistocene climatic fluctuations could have on this species, diversity was assessed from two non-coding chloroplast sequences (trnT-L and rpl32-trnL) from 40 individuals and five ISSR from 45 individuals coming from four populations. The variability and genetic structure were analyzed, as well as the relationship between cDNA haplotypes. Searching for climatic events that could match the origin of the haplotypes, the divergence time was inferred by means of a molecular clock. Finally, the historical demographic trend was estimated by the Bayesian Analysis of Skyline Plot. It was found that nucleotide and haplotypic diversities are high ($\pi = 0.0013$ y $Hd = 0.75$) and the expected heterozygosity is moderate ($H_e = 0.297$). The interpopulation differentiation was high among columnar cacti and significant ($F_{ST} \sim 0.2$ p < 0.001). Two groups were formed with the cpDNA which diverged 1.37 Mya. (HPD 95%: 2.27-0.686) during the Pleistocene. These groups have had different demographic trends, one of them has maintained a constant population size since 0.175 Mya. and the other one has experienced a continuous population growth since 0.150 Mya. The results were not consistent with the IRH, it seems that the climatic fluctuations of the Late Quaternary have not had a determining effect on *C. nizardensis*' diversity and genetic structuring. High genetic variability in this species may be due to long-lasting permanence over time and to population expansion, while population differentiation is maybe due to edaphic specificity and to participation of pollinators and dispersers with low vagility.

Agradecimientos

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Variación Biológica y Evolución del departamento de Zoología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Carlos Fabián Vargas Mendoza y la Dra. Amelia Cornejo Romero.

El sustentante agradece la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del Programa de Maestría en Biociencias de la ENCB del IPN, durante el periodo septiembre de 2017 a agosto de 2019 (N° de registro: 629069), así como las becas complementarias otorgadas por la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN, por medio del Programa Institucional de Formación de Investigadores.

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Investigación y Posgrado del IPN, como parte de los proyectos:

20170729, Diversidad y estructura genética de *Cephalocereus nizandensis*, una especie microendémica

20180562, Diversidad y estructura genética de *Cephalocereus nizandensis*, II

20195362, Caracterización de algunos elementos de la biodiversidad para diferentes ecosistemas del estado de Oaxaca

Agradezco a mis directores, Dr. Carlos Fabián Vargas Mendoza y Dra. Amelia Cornejo Romero, por sus enseñanzas y paciencia durante estos últimos años; a los miembros del jurado y mi comité tutor, Dra. Alicia Callejas Chavero, Dr. Norberto Martínez Méndez y Dr. Héctor Omar Mejía Guerrero, por tomarse el tiempo de evaluar mi trabajo y por sus observaciones.

A Bruno, Erick y Andrea, quienes participaron en el trabajo en campo; a Areli y Demian, por apoyar en alguna parte del trabajo de laboratorio; especialmente a Gerardo por hacer más amenos los días en el laboratorio.

A mis padres, por todo.

Índice

<i>Acta de Revisión de Tesis</i>	I
<i>Carta de Cesión de Derechos</i>	II
<i>Resumen</i>	III
<i>Abstract</i>	IV
<i>Agradecimientos</i>	V
<i>Lista de figuras</i>	X
<i>Lista de tablas</i>	XI
1. <i>Introducción</i>	1
2. <i>Antecedentes</i>	8
3. <i>Justificación</i>	12
4. <i>Hipótesis</i>	13
5. <i>Objetivo General</i>	14
5.1 <i>Objetivos particulares</i>	14
6. <i>Área de estudio</i>	15
7. <i>Especie de estudio</i>	16
8. <i>Métodos</i>	18
8.1 <i>Muestreo</i>	18
8.2 <i>Extracción de ADN</i>	18
8.3 <i>Amplificación y secuenciación de las regiones intergénicas de ADNcp</i>	19
8.4 <i>Amplificación y lectura de los ISSR</i>	20
8.5 <i>Análisis de Diversidad y Estructura Genética en Secuencias de ADNcp</i> ..	22
8.6 <i>Tiempo de divergencia</i>	26
8.7 <i>Demografía histórica</i>	27
8.8 <i>Análisis de Diversidad y Estructura Genética en ISSRs</i>	29

9. Resultados.....	31
9.1 Extracción y amplificación del ADN	31
9.2 Diversidad y Estructura Genética en Secuencias de ADNcp.....	34
9.3 Tiempo de divergencia.....	40
9.4 Demografía histórica.....	41
9.5 Diversidad y Estructura Genética en ISSRs.....	47
10. Discusión.....	51
10.1 Diversidad.....	51
10.2 Estructura genética	53
10.3 Demografía histórica.....	56
11. Conclusiones.....	59
Literatura citada	60
Anexos.....	68
Diversidad genética en grupos genéticos de ADNcp.....	68

Lista de figuras

Figura 1. Ubicación de las poblaciones de <i>Cephalocereus nizamensis</i> , en la región de Nizanda, Oaxaca.	16
Figura 2. Prueba de integridad de ADN extraído de individuos de cuatro poblaciones de <i>Cephalocereus nizamensis</i>	31
Figura 3. Amplificados de las regiones de ADNcp, <i>rpl32-trnL</i> (a) y <i>trnT-trnL</i> (b) en <i>Cephalocereus nizamensis</i>	32
Figura 4. Patrones de bandeo obtenidos al amplificar cinco ISSRs en <i>Cephalocereus nizamensis</i>	33
Figura 5. Mapa de distribución de haplotipos de <i>Cephalocereus nizamensis</i> en la región de Nizanda, Oaxaca.	35
Figura 6. Estructura genética del ADNcp de <i>Cephalocereus nizamensis</i>	38
Figura 7. Red de haplotipos de <i>Cephalocereus nizamensis</i>	39
Figura 8. Cronograma bayesiano de haplotipos de <i>Cephalocereus nizamensis</i>	41
Figura 9. Expansión demográfica de las poblaciones de <i>Cephalocereus nizamensis</i>	43
Figura 10. Expansión espacial de las poblaciones de <i>Cephalocereus nizamensis</i> . .	44
Figura 11. Análisis de demografía histórica de <i>Cephalocereus nizamensis</i>	45
Figura 12. Análisis de demografía histórica de los linajes de <i>Cephalocereus nizamensis</i>	46
Figura 13. Estructura genética del ADNn de <i>Cephalocereus nizamensis</i>	49
Figura 14. Valores de <i>Delta K</i> para los niveles de agrupamiento probados para <i>Cephalocereus nizamensis</i>	50

Lista de tablas

Tabla 1. Primers ISSR y sus respectivas secuencias usados en <i>Cephalocereus nizandensis</i>	21
Tabla 2. Diversidad genética en ADNcp en las poblaciones de <i>Cephalocereus nizandensis</i>	34
Tabla 3. AMOVA de las regiones intergénicas de ADNcp, <i>rpl32-trnL</i> y <i>trnT-L</i> de <i>Cephalocereus nizandensis</i>	36
Tabla 4. Diferenciación genética (F_{ST}) por pares de poblaciones en <i>Cephalocereus nizandensis</i> , obtenidas a partir de las regiones <i>rpl32-trnL</i> y <i>trnT-L</i> de ADNcp.....	36
Tabla 5. Flujo génico de ADNcp entre pares de poblaciones de <i>Cephalocereus nizandensis</i>	38
Tabla 6. Pruebas de neutralidad D (Tajima, 1989) y F_s (Fu, 1997) para <i>Cephalocereus nizandensis</i>	42
Tabla 7. Índices de diversidad genética de <i>Cephalocereus nizandensis</i> , obtenidos con ISSR.....	47
Tabla 8. AMOVA en ISSRs de <i>Cephalocereus nizandensis</i>	48
Tabla 9. Diferenciación genética (F_{ST}) por pares de poblaciones en ISSRs de <i>Cephalocereus nizandensis</i>	48
Tabla 10. Número de migrantes por generación (N_m), entre pares de poblaciones de <i>Cephalocereus nizandensis</i> , obtenido con cinco ISSR.	49
Tabla 11. Diversidad genética en grupos genéticos de <i>Cephalocereus nizandensis</i>	68

1. **Introducción**

La distribución de los alelos o genotipos de las especies no es aleatoria. Es resultado de la acción conjunta de la mutación, la selección, la migración y la deriva génica, procesos que actúan en un contexto histórico y biológico particular para cada especie. Sin embargo, la variabilidad genética y su distribución tienen un efecto importante en el destino evolutivo de las especies, ya que los patrones adaptativos dependen de estos (Avice, 2000; Hartl y Clark, 2007).

La evaluación de la diversidad y estructura genética actual nos permite conocer el efecto que han tenido factores intrínsecos y extrínsecos sobre las poblaciones y sus linajes en tiempos pasados (Avice, 2000). Respecto a los factores extrínsecos, ha sido ampliamente documentada la relación de las fluctuaciones climáticas recientes, como las del Cuaternario Tardío (0.126 a 0.010 Ma), con la distribución de la variabilidad genética y se considera que los ciclos glaciales-interglaciales de este periodo han tenido un efecto determinante para las poblaciones actuales (Hewitt, 2000; 2004; Hofreiter y Stewart, 2009). Gracias a la evidencia fósil, palinológica y paleoclimática, se ha observado cómo las especies cambiaron su distribución y abundancia a través del tiempo, siguiendo las condiciones climáticas más adecuadas para su supervivencia (Hewitt, 1996; Taberlet, *et al.*, 1998). Así, los periodos de rápido cambio climático han generado la extinción de poblaciones en grandes áreas donde el clima se torna poco favorable según las adaptaciones de cada especie, *e. g.* durante las etapas frías y secas de los glaciales, para especies adaptadas a ambientes templados y durante las etapas cálidas y húmedas de los interglaciales, para especies adaptadas a condiciones de frío o aridez (Hofreiter y Stewart, 2009).

De acuerdo con un modelo de contracción de hábitat, las especies sobreviven las etapas adversas en refugios, áreas más pequeñas que conservan las condiciones adecuadas para la permanencia de ciertos grupos de especies, y colonizan áreas más extensas durante las etapas favorables, en un proceso de expansión (Hewitt, 1996; Taberlet, *et al.*, 1998). La extinción local y la reducción en el tamaño poblacional conllevan a la pérdida de variabilidad genética, principalmente de alelos raros (Amos y Harwood, 1998), por lo que las poblaciones de los refugios poseen mayor diversidad que las poblaciones más recientes resultantes de la expansión (Hewitt, 1996). Además, los refugios suelen mantener poco flujo génico entre sí (Hewitt, 1996; Taberlet, *et al.*, 1998), lo cual en conjunto con la deriva génica provoca diferenciación y estructura poblacional (Amos y Harwood, 1998). Por medio de estos procesos es que se considera a los ciclos glaciales-interglaciales recientes como una de las fuerzas primarias de la estructuración poblacional (Hewitt, 1996; Taberlet, *et al.*, 1998).

Se han propuesto diferentes enfoques que utilizan los refugios como parte de la explicación del origen y estructuración de la diversidad genética actual (Bennett y Provan, 2008; Rull, 2009; Stewart, *et al.*, 2010). Este estudio se enfocó en las hipótesis contrastantes de refugios glaciales e interglaciales (HRG y HRI, respectivamente). En la HRG se considera que las especies adaptadas a ambientes templados sobrevivieron a las etapas más frías del Último Máximo Glacial (UMG 0.029 – 0.017 Ma) en refugios semi-aislados y colonizaron sus distribuciones actuales tras la deglaciación, durante la etapa más cálida y húmeda del actual interglacial (Holoceno ~ 0.012 Ma); proceso que formó gradientes de diversidad genética que descienden desde los refugios hacia las áreas alcanzadas durante la expansión (Taberlet, *et al.*, 1998; Hewitt, 2000). Mientras que la HRI plantea que especies con adaptaciones distintas, como algunas especies

de ambientes áridos subtropicales, tuvieron una mayor extensión geográfica y conectividad genética durante los periodos glaciales y pasaron por eventos de contracción poblacional durante las etapas más húmedas como el actual interglacial, lo que originó las poblaciones fragmentadas que observamos en el presente, las cuales tienen una alta diversidad genética con poca estructura geográfica (Haffer, 1969; Stewart, *et al.*, 2010).

Se ha evidenciado la existencia de refugios glaciales con plantas desérticas en Norteamérica, por medio de evidencia paleoclimática, registro fósil y palinológico que respaldan la presencia de *Larrea tridentata* y *Agave lechuguilla* en el bolsón de Mapimí y el cañón de las Maravillas, dentro del desierto Chihuahuense (Van Devender, 1990; Van Devender y Burgess, 1985) y *Yucca whipplei* en el desierto de Mojave (Spaulding, 1990), las cuales tuvieron una distribución más meridional durante el periodo glacial, hasta hace 0.011 a 0.008 Ma. También, se ha propuesto la existencia de refugios a partir de la evidencia molecular, por ejemplo, en la Sierra Madre Oriental, al centro sur del desierto Chihuahuense, donde la diversidad de las poblaciones de *Buchloe dactyloides* (Peakall, *et al.*, 1995) y *Hunnemannia fumariifolia* (Sosa, *et al.*, 2009) es más alta en las poblaciones del sur y particularmente, *H. fumariifolia* posee además poblaciones con altos niveles de diferenciación y aislamiento por distancia (Sosa, *et al.*, 2009), así como en las regiones de Cuatro Ciénegas-Mapimí, en la cuenca baja del Colorado y en la planicie Tamaulipeca, los gradientes de diversidad, estructuración y la distribución de poblaciones con diferente ploidía observada en *Melampodium leucanthum* respaldan la existencia de refugios (Rebernig, *et al.*, 2010). Estos patrones genéticos que respaldan la HRG, están descritos para el norte del país, sin embargo,

el sur del país ha sido poco estudiado en este aspecto, por lo que no se conocen refugios respaldados por evidencia molecular.

En contraste, se han observado patrones de distribución geográfica en especies xerófitas de la sabana rocosa del este de Brasil, las cuales se encuentran en parches dispersos en una extensa área. Lo cual ha llevado a sugerir que este tipo de vegetación ha sido fragmentada recientemente, después de una expansión durante la etapa más árida del último glacial (aproximadamente 0.020 Ma.) cuando las especies xerófitas ocupaban gran parte de la región boscosa actual, de acuerdo con la HRI (Haffer, 1969). Se ha comprobado esta hipótesis a nivel molecular a partir de la estructura filogeográfica e historia de diversificación de las cactáceas columnares del complejo *Pilosocereus aurisetus*, endémicas de formaciones rocosas en la sabana del Cerrado y Campo rupestre brasileño. Estas especies presentan poblaciones con poca estructura genética, alta diversidad de haplotipos y una historia demográfica que sugiere una expansión poblacional a inicios de la última glaciación y contracción poblacional reciente (Bonatelli *et al.*, 2014).

Los sitios considerados como refugios son de interés para comprender la evolución de la biota. Al conservarse en estos sitios las condiciones para la supervivencia de una especie durante los ciclos climáticos, estos fungen como reservorios de la diversidad genética que da origen a las poblaciones que emergen durante las fases de expansión. Su estudio también ayuda a comprender el origen de la distribución y los patrones de estructura genética de las especies en la actualidad (Taberlet *et al.*, 1998; Hewitt, 2000; Stewart *et al.*, 2010).

Al centro-sur de México hay un área de alta diversidad florística comprendida por el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, así como las cuencas del Balsas y de Tehuantepec

(Ezcurra, 1997; Sosa y Nova, 2012). Esta región, en particular la cuenca de Tehuantepec, has sido poco estudiada respecto al efecto de los procesos históricos climáticos (fluctuaciones climáticas) sobre la estructura de la diversidad genética en las plantas xerófilas. Las zonas áridas y semi-áridas del sur del país, como el Valle de Tehuacán y las selvas caducifolias de Oaxaca, han sido menos estudiadas que las zonas áridas del norte (e. g. Gámez, *et al.*, 2014; Cornejo-Romero *et al.*, 2017). Sin embargo, el sur de México es rico en endemismos de algunos grupos de plantas adaptadas a ambientes áridos y semi áridos, por ejemplo, las cactáceas columnares (Ezcurra, 1998; Sosa y De Nova, 2012) y esta zona es de importancia para comprender la diversidad del resto de las zonas áridas (González-Medrano, 1996).

El Istmo de Tehuantepec posee una alta diversidad florística y se ha propuesto que ahí se encuentran refugios donde permanecen relictos de antiguas migraciones de elementos neotropicales de la flora xerófila de México (González-Medrano, 1996). Los enclaves rocosos de Nizanda representan las comunidades xerófilas más meridionales del país y se encuentran aisladas en una matriz de vegetación mesófila (Pérez-García y Meave, 2005), razón por la cual estos sistemas rocosos podrían fungir o haber fungido como refugios.

Esta hipótesis sobre la Región de Nizanda como refugio de la flora xerófila mexicana, se sustenta en la alta afinidad florística entre la cuenca alta de Tehuantepec y el Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Acosta-Castellanos y Rodríguez, 2003), la característica composición florística rica en endemismos, algunos de los cuales están asociados a rasgos geomorfológicos característicos como los enclaves rocosos, así como la presencia de especies basales o con caracteres ancestrales de familias adaptadas a condiciones xerófilas, como *Pereskia lychnidiflora* y *Pereskiaopsis kellermannii*

(Cactaceae) que se desarrollan en la selva baja y *Agave nizandensis* (Agavaceae) que también está asociada a sustratos rocosos (Pérez-García, 2002 Pérez-García y Meave, 2005).

Cephalocereus nizandensis es una especie dominante que se desarrolla en hábitats insulares de la región de Nizanda (Pérez-García y Meave, 2005). Esta región se ha propuesto como refugio de la flora xerófila (González-Medrano, 1996), por lo cual, *C. nizandensis* representa un buen modelo para probar las hipótesis de refugios. El estudio de esta especie mediante el análisis de su diversidad y estructura genética ayudará a comprender como los eventos históricos, en particular, las fluctuaciones climáticas, pudieron afectar la diversidad genética de especies de cactáceas columnares en el sur de México.

Las variaciones nucleotídicas en las secuencias de las regiones no codificantes (intergénicas o espaciadores) del ADN de cloroplasto (ADNcp) han sido ampliamente utilizadas en estudios intraespecíficos, ya que reflejan la herencia monoparental materna y muestran una mayor frecuencia de mutaciones respecto a las regiones codificantes, lo que genera una variabilidad que permite un análisis a bajo nivel molecular, lo cual permite poner a prueba hipótesis de carácter histórico, ya que gracias a su herencia matrilineal se puede inferir una estimación del tiempo en que ocurrieron procesos demográficos y de divergencia (Shaw, *et al.*, 2007; Vázquez-Domínguez, *et al.*, 2009). En cactáceas se han utilizado para filogenia, genética de poblaciones y filogeografía, estudios que implican análisis a nivel de género o infraespecíficos (*e. g.* Bonatelli *et al.*, 2014; Ornelas y Rodríguez-Gómez, 2015; Cornejo-Romero *et al.*, 2017; Tapia, *et al.*, 2017; Quipildor *et al.*, 2017).

La inclusión de marcadores distintos, con información de genomas de herencia materna y biparental puede ayudar a distinguir entre los efectos del flujo génico mediado por polinización y dispersión (Duminil, *et al.*, 2007). Los ISSRs (*inter simple sequence repeats*, por sus siglas en inglés) han sido poco utilizados en poblaciones silvestres de cactáceas (*Ferocactus histrix*, *Stenocereus thurberi* y *Eulychnia acida*; Castro-Felix, *et al.*, 2014; Bustamante, *et al.*, 2016; Jana, *et al.*, 2017), pero han sido empleados para buscar variabilidad en una gran diversidad de especies cultivadas, por ejemplo, *Hylocereus undatus*, *Pilosocereus robinii* y *Opuntia ficus-indica* (Fan, *et al.*, 2013; Khattab, *et al.*, 2014; Ganopoulos, *et al.*, 2015). Estos marcadores brindan información principalmente de ADN nuclear y dada su accesibilidad, reproducibilidad y resolución (González y Aguirre, 2007) son adecuados para complementar el análisis con secuencias de cloroplasto.

2. **Antecedentes**

En esta sección se describen los principales patrones geográficos reportados para la diversidad genética de las cactáceas columnares. El primer patrón filogeográfico probado en cactáceas fue el de la columnar *Lophocereus schottii* del desierto de Sonora (Nason, *et al.*, 2002). A partir del análisis de la estructura genética obtenida mediante aloenzimas, se dedujo que los linajes continentales y peninsulares se separaron por vicarianza a partir del desprendimiento de Baja California y que las poblaciones del norte son derivadas de un único refugio glacial al sur de la península. Estas poblaciones se originaron por eventos de dispersión durante un proceso de expansión propiciado por los ciclos climáticos del Pleistoceno. La persistencia de poblaciones de esta cactácea en un refugio glacial al sur de Baja California y su posterior expansión durante el interglacial, generó un gradiente latitudinal de diversidad a lo largo de la península, con las poblaciones de mayor variabilidad en el sur y las de menor variabilidad hacia el norte, acompañado de una correlación entre la distancia genética y geográfica, lo que se conoce como aislamiento por distancia, y un anidamiento filogenético en el mismo sentido sur-norte, indicando que las poblaciones del norte son descendientes de aquellas al sur (Nason, *et al.*, 2002).

Stenocereus gummosus, también de la península de Baja California, posee una estructura genética, estimada con aloenzimas, con un gradiente de diversidad similar al de *L. schottii*, sugiriendo que esto es resultado de una historia ambiental común (Clark-Tapia y Molina-Freaner, 2003)

Pilosocereus machrisii y *Praerocereus euchlorus* del este de Brasil poseen elevados valores de diferenciación poblacional ($F_{ST} = 0.281$ y 0.484 , respectivamente), en

ausencia de aislamiento por distancia. Esto en conjunto con un patrón de distribución insular, respaldan una hipótesis de fragmentación poblacional causada por la contracción de zonas áridas de Sudamérica durante el actual periodo interglacial (Moraes, *et al.*, 2005).

Las especies del complejo *Pilosocereus aurisetus* (*P. aurisetus*, *P. machrisii*, *P. vilaboensis*, *P. jauruensis*, *P. aureispinus*, *P. parvus* y *P. bohlei*) que habitan parches xerófilos del sudeste de Brasil, fueron analizadas con microsatélites y secuencias nucleares y de cloroplasto, arrojando evidencia de múltiples niveles de fragmentación en la distribución de las poblaciones durante las etapas interglaciales, lo cual dio lugar a la diferenciación y diversificación de las especies, con contacto secundario generado por expansión durante las etapas glaciales, cuando los ambientes xerófilos tuvieron una distribución más extensa y continua (Bonatelli, *et al.*, 2014).

La estructura genética de *Pachycereus pringlei* obtenida con microsatélites presenta un gradiente sur-norte, con aislamiento por distancia a lo largo de la península de Baja California, como en el caso de *L. schottii*, las poblaciones del sur poseen alelos exclusivos y los modelos de nicho predicen su presencia restringida al extremo sur de la península durante el Último Máximo Glacial (~0.021 Ma.; Gutiérrez-Flores, *et al.*, 2016)

Se han puesto a prueba las hipótesis contrastantes HRG e HRI a partir de secuencias de cloroplasto de *Cephalocereus columna-trajani* del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Se encontró evidencia de expansión poblacional y espacial durante el último interglacial (0.123 Ma.) y de reducción en el último periodo glacial, de acuerdo con la HRG. Además de baja diversidad nucleotídica y baja estructura genética, por lo que se

considera a *C. columna-trajani* una sola población panmítica, posiblemente resultado de la dispersión quiropterófila (Cornejo-Romero, *et al.*, 2017).

Se ha encontrado, mediante análisis de modelos de nicho ecológico, que las especies del género *Cephalocereus* pudieron tener diferentes patrones de expansión y contracción del hábitat durante las fluctuaciones climáticas del Cuaternario. Las especies del Valle de Tehuacán-Cuicatlán y Barranca de Metztitlán se pudieron contraer durante el último periodo glacial y expandirse en los interglaciares. En contraste, las especies de la cuenca de Tehuantepec pudieron expandir su hábitat durante el último glacial y su distribución sería más restringida durante los interglaciares (Juárez Miranda, 2017), caso que podría ocurrir para *C. nizandensis*.

Las poblaciones de *Echinopsis terscheckii* muestran evidencia de persistencia duradera y la presencia de múltiples refugios glaciales a lo largo de toda su distribución e indican diferentes respuestas a los ciclos climáticos del Cuaternario, dependiendo de la latitud. Las poblaciones de esta especie se encuentran moderadamente diferenciadas ($F_{ST} = 0.12$) en grupos al norte y al sur de la Sierra del Aconquija, en los Andes argentinos. A partir del análisis de isoenzimas y modelos de nicho ecológico, se dedujo que las poblaciones que se observan actualmente al norte son resultado de persistencia local de pequeñas poblaciones que sobrevivieron a las condiciones climáticas adversas del periodo glacial y/o son resultado de dispersión a larga distancia. Cualquiera de los dos escenarios explica la reducción en la diversidad respecto a las poblaciones del sur ($H_E = 0.39$) y una mayor divergencia entre poblaciones ($F_{ST} = 0.116$), por causas de la deriva génica o el efecto fundador. Posteriormente, el mejoramiento de las condiciones climáticas al norte de la Sierra del Aconquija durante el Holoceno permitió la expansión de esta cactácea a mayores

altitudes. Por otro lado, las poblaciones del sur pudieron persistir como poblaciones estables en los sitios de su distribución actual, durante las condiciones climáticas del UMG e incluso expandirse hacia las tierras bajas adyacentes, lo que se ve reflejado en una mayor diversidad ($H_E = 0.49$) y cohesión genética entre las poblaciones ($F_{ST} = 0.088$). Durante el Holoceno (~ 0.010 Ma.) las poblaciones sureñas de *E. terscheckii* se contrajeron, lo cual es respaldado por la reducción proyectada por el nicho ecológico y la evidencia genética de cuellos de botella (Quipildor, *et al.*, 2017).

Se ha encontrado que las oscilaciones climáticas del Cuaternario Temprano (~ 2.6 Ma) pudieron ser más influyentes en la distribución de la variabilidad genética de *Cereus hildmannianus* en el sureste de Brasil, creando cuellos de botella sobre una población ancestral ampliamente distribuida, dejando un papel secundario a las fluctuaciones del Cuaternario Tardío (Silva, *et al.*, 2018).

En *Stenocereus laevigatus* del sureste de México, la estructura filogenética obtenida con microsatélites encontró que las poblaciones más derivadas se encuentran en las zonas kársticas yucatecas de origen más reciente de la península de Yucatán, lo cual sugiere una colonización reciente de menos de 0.018 Ma. (Alvarado-Sizzo, *et al.*, 2018).

Se ha sugerido que *Echinopsis chiloensis* pasó por una contracción poblacional hacia el norte de Chile, acompañada de fragmentación poblacional durante la etapa fría y húmeda del último periodo glacial (HRG) y expansión durante las condiciones xéricas del Holoceno Medio. Esta propuesta está respaldada por paleo-reconstrucción del modelo de nicho climático, así como un gradiente de diversidad genética decreciente hacia el sur, acompañado de aislamiento por distancia (Ossa, *et al.*, 2019).

3. **Justificación**

Las cactáceas columnares son elementos clave en la ecología y funcionamiento de los ambientes áridos y semi-áridos de América, son elementos dominantes del paisaje, participan de múltiples interacciones bióticas, además de su importancia cultural y económica (Fleming y Valiente-Banuet, 2002).

Las especies de cactáceas del sur de México están poco representadas en los trabajos relacionados con la genética de poblaciones (Cornejo-Romero *et al.*, 2013; Bustamante *et al.*, 2016). Además, la región donde se llevó a cabo este estudio se encuentra dentro de uno de los centros de diversificación de las cactáceas columnares de Norteamérica (tribu Pachycerineae; Ezcurra, 1997), la cuenca de Tehuantepec pudo ser una zona de tránsito de los elementos neotropicales que componen las zonas áridas de Norteamérica (González-Medrano, 1996) y el hábitat rocoso donde se desarrolla esta especie podría fungir como refugio para la biota.

El presente estudio aportará evidencia sobre el efecto que han tenido los eventos históricos climáticos sobre la diversidad y estructura genética de una cactácea columnar que se desarrolla en los matorrales xerófilos más meridionales de Norteamérica, dentro del centro de diversificación de la tribu Pachycereae, lo cual permitirá contribuir al conocimiento sobre el origen de la diversidad de un grupo taxonómico importante de las zonas áridas de América.

4. Hipótesis

En el contexto de la hipótesis de refugios interglaciales, se esperaba encontrar para *Cephalocereus nizandensis* un patrón genético con diversidad relativamente alta y con poca diferenciación interpoblacional, similar a lo reportado en otras cactáceas columnares, así como un incremento en el tamaño efectivo poblacional que coincidiera temporalmente con el Último Máximo Glacial.

5. Objetivo General

Determinar el efecto de los ciclos climáticos del Cuaternario Tardío sobre la diversidad y estructura genética de cuatro poblaciones de *C. nizandensis*, mediante el análisis con secuencias de ADN de cloroplasto e ISSR.

5.1 Objetivos particulares

- a) Estimar la diversidad genética de *C. nizandensis* a nivel poblacional.
- b) Determinar la estructura genética y filogeográfica de *C. nizandensis*
- c) Estimar el tiempo de divergencia de los haplotipos para probar la relación entre los ciclos climáticos con la diversificación de las poblaciones.
- d) Inferir la dinámica demográfica y espacial histórica de *C. nizandensis*.

6. Área de estudio

Cephalocereus nizandensis crece dentro de la región de Nizanda, la cual se ubica al sureste del Istmo de Tehuantepec, en el distrito de Juchitán, Oaxaca (16°39'N, 95°00'W). Esta región colinda al norte con las planicies de Chivela, al sur con la planicie de Tehuantepec, al oeste con las laderas del Cerro Naranjo y al este con la carretera Chivela – La Ventosa. La región abarca un área aproximada de 85 Km², la altitud varía entre 90 y 700 m (Pérez-García, *et al.*, 2001; Figura 1).

El clima es tropical húmedo y altamente estacional, con lluvias intermitentes entre junio y octubre, con precipitación media anual alrededor de 1000 mm. El suelo dominante es litosol, con presencia de feozems háplicos y regosoles, sobre los cuales se desarrolla la vegetación méstica, dominada por selva baja caducifolia. Embebidos en esta matriz de vegetación, se desarrollan parches aislados de matorral xerófilo, en un corredor discontinuo de aproximadamente 10 Km de largo por 1 Km de ancho, que persisten gracias a la aridez edáfica que generan los afloramientos de roca caliza expuesta. Este matorral es de tipo crasicaule y está conformado principalmente por *C. nizandensis*, *Hechtia rosea*, *Comocladia engleriana*, *Pseudosmodium multifolium*, *Mammillaria voburnensis*, *M. albilanata* y *Agave ghiesbreghtii* (Pérez-García y Meave, 2005; Pérez-García, *et al.*, 2009).

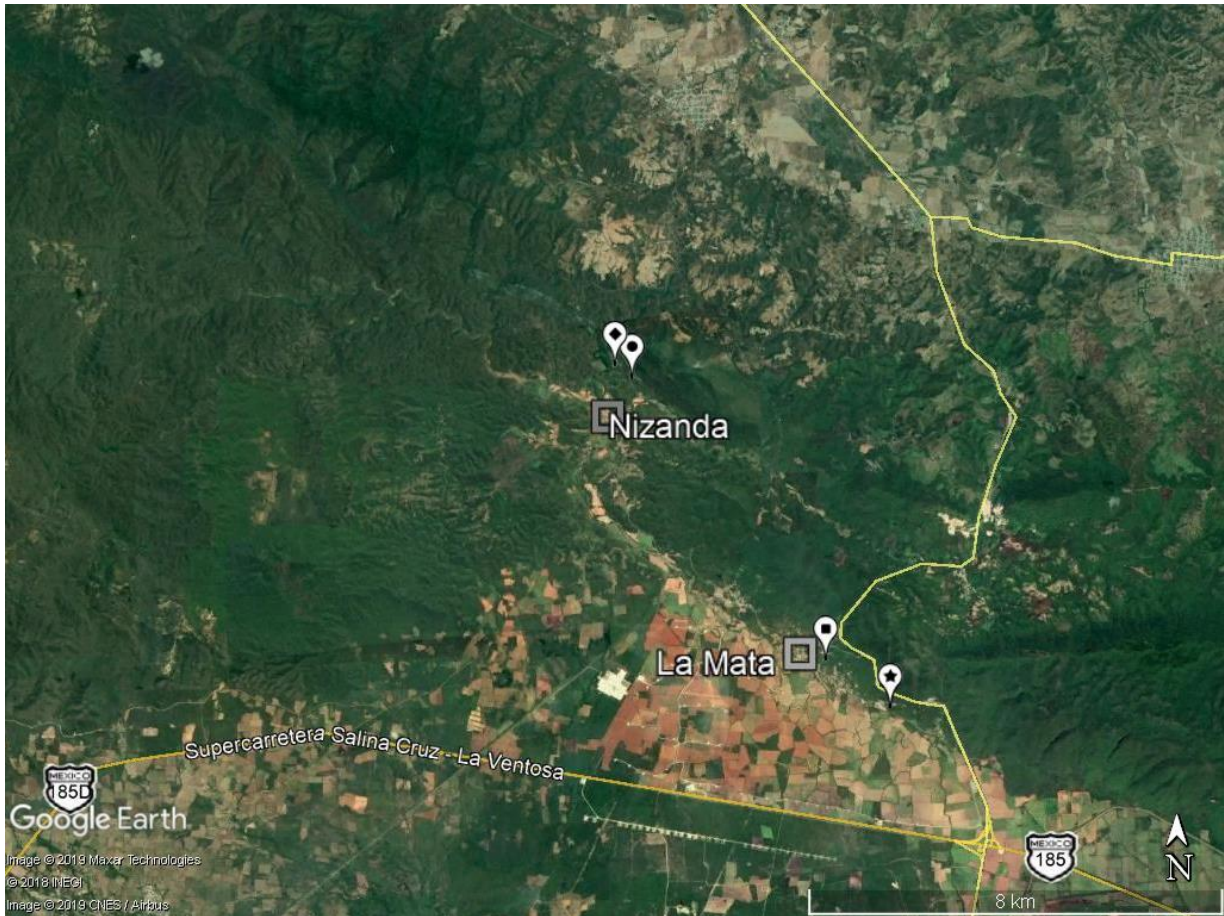


Figura 1. Ubicación de las poblaciones de *Cepholocereus nizandensis*, en la región de Nizanda, Oaxaca. Poblados más cercanos a los sitios muestreados (cuadros grises). Las poblaciones se nombraron: M1 (cuadrado), M2 (estrella), N1 (círculo) y N2 (rombo).

7. *Especie de estudio*

Cepholocereus nizandensis (Bravo y T. MacDoug.) Buxb. es una cactácea columnar microendémica de los enclaves xerófilos de la cuenca de Tehuantepec. Se conocen pocas poblaciones con decenas a cientos de individuos (Bárcenas-Argüello, 2011). La presencia de *C. nizandensis* está fuertemente restringida por su preferencia edáfica, ya que su distribución se limita a afloramientos de rocas metacalizas, donde los procesos de disolución forman cavidades de hasta 10 cm de profundidad, que acumulan el agua y restos orgánicos, permitiendo el establecimiento y crecimiento de

las plantas en un sustrato casi inexistente, pobre en nutrientes y que mantiene altas temperaturas (Bárcenas-Argüello, *et al.*, 2010; Bárcenas-Argüello, 2011).

Esta cactácea mide de 1.5 a 3 metros de alto, con tallos de entre 12 y 15 cm de diámetro, inicialmente sin ramificaciones. La zona reproductiva está diferenciada en un pseudocefalio apical, con abundantes lanosidades amarillentas a cafés; del pseudocefalio emergen flores de forma tubular a campanulada, de color crema a rosado de aproximadamente 4 cm de largo (Bravo Hollis y Sánchez Mejorada, 1978; Anderson, 2001). Se ha reportado la ausencia de reproducción clonal en la especie (Tovar Romero, 2005) y no se tiene registro de sus polinizadores o dispersores.

8. Métodos

8.1 Muestreo

Se seleccionaron dos sitios cercanos a Nizanda (N1 y N2) y dos en La Mata (M1 y M2; Figura 1). Se colectó tejido vegetal de al menos 20 individuos por sitio, dependiendo del tamaño de la población. La colecta se realizó seleccionando aleatoriamente individuos reproductivos, con pseudocefalio y mayores a 1.5 m de alto. Se obtuvo una sección del tallo de aproximadamente 5 x 3 cm, en zonas libres de lignificación o evidencia de plagas. Las heridas causadas por el muestreo fueron cubiertas con cera de Campeche para evitar la entrada de patógenos. Las muestras se trasladaron en un termo con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta la extracción de ADN.

8.2 Extracción de ADN

Se obtuvo ADN genómico de 97 individuos de *C. nizandensis* a partir de 100 mg de clorénquima congelado, siguiendo el protocolo de extracción del *DNeasy Plant Minikit* (QIAGEN), con modificaciones mínimas. Se reemplazó la incubación en hielo por temperatura ambiente y se incrementó a 1.5 volúmenes de buffer de precipitación (AP1). Para verificar la integridad del ADN se utilizó electroforesis en gel de agarosa 1% con buffer TBE y se cuantificó la concentración de ADN por espectrofotometría en *NanoDrop* (ThermoFisher).

8.3 Amplificación y secuenciación de las regiones intergénicas de ADNcp

En este estudio se seleccionaron dos regiones intergénicas de ADNcp: *trnT-trnL*, la cual se encuentra en la sección larga de copia única (LSC) del cloroplasto y posee un tamaño muy variable (Taberlet, *et al.*, 1991), este fragmento suele medir entre 537 y 559 pb en la tribu Cactoideae (Appelquist y Wallace, 2002), a la cual pertenecen las cactáceas columnares. La región *rpl32-trnL^(UAG)*, se encuentra en la región corta de copia única (SSC) del genoma del cloroplasto, tiene un tamaño de 543 a 1417 pb y es una de las regiones más variables del cloroplasto (Shaw *et al.*, 2007).

Para realizar el análisis de las secuencias de ADN es necesario primero obtener múltiples copias de las regiones de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), la cual consiste en producir *in vitro* el proceso de replicación del ADN de manera cíclica. Así cada ciclo multiplica exponencialmente la cantidad de copias de la región de ADN especificada por los *primers* (Espinosa Asuar, 2007). Las reacciones PCR se realizaron en un volumen de 25 μL utilizando 12.5 μL de *Taq Mastermix* (RADIANT), 100 ng de ADN molde por reacción, 10 ng de cada *primer* y agua inyectable hasta completar el volumen. Se siguieron las condiciones de reacción indicadas por el fabricante: 60 segundos de desnaturalización inicial a 94°C; 30 a 40 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 94°C, 15 segundos de alineamiento con temperaturas según los *primers*; 15 segundos de extensión a 72°C. Para *trnT-trnL* se usaron 40 ciclos a 55 °C para el alineamiento y 30 ciclos a 60°C para *rpl32-trnL*. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador *SelectCycler II* (Select BioProducts). La amplificación de los fragmentos se verificó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa 2% en Buffer TBE.

Posterior a la amplificación se realizó una purificación de los productos de PCR, para llevar a cabo la reacción de secuenciación. Estos procesos se realizaron con la compañía MACROGEN INC., mediante secuenciación automática.

Obtenidas las secuencias, se realizó una búsqueda de similitudes en GenBank, mediante un alineamiento en BLAST (Altschul, *et al.*, 1990), para corroborar la identidad de las secuencias. Adicionalmente, se descargaron del GenBank las secuencias de las regiones intergénicas *rpl32-trnL* de *C. totolapensis* y *C. apicicephalium* y *trnT-trnL* de *C. columna-trajani* para utilizar como referencia en el alineamiento, el cual se llevó a cabo en el programa MUSCLE, con el método de agrupamiento UPGMB con hasta ocho iteraciones y penalización para la apertura de gaps = 400 y 0.01 para la extensión del gap (Edgar, 2004). La edición de las secuencias se realizó manualmente en MEGA 7 (Kumar, *et al.*, 2016)

8.4 Amplificación y lectura de los ISSR

Los Inter-microsatélites (ISSR) son marcadores dominantes, semi arbitrarios, que amplifican los segmentos de ADN que se encuentran entre dos secuencias de un microsatélite. Estos marcadores permiten observar la variabilidad dispersa en varios genomas, principalmente el nuclear, y su resolución llega a ser a nivel de individuo. Funcionan con *primers* que no requieren conocer previamente el genoma, los cuales se unen a las regiones con Repeticiones de Secuencias Simples (SSR, por sus siglas en inglés) o microsatélites. Los ISSR se visualizan en geles de agarosa o acrilamida y generan patrones de hasta 50 bandas, donde cada molécula de un tamaño determinado se lee como un locus con dos alelos (González y Aguirre, 2007).

Se ensayaron 19 *primers* ISSR que han mostrado polimorfismos en otras especies de la familia Cactaceae (Khattab, *et al.*, 2014; Castro-Felix, *et al.*, 2014; Ganopoulos, *et al.*, 2015; Valadez-Moctezuma, *et al.*, 2015; Jana, *et al.*, 2017). De ellos se seleccionaron cinco de los más variables para estimar la diversidad en *C. nizandensis* (Tabla 1).

Tabla 1. Primers ISSR y sus respectivas secuencias usados en *Cephalocereus nizandensis*.

Etiqueta	Secuencia	TA [°C]	Referencia
Sh1	(GA)8CTC	55	Khattab <i>et al.</i> , 2013
Sh3	(AC)8CTT	56	Khattab <i>et al.</i> , 2013
IS-01	AC(GACA)4	56	Valadez-Moctezuma <i>et al.</i> , 2014
827	(AC)8G	54	Ganopoulos <i>et al.</i> , 2015
Fero6	(GA)8C	56	Castro-Felix <i>et al.</i> , 2008

Temperatura de alineamiento (TA).

La amplificación se realizó con 12.5 µL de Taq MasterMix (RADIANT), 50 ng de ADN molde, 10 ng de primer y agua inyectable hasta completar el volumen de 25 µL. El programa de la amplificación consistió en 3 min de desnaturalización inicial; un ciclo de 15 s a 94°C, 15 s a temperatura de alineamiento de acuerdo con el primer (Tabla 1) y 30 seg. a 72°C; nueve ciclos de *touchdown* disminuyendo 1°C/ciclo a partir de la temperatura de alineamiento (Tabla 1); 30 ciclos idénticos al primero y dos min. de extensión final. Las reacciones se realizaron en un termociclador Prime (Techne). Los productos de la amplificación se sometieron a electroforesis horizontal en gel de agarosa 1.5% en solución amortiguadora TBE y fueron observados por medio del agente intercalante GelRed (Biotium) en un fotodocumentador Mini-Bis Pro (DNR Bio-Imaging Systems). A partir de las capturas del fotodocumentador se elaboraron matrices de presencia/ausencia para cada primer.

8.5 Análisis de Diversidad y Estructura Genética en Secuencias de ADNcp

La variación dentro de las secuencias de ADN a nivel de población se cuantifica usualmente mediante datos de *loci* haploides provenientes de los organelos (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009). Los estimadores de la diversidad pueden reflejar la influencia de diversos factores como la proporción de reproducción sexual/asexual, el tamaño y la edad de las poblaciones, la conectividad genética, eventos de introgresión, la tasa de mutación y el impacto de la selección, entre otros (Goodall-Copestake, *et al.*, 2012). Para analizar la variabilidad genética a nivel de especie, dentro de las poblaciones y de los grupos genéticos (obtenidos con STRUCTURE, como se menciona más adelante), se utilizaron los siguientes estimadores:

La diversidad nucleotídica (π), que estima el promedio de la diversidad genética por *loci*, mediante las diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias seleccionadas al azar y se calcula como la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos elegidos al azar sean distintos (Nei y Li, 1997).

La diversidad haplotípica (Hd), estima la probabilidad de seleccionar al azar dos haplotipos diferentes. Los valores de este índice van del 0 al 1, 0 indica que todos los individuos tienen el mismo haplotipo y 1 que todos los individuos tienen diferentes haplotipos (Nei 1987). Para calcular estos índices se utilizó el software DNASP 5 (Librado y Rozas, 2009).

Para estimar la estructura genética se llevó a cabo un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), el cual es un método estadístico que estima las diferencias genéticas entre grupos, usando la información del contenido alélico de los haplotipos, así como su frecuencia. El AMOVA permite estimar los componentes de la varianza, reflejando la

correlación de la diversidad haplotípica en diferentes niveles de una subdivisión jerárquica (grupos y poblaciones) a partir de una matriz de distancias euclidianas cuadráticas entre todos los pares de haplotipos (Excoffier, *et al.*, 1992).

La diferencia entre las poblaciones se obtiene como el índice F_{ST} , el cual indica la proporción de endogamia que es causada por la diferenciación entre subpoblaciones. Este índice tiene valores que van del 0 al 1, donde el cero indica que no hay diferencias entre poblaciones y el 1 indica la mayor diferenciación, donde las poblaciones no comparten haplotipos. Además, este método permite probar la significancia de los índices, usando procedimientos de permutaciones no paramétricas (Excoffier *et al.*, 1992).

Este análisis se realizó considerando cada una de las localidades como una subdivisión del mismo nivel jerárquico, es decir, cuatro poblaciones dentro de un grupo. Se utilizaron 1000 permutaciones para probar la significancia. Adicionalmente, se calculó el índice F_{ST} para todos los pares de poblaciones, con la finalidad de probar la diferencia entre cada una de estas. El análisis se realizó mediante el programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010).

Para obtener una estimación de la conectividad genética entre poblaciones, se calculó el flujo génico (Nm). El cual estima el número de migrantes a partir de los índices F_{ST} , asumiendo una relación simple entre la migración y la deriva génica, con una tasa de mutación despreciable. El valor de Nm es directamente proporcional al número de migrantes para las poblaciones haploides (Slatkin, 1991) y se obtuvo por medio del software ARLEQUIN 3.5 (Excoffier, 2010).

Finalmente, se realizó un Análisis Bayesiano de Estructura Genética, ya que los análisis tradicionales, como los índices F o las distancias genéticas, cuantifican la variación genética a partir de una estructura fija pre-asignada, mientras que los análisis bayesianos no imponen una estructura *a priori* y consideran la posibilidad de formar cualquier combinación de grupos, buscando la subestructura empíricamente más plausible a partir de los datos (Corander, *et al.*, 2013). Los métodos que arreglan una muestra de individuos en grupos genéticos sin una caracterización *a priori* permiten estimar la subestructura oculta. Estos operan minimizando el desequilibrio de Hardy-Weinberg y el desequilibrio de ligamiento que podría resultar si individuos de diferentes poblaciones con apareamiento aleatorio son incorrectamente agrupados en una misma población (Latch, *et al.*, 2006).

El análisis se hizo por agrupamiento con loci ligados, siguiendo un modelo de ligamiento lineal, se probaron un máximo de 20 grupos probables, para lo cual se utilizó el programa Bayesian Analysis of Population Structure (BAPS) v6.0 (Corander *et al.*, 2012). El análisis utiliza un esquema de muestreo Monte Carlo Cadenas de Markov (MCMC), para combinar información de múltiples *loci* en un solo modelo probabilístico. La asignación de la agrupación más probable se realiza a partir de la distribución de la probabilidad posterior para cada número de grupos K inferidos (Corander *et al.*, 2012). Para analizar las diferencias en el nivel de variabilidad genética de los grupos genéticos obtenidos, también se les calcularon los índices de diversidad genética. Además, dado que la estructura genética fue significativa, los grupos genéticos fueron considerados para los análisis de demografía histórica, para cumplir con el supuesto de panmixia y se señalaron como referencia en la red de haplotipos y el árbol filogenético obtenido en la estimación de tiempos de divergencia.

Se estimó la relación entre los haplotipos por medio de una red de haplotipos, el cual es un método de reconstrucción filogenética basado en el número mínimo de mutaciones (Vázquez-Domínguez, *et al.*, 2009). Las redes de haplotipos permiten describir relaciones evolutivas en forma de árboles multibifurcantes, donde un haplotipo puede dar origen a muchos otros y las conexiones entre haplotipos representan eventos de coalescencia que permiten hacer ciertas predicciones, por ejemplo: 1) los haplotipos ancestrales tienen mayor probabilidad de aparecer con una alta frecuencia y se espera que estén presentes en una distribución geográfica amplia, 2) los haplotipos con múltiples conexiones tienen mayor probabilidad de ser ancestrales, 3) los haplotipos ancestrales se encuentran al interior de la red, mientras que los haplotipos periféricos son probablemente más recientes y 4) se espera que los haplotipos con una sola conexión estén conectados con haplotipos de la misma población (Vázquez-Domínguez, *et al.*, 2009).

Con los haplotipos formados por las secuencias de *C. nizandensis* y secuencias de *C. columna-trajani* y *Carnegiea gigantea* obtenidas del GenBank, usadas como grupo externo, se realizó una red de haplotipos mediante un algoritmo *Median Joining*. Este algoritmo identifica grupos de haplotipos cercanamente relacionados e introduce una hipótesis de ancestría, uniendo a los haplotipos en una red parsimoniosa regida por el parámetro *épsilon* que determina el agrupamiento inicial de haplotipos cercanos (Bandelt, *et al.*, 1999). La red se realizó con el programa NETWORK v4.613 (Fluxus Technology Ltd, 2015), se le otorgó el mismo peso (10) a todos los sitios variables, el peso entre transiciones y transversiones fue 1:1. Se utilizó el criterio de costo de conexión y se usó el valor de *épsilon* = 10. Se crearon nodos proporcionales a la

frecuencia de los haplotipos y estos fueron indicados con colores de acuerdo con los grupos genéticos del agrupamiento bayesiano.

8.6 *Tiempo de divergencia*

Con la finalidad de estimar el tiempo en el que se originaron los diferentes haplotipos y contrastarlo con el tiempo en el que han ocurrido eventos climáticos, se realizó un reloj molecular a partir de las secuencias de ADNcp. En el concepto de reloj molecular se asume que las secuencias de ADN evolucionan a tasas constantes, por lo que se puede estimar directamente el tiempo de divergencia entre dos secuencias, basado en el número de diferencias nucleotídicas y expresado como el porcentaje de sitios variables entre pares de secuencias (Zuckerandl y Pauling, 1965). Esta estimación se realiza, a grandes rasgos, considerando que las secuencias similares habrán divergido recientemente y las secuencias muy distintas habrán sido evolutivamente independientes por un tiempo relativamente largo. Para obtener las fechas de divergencia se utiliza una calibración con base en la fecha aproximada de cuando divergieron dos linajes y a partir de esta fecha se calcula el valor de divergencia que ha ocurrido en ese lapso (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009).

Para la estimación del tiempo de divergencia entre haplotipos, se realizó una reconstrucción filogenética por el método de máxima verosimilitud, utilizando el modelo evolutivo HKY (Hasegawa, *et al.*, 1985) con 0.05 parámetros de distribución *gamma*, ya que resultó el modelo con menor valor de Criterio de Información Bayesiana, de acuerdo con el análisis de selección de modelos disponible en MEGA 7 (Kamura *et al.*, 2016). Se utilizaron secuencias de *C. columna-trajani* y *C. gigantea* como grupo

externo. Esta reconstrucción filogenética se usó como *prior* en un análisis bayesiano de reloj molecular, para el cual se asumió un reloj estricto, con una tasa de sustitución uniforme de 1.1×10^{-9} a 1.6×10^{-9} sustituciones por sitio por año, de acuerdo con los mínimos y máximos estimados para genes de cloroplasto (Wolfe, *et al.*, 1987); adicionalmente, se utilizaron como calibración secundaria la edad del grupo corona de la subtribu Pachycereinae (5.28 Ma. [HPD 95% 7.74 - 3.47]; Hernández-Hernández, *et al.*, 2014). Se utilizó una cadena de Markov con 20,000,000 de pasos muestreados en cada 1000. Los resultados fueron verificados visualmente en TRACER V. 1.7.1 (Rambaut, *et al.*, 2018), los árboles resultantes fueron condensados en TREEANOTATOR V 1.10.4 (Rambaut y Drummond, 2018) utilizando un *burn-in* de 10%. Finalmente, el árbol resultante fue visualizado y editado en FIGTREE V1.4.4. (Rambaut, 2018)

8.7 Demografía histórica

Con la finalidad de inferir los procesos demográficos que dieron origen a la diversidad genética actual de *C. nizandensis*, se realizaron distintas pruebas. Inicialmente se exploró la probabilidad de una expansión poblacional reciente mediante las pruebas de neutralidad, esto se puede estimar a partir de distintos índices de variabilidad genética (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009). Se utilizaron las pruebas *D* de Tajima, basada en la proporción de sitios segregantes, respecto al promedio de diferencias pareadas (Tajima, 1989) y *F_s* de Fu, basada en las frecuencias haplotípicas (Fu, 1997) Para ambos índices, los valores negativos indican un incremento reciente en el tamaño

poblacional histórico. Estos estadísticos se obtuvieron con el programa DNASP 5.0 (Rozas, 2009), utilizando 10,000 remuestreos simulados para probar la significancia. Para probar expansión demográfica y espacial, se realizó un análisis de distribución *mismatch*, el cual permite estimar los parámetros de expansión poblacional a partir de la distribución de las diferencias por pares de haplotipos (distancias genéticas; Rogers y Harpending, 1992), calculando el número de diferencias observado en una muestra y utiliza una aproximación generalizada, no lineal, de mínimos cuadrados para estimar los parámetros de una expansión repentina. Lo anterior permite observar si la distribución de las diferencias nucleotídicas es la esperada bajo un escenario de expansión poblacional (Schneider y Excoffier, 1999). La distribución observada suele ser multimodal para poblaciones en equilibrio demográfico, lo cual refleja una configuración de árboles de genes altamente estocástica, mientras que la distribución suele ser unimodal en poblaciones que han pasado por eventos de expansión demográfica reciente (Slatkin y Hudson, 1991; Rogers y Harpending, 1992). La expansión poblacional se estima a partir del índice de Rugosidad R de Harpending (1994), el cual es una medida *ad hoc* de la variación de alta frecuencia en una serie de números, permite distinguir entre poblaciones estacionarias y en expansión, cuantificando la lisura de la distribución *mismatch* observada. El análisis fue realizado con el programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010), utilizando 3000 permutaciones para probar la significancia.

Finalmente, se estimaron los cambios históricos en el tamaño poblacional efectivo, usando un análisis Bayesiano de *skyline plot*, que permite extraer la información de la dinámica poblacional pasada a partir de un árbol filogenético. Esto se logra estimando la media armónica del tamaño poblacional efectivo para intervalos de tiempo medidos

en eventos mutacionales y brinda una estimación no paramétrica del tamaño efectivo de la población a través del tiempo (Drummond, *et al.*, 2005). Se utilizó el programa BEAST (Drummond *et al.*, 2012), asumiendo un reloj molecular estricto, el cual supone una tasa de mutación igual para todas las ramas del árbol; la tasa de mutación utilizada fue de 1.1×10^{-9} a 1.6×10^{-9} sustituciones por sitio por año. Se utilizó una cadena MCMC con 10,000,000 de réplicas muestreadas cada 1000 pasos, con un *burn-in* de 10%. Los resultados fueron verificados y visualizados en TRACER V. 1.7.1 (Rambaut *et al.*, 2018)

8.8 *Análisis de Diversidad y Estructura Genética en ISSRs*

La variabilidad genética proporcionada por el núcleo se estimó a partir de los índices de diversidad H_e , el cual indica la heterocigosidad esperada en un locus promedio si los apareamientos fueran al azar (Nei, 1976) y la proporción de *loci* polimórficos (%P), la cual indica el porcentaje total de loci que son polimórficos, es decir los que poseen ambas variantes de los alelos. Estos cálculos se realizaron en POPGEN V 1.32 (Yeh, *et al.*, 1997) y ARLEQUIN (Excoffier, 2010). Se probó la estructura genética a través del AMOVA y se calculó el flujo génico con ARLEQUIN 3.5 (Excoffier, 2010). Finalmente, se buscó el número más probable de grupos genéticos mediante un análisis bayesiano de mezcla genética con frecuencias de alelos independientes, en el programa STRUCTURE 2.3 (Pritchard, *et al.*, 2010). Se utilizó una cadena de Markov con 50,000 repeticiones y una longitud de *burn-in* de 5000, se usaron 20 réplicas para probar de 1 a 10 grupos genéticos. Se infirió el número más probable de

grupos, estimando la Delta K (Evanno, *et al.*, 2005) en STRUCTURE HARVESTER (Earl, 2012) y finalmente se visualizó en DISTRUCT V 1.1 (Rosenberg, 2004).

9. Resultados

9.1 Extracción y amplificación del ADN

Se logró extraer ADN genómico de 97 individuos de *C. nizandensis*. La integridad fue heterogénea, como puede observarse por las bandas de diferente intensidad en el gel (Figura 2), la concentración promedio de ADN fue de 33.63 ng/μL, de acuerdo con la espectrofotometría. Además, la pureza fue baja, con un promedio de 0.98 en la relación A_{1260}/A_{280} .

Se obtuvieron las secuencias de ADNcp para 40 individuos. El tamaño de las secuencias después de la edición fue de 523 pb para *trnT-trnL* y de 969 pb para *rpl32-trnL* (Figura 3), resultando en una secuencia concatenada de 1492 bases.

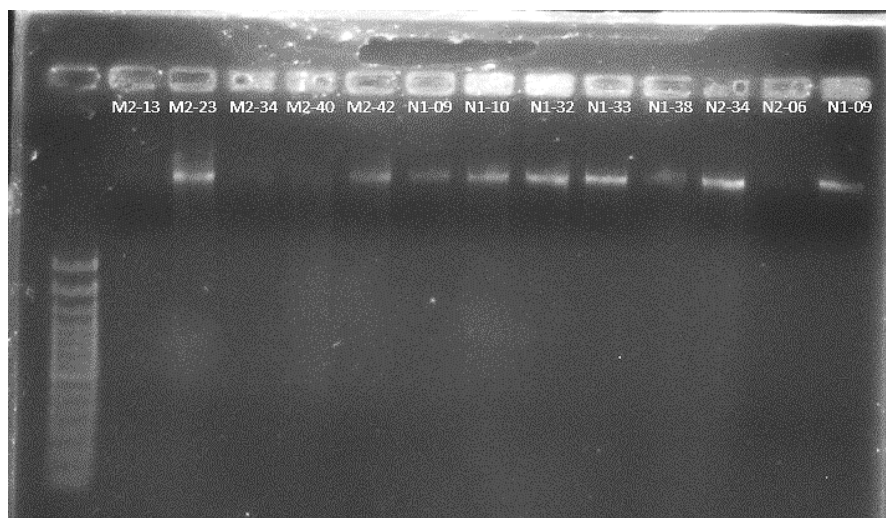


Figura 2. Prueba de integridad de ADN extraído de individuos de cuatro poblaciones de *Cephalocereus nizandensis*. Se observan bandas de ADN > 2000 pb con distintos niveles de intensidad. Marcador de talla molecular 100pb (a la izquierda), Etiquetas de los individuos, señalando la población de procedencia (parte superior).

Nueve de los ISSR probados fueron polimórficos, de estos se seleccionaron cinco para los análisis posteriores (Tabla 1), con los cuales se obtuvieron un total de 77 bandas entre 300 y 2,000 pb (Figura 4). El *primer* IS01 obtuvo 16 bandas; el Sh01, 15; el Sh03, 19, el Fero06, 12 y el 827, 15 bandas.

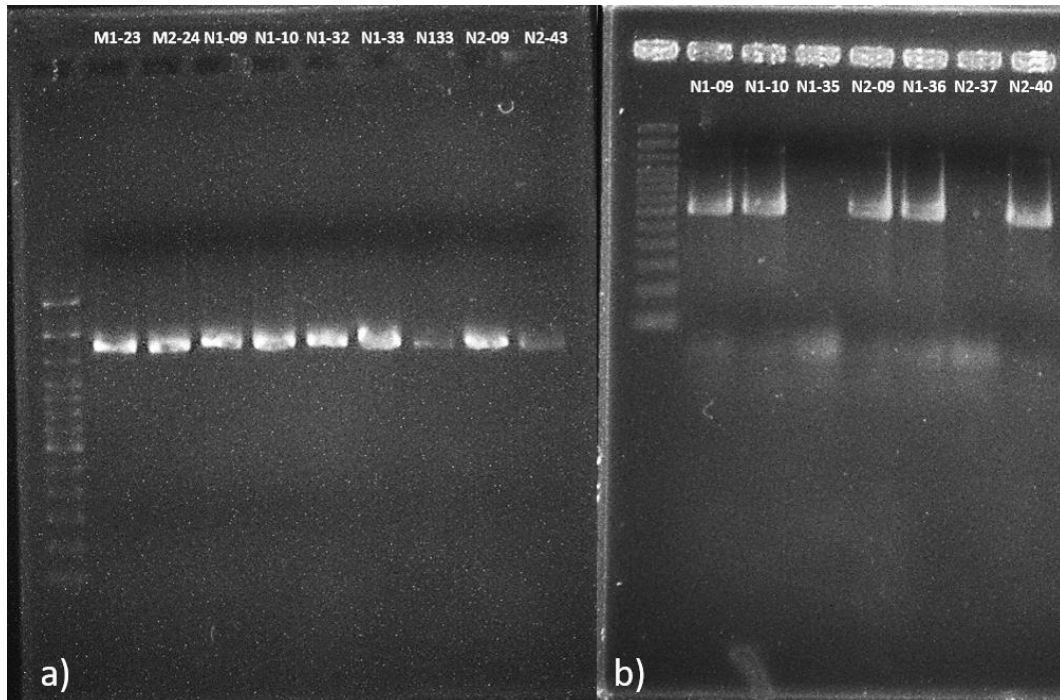


Figura 3. Amplificados de las regiones de ADNcp, *rpl32-trnL* (a) y *trnT-trnL* (b) en *Cephalocereus nizardensis*. Se muestran los geles de agarosa con los productos de la amplificación de *rpl32-trnL* (a) y *trnT-trnL* (b) con bandas entre 1200 y 1500 pb y 600 y 800 pb, respectivamente. Marcador de talla molecular 100pb (a la izquierda), Etiquetas de los individuos, señalando la población de procedencia (parte superior).

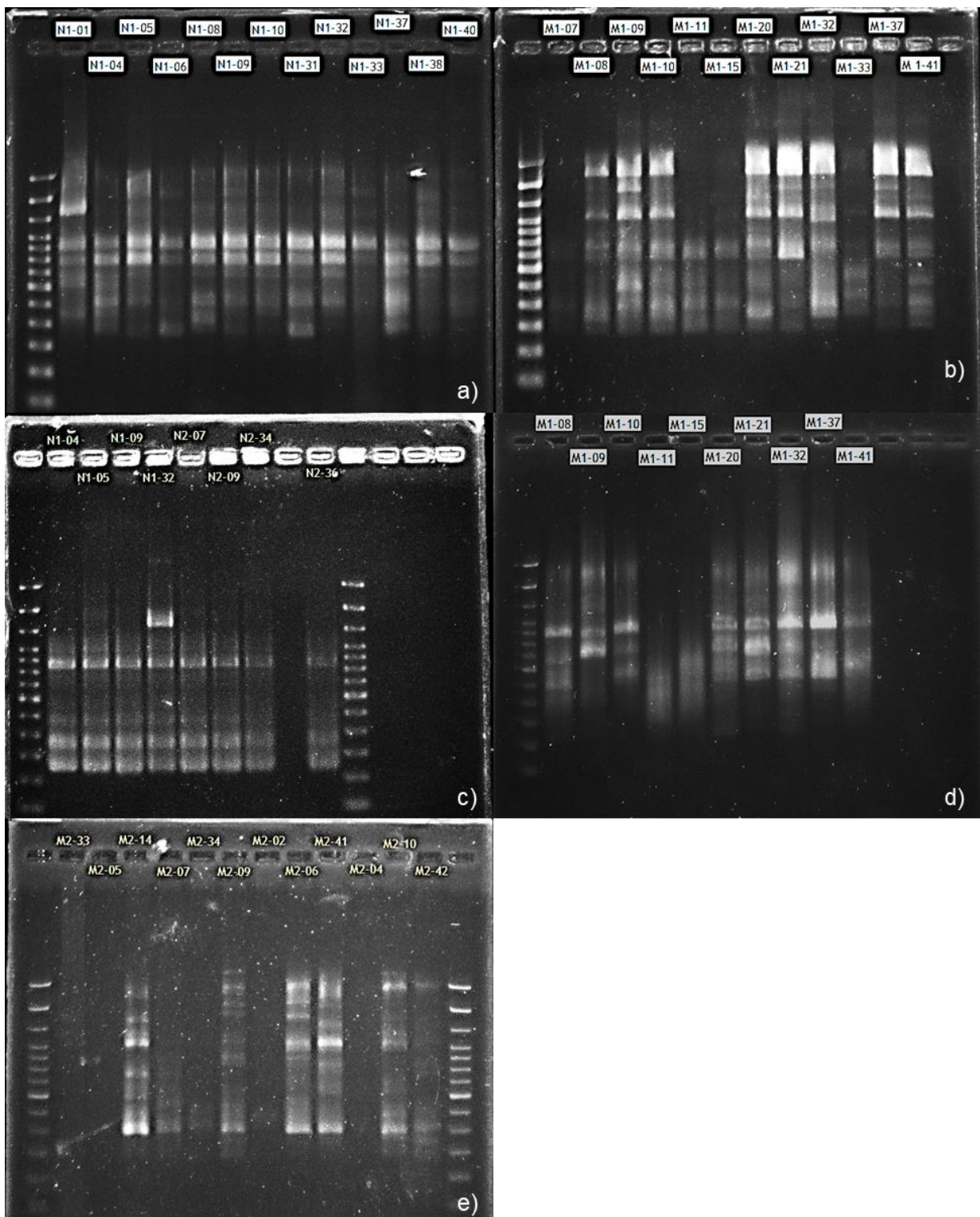


Figura 4. Patrones de bandeo obtenidos al amplificar cinco ISSRs en *Cephalocereus nizardensis*. Se muestra un ejemplo de los productos amplificados con los primers Sh01 (a), Sh03 (b), Fero06 (c), 827 (d) e IS01 (d). El marcador de talla molecular utilizado fue de 100 pb, en la parte superior de cada gel se señalan las etiquetas de los individuos.

9.2 Diversidad y Estructura Genética en Secuencias de ADNcp

Se obtuvo una secuencia concatenada de 1492 bases, en la cual se encontraron 12 sitios polimórficos, todos fueron singletons, 10 de los cuales se encontraron en la región *rpl32-trnL*. La diversidad nucleotídica de *C. nizandensis* fue $\pi = 0.0013$. Los valores más altos se encontraron en M2 ($\pi = 0.0015$) y los más bajos en M1 ($\pi = 0.0007$). El promedio de sustituciones nucleotídicas varió entre $k = 2.18$ en M2 y $k = 1.0$ en M1. Por su parte, la diversidad haplotípica total fue alta ($Hd = 0.75$), el valor mayor se registró en N1 ($Hd = 0.84$) y el menor en M1 ($Hd = 0.25$; Tabla 2).

Las poblaciones más diversas a nivel nucleotídico y haplotípico fueron M2 y N1. La población N1 presentó el mayor número de haplotipos, pero tiene una baja diversidad nucleotídica (Tabla 2). Mientras que M2 presenta una diversidad haplotípica moderada con el promedio de diferencias nucleotídicas (k) más alto (Tabla 2).

Tabla 2. Diversidad genética en ADNcp en las poblaciones de *Cephalocereus nizandensis*

Poblaciones	N	π	sd	k	h	Hd	sd
M1	8	0.0007	0.0005	1.0	2	0.25	0.18
M2	11	0.0015	0.0006	2.18	5	0.62	0.16
N1	12	0.0009	0.0002	1.27	6	0.80	0.10
N2	9	0.0011	0.0005	1.61	3	0.42	0.19
Total	40	0.0013	0.0003	1.91	14	0.75	0.07

Número de individuos (N), Diversidad nucleotídica (π), Promedio de diferencias nucleotídicas (k), número de haplotipos (h), Diversidad haplotípica (Hd), desviación estándar (sd).

Se obtuvieron 14 haplotipos distintos, el haplotipo H02 está presente en 47.5% de los individuos, el H04 en 17.5% y el H09 en 7.5%, el resto de los individuos presentan haplotipos únicos. Trece de los haplotipos son exclusivos de alguna población, las poblaciones M1, N1 y N2 comparten el haplotipo H02, mientras que M2 no comparte haplotipos con ninguna población (Figura 5).

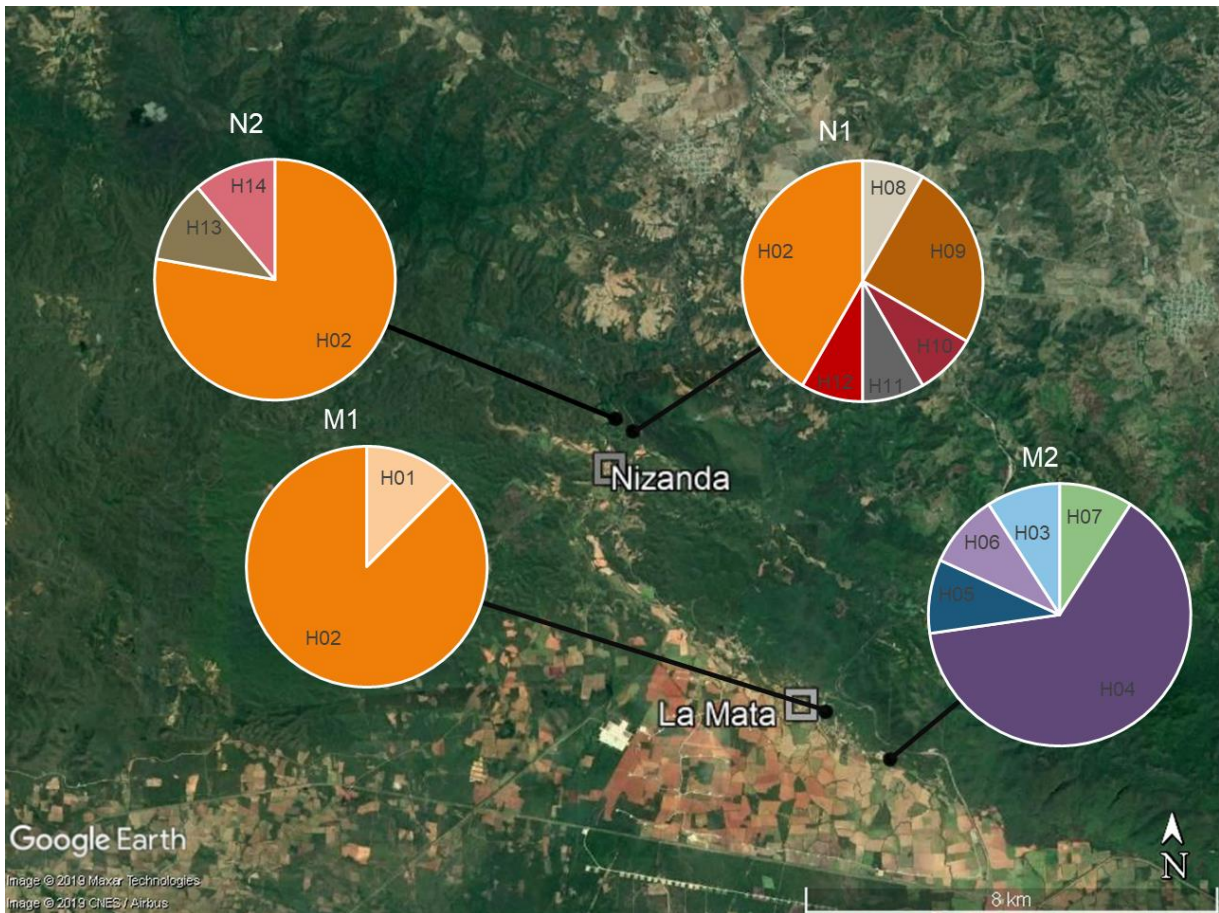


Figura 5. Mapa de distribución de haplotipos de *Cephalocereus nizandensis* en la región de Nizanda, Oaxaca. Se muestran las frecuencias haplotípicas en las poblaciones. Cada color representa un haplotipo distinto.

En cuanto a la estructura poblacional, el AMOVA indicó que el 78.9% de la variabilidad genética está dada por las diferencias al interior de las poblaciones, mientras que las diferencias entre las poblaciones solo explican 21.1% de la variabilidad (Tabla 3). Se encontró que la diferenciación genética entre las poblaciones de *C. nizandensis* fue elevada y significativamente distinta de cero ($F_{ST} = 0.211$; $p < 0.001$). La prueba F_{ST} por pares indicó que no había diferencia significativa entre las poblaciones M1, N1 y N2, mientras que las diferencias entre M2 respecto a las otras tres poblaciones si fueron significativamente distintas (Tabla 4).

Tabla 3. AMOVA de las regiones intergénicas de ADNcp, *rp132-trnL* y *trnT-L* de *Cephalocereus nizandensis*.

Fuente de variación	GI	SC	% Var.	Com. Var.
Entre poblaciones	3	9.57	21.1	0.234
Dentro de las poblaciones	36	31.43	78.9	0.873
Total	39	41		1.107

Grados de libertad (GI), suma de cuadrados (SC), porcentaje de varianza explicada (%Var.), componente de la varianza (Com. Var.)

Tabla 4. Diferenciación genética (F_{ST}) por pares de poblaciones en *Cephalocereus nizandensis*, obtenidas a partir de las regiones *rp132-trnL* y *trnT-L* de ADNcp. Se muestran en negritas los valores significativos $p < 0.05$

	M1	M2	N1	N2
M1				
M2	0.252			
N1	-0.019	0.313		
N2	0.014	0.348	-0.345	

El flujo génico entre pares de poblaciones fue muy elevado entre M1, N1 y N2, incluso fue infinito entre M1 con N1 y N1 con N2, indicando panmixia entre estas poblaciones. Es decir, que el flujo de semillas es igualmente probable entre estas tres poblaciones, por lo que se comportan como una sola población con apareamientos al azar. Aunque M2 tiene menores niveles de flujo génico, estos son superiores a uno, por lo que esta población mantiene la conectividad con todas las poblaciones, ya que los valores de N_m estimados son cercanos a uno (Tabla 5).

De acuerdo con el Análisis Bayesiano de Agrupamiento, se tuvo la mayor probabilidad (0.98 con un valor $\log(\text{ml})$ de -134.0645) para el agrupamiento de *C. nizandensis* en cuatro grupos genéticos distintos. Se formó un grupo con individuos en las poblaciones M1, N1 y N2, representado en color verde; un grupo restringido a M2, en color amarillo; y dos grupos pequeños con pocos individuos en diferentes poblaciones: el grupo en rojo, incluye los individuos que corresponden al haplotipo H01 de M1, H05 y H06 de M2 y el grupo azul incluye a los haplotipos H08 de N1, H13, H14 de N2 y H03 de M2 (Figura 6). Estos resultados son consistentes con el AMOVA y el flujo génico en que N1 y N2 son las poblaciones más similares, mientras que M2 es la población más diferenciada.

Tabla 5. Flujo génico de ADNcp entre pares de poblaciones de *Cephalocereus nizandensis*.

	M1	M2	N1	N2
M1				
M2	1.48			
N1	Inf.	0.96		
N2	33.68	1.1	inf.	

Número de migrantes por generación (Nm), Infinitos(Inf)

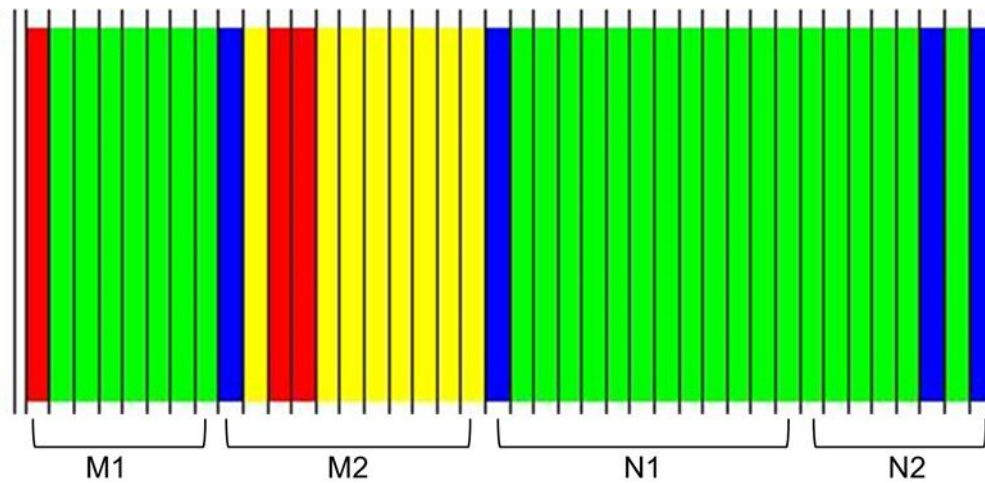


Figura 6. Estructura genética del ADNcp de *Cephalocereus nizandensis*. Se muestra la asignación de grupos genéticos para los individuos de *C. nizandensis*, obtenida mediante Análisis Bayesiano (BAPS) de las regiones intergénicas de ADNcp *rpl32-trnL* y *trnT-L*. Cada línea representa un individuo y cada color representa un grupo.

La red de haplotipos tiene una forma de estrella en su parte central, con dos grupos periféricos. La posición central, frecuencia y conectividad del haplotipo H02 sugieren una expansión poblacional reciente; H02 está conectado por un paso mutacional a los cuatro haplotipos con los que se conforma el torso de la red (H04, H09, H10 y H12), el primero perteneciente a la población M2 y el resto a N1. Los dos grupos de haplotipos

periféricos, derivados de H05 y H08, conectan individuos de distintas poblaciones y acumulan múltiples pasos mutacionales, lo cual puede indicar un flujo génico constante (Figura 7).

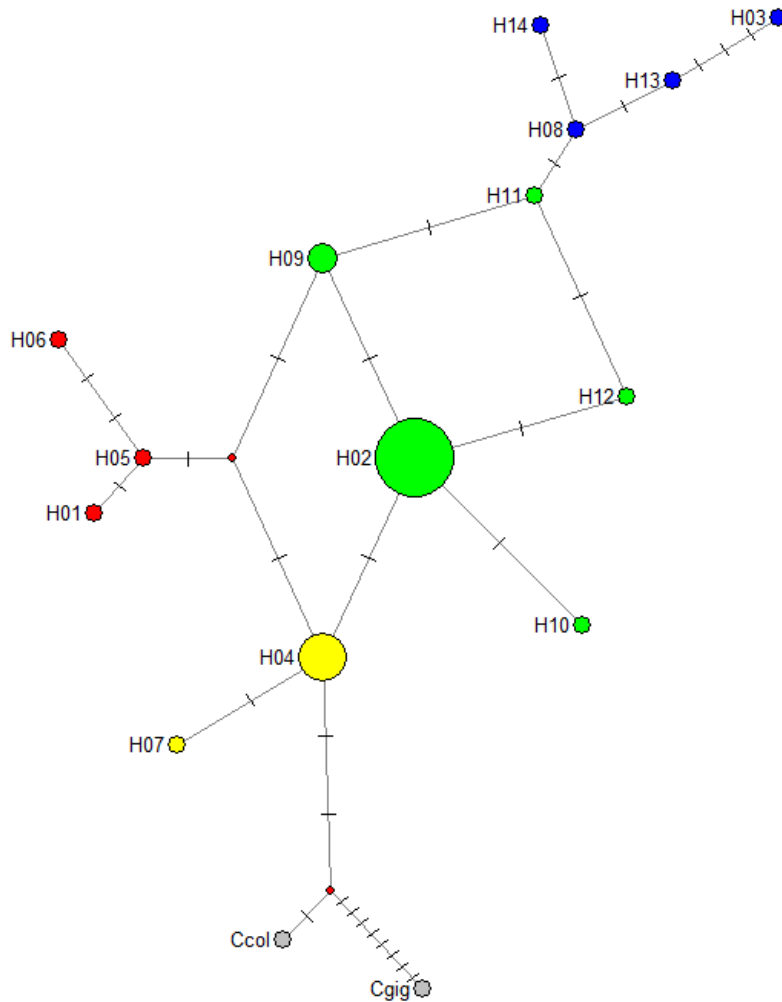


Figura 7. Red de haplotipos de *Cephalocereus nizandensis*. Se muestra una red *median joining* generada a partir de las secuencias de ADNcp. Los colores representan los grupos genéticos del análisis BAPS y el tamaño de los círculos es proporcional a su frecuencia. Ccol, *Cephalocereus columnnatajani*; Cgig, *Carnegiea gigantea*.

La abundancia de H02 en tres poblaciones y su posición central en la red podrían indicar que este haplotipo representa la condición más ancestral de *C. nizandensis*. Sin embargo, al incluir secuencias de *C. columna-trajani* y *C. gigantea* como grupo externo, estas son más cercanas a H04, por lo que se considera que la condición ancestral de *C. nizandensis* está representada en la localidad o los alrededores de M2.

9.3 *Tiempo de divergencia*

El origen de la diversidad genética de *C. nizandensis* es anterior a los ciclos climáticos del Cuaternario Tardío, los cuales se hipotetizó que pudieron tener un impacto en la diversidad genética de la especie, de acuerdo con las hipótesis de refugios. El origen de *C. nizandensis* se estimó en 2.15 Ma. (HPD 95% 3.47-1.11), los haplotipos divergieron en dos grupos (amarillo/rojo y verde/azul) aproximadamente 1.37 Ma. (HPD 95%: 2.27-0.686). Los haplotipos rojos divergieron de los amarillos alrededor de 0.968 Ma. (HPD 95%: 1.7-0.363). En la rama verde/azul, los haplotipos H02, H10 y H12 divergieron del resto en 0.833 Ma. (HPD 95%: 1.43-0.362); a su vez, en la rama restante, el haplotipo H09 se separó de los demás hace 0.577 Ma. (HPD 95%: 1.08-0.234) y H11 se separó de los haplotipos azules hace 0.418 (HPD 95%: 0.781-0.141). Los tiempos de divergencia estimados para la mayoría de los haplotipos al interior de los grupos genéticos se estimó entre 0.2 y 0.4 Ma., desde la divergencia de los haplotipos rojos en 0.428 Ma. (95% HPD 0.925-0.073), hasta la divergencia más reciente del grupo azul en 0.293 Ma. (HPD 95%: 0.581-0.086; Figura 8). Todos los tiempos de divergencia estimados para los haplotipos de *C. nizandensis* son anteriores al último ciclo interglacial-glacial-interglacial (130 Ka).

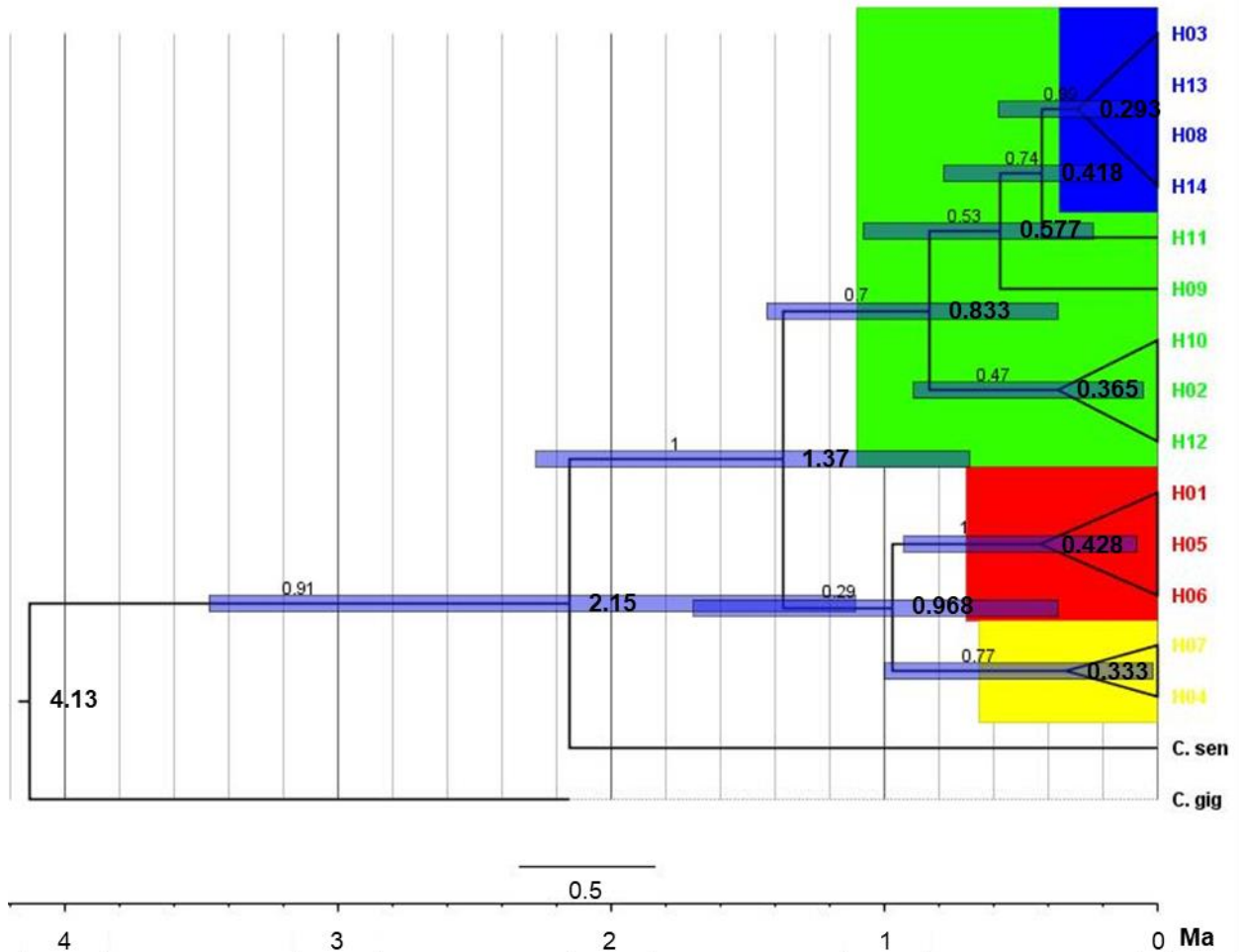


Figura 8. Cronograma bayesiano de haplotipos de *Cephalocereus nizardensis*. Se muestra un árbol calibrado de *C. nizardensis* construido con BEAST. En los nodos se indican las edades de divergencia; en las barras azules, la densidad posterior más alta al 95% (HPD); sobre las ramas, la Probabilidad posterior; y los recuadros de colores resaltan los grupos genéticos del BAPS. La escala representa el tiempo en millones de años (Ma).

9.4 Demografía histórica

Los linajes genéticos de *C. nizardensis* han presentado diferentes tendencias demográficas. Las pruebas de neutralidad indican que a nivel de especie se ha producido una expansión poblacional ($F_s = -7.224$; $p < 0.001$), sin embargo, al realizar las pruebas independientemente en cada población solo N1 mostró indicios de expansión. ($F_s = -2.59$; $p = 0.011$). Los resultados de D y F_s son contradictorios para

M1. En cuanto a los grupos genéticos, en el grupo verde y el amarillo se encontró expansión poblacional ($F_s = -3.40 \times 10^{38}$; $p < 0.001$; $F_s = -18.835$; $p < 0.001$; respectivamente, Tabla 6). Por su parte, el análisis de distribución *mismatch* mostró una desviación significativa respecto al modelo de expansión para toda la especie y solo la población N1 mostró expansión poblacional (Figura 11, Anexos).

Tabla 6. Pruebas de neutralidad D (Tajima, 1989) y F_s (Fu, 1997) para *Cephalocereus nizandensis*. Se muestran los resultados por población y grupos genéticos.

Poblaciones	D	ds	p	F_s	p
M1	-1.64	0.9196	0.02	0.9714	0.727
M2	-1.219	0.9289	0.116	-0.194	0.421
N1	-0.138	0.9347	0.486	-2.594	0.011
N2	-0.526	0.9457	0.326	1.304	0.771
Grupos genéticos					
Amarillo	-1.055	0.767	0.206	-18.835	< 0.001
Azul	-0.212	0.921	0.556	-1.414	0.066
Rojo				-0.693	0.131
Verde	-0.879	0.924	0.21	-3.40E38	< 0.001
Total	-1.236	0.90075	0.098	-7.224	< 0.001

Desviación estándar (ds) y valor de significancia (p), se muestran en negritas los valores significativos, los valores negativos indican expansión .

Los resultados de la distribución *mismatch* muestran que hay una desviación significativa del modelo esperado de expansión demográfica (Total: SSD = 0.214; $p < 0.05$; Figura 9), Sin embargo, *C. nizandensis* se ajusta al modelo de expansión espacial (Total: SSD = 0.007; $p > 0.05$; Figura 10), Únicamente la población N1 se ajusta a los modelos de expansión demográfica y espacial, el resto de las poblaciones presentó distribuciones multimodales y/o desviaciones significativas de los modelos.

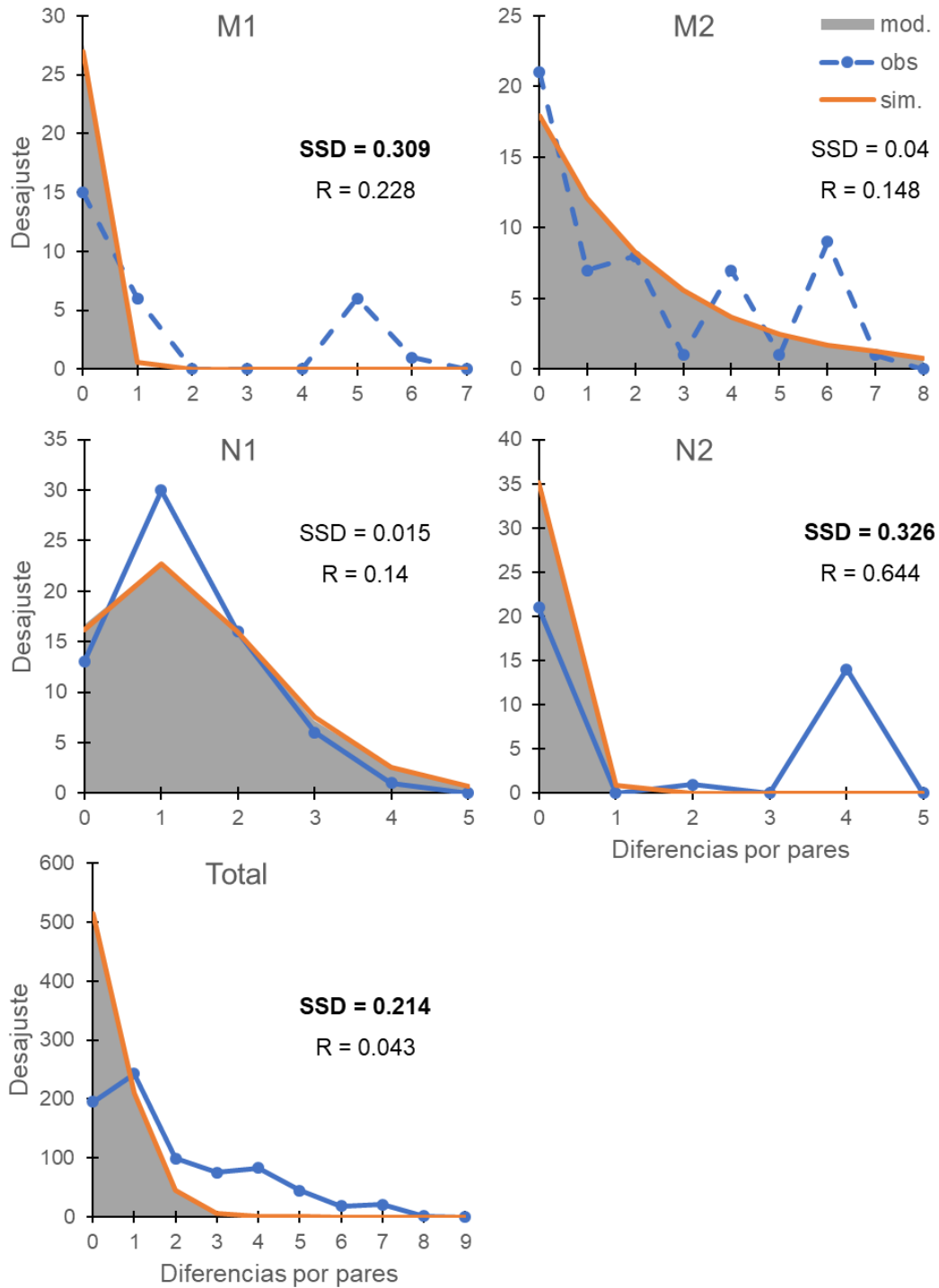


Figura 9. Expansión demográfica de las poblaciones de *Cephalocereus nizandensis*. Se muestran los resultados del análisis *mismatch*. Datos observados (obs), el modelo de expansión (mod), las simulaciones (sim), la desviación de suma de cuadrados (SSD) y el índice de rugosidad (R), los valores significativos ($p < 0.05$) están en negritas.

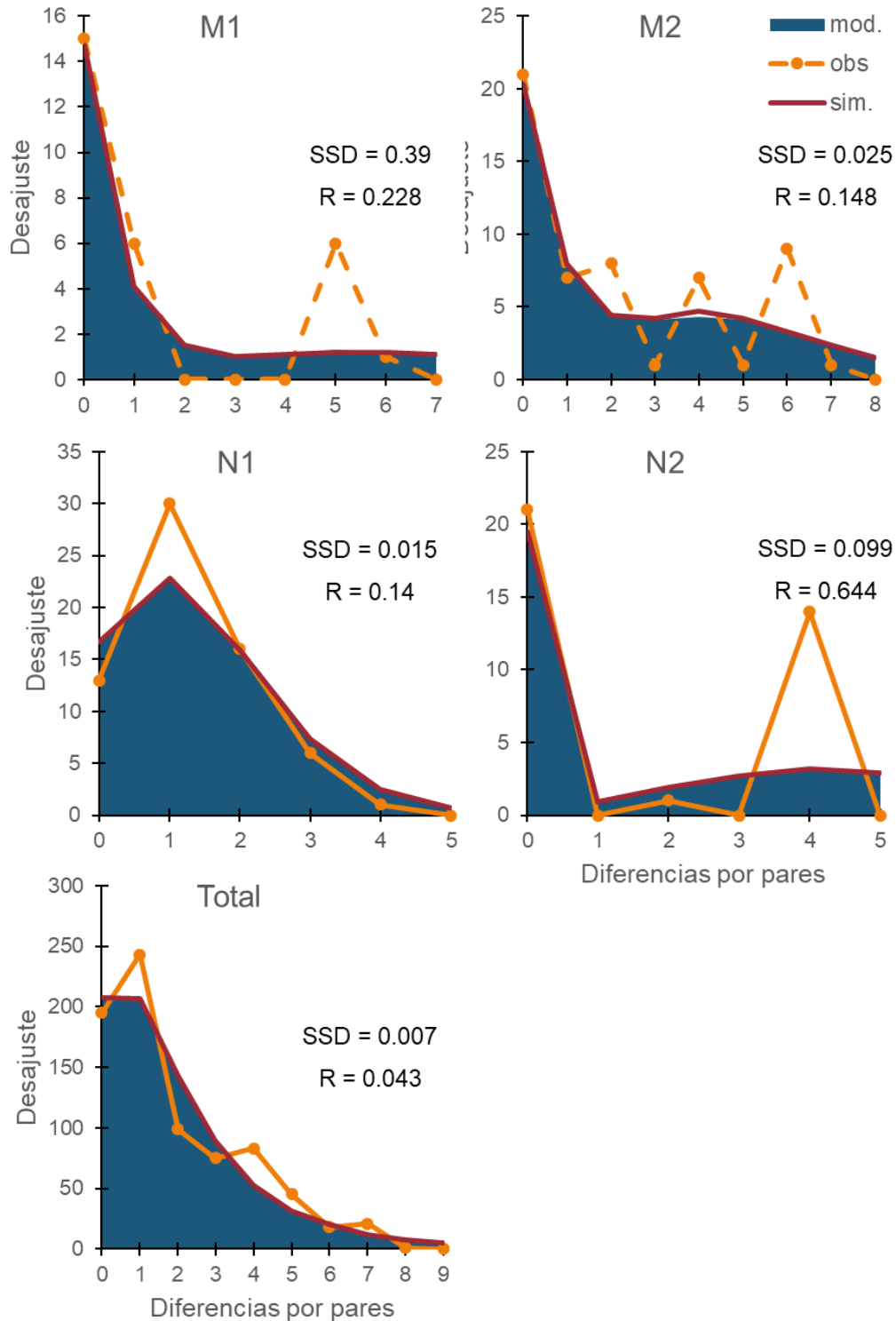


Figura 10. Expansión espacial de las poblaciones de *Cephalocereus nizandensis*. Se muestran los resultados del análisis *mismatch*. Datos observados (obs), el modelo de expansión (mod), las simulaciones (sim), la desviación de suma de cuadrados (SSD) y el índice de rugosidad (R), los valores significativos ($p < 0.05$) están en negritas.

Cephalocereus nizandensis ha experimentado un incremento de tamaño poblacional sostenido desde aproximadamente 0.175 Ma. (Figura 11 y 12b). Al analizar por separado a los dos linajes principales arrojados en el análisis filogenético, ramas verde/azul y rojo/amarillo (Figura 8), encontramos que estas tienen tendencias demográficas distintas. Por una parte, el linaje amarillo-rojo ha mantenido un tamaño poblacional constante los últimos 0.175 Ma., mientras que el linaje verde-azul ha sostenido un crecimiento poblacional constante desde hace 0.150 Ma. (Figura 12). Las tendencias demográficas de ambos linajes de *C. nizandensis* se han mantenido desde antes del último ciclo interglacial-glacial-interglacial, por lo que aparentemente los tamaños poblacionales de esta especie no han sido afectados por los ciclos climáticos recientes.

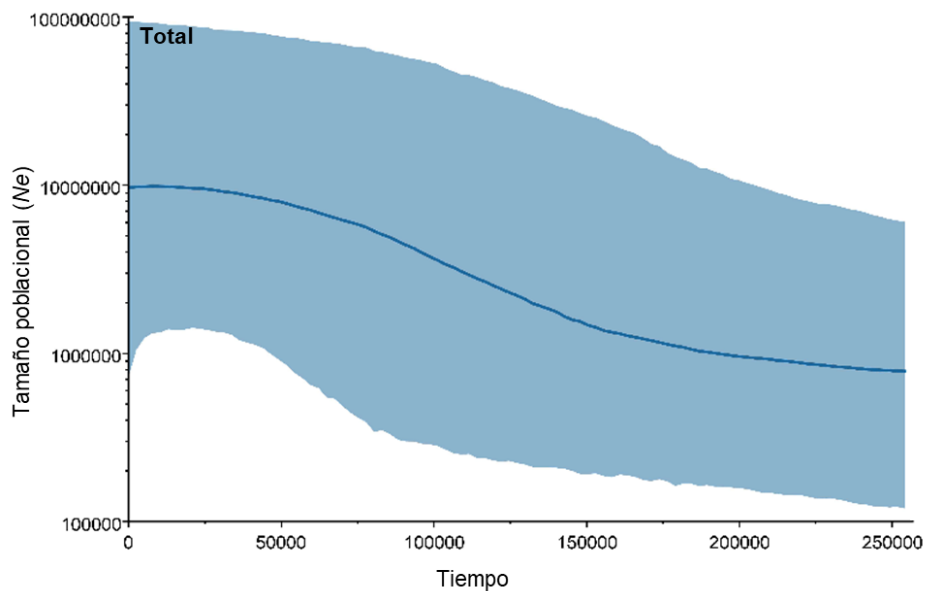


Figura 11. Análisis de demografía histórica de *Cephalocereus nizandensis*. Se muestra la media del tamaño poblacional efectivo (línea azul oscuro) y el Intervalo de confianza 95% (área azul claro).

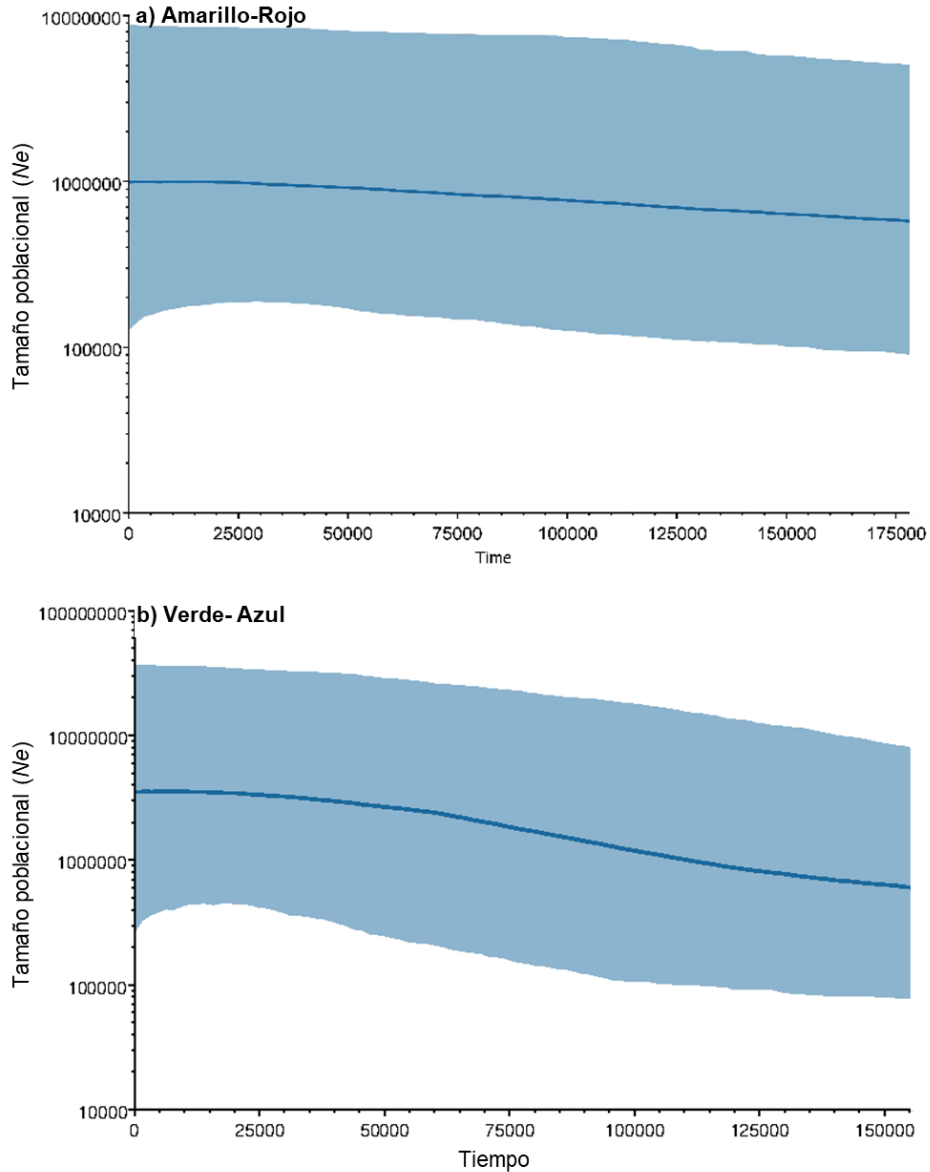


Figura 12. Análisis de demografía histórica de los linajes de *Cephalocereus nizandensis*. Se muestra la media del tamaño poblacional efectivo (línea azul oscuro) y el Intervalo de confianza 95% (área azul claro). Linaje rojo/amarillo (a), verde/azul (b).

9.5 Diversidad y Estructura Genética en ISSRs

Se obtuvieron un total de 77 bandas para toda la especie, con una proporción de *loci* polimórficos de $P = 98.7\%$, la proporción de *loci* raros, presentes en menos de 50% de la muestra fue baja, entre 6 y 12 *loci* por población, así como los *loci* exclusivos, de 2 a 7 *loci*. La diversidad genética estimada para el genoma nuclear de *C. nizandensis* fue $H_e = 0.296$, todas las poblaciones poseen una diversidad moderada, el valor de heterocigosidad esperada más alto se encontró en M1 ($H_e = 0.25$) y el menor en M2 ($H_e = 0.21$; Tabla 7).

Tabla 7. Índices de diversidad genética de *Cephalocereus nizandensis*, obtenidos con ISSR.

	Loci	% P.	Loci raros (<=50%)	Loci exclusivos	He
M1	55	71.43	7	7	0.251
M2	47	58.44	5	2	0.211
N1	56	68.83	12	6	0.235
N2	49	55.84	6	4	0.216
Total	77	98.70	0	-	0.296

Porcentaje de polimorfismo (%P) y Heterocigosidad esperada (He)

La diferenciación entre las poblaciones de *C. nizandensis* fue alta ($F_{ST} = 0.228$; $p < 0.001$) y resultó significativa entre todos los pares de poblaciones, con valores desde $F_{ST} = 0.156$, entre M1 y N2, hasta $F_{ST} = 0.334$, entre M2 y N1 (Tabla 9). Aun así, la mayoría de la variabilidad es explicada por las diferencias dentro de las poblaciones (77.2%), mientras que la diferencia entre estas solo explica una proporción menor de la variabilidad (22.8%; Tabla 8).

Tabla 8. AMOVA en ISSRs de *Cephalocereus nizandensis*.

Fuente de variación	Gl	SC	% Var.	Com. Var.
Entre poblaciones	3	94.93	22.8	2.165
Dentro de las poblaciones	41	300.6	77.2	7.332
Total	44	395.53		9.437

Grados de libertad (Gl), suma de cuadrados (SC), porcentaje de varianza explicada (%Var.), componente de la varianza (Com. Var.)

Tabla 9. Diferenciación genética (F_{ST}) por pares de poblaciones en ISSRs de *Cephalocereus nizandensis*.

	M1	M2	N1	N2
M1				
M2	0.214			
N1	0.246	0.334		
N2	0.158	0.212	0.017	

Se muestran en negritas los valores significativos $p < 0.05$

El nivel de flujo genético es igual o mayor a uno entre todos los pares de poblaciones, lo cual indica que el flujo de polen mantiene la cohesión entre todas las poblaciones. El menor valor se encontró entre M2 y N1 ($N_m = 0.996$) y el mayor valor, entre M1 y N1 ($N_m = 2.672$; Tabla 10). Estos niveles son suficientes para mantener la cohesión entre las cuatro poblaciones.

Tabla 10. Número de migrantes por generación (Nm), entre pares de poblaciones de *Cephalocereus nizandensis*, obtenido con cinco ISSR.

	M1	M2	N1	N2
M1				
M2	1.835			
N1	1.53	0.996		
N2	2.672	1.86	2.411	

Con base en el análisis de agrupamiento, se reconocen dos grupos genéticos de *C. nizandensis* (Figura 13), de acuerdo con el valor más alto de Delta K (Figura 14). Estos grupos no se corresponden con las poblaciones geográficas. Ambas estructuras genéticas, de ADNcp y nuclear, coinciden en diferenciar más a los individuos de la población M2 del resto. Los ISSRs mostraron que los individuos de M2 tienen asignación a un solo grupo (naranja), mientras que el resto de las poblaciones incluyen individuos asignados a ambos grupos (Figura 13). También coinciden en que la diferenciación es más elevada entre M2 y las poblaciones de Nizanda (N1 y N2).



Figura 13. Estructura genética del ADNn de *Cephalocereus nizandensis*. Se muestra la asignación de grupos genéticos para los individuos de *C. nizandensis*, obtenida mediante Análisis Bayesiano (STRUCTURE) a partir de la información de cinco ISSR. Cada línea representa un individuo y cada color representa un grupo.

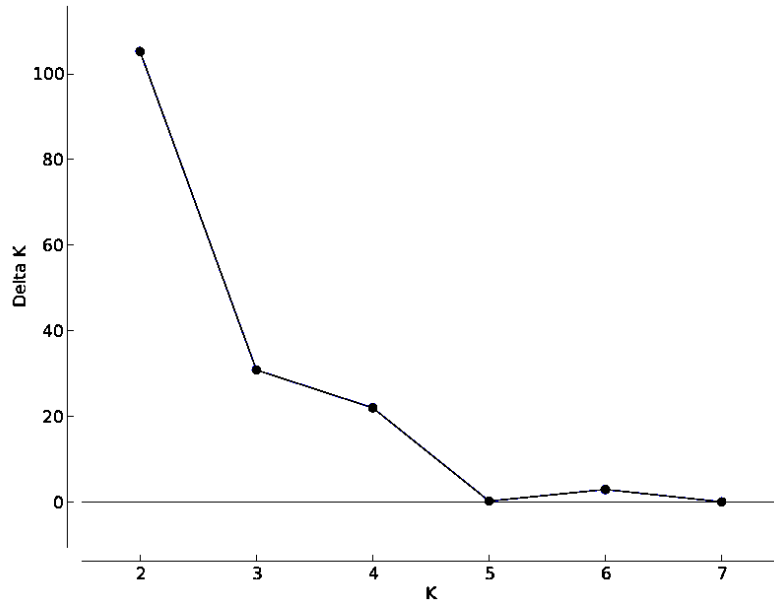


Figura 14. Valores de *Delta K* para los niveles de agrupamiento probados para *Cephalocereus nizandensis*. Número de grupos (K)

10. **Discusión**

10.1 *Diversidad*

Para este estudio la diversidad genética encontrada fue moderada o elevada para la familia Cactaceae. La variabilidad en el ADNcp de *C. nizandensis* fue moderada a nivel nucleotídico y elevada a nivel haplotípico ($\pi = 0.0013$; $Hd = 0.75$) respecto a lo reportado en otras cactáceas ($\pi = 0.0001 - 0.0043$; $Hd = 0.19 - 0.51$; Bonatelli *et al.*, 2014; Ornelas y Rodríguez-Gómez, 2015; Cornejo-Romero *et al.*, 2017; Quipildor *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2017). Mientras que en el ADN nuclear, los ISSR mostraron heterocigocidad moderada y el porcentaje de polimorfismo fue elevado ($He = 0.296$; $\%P = 98.7$) respecto a lo reportado en otros trabajos ($He = 0.178 - 0.207$; $\%P = 56 - 83.08$; Castro-Felix, *et al.*, 2014; Bustamante, *et al.*, 2016; Jana, *et al.*, 2017).

Los elevados niveles de diversidad genética se pueden relacionar a las características biológicas de las cactáceas columnares (Hamrick y Godt, 1996; Charlesworth y Wright, 2001). Por ejemplo, los ciclos de vida largos que permiten la permanencia de genotipos en la población, reduciendo así el efecto de la deriva génica; el entrecruzamiento, que reduce la endogamia (Boyle, 1997); así como la polinización y dispersión a larga distancia promovida por animales, la cual incrementa el flujo génico (Alvarado-Sizzo, 2019), tal parece ser el caso observado aquí con *C. nizandensis* a nivel de cloroplasto ($Hd = 0.75$; Tabla 2). Por su parte, los ISSRs brindan pistas sobre la reproducción de la especie, la cual, al no haberse encontrado clones, parece ser exclusivamente sexual, lo que coincide con observaciones morfológicas que reportan escasa clonalidad en esta especie (Tovar, 2005). Esta característica reproductiva puede

aportar al mantenimiento de una variabilidad genética moderada, por medio de la recombinación genética (Hamrick *et al.*, 1992).

Los niveles de diversidad genética de *C. nizandensis* son notorios dado lo restringido de su distribución. Este patrón se ha observado en otras cactáceas de distribución restringida, como *Neobuxbaumia macrocephala*, en el Valle de Tehuacán ($H_e = 0.335$; Esparza-Olguín, 2005), *Pilosocereus machrisii*, *Facheiroa squamosa* en el este de Brasil ($H_e = 0.38$ y 0.401 , respectivamente; Moraes *et al.*, 2005) y *P. tillianus* en los Andes de Venezuela ($H_e = 0.352$; Figueredo *et al.*, 2010). Es de resaltar que todas las especies antes mencionadas presentan restricciones edáficas, al igual que *C. nizandensis* (Bárceñas-Argüello, *et al.*, 2010), *N. macrocephala* se restringe a suelos con alto contenido en calcio y materia orgánica (Esparza-Olguín, 2005), *P. machrisii*, *F. squamosa* y *P. tillianus*, se restringen a parches xéricos con suelos someros y rocosos (Moraes *et al.*, 2005; Figueredo *et al.*, 2010). Se han planteado hipótesis para explicar la alta variabilidad genética en estas especies restringidas, basadas en factores históricos (Esparza-Olguín, 2005) o cambios climáticos (Moraes *et al.*, 2005; Figueredo *et al.*, 2010), se considera que estas especies tuvieron una mayor distribución en el pasado, como se hipotetizó para *C. nizandensis*.

En el caso de *C. nizandensis* se proponen dos escenarios históricos que pueden explicar la variabilidad genética, partiendo de las evidencias demográficas encontradas para los dos linajes observados en el análisis filogenético. La elevada diversidad nucleotídica del linaje denominado amarillo-rojo ($\pi = 0.00109$; Tabla 11), con haplotipos separados por múltiples mutaciones (Figura 7; H1, H4, H5, H6 y H7), refleja la acumulación de mutaciones por un amplio periodo de tiempo, lo cual es coherente con la demografía histórica constante durante los últimos 170 mil años (Figura 12 a).

El efecto de la deriva génica se ve reducido en las poblaciones que conservan elevados tamaños poblacionales por un prolongado periodo de tiempo, como en el caso de *C. nizandensis* (Figura 10). Asimismo, se ha encontrado en otras especies que habitan sistemas rocosos insulares, que sus poblaciones han mantenido un tamaño constante, el cual no se vio afectado por las fluctuaciones climáticas (Byrne *et al.*, 2018). Por lo cual *C. nizandensis* también podría haber sido resiliente ante los cambios climáticos del Cuaternario Tardío, lo cual permitiría la acumulación de una elevada variabilidad genética.

Por otro lado, el denominado linaje verde-azul posee menor diversidad nucleotídica ($\pi = 0.00101$; Tabla 11), con cuatro de sus haplotipos (H03, H08, H13 y H14) separados por un paso mutacional (Figura 7), lo cual es consistente con una acumulación de variabilidad en un periodo de tiempo corto, en coherencia con la expansión demográfica estimada para los últimos 150 mil años (Figura 12b). De las tres poblaciones que formaron este linaje, N1 es la que posee mayor diversidad haplotípica ($H_d = 0.80$; Tabla 2), esto se debe a la expansión poblacional (Tabla 6 y Figura 12).

10.2 Estructura genética

Respecto a la estructura genética, la diferenciación entre las poblaciones de *C. nizandensis* encontrada con ambos marcadores es elevada ($F_{ST} = 0.211$; $F_{ST} = 0.228$ con ADNcp e ISSRs, respectivamente) respecto a lo encontrado en general para cactáceas ($F_{ST} = 0.124 - 0.47$; $F_{ST} = 0.144 - 0.19$ con ADNcp e ISSRs, respectivamente; Cornejo-Romero *et al.*, 2017; Palleiro-Dutrenit 2008; Ornelas y Rodríguez-Gómez, 2015; Bustamante, *et al.*, 2016).

El ADNcp separa a M2 del resto de las poblaciones (Tabla 4), mientras que el ADN nuclear presentó diferencias significativas entre todas las poblaciones (Tabla 9). Pero ambos marcadores coinciden en que el flujo génico mediado tanto por semillas como por polen, es menor entre las poblaciones M2 y N1 (Tablas 5 y 10), por lo que la distancia y tipo de vegetación que hay entre estas dos poblaciones podrían representar una limitante para el flujo génico.

Ambos análisis bayesianos de estructura genética encontraron grupos genéticos que no se ajustan a las localidades geográficas, el ADNcp formó cuatro grupos genéticos, mientras que los ISSRs solo formaron dos grupos (Figuras 6 y 13). El programa BAPS utilizado para el ADNcp, suele sobreestimar el número de grupos genéticos, asignando la mayoría de los individuos a grupos genéticos con muchos representantes y formando algunos grupos con pocos individuos (Latch, *et al.*, 2006) como se observó en este estudio (Figura 6). Tomando en cuenta el análisis filogenético (Figura 8), observamos que *C. nizandensis* también se puede separar en dos grupos por el ADNcp, juntando los grupos formados por BAPS, amarillo con rojo y azul con verde. Así, tenemos que ambos marcadores muestran que M2 es la población más diferenciada, ya que en ADNcp el grupo verde-azul incluye individuos de las cuatro poblaciones y el grupo amarillo-rojo solo incluye individuos de las poblaciones M2 con un individuo de M1 (Figura 6) y por su parte, con los ISSR, M2 es la única población con individuos asignados a un solo grupo, mientras el resto de las poblaciones representan una mezcla de ambos grupos (Figura 13).

La diferenciación de la población M2 puede deberse a la permanencia prolongada en el tiempo, que al mantener un tamaño poblacional constante (Figura 12 a), le ha permitido mantener haplotipos ancestrales, como el H04, que también se encontró en

C. totolapensis y *C. apicicephalum*. La diferenciación de esta población (M2) también es apreciable en campo, ya que la morfología de los individuos de este sitio es un poco diferente a la del resto; con tallos menos robustos y de color más oscuro, las flores son en su mayoría de tonos claros, mientras que en las otras poblaciones son predominantemente rozadas. Aunque las diferencias morfológicas pueden deberse a otros factores, como las condiciones ambientales distintas y no son necesariamente reflejo de la variación genética, si resulta interesante que se vea este patrón de diferenciación genética y morfológica.

La posibilidad de que el sitio M2 se trate de una especie distinta es poco factible ya que se ha mantenido un flujo génico entre M2 y el resto de las poblaciones (Tabla 5), como se puede apreciar por la asignación de individuos de múltiples poblaciones a los grupos genéticos rojo y azul (Figura 6). Aunque el flujo génico sea esporádico, este puede mantener la cohesión entre las poblaciones, ya que teóricamente basta un individuo migrante para reestablecer la conectividad (Slatkin, 1985).

La diferenciación poblacional en otras cactáceas columnares, como *C. columna-trajani* es probablemente debida a la dispersión de las semillas a corta distancia que promueven los murciélagos, lo que hace que los individuos genéticamente más cercanos se encuentren en la misma población (Cornejo Romero *et al.*, 2017). Los valores más altos de diferenciación de *C. nizandensis* ($F_{ST} = 0.211$) respecto a *C. columna-trajani* ($F_{ST} = 0.124$; Cornejo Romero *et al.*, 2017) en un área de distribución más reducida, sugieren la participación de dispersores con una menor vagilidad. Por ejemplo, aves pequeñas, las cuales son capaces de percharse sobre los mismos cactus mientras ingieren rápidamente la pulpa de un solo fruto, estas dispersan poco las semillas de *Stenocereus eichlamii* y *Pilosocereus maxonii* (Wendelken y Martin,

1988) y suelen trasladar las semillas a una distancia de 10.6 m del fruto antes de descartar la pulpa (Gomes, *et al.*, 2014).

Adicionalmente, el valor de diferenciación observado en *C. nizandensis* ($F_{ST} = 0.2$) es más similar a lo reportado en cactáceas columnares de polinización mediada por insectos ($G_{ST} = 0.102 - 0.352$; Parker y Hamrick. 1992; Nason *et al.*, 2002; Clark-Tapia y Molina-Freaner, 2003; Ossa *et al.*, 2019). Aunque también, se ha encontrado diferenciación poblacional elevada ($\phi_{ST} = 0.19$) en la cactácea columnar de polinización quiropterófila, *Stenocereus turberii*, usando marcadores ISSR (Bustamante *et al.* 2016).

En este sentido, la baja movilidad de los polinizadores podría explicar el origen de la diferenciación (Fleming y Holland, 1998). La observación de flores abiertas después de mediodía en *C. nizandensis* durante el muestreo sugiere la participación de polinizadores diurnos, como las abejas que ya han sido reportadas como polinizadores de columnares (Valiente-Banuet, *et al.*, 2002; Clark-Tapia y Molina Freaner, 2003), esta clase de polinizadores mueve poco el polen como se vio en el caso de *Stenocereus turberii* (Bustamante *et al.* 2016).

10.3 Demografía histórica

La reconstrucción demográfica de *C. nizandensis* indicó un incremento sostenido en el tamaño poblacional efectivo desde hace más de 0.150 Ma. (Figura 11), en el mismo sentido, las divergencias de haplotipos más recientes de *C. nizandensis* se estimaron en 0.293 Ma. (HPD 95%: 0.581-0.086). Tal parece que, a pesar de que las condiciones ambientales de la región durante el último periodo glacial pudieron ser favorables para

la expansión espacial de *C. nizandensis* y sus congéneres *C. totolapensis* y *C. apicicephalium* (Juárez Miranda, 2017), las fluctuaciones climáticas de los últimos ciclos interglacial-glacial-interglacial, cuyas etapas glaciales tuvieron lugar entre 180-150 Ka (Curry, et al., 2011) y 30 -19 Ka (Clark, et al., 2009), no han tenido un efecto observable en la demografía y diversificación de haplotipos de esta especie. Esto puede deberse a la alta especialización edáfica que restringe la distribución de *C. nizandensis* (Bárcenas-Argüello et al., 2010), ya que los trabajos florísticos de Nizanda solo reportan a esta especie en las simas de roca expuesta y con frecuencia incidental en la selva baja que se desarrolla sobre roca (Tovar, 2005). Así las condiciones del suelo pudieron ser un factor limitante para el establecimiento de *C. nizandensis* aún bajo condiciones ambientales idóneas.

Se ha planteado para el caso de otra cactácea columnar, *Cereus hildmannianus*, que las fluctuaciones climáticas del Cuaternario Tardío poseen un papel secundario en el origen de la diversidad y estructuración genética, siendo más influyentes las fluctuaciones climáticas tempranas (Silva et al. 2018). La expansión poblacional del linaje verde-azul se estimó hace 0.150 Ma, lo cual coincide con el fin del Penúltimo periodo glacial (Curry et al. 2011), también el tiempo de divergencia del grupo verde se estimó en 0.833 Ma. (HPD 95%: 1.43-0.362) y la divergencia más reciente, grupo azul, en 0.293 Ma. (95% HPD 0.581-0.086; Figura 7). Por lo que cabría plantear si otros eventos climáticos e históricos que transcurrieron en este periodo de tiempo pudieron afectar a *C. nizandensis* como lo hicieron con *C. hildmannianus*.

Se ha encontrado un patrón similar de variabilidad genética elevada con diferenciación poblacional, en otras especies de plantas con restricciones edáficas asociadas a enclaves rocosos, estas especies no presentan evidencia de cambios en su

distribución, ni cambios recientes en sus tamaños poblacionales efectivos relacionados con los cambios climáticos del Cuaternario y su diversidad es explicada por permanencia prolongada a través del tiempo (Turchetto-Zolet *et al.*, 2013; Bryne *et al.*, 2008). Esto podría adecuarse a lo observado en *C. nizandensis*, al menos para el linaje amarillo-rojo, dada su divergencia temprana (Figura 8) y su tamaño poblacional constante (Figura 12 a). Sin embargo, *C. nizandensis* también presenta evidencia de expansión demográfica (Figuras 9 y 11) y espacial (Figura 10). Ambos procesos de expansión solo se rastrearon en la población N1 (Figuras 9 y 10). La diferencia en las tendencias demográficas puede explicarse si las poblaciones M2 y N1 son resultado de un evento fundador antiguo, producto de la dispersión a larga distancia, como lo sugiere la elevada diferenciación poblacional (Bialozyt *et al.*, 2006), ya que las poblaciones resultantes de estos eventos pueden diferenciarse por efecto de la reducción en su diversidad genética a causa de la deriva génica, si el flujo génico es restringido (Petit *et al.*, 1997), como se observa para ambos marcadores entre M2 y N1 (Tablas 5 y 10); también pueden diferenciarse por efecto de las presiones selectivas de los nuevos hábitats colonizados (Kirkpatrick y Barton, 1997). Por otro lado, La diversidad genética compartida entre las poblaciones sugiere una expansión gradual de un frente de expansión (Ibrahim *et al.*, 1996), el cual en el caso de *C. nizandensis* sería de N1 hace M1 y N2.

11. Conclusiones

Los resultados encontrados en este estudio no permitieron verificar la hipótesis de que *C. nizandensis* estuvo confinada a refugios interglaciares, en virtud de que no se encontraron pruebas de que las poblaciones se hayan contraído y expandido en sincronía con los ciclos glaciales-interglaciales del Cuaternario Tardío.

A pesar de que la diversidad genética fue elevada, se observó que la estructura genética presenta diferencias significativas entre las poblaciones.

Las poblaciones de *C. nizandensis* están genéticamente estructuradas. La dispersión de semillas ha diferenciado a la población M2 en un grupo de ADNcp separado del resto de las poblaciones. Sin embargo, el flujo génico, ha sido lo suficientemente alto para mantener la cohesión entre las cuatro poblaciones.

La alta diversidad presente en ambos linajes, además de deberse a las características biológicas de la especie, tiene orígenes históricos distintos, en la permanencia a través del tiempo y la expansión espacial y demográfica.

Cephalocereus nizandensis es una especie de origen pleistocénico y está formado por dos linajes de ADNcp que divergieron de manera temprana aproximadamente hace 1.37 Ma.

Las tendencias demográficas y el tiempo de divergencia de los haplotipos son anteriores al último ciclo glacial

Literatura citada

- Acosta-Castellanos, S., y Rodríguez, C. (2003). Afinidades Fitogeográficas y endemismos de la zona semiárida de la cuenca alta del río Tehuantepec, Oaxaca, México. *Biogeographica*(3), 97-124.
- Adams, J., Maslin, M., y Thomas, E. (1999). Sudden climate transitions during the Quaternary. *Progress in Physical Geography*(1), 1-36.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*(3), 403-410.
- Alvarado-Sizzo, H., Casas, A., Parra, F., Arreola-Nava, H. J., Terrazas, T., y Sánchez, C. (2018). Species delimitation in the *Stenocereus griseus* (Cactaceae) species complex reveals a new species, *S. huastecorum*. *PloS one*(1), e0190385.
- Amos, W., y Harwood, J. (1998). Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*(1366), 177-186.
- Anderson, E. F. (2001). *The cactus family*. Portland: Timber Press.
- Applequist, W. L., y Wallace, R. S. (2002). Deletions in the plastid trnT-trnL intergenic spacer define clades within Cactaceae subfamily Cactoideae. *Plant Systematics and Evolution*(1), 153-162.
- Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard university press.
- Bandelt, H. J., Forster, P., y Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology*(1), 37-48.
- Barba Montoya, J. A. (2009). *Origen y diversificación de la tribu Pachycereeae (Cactaceae)*. Tesis de Licenciatura. México, D.F.: Facultad de Ciencias, UNAM.
- Bárcenas-Argüello, M. L. (2011). *Distribución ecológica del subgénero Neodawsonia Backeb. del género Cephalocereus Pfeiff. (Cactaceae), en el Istmo de Tehuantepec, México*. Tesis doctoral. Texcoco, México: Colegio de Posgraduados Montecillo.
- Bárcenas-Argüello, M. L., Gutiérrez-Castorena, M. d., Terrazas, T., y López-Mata, L. (2010). Rock-Soil Preferences of Three (Cactaceae) Species of Tropical Dry Forests. *Soil Science Society of America Journal*(4), 1374-1382.
- Bennett, K. D., y Provan, J. (2008). What do we mean by 'refugia'? *Quaternary Science Reviews*(27), 2449-2455.
- Bialozyt, R., Ziegenhagen, B., y Petit, R. J. (2006). Contrasting effects of long distance seed dispersal on genetic diversity during range expansion. *Journal of evolutionary biology*(1), 12-20.
- Bonatelli, I. A., Perez, M. F., Peterson, A. T., Taylor, N. P., Zappi, D. C., Machado, M. C., Koch I, Pires A. H., Moraes, E. M. (2014). Interglacial microrefugia and diversification of a cactus species complex: phylogeography and palaeodistributional reconstructions for *Pilosocereus aurisetus* and allies. *Molecular ecology*, (12), 3044-3063.
- Boyle, T. H. (1997). The genetics of self-incompatibility in the genus *Schlumbergera* (Cactaceae). *Journal of Heredity*(3), 209-214.
- Bravo Hollis, H., y Sánchez Mejorada, R. H. (1978). *Las cactáceas de México* (Segunda ed., Vol. I). México D.F.: UNAM.
- Bustamante, E., Búrquez, A., Scheinvar, E., y Eguiarte, L. E. (2016). Population genetic structure of a widespread bat-pollinated columnar cactus. *PloS one*(3), e0152329.
- Byrne, M., y Hopper, S. D. (2008). Granite outcrops as ancient islands in old landscapes: evidence from the phylogeography and population genetics of *Eucalyptus caesia* (Myrtaceae) in Western Australia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 93, 177-188.

- Castro-Felix, P., Rosas-Espinoza, V. C., Díaz-Cárdenas, B., Pérez-Valencia, L. I., Huerta-Martínez, F. M., y Santerre, A. (2014). Genetic diversity within a declining natural population of *Ferocactus histrix* (DC) Lindsay. *Plant species biology*(3), E21-E30.
- Charlesworth, D., y Wright, S. I. (2001). Breeding systems and genome evolution. *Current opinion in genetics y development*(6), 685-690.
- Clark, P. U., Dyke, A. S., Shakun, J. D., Carlson, A. E., Clark, J., Wohlfarth, B., Mitrovica, J. X., Hostetler, S. W., McCabe, A. M. (2009). The last glacial maximum. *Science*(5941), 710-714.
- Clark-Tapia, R., y Molina-Freaner, F. (2003). The genetic structure of a columnar cactus with a disjunct distribution: *Stenocereus gummosus* in the Sonoran desert. *Heredity*(6), 443-450.
- Contreras-Negrete, G., Ruíz-Durán, M. E., Cabrera-Toledo, D., Casas, A., Vargas, O., y Parra, F. (2015). Genetic diversity and structure of wild and managed populations of *Polaskia chende* (Cactaceae) in the Tehuacan-Cuicatlan Valley, Central Mexico: insights from SSR and allozyme markers. *Genetic resources and crop evolution*(1), 85-101.
- Corander, J., Marttinen, P. S., y Tang, J. (2013). *BAPS: Bayesian analysis of population structure*. University of Helsinki.
- Cornejo-Romero, A., Vargas-Mendoza, C. F., Aguilar-Martínez, G. F., Medina-Sánchez, J., Rendón-Aguilar, B., Valverde, P. L., Zavala-Hurtado, J. A., Serrato, A., Rivas-Arancibia, S., Pérez-Hernández, M. A., López-Ortega, G., Jiménez-Sierra, C. (2017). Alternative glacial-interglacial refugia demographic hypotheses tested on *Cephalocereus columna-trajani* (Cactaceae) in the intertropical Mexican drylands. *PLoS ONE*(4), e0175905.
- Cornejo-Romero, A., Vargas-Mendoza, C. F., Valverde, P., y Rendón-Aguilar, B. (2013). Estructura genética y filogeografía en cactáceas. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 58(1), 4-28.
- Cota-Sánchez, J. H., Remarchuk, K., y Ubayasena, K. (2006). Ready-to-use DNA extracted with a CTAB method adapted for herbarium specimens and mucilaginous plant tissue. *Plant Molecular Biology Reporter*, 24(2), 161-167.
- Cruse-Sanders, J. M., Parker, K. C., Friar, E. A., Huang, D. I., Mashayekhi, S., Prince, L. M., Otero-Arnaiz, A., Casas, A. (2013). Managing diversity: Domestication and gene flow in *Stenocereus stellatus* Riccob.(Cactaceae) in Mexico. *Ecology and evolution*(5), 1340-1355.
- Curry, B. B., Grimley, D. A., y McKay III, E. D. (2011). Quaternary glaciations in Illinois. *Developments in Quaternary sciences*(15), 467-487.
- Drummond, A. J., Rambaut, A., Shapiro, B. E., y Pybus, O. G. (2005). Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular biology and evolution*(5), 1185-1192.
- Drummond, A., Suchard, M., Xie, D., y Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology And Evolution*, 29, 1969-1973.
- Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Jordano, P., Salvini, D., Vendramin, G. G., y Petit, R. J. (2007). Can population genetic structure be predicted from life-history traits? *The American Naturalist*(5), 662-672.
- Duran, K. L., Lowrey, T. K., Parmenter, R. R., y Lewis, P. O. (2005). Genetic diversity in Chihuahuan Desert populations of creosotebush (Zygophyllaceae: *Larrea tridentata*). *American journal of botany*(4), 722-729.
- Earl, D. A. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*(2), 359-361.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*(5), 1792-1797.

- Esparza-Olguín, L. G. (2005). *Estudio comparativo de tres especies de cactáceas columnares del género Neobuxbaumia que difieren en su nivel de rareza: un enfoque genético-demográfico*. Tesis doctoral. México, D.F.: Facultad de Ciencias, UNAM.
- Espinosa Asuar, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. En E. Eguiarte Luis, V. Souza, y X. Aguirre, *Ecología molecular* (págs. 517-540). México, D.F.: Semanrant, Conabio, Inst. de Ecología UNAM.
- Evanno, G., Regnaut, S., y Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*(8), 2611-2620.
- Excoffier, L., y Lischer, H. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*(3), 564–567.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., y Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*(2), 479-491.
- Ezcurra, E. (1997). *Patrones biogeográficos de las cactáceas columnares de México*. México, D.F.: Conabio.
- Fan, Q. J., Zheng, S. C., Yan, F. X., Zhang, B. X., Qiao, G., y Wen, X. P. (2013). Efficient regeneration of dragon fruit (*Hylocereus undatus*) and an assessment of the genetic fidelity of in vitro-derived plants using ISSR markers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*(88), 631-637.
- Figueredo, C. J., Nassar, J. M., García-Rivas, A. E., y González-Carcacia, J. A. (2010). Population genetic diversity and structure of *Pilosocereus tillianus* (Cactaceae, Cereeae), a columnar cactus endemic to the Venezuelan Andes. *Journal of Arid Environm*(11), 1392-1398.
- Fleming, T. H., y Valiente-Banuet, A. (2002). *Columnar cacti and their mutualists: evolution, ecology, and conservation*. University of Arizona Press.
- Fleming, T. H., Maurice, S., y Hamrick, J. L. (1998). Geographic variation in the breeding system and the evolutionary stability of trioecy in *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *Evolutionary Ecology*(3), 279-289.
- Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*(2), 915-925.
- Fu, Y. X., y Li, W. H. (1993). Maximum likelihood estimation of population parameters. *Genetics*, 134(4), 1261-1270.
- Gámez, N., Escalante, T., Espinosa, D., Eguiarte, L. E., y Morrone, J. J. (2014). Temporal dynamics of areas of endemism under climate change: a case study of Mexican *Bursera* (Burseraceae). *Journal of Biogeography*(5), 871-881.
- Ganopoulos, I. K., Xanthopoulou, A., Mastrogianni, A., Koubouris, G., y Madesis, P. (2015). Genetic diversity of Barbary fig (*Opuntia ficus-indica*) collection in Greece with ISSR molecular markers. *Plant Gene*(2), 29-33.
- Goettsch, B., Hilton-Taylor, C., Cruz-Piñón, G., Duffy, J. P., Frances, A., Hernández, H. M., Inger, R., Pollock, C., Schipper, J., Superina, M., Taylor, N. P., Tognelli, M., Abba, A. M., Arias, S., Arreola-Nava, H. J., Baker, M. A., Bárcenas, R. T., Barrios, D., Braun, P., Butterworth, C. A., Búrquez, A., Caceres, F., Chazaro-Basañez, M., Corral-Díaz, R., Del Valle Perea, M., Demaio, P. H., Duarte de Barros, W. A., Durán, R., Yancas, L. F., Felger, R. S., Fitz-Maurice, B., Fitz-Maurice, W. A., Gann, G., Gómez-Hinostrosa, C., Gonzales-Torres, L. R., Patrick Griffith, M., Guerrero, P. C., Hamme, I. B., Heil, K. D., Hernández-Oria, J. G., Hoffmann, M., Ishihara, M. I., Kiesling, R., Larocca, J., León-de la Luz, J. L., Loaiza S., C. R., Lowry, M., Machado, M. C., Majure, L. C., Ávalos, J. G., Martorell, C., Maschinski, J., Méndez, E., Mittermeier, R. A., Nassar, J. M., Negrón-Ortiz, V., Oakley, L. J., Ortega-Baes, P., Ferreira, A., Pinkava, D. J., Porter, J. M., Puente-Martínez, R., Gamarra, J. R., Pérez, P. S., Martínez, E. S., Smith, M., Manuel

- Sotomayor, M. Del C. J., Stuart, S. N., Muñoz, J. L., Terrazas, T., Terry, M., Trevisson, M., Valverde, T., Van Devender, T. R., Véliz-Pérez, M. E., Walter, H. E., Wyatt, S. A., Zappi, D., Zavala-Hurtado, J., Gaston, K. J. (2015). High proportion of cactus species threatened with extinction. *Nature Plants*(10), 15142.
- Gomes, V. G., Quirino, M., Z. G., y Araujo, H. F. (2014). Frugivory and seed dispersal by birds in *Cereus jamacaru* DC. ssp. *jamacaru* (Cactaceae) in the Caatinga of Northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology*(1), 32-40.
- González-Medrano, F. (1996). Algunos aspectos de la evolución de la vegetación de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*(58), 129–136.
- González, A., y Aguirre, X. (2007). Inter simple sequence repeats (ISSRs). En L. E. Eguiarte, S. V., y A. X., *Ecología molecular* (págs. 567-571). México D.F.: Semanant, Conabio, Inst. de Ecología UNAM.
- Goodall-Copestake, W. P., Tarling, G. A., y Murphy, E. J. (2012). On the comparison of population-level estimates of haplotype and nucleotide diversity: a case study using the gene *cox1* in animals. *Heredity*(109), 50-56.
- Gutiérrez-Flores, C., García-De León, F. J., y Cota-Sánchez, J. H. (2016). Microsatellite genetic diversity and mating systems in the columnar cactus *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 22, 1-10.
- Haffer, J. (1969). Speciation in Amazonian forest birds. *Science*(165), 131–137.
- Hamrick, J. L., y Godt, M. J. (1989). Allozyme Diversity in Plant Species. En A. H. Brown, A. L. Clegg, y B. S. Weir, *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources* (págs. 43-63). Sunderland, Massachusetts, U.S.A.: Sinauer Associates Inc.
- Hamrick, J. L., y Godt, M. J. (1996). Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 351(1345), 1291-1298.
- Hamrick, J. L., Nason, J. D., Fleming, T. H., y Nassar, J. M. (2002). Genetic diversity in columnar cacti. En T. H. Fleming, y A. Valiente-Banuet (Edits.), *Columnar cacti and their mutualists: Evolution, Ecology, and Conservation* (págs. 122-133). Tucson, Arizona: University of Arizona Press.
- Harpending, H. C. (1994). Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human biology*(4), 591-600.
- Hartl, D. L., y Clark, A. G. (2007). *Principles of population genetics* (4 ed.). Sinauer Associates.
- Hasegawa, M., Kishino, H., y Yano, T. A. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of molecular evolution*(2), 160-174.
- Hernández-Hernández, T., Brown, J. W., Schlumpberger, B. O., Eguiarte, L. E., y Magallón, S. (2014). Beyond aridification: multiple explanations for the elevated diversification of cacti in the New World Succulent Biome. *New phytologist*, 202, 1382-1397.
- Hewitt, G. M. (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*(3), 247-276.
- Hewitt, G. M. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*(6789), 907-9013.
- Hewitt, G. M. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*(1442), 183-195.
- Hofreiter, M., y Stewart, J. (2009). Ecological change, range fluctuations and population dynamics during the Pleistocene. *Current biology*(14), R584-R594.
- Ibrahim, K. M., Nichols, R. A., y Hewitt, G. M. (1996). Spatial patterns of genetic variation generated by different forms of dispersal during range expansion. *Heredity* (3), 282-291.
- Jana, C., Salvatierra, A., Díaz, D., y Martínez, L. (2017). Morphological and genetic characterization among wild populations of copao (*Eulychnia acida* Phil.), cactus endemic to Chile. *Chilean journal of agricultural research*, 17, 3-14.

- Juárez Miranda, A. (2017). En *Proyección retrospectiva del Modelo de Nicho Ecológico del género Cephalocereus (Cactaceae) y su respuesta a la aridez. Tesis de Licenciatura*. Ciudad de México: Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional.
- Khattab, S., El Sherif, F., El-Garhy, H. A., Ahmed, S., y Ibrahim, A. (2014). Genetic and phytochemical analysis of the in vitro regenerated *Pilosocereus robinii* by ISSR, SDS-PAGE and HPLC. *Gene*(1), 313-321.
- Kirkpatrick, M., y Barton, N. H. (1997). Evolution of a species' range. *The American Naturalist*(1), 1-23.
- Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*(7), 1870-1874.
- Latch, E. K., Dharmarajan, G., Glaubitz, J. C., y Rhodes, O. E. (2006). Relative performance of Bayesian clustering software for inferring population substructure and individual assignment at low levels of population differentiation. *Conservation Genetics*(2), 295-302.
- Librado, P., y Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*(11), 1451-1452.
- Monteiro, E. R., Mangolin, C. A., das Neves, A. F., Orasmo, G. R., y da Silva, M. D. (2015). Genetic diversity and structure of populations in *Pilosocereus gounellei* (FAC Weber ex K. Schum.)(Cactaceae) in the Caatinga biome as revealed by heterologous microsatellite primers. *Biochemical systematics and ecology*(58), 7-12.
- Moraes, E. M., Abreu, A. G., Andrade, S. C., Sene, F. M., y Solferini, V. N. (2005). Population genetic structure of two columnar cacti with a patchy distribution in eastern Brazil. *Genetica*(2), 311-323.
- Nason, J. D., Hamrick, J. L., y Fleming, T. H. (2002). Historical vicariance and postglacial colonization effects on the evolution of genetic structure in *Lophocereus*, a Sonoran Desert columnar cactus. *Evolution*(11), 2214-2226.
- Nassar, J. M., Hamrick, J. L., y Fleming, T. H. (2003). Population genetic structure of Venezuelan chiropterophilous columnar cacti (Cactaceae). *American Journal of Botany*(11), 1628-1637.
- Navarro-Quezada, A., González-Chauvet, R., Molina-Freaner, F., y Eguiarte, L. E. (2003). Genetic differentiation in the *Agave deserti* (Agavaceae) complex of the Sonoran desert. *Heredity*(3), 220-227.
- Ornelas, J. F., y Rodríguez-Gómez, F. (2015). Influence of Pleistocene glacial/interglacial cycles on the genetic structure of the mistletoe cactus *Rhipsalis baccifera* (Cactaceae) in Mesoamerica. *Journal of Heredity*(2), 196-210.
- Ossa, C. G., Montenegro, P., Larridon, I., y Pérez, F. (2019). Response of xerophytic plants to glacial cycles in southern South America. *Annals of botany*(124), 15-25.
- Otero-Arnaiz, A., Casas, A., Hamrick, J. L., y Cruse-Sanders, J. (2005). Genetic variation and evolution of *Polaskia chichipe* (Cactaceae) under domestication in the Tehuacan Valley, central Mexico. *Molecular ecology*(6), 1603-1611.
- Parker, K. C., y Hamrick, J. L. (1992). Genetic diversity and clonal structure in a columnar cactus, *Lophocereus schottii*. *American Journal of Botany*(1), 86-96.
- Parra, F., Casas, A., Peñaloza-Ramírez, J. M., Cortés-Palomec, A. C., Rocha-Ramírez, V., y González-Rodríguez, A. (2010). Evolution under domestication: ongoing artificial selection and divergence of wild and managed *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) populations in the Tehuacán Valley, Mexico. *Annals of Botany*(3), 483-496.
- Peakall, R., Smouse, P. E., y Huff, D. R. (1995). Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloe dactyloides*. *Molecular Ecology*(2), 135-148.

- Petit, R. J., Pineau, E., Demesure, B., Bacilieri, R., Ducouso, A., y Kremer, A. (1997). Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*(18), 9996-10001
- Pérez-García, E. A. (2002). *Enclaves de vegetación xerofítica en regiones mésicas: caracterización, análisis de su diversidad florística e importancia en el mantenimiento de floras xerofíticas. Tesis de Maestría.* México D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Pérez-García, E. A., Meave, J. A., y Gallardo, C. (2001). Vegetación y flora de la región de Nizanda, istmo de Tehuantepec, Oaxaca, México. *Acta Botánica Mexicana*, 56, 19 - 88.
- Pérez-García, E. A., Sevilha, A. C., Meave, J. A., y Scariot, A. (2009). Floristic differentiation in limestone outcrops of southern Mexico and central Brazil: a beta diversity approach. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*(84), 45-58.
- Pérez-García, E., y Meave, J. (2005). Heterogeneity of xerophytic vegetation of limestone outcrops in a tropical deciduous forest region in southern México. *Plant Ecology*, 175, 147–163.
- Pinheiro, F., de Barros, F., Palma-Silva, C., Fay, M. F., Lexer, C., y Cozzolino, S. (2011). Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. *Journal of Biogeography*(10), 1923-1935.
- Pritchard, J. K., Wen, X., y Falush, D. (2010). STRUCTURE software, version 2.3. University of Chicago, Chicago.
- Quipildor, V. B., Kitzberger, T., Ortega-Baes, P., Quiroga, M. P., y Premoli, A. C. (2017). Regional climate oscillations and local topography shape genetic polymorphisms and distribution of the giant columnar cactus *Echinopsis terscheckii* in drylands of the tropical Andes. *Journal of Biogeography*, 45, 116-126.
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., y Suchard, M. A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic biology*(5), 901-904.
- Rebernick, C. A., Schneeweiss, G. M., Bardy, K. E., Schoenswetter, P., Villasenor, J. L., Obermayer, R., y Weiss-Schneeweiss, H. (2010). Multiple Pleistocene refugia and Holocene range expansion of an abundant southwestern American desert plant species (*Melampodium leucanthum*, Asteraceae). *Molecular Ecology*(16), 3421-3443.
- Rogers, A. R., y Harpending, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular biology and evolution*(3), 552-569.
- Rosenberg, N. A. (2004). DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular ecology notes*(1), 137-138.
- Rozas, J. (2009). DNA Sequence Polymorphism Analysis using DnaSP. *Methods in Molecular Biology*, 537, 337-350.
- Rull, V. (2009). Microrefugia. *Journal of Biogeography*(3), 481-484.
- Scheinvar, E., Gámez, N., Castellanos-Morales, G., Aguirre-Planter, E., y Eguiarte, L. E. (2017). Neogene and Pleistocene history of *Agave lechuguilla* in the Chihuahuan Desert. *Journal of Biogeography*(4), 322-334.
- Schneider, S., y Excoffier, L. (1999). Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics*(3), 1079-1089.
- Shaw, J., Lickey, E. B., S. E., y Small, R. L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American journal of botany*(3), 275-288.
- Silva, G. A., Antonelli, A., Lendel, A., Moraes, E. D., y Manfrin, M. H. (2018). The impact of early Quaternary climate change on the diversification and population dynamics of a South American cactus species. *Journal of biogeography*(1), 76-88.

- Slatkin, M. (1985). Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*(1), 53-65.
- Slatkin, M. (1991). Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genetics Research*(2), 167-175.
- Slatkin, M., y Hudson, R. R. (1991). Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*(2), 555-562.
- Sosa, V., y Nova, J. (2012). Endemic angiosperm lineages in Mexico: hotspots for conservation. *Acta botánica mexicana*(100), 293-315.
- Sosa, V., Ruiz-Sanchez, E., y Rodriguez-Gomez, F. C. (2009). Hidden phylogeographic complexity in the Sierra Madre Oriental: the case of the Mexican tulip poppy *Hunnemannia fumariifolia* (Papaveraceae). *Journal of Biogeography*(1), 18-27.
- Spaulding, W. G. (1990). Vegetational and climatic development of the Mojave Desert: the last glacial maximum to the present. En J. L. Betancourt, T. R. Van-Devender, y P. S. Martin, *Packrat Middens; The Last 40,000 years of Biotic Change* (págs. 166-199). University of Arizona Press.
- Stewart, J. R., Lister, A. M., Barnes, I., y Dalén, L. (2010). Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*(1682), 661-671.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A. G., y Cosson, J. F. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*(4), 453-464.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., y Bouvet, J. (1991). Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant molecular biology*(5), 1105-1109.
- Tajima, F. (1989). Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585-595.
- Tapia, H. J., Bárcenas-Argüello, M. L., Terrazas, T., y Arias, S. (2017). Phylogeny and circumscription of *Cephalocereus* (Cactaceae) based on molecular and morphological evidence. *Systematic Botany*(4), 709-723.
- Tapper, S. L., Byrne, M., Yates, C. J., Keppel, G., Hopper, S. D., Van Niel, K., Schut, A. G. T., Mucina, L., Wardell-Johnson, G. W. (2014). Prolonged isolation and persistence of a common endemic on granite outcrops in both mesic and semi-arid environments in south-western Australia. *Journal of Biogeography*(11), 2032-2044.
- Tovar Romero, H. A. (2005). *Morfología y distribución de las cactáceas en el paisaje complejo de nizanda (Oaxaca), México*. Tesis de Licenciatura. México, D.F.: Facultad de Ciencias, UNAM.
- Turchetto-Zolet, A. C., Pinheiro, F., Salgueiro, F., y Palma-Silva, C. (2013). Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*, 22(5), 1193–1213.
- Valadez-Moctezuma, E., Samah, S., y Luna-Paez, A. (2015). Genetic diversity of *Opuntia* spp. varieties assessed by classical marker tools (RAPD and ISSR). *Plant systematics and evolution*(2), 737-747.
- Valiente-Banuet, A., Arizmendi, M. C., Rojas-Martínez, A., Godínez-Álvarez, H., Silva, C., y Dávila-Aranda, P. (2002). Biotic interactions and population dynamics of columnar cacti. En T. H. Fleming, y A. Valiente-Banuet, *Columnar Cacti and their Mutualists: Evolution, Ecology, and Conservation* (págs. 225-240). University of Arizona Press.
- Van Devender, T. R. (1990). Late quaternary vegetation and climate of the Chihuahuan Desert, United States and Mexico. En J. L. Betancourt, T. R. Van Devender, y P. Schultz Martin, *Packrat Middens: The Last 40,000 Years of Biotic Change* (págs. 104-133). University of Arizona Press.
- Van Devender, T. R., y Burgess, T. L. (1985). Late Pleistocene woodlands in the Bolson de Mapimi: a refugium for the Chihuahuan Desert biota? *Quaternary Research*(3), 346-353.

- Vázquez-Domínguez, E., Castañeda-Rico, S., Garrido-Garduña, T., y Gutiérrez-García, T. A. (2009). Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista chilena de historia natural*(2), 277-297.
- Wendelken, P. W., y Martin, R. F. (1988). Avian consumption of the fruit of the cacti *Stenocereus eichlamii* and *Pilosocereus maxonii* in Guatemala. *American Midland Naturalist*(2), 235-243.
- Wolfe, K. H., Li, W. H., y Sharp, P. M. (1987). Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*(24), 9054-9058.
- Yeh, F. C., Yang, R. C., Boyle, T. B., Ye, Z. H., y Mao, J. X. (1997). POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular biology and biotechnology centre, University of Alberta.
- Zuckerlandl, E., y Pauling, L. (1965). Molecules as documents of evolutionary history. *ournal of theoretical biology*(2), 357-366.

Anexos

Diversidad genética en grupos genéticos de ADNcp

Los valores de diversidad genética de los grupos azul y rojo son muy elevados ya que cada uno de los individuos que los conforman poseen un haplotipo diferente. De los dos grupos restantes, el verde posee una mayor diversidad genética y está conformado por cinco haplotipos distintos, mientras que el grupo amarillo solo está formado por dos haplotipos (Tabla 6).

Tabla 11. Diversidad genética en grupos genéticos de *Cephalocereus nizardensis*

Grupos genéticos	N	Pi	sd	h	Hd	sd	k
Amarillo	8	0.0002	0.0001	2	0.25	0.18	0.25
Azul	4	0.0018	0.0006	4	1.00	0.18	2.67
Rojo	3	0.0014	0.0005	3	1.00	0.27	2.00
Verde	25	0.0004	0.0001	5	0.42	0.12	0.51
Amarillo/Rojo	11	0.00109	0.0004	5	0.618	0.16	1.6
Verde/Azul	29	0.00101	0.0003	9	0.571	0.12	1.48
Total	40	0.0013	0.0003	14	0.75	0.07	1.91

Número de individuos (N), Diversidad nucleotídica (Pi), número de haplotipos (h), Diversidad haplotípica (Hd), Promedio de diferencias nucleotídicas (k), desviación estándar (sd).