

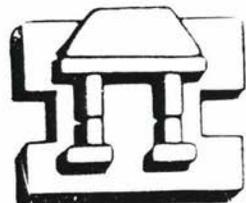


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“Estudio de la estructura poblacional de *Neoburbaumia macrocephala* en Tehuacán - Cuicatlán, Puebla, mediante el uso de marcadores moleculares”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
LAURA PATRICIA ALEJOS VELAZQUEZ



IZTACALA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARTHA MARTINEZ GARCÍA,
LABORATORIO DE BIOQUÍMICA MOLECULAR, UBIPRO

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



U.N.A.M. CAMPUS



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
 IZTACALA
 JEFATURA DE LA CARRERA DE BIOLOGIA



04 de febrero del 2002

SOLICITUD DE REVISION DE ESTUDIOS

LIC. AMERICA LANDA ROMERO
 JEFA DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACION
 ESCOLAR.
 PRESENTE

Por este medio comunico a Ud. Que el posante de Biología

—P LAURA PATRICIA ALIROS VILLAZQUEZ

Ha concluido su trabajo de tesis titulado:

—▷ "Estudio de la estructura poblacional de *Neohabibama macronyctera* (Lepidoptera: Cuniculán, Puebla, mediante el uso de marcadores moleculares"

Habiendo entregado a esta Jefatura los votos aprobados, se extiende la presente cédula de autorización de los trámites pertinentes para la realización de la tesis mencionada.

Atentamente,

Por esta rúbrica habilitada

10 FEB 2002

Dr. Sergio Vaca
 Jefe de la Carrera

RECIBIDO EN LA UNIDAD DE ADMINISTRACION ESCOLAR
 EL 04 DE FEBRERO DE 2002
 A LAS 10:00 HORAS
 EN EL CARRERON DE BILOGIA
 IZTACALA

Este trabajo fue realizado con ayuda parcial del proyecto UNAM-DGAPA con número IN22059 y el proyecto PAPCA de la FES-Iztacala, UNAM.

REVISORES ASIGNADOS

PRESIDENTE	DR. JORGE E. CAMPOS CONTRERAS
VOCAL	DRA. MARTHA MARTÍNEZ GARCÍA
SECRETARIO	DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
1^{ER} SUPLENTE	BIOL. JOSEFINA VÁZQUEZ MENDRANO
2^{DO} SUPLENTE	M. EN C. GERARDO ZÚÑIGA BERMUDEZ

DEDICATORIA

A dos mujeres que son un gran ejemplo a seguir, por todo su valor y entereza para enfrentar la vida

Mi abuelita *Anita Martínez*,
y

Mi tía *Exiquia Alejos*.

A mis padres por confiar en mí siendo un apoyo incondicional, el mejor de mis refugios y mi mayor motivo.....

Salvador Alejos Betancourt

y

Patricia Velázquez Martínez

Este título también es de ustedes.

A mis hermanos, por lo que hemos aprendido y vivido juntos

*Salvador
Carmen
Karina
Lizeth
Karen
Yenny
Carolina*

Gracias por todo su apoyo.



AGRADECIMIENTOS

A Dios, por todas las cosas bellas que me ha brindado a lo largo de mi vida y por las experiencias que me han ayudado a ser quien soy.....

Muchos maestros podrán enseñar en clase las teorías de la ciencia, pero muy pocos comparten las experiencias de su vida. Gracias Dra. Martha por dirigir mi trabajo de Tesis, por compartir conmigo su conocimiento, pero sobre todo, por la bella amistad que me ha brindado. Mi deuda con usted es muy grande.....

A mis revisores, el Dr. Jorge, gracias por su paciencia, a la maestra Coro, al maestro Gerardo y a la maestra Josefina. Gracias por todo su apoyo y ayuda.

Agradeceré eternamente a mis padres, por todo su amor y dedicación, por sus desvelos, sus consejos, su ejemplo, por brindarme la oportunidad de ser alguien en la vida, por ser mis mejores amigos siempre pacientes y dispuestos a escucharme.

A mis hermanos, gracias por preocuparse por mí, por comprenderme y apoyarme. Espero compartir con ustedes la satisfacción de ver realizados sus sueños Los amo muchísimo.

A mis todos mis tíos y a Gerardo Granados y Delia Jaimes, a mi padrino Ernesto Gómez, a la Sra. Josefina y al Sr. Andrés López. Les agradezco mucho su confianza y la ayuda que me brindaron.

A Iván Cárdenas, mi compañero, amigo y confidente. Gracias por apoyarme a terminar esta etapa de mi carrera, por recordarme que la vida es bella y por enseñarme que hasta la circunstancia más adversa tiene su lado bello que nos ayuda a ser quien somos. Te amo latoso.....

A mis maestros, en especial a la maestra Irma E. Dueñas, Laura Castañeda, Marú Héres, Sergio Vaca, Pilar Villeda y Carmelo Reyes. Por apoyarme y enseñarme que se debe luchar por lo que se quiere, ya que en este mundo el lugar que uno obtiene es el reflejo del esfuerzo diario.

Mis amigos Chucho O., Julio G., Huguito, Vicky, Roció, Alfredo y Gina por compartir conmigo todas las locuras que se les ocurrieron que hicieron más divertida la carrera. Y dentro de mi grupo de amigos hay unos muy especiales a los que quiero mucho: Alma David, Martha Contreras, Lety Santos, Carlos A. Pérez y Lalo Alvarado. (Einstein), gracias por escucharme por estar conmigo en las buenas pero sobre todo en las malas, gracias por ser mis amigos.

A los integrantes del laboratorio de Evolución y Variación Biológica de la ENCB-IPN, por brindarme su espacio y hacer más placenteras las horas de exilio.

A los profesores Osvaldo Téllez, Adelaida Ocampo y Francisco López, por sus comentarios y su valiosa ayuda para la realización de este trabajo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Bioquímica Molecular (IBM) Lety, Irma, Wendy, Amelia, Jenny, Miguel, Alejandro, a la Dra. Martha y al Dr. Jorge y aunque ya no estén Blanca, Ale y Mario. Gracias a todos por ayudarme, en el trabajo de campo y por hacer del Laboratorio un segundo hogar en el que las horas pasan sin sentirse. A todos muchas gracias.....



ÍNDICE

Índice de cuadros		V
Índice de Figuras	IZT.	VI
Abreviaturas		VII
Resumen		VIII
1 INTRODUCCIÓN		1
1.1 Diversidad Genética		1
1.2 Especies Endémicas		2
1.3 Técnicas Moleculares		3
1.4 RAPD		6
1.5 Los Desiertos		8
1.6 Cactáceas		8
1.7 El Género <i>Neobuxbaumia</i>		9
1.8 Hipótesis		11
1.9 Objetivos		12
2 METODOLOGÍA		13
2.1 Área de Estudio		13
2.2 <i>Neobuxbaumia macrocephala</i> (WEBER) DAWSON		15
2.3 Trabajo de Campo		17
2.4 Trabajo de Laboratorio		17
2.4.1 Extracción de ADN		18
2.4.2 Amplificación		19
2.5 Análisis Estadístico		19
2.5.1 Distancia Genética		19
2.5.2 Relaciones Espaciales		20
2.5.3 Estructura Genética		20
2.5.4 Diversidad Genética		21
2.5.5 Distancia Genética vs. Distancia Geográfica		22



3 RESULTADOS	23
3.1 Trabajo de Campo	24
3.2 Trabajo de Laboratorio	24
3.2.1 Extracción de ADN	24
3.2.2 Amplificación	24
3.3 Análisis Estadístico	26
3.3.1 Distancia Genética	26
3.3.2 Relaciones Espaciales	29
3.3.3 Estructura Genética	32
3.3.4 Distancia Genética vs Distancia Geográfica	47
4 DISCUSIÓN	50
Estructura Poblacional de <i>Neobuxbaumia macrocephala</i>	50
Método de Evaluación del Riesgo de Extinción de las Especies Silvestres en México (MER), una propuesta para <i>Neobuxbaumia macrocephala</i>	58
Perspectivas sobre la conservación de <i>Neobuxbaumia macrocephala</i>	62
5 CONCLUSIONES	65
6 BIBLIOGRAFÍA	66
7 ANEXO Matriz de similitud con el índice de Jaccard	75



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Especies de <i>Neobuxbaumia</i>	10
Cuadro 2.	Regiones, cuadrantes y número de individuos	23
Cuadro 3.	Secuencia de los decanucleótidos	25
Cuadro 4.	Porcentaje de componentes principales	29
Cuadro 5.	Resultados del análisis molecular de varianza (AMOVA)	32
Cuadro 6.	Valores de diversidad genética para cada iniciador	33
Cuadro 7.	Matriz de Φ_{ST} pareadas para las poblaciones muestreadas	33
Cuadro 8.	Valores de diversidad genética, para las poblaciones de adultos y juveniles	37
Cuadro 9.	Matriz de Φ_{ST} pareadas de poblaciones de individuos adultos y juveniles	45
Cuadro 10.	Valores de diversidad y estructura genética	47
Cuadro 11.	Matriz de correlación entre las Φ_{ST} pareadas y la distancia geográficas	48



INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Mapa que muestra los sitios de distribución	14
Figura 2.	Individuo de <i>Neobuxbaumia macrocephala</i>	16
Figura 3.	Polimorfismos obtenidos con el oligonucleotido OP B10	26
Figura 4.	Dendrograma de <i>N. macrocephala</i>	28
Figura 5.	PCO con MST sobrepuesto en los individuos juveniles	31
Figura 6.	PCO con MST sobrepuesto en los individuos adultos	31
Figura 7.	PCO en dos dimensiones con MST sobrepuesto para las cuatro poblaciones	35
Figura 8.	Dendrograma las poblaciones	36
Figura 9.	PCO con MST sobrepuesto en los sitios de colecta	36
Figura 10.	PCO en dos dimensiones con MST sobrepuesto para las cuatro poblaciones	38
Figura 11.	Dendrograma obtenido a partir de los individuos adultos	40
Figura 12.	PCO con MST sobrepuesto, sobre las poblaciones de individuos adultos	40
Figura 13.	PCO de dos componentes con MST sobrepuesto en las cuatro zonas de individuos juveniles	42
Figura 14.	Dendrograma para los individuos juveniles	44
Figura 15.	PCO con MST sobrepuesto en las poblaciones de individuos juveniles	44
Figura 16.	PCO con MST sobrepuesto en poblaciones de individuos juveniles y adultos	46
Figura 17.	Gráfica de dispersión a partir de la matriz de Mantel	49
Figura 18.	Gráfica de dispersión con regresión lineal	49



ABREVIATURAS

Ácido desoxirribonucleico	ADN
Análisis Molecular de Varianza	AMOVA
Convenio sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre	CITES
Cerro "La Yerba"	CY
Coefficiente de endogamia	Φ_{ST}
Índice de diversidad	G'_{st}
Diversidad por locus	H_o
Diversidad para todas las poblaciones	H_{pop}
Diversidad de la especie	H_{sp}
Número de inmigrante por generación	m
Método de Evaluación del Riesgo de Extinción de las Especies Silvestres en México	MER
Herbario Nacional de México	MEXU
Red de Tendido Mínimo	MST
Tamaño Poblacional Mínimo Viable	MVP
Los Reyes Metzontla	MZ
Número efectivo de la población	N_e
Unidad Taxonómica Operativa	OTUS
Componente Principal	PCO
Reacción en Cadena de la Polimerasa	PCR
Coefficiente de correlación	r
Amplificación al Azar del DNA Polimórfico	RAPD
Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales	SEMARNAT
San Juan Raya	SJR
San Martín	SM
Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza	UICN
Agrupamiento por Promedio Aritmético no Ponderado	UPGMA



RESUMEN

El conocimiento de la variabilidad genética permite plantear estrategias efectivas de conservación que dependen de la estructura genética de las poblaciones estudiadas. El objetivo de este estudio fue establecer la estructura genética espacio-temporal de la cactácea columnar *Neobuxbaumia macrocephala* mediante marcadores RAPD. Esta especie presenta una distribución más restringida que la de sus congéneres *N. mezcalaensis* y *N. tetetzo* dentro del valle de Tehuacán-Cuicatlán, por lo que se le considera una especie endémica estricta del valle. Además, presenta una baja densidad poblacional (200 Ind/ha) y es polinizada exclusivamente por tres especies de murciélagos nectarívoros quienes también distribuyen sus semillas.

En la realización de este trabajo se utilizaron seis oligonucleótidos para analizar 84 individuos (colectados en 6 poblaciones de San Juan Raya, 1 en Cerro "La Yerba", 4 en San Martín y 1 en Reyes Metzontla). Para estimar la variabilidad genética se utilizó el índice de Shannon, la relación genética de individuos y poblaciones se realizó por análisis de agrupamiento (Jaccard-UPGMA) y ordenación (PCO). La estructura genética se determinó mediante un AMOVA y el flujo génico a partir del Φ_{ST} , que se considera equivalente al índice de diversidad de Wright.

Se encontró que la variabilidad genética entre las poblaciones es del 23% (G'_{ST} 0.226) (1 = igualdad genética) este valor es menor al reportado para *N. tetetzo* (G'_{ST} 0.600) (Martínez-García *et al.*, 2002). Así mismo, el AMOVA indica que no existe estructuración genética ya que el 89.38% de la variación total se encuentra dentro de las cuatro poblaciones estudiadas. San Martín, fue la población más variable (He 7.18), enseguida la de San Juan Raya (He 6.74) y después le siguieron la de Los Reyes Metzontla (He 5.59) y cerro "La Yerba" (He 3.75). La población de San Martín presentó menor interacción con las poblaciones restantes a diferencia de la población de San Juan Raya. El valor de la Φ_{ST} para todas las poblaciones, fue de 0.106 (1 = igualdad genética), indicando que existe flujo génico ($N_e m = 1.19$). Para los adultos y juveniles el AMOVA mostró que no existe una estructura genética en estas poblaciones. Sin embargo, de acuerdo al índice de diversidad de Shannon, existe una mayor variabilidad en los adultos (G'_{ST} 0.217) que en los juveniles (G'_{ST} 0.388), aunque la diversidad en juveniles es menor ($\Phi_{ST} =$



0.073) a la que presentan los adultos ($\Phi_{ST} = 0.127$). Con respecto al flujo génico de los adultos, en general es menor ($N_e m = 0.97$) comparado con el de los juveniles ($N_e m = 1.79$).

Con base en los resultados obtenidos se concluye que *N. macrocephala* no presenta una estructura genética en sus poblaciones, probablemente este carácter está influenciado por el proceso de polinización realizado por los murciélagos, quienes favorecen el intercambio genético en las poblaciones. Por otro lado la variabilidad de los juveniles disminuye por una alta mortandad de plántulas y un bajo porcentaje de establecimiento de nuevos individuos. Estos procesos se ven afectados por factores ambientales y no por factores genéticos, sin embargo estos últimos a la larga pueden ser afectados de manera negativa e influir en la sobrevivencia de la especie en el valle.

De acuerdo a estos resultados sería conveniente incluir a *N. macrocephala* en la NOM-ECOL-059-2001. Para determinar en que categoría se podría ubicar, se aplicó el Método de Evaluación del Riesgo de Extinción de las Especies Silvestres en México (MER), que considera características como la distribución, el efecto de la calidad del hábitat, el impacto de la actividad humana y la vulnerabilidad biológica como estrategia reproductiva, variabilidad genética, tasa de reclutamiento, etc.

De acuerdo a los datos bibliográficos y a la evaluación de este trabajo bajo estos criterios es factible proponer a *N. macrocephala* como una especie en peligro de extinción. Como una estrategia de conservación *ex situ* a corto plazo, se propone preservar el germoplasma de las poblaciones para futuras estrategias de propagación y reintroducción en la población original. Las poblaciones encontradas en San Martín y San Juan Raya, se consideran las más adecuadas para conservar el germoplasma, debido a que poseen una alta variabilidad genética y una alta interacción poblacional.



1 INTRODUCCIÓN

1.1 DIVERSIDAD GENÉTICA

La variación que existe entre las especies genera el mosaico que observamos en los diferentes ecosistemas, cuyo equilibrio ecológico y genético ha sido alterado por procesos de deterioro ambiental en los que se pierde información biológica importante (Eguiarte y Piñero, 1990). Por lo anterior, han surgido programas de conservación, en los que se utilizan marcadores genéticos como una herramienta que contribuye al estudio de la evolución de las plantas (Smith y Vuong, 1996; Cruzan, 1998; Hagen y Hamrick, 1998; Ayres y Ryan, 1999; Francisco-Ortega, 2000; Kim *et al.*, 2001) y al mismo tiempo permiten estimar la estructura genética de las poblaciones (Apostol *et al.*, 1996; Bonnin *et al.*, 1996; Ayres y Ryan, 1997; Gabrielsen *et al.*, 1997; Martín *et al.*, 1997; Zoro *et al.*, 1997; Tarayre *et al.*, 1997). Con este conocimiento es posible elaborar planes de manejo que permiten la preservación y el buen uso de diferentes especies.

Las especies presentan archivos con información genética que se ha demostrado son la base del concepto de preadaptación, siendo la materia prima de la futura evolución de diversos linajes. Por ello, los niveles y patrones de variación genética, tienen un papel importante para determinar el potencial evolutivo de una especie (Eguiarte y Piñero, 1990). Actualmente la diversidad genética se puede utilizar para describir, estudiar, conservar y analizar la riqueza biológica (Guzmán, 1993; Eguiarte, 1993), utilizando técnicas detalladas y sofisticadas en las que se realizan análisis moleculares indirectos o directos del material genético, estos últimos miden la variación genética no evidente, un factor importante que estima el grado de conservación de una especie, ya que en ella se observa la fluctuación genética y el porcentaje de endogamia (Ayres y Ryan, 1999).

Basándose en la variabilidad genética de los organismos, los estudios de marcadores moleculares han ayudado a interpretar la estructura genética de las poblaciones naturales. Con estos datos es posible estimar el tamaño poblacional mínimo viable (MVP) y ayudar al diseño de reservas ecológicas que permiten la conservación de las especies (Álvarez-Buylla *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2001; Archibald *et al.*, 2001; Breyne *et al.*, 1997; Wong y Sun, 1999).



Es importante determinar la estructura genética poblacional de una especie cuando se pretende fomentar su conservación, ya que la evolución de una especie con poblaciones estructuradas es diferente a la que no lo esta. La diferencia radica en que en una población estructurada, no existe el apareamiento al azar y algunas subpoblaciones se aparean preferentemente con otras más cercanas, subdividiéndose la población en grupos genéticamente más parecidos entre sí, esto depende del tamaño de la población, su sistema de apareamiento, los mecanismos de polinización, la dispersión de semillas y su extensión geográfica (Luna *et al.*, 2001; Kalisz *et al.*, 2001). Todo en conjunto conlleva a una diferenciación dentro de la especie que es importante tomar en cuenta al elaborar los planes de manejo y decidir si se debe conservar *in situ*, *ex situ* o de ambas formas (Álvarez-Buylla *et al.*, 1996; Hannan y Orick, 2000; Kim *et al.*, 2001).

1.2 ESPECIES ENDÉMICAS

Una de las principales prioridades de los biólogos conservacionistas es el análisis de especies endémicas que sobreviven en ambientes inhóspitos en condiciones biológicas y climáticas restringidas, como en el caso de las zonas de montaña húmeda y desiertos (Eguiarte y Piñero, 1990). Se asume que en estas especies la variación genética puede ser muy escasa, aunque existen casos en la literatura en que las plantas raras o endémicas de distribución restringida, poseen mayor variación que sus congéneres con mayor distribución, contradiciendo las predicciones teóricas (Karron, 1987; Hamrick y Godt, 1990; Ranker, 1994, Smith y Vuong, 1996; Otero *et al.*, 1997). Las explicaciones dadas a esta observación son, la reciente especiación de estos grupos a partir de especies con mayor dispersión, cambios recientes en la distribución o hábitat, eficientes sistemas reproductivos, mutaciones somáticas, múltiples eventos de fundación o bien que las especies se encuentran en regiones que fueron refugios Pleistocénicos (Smith y Vuong, 1996). Evidencia experimental a favor de estas consideraciones no son del todo contundentes y son muy pocos los estudios realizados en las especies endémicas para generalizar.



1.3 TÉCNICAS MOLECULARES

Entre las herramientas que se utilizan para comprender la estructura poblacional de las diferentes especies se encuentran las características morfológicas que actualmente han sido complementadas con técnicas moleculares, que se basan en el análisis de los constituyentes químicos y la caracterización de macromoléculas (Otero *et al.*, 1997).

Dentro de los marcadores bioquímicos, la primera técnica molecular utilizada para estimar la variabilidad genética fue el análisis de proteínas de reserva en semillas, que se basa en el hecho de que las proteínas de diferentes individuos, poblaciones y especies son homólogas, y que al separarse en un gel producirán bandas similares o diferentes. Una de las desventajas que posee es que el número de genes que controlan estas características es reducido. De igual forma, la cantidad de diversidad genética mediante polimorfismo proteico puede ser subestimada por que no se detectan las mutaciones silenciosas (Gepts, 1990; Becerra y Paredes, 2000).

En los años 70 se demostró la existencia de las isoenzimas, formas moleculares múltiples dentro de un organismo que catalizan una misma reacción. El efecto de una modificación alélica puede ser detectado con certeza, debido a un cambio de movilidad electroforética. Las principales características de las isoenzimas incluyen la simplicidad, mínima cantidad del material en estudio, bajo costo y una cobertura del genoma de 10-20 *loci* por especie. Entre sus desventajas se incluye un nivel bajo de polimorfismo al presentar pocos alelos por *locus*, especialmente cuando la base genética es estrecha y que pueden ser afectadas en su nivel de expresión por factores ambientales (Hongwen *et al.*, 1998; Becerra y Paredes, 2000).

Posteriormente surgieron los marcadores moleculares, que analizan directamente el ácido desoxirribonucleico (ADN) y que han favorecido las investigaciones relacionadas con la diversidad en plantas. Las principales técnicas se basan en el análisis de Fragmentos de Restricción Polimórficos (RFLP) y en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), a partir de estas técnicas se han derivado muchas otras.

Los RFLP en general, permiten estudiar el genoma con una mayor cobertura al incluir secuencias codificadoras y no-codificadoras del ADN. Esto permite detectar con mayor eficiencia



cambios genéticos puntuales, comparado con las proteínas (Wang *et al.*, 1992). La técnica está basada en la digestión del ADN total de un individuo con diferentes enzimas de restricción. Básicamente, los RFLPs son causados por rearrreglos del ADN, tales como pérdidas, inserciones o sustituciones de secuencias o nucleótidos únicos, lo que significa la ganancia o pérdida de sitios de restricción. Esto es detectado a través de diferencias en el peso molecular de los fragmentos homólogos de restricción del ADN genómico al hibridar con la sonda seleccionada. Estos marcadores se expresan de manera codominante y una de sus principales desventajas es el uso de radioactividad, aunque últimamente se ha desarrollado una técnica no radioactiva (Becerra y Paredes, 2000).

La técnica de PCR se basa en la amplificación de fragmentos de ADN a partir de oligonucleótidos iniciadores prediseñados. Esta reacción es sometida a diferentes condiciones cíclicas de temperatura, lo que permite la amplificación *in vitro* de múltiples fragmentos de ADN a partir de una cadena molde. A partir del PCR se han generado una serie de técnicas, como la Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico (RAPD). Esta técnica se basa en la amplificación de segmentos de ADN polimórficos, usando oligonucleótidos iniciadores que son complementarios al ADN analizado (Williams *et al.*, 1990). Los productos son polimórficos cuando se pierde, se inserta o se cambia un solo nucleótido en la cadena molde (ADN genómico) y son separados mediante electroforesis. Las bandas visualizadas de diferente peso molecular, representan diferentes regiones dentro del genoma. Los resultados de RAPD obtenidos en plantas indican su herencia dominante y su habilidad para detectar regiones de ADN altamente variables (5-10 *loci* por oligonucleótido), además presentan potencialidad en el mapeo de genes, identificación de razas, estudios de hibridación inter e intraespecífica y en el estudio de la variación genética en poblaciones altamente emparentadas. Las principales ventajas de esta técnica son la rapidez en la obtención de resultados, el costo, el no uso de radioactividad, menor inversión en equipos y la cantidad reducida de ADN requerida. Sin embargo como desventaja aparece la inconsistencia de los datos que puede reducirse considerablemente con la estandarización de la técnica.

Recientemente, otra técnica basada en el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido desarrollada y es la obtención de fragmentos de restricción polimórficos



denominados Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP). En esta técnica se combinan los principios de los RFLP y PCR, donde una submuestra de fragmentos producidos por la restricción del ADN bajo estudio son amplificados selectivamente en cascada. Los AFLP usan como iniciadores oligonucleótidos complementarios a las secuencias que han sido ligadas a cada extremo del ADN digerido. El polimorfismo es detectado por la presencia o ausencia de fragmentos y son normalmente, al igual que RAPD, de herencia dominante. Una de las mayores ventajas de esta técnica es que en una sola reacción se puede identificar alrededor de 50 *loci* en un tiempo corto. Una de las desventajas para la interpretación de los datos es el tiempo necesario para el análisis cuando se realiza en forma no automatizada (Simpson, 1997; Tohme *et al.*, 1996; Becerra y Paredes, 2001).

Otra técnica utilizada, son las secuencias de ADN de mini (VNTR) y microsatélites (SSR), dos categorías de secuencias repetidas que se presentan en eucariontes. Estas secuencias se repiten en tandem y están dispersas a través del genoma representando muchos *loci*. Cada *locus* tiene distinto número de repeticiones variable, asociándose de esta manera a alelos específicos de alta variabilidad. A través del uso de estos marcadores se han obtenido patrones complejos de ADN en animales, plantas, y microorganismos.

Los minisatélites son usados como sondas de secuencias simples repetidas que generalmente tienen 15-35 pares de bases. La información generada es comparada con los RFLP. La técnica es de alta reproducibilidad, aunque requiere de un proceso de clonación previo de la sonda.

Por otro lado, los microsatélites, son secuencias de 1 a 5 nucleótidos repetidos en tandem y existen en forma abundante en plantas. Mediante estos se puede medir la diversidad entre genotipos, amplificando mediante PCR la región del ADN genómico que contiene estas secuencias repetidas. Los fragmentos generados son separados en geles desnaturizantes de poliacrilamida y visualizados radiactivamente o por tinción con nitrato de plata. Una de las desventajas de los microsatélites es el tiempo y costo involucrado en el proceso del diseño de cada iniciador, sin embargo existe la posibilidad de usar los mismos iniciadores en más de una especie (Condit y Hubbell, 1991; Becerra y Paredes, 2001).



Como se observa, existe una amplia variedad de técnicas moleculares y el emplear una u otra técnica depende de la pregunta que se quiera responder y sobre todo del material biológico y tecnológico que se posea. Por otro lado la técnica de RAPD permite detectar una mayor variación comparada con otras técnicas como la de las isoenzimas, además permite determinar la estructura genética en poblaciones que poseen poca variación (Otero *et al.*, 1997; Hongwen *et al.*, 1998; Ayres y Ryan, 1999) y sobre todo el costo, el tiempo y las diversas modificaciones que se le han hecho permiten que esta técnica molecular sea una de las más utilizadas en diversos campos de la biología (Otero *et al.*, 1997).

1.4 RAPD

La técnica de RAPD, es utilizada a partir de la década de los 90's, (Williams *et al.*, 1990). Consiste en utilizar un solo oligonucleótido como iniciador. El iniciador debe tener de 9 a 10 bases con secuencias aleatorias y es elegido arbitrariamente, con el requisito de que el contenido G + C no sea mayor al 60% para evitar alineaciones erróneas además, que no sean secuencias palindrómicas para evitar que se unan entre sí.

El iniciador se une al ADN genómico en diferentes regiones y reproduce estas secuencias en forma aleatoria con ayuda de una ADN polimerasa termoestable obtenida de la bacteria *Thermus aquaticus*, que soporta altas temperaturas y que se denomina Taq polimerasa (Breyne *et al.*, 1997; Hu *et al.*, 1995).

El polimorfismo es el resultado de cambios tanto en el sitio de unión del oligonucleótido (mutaciones puntuales) o por cambios que alteran el tamaño o evitan la amplificación de un fragmento del ADN (inserciones, deleciones, translocaciones).

Los productos de amplificación individual representan de manera teórica un alelo por locus y son transmitidos como marcadores dominantes, por consiguiente los homocigotos recesivos se manifiestan por la ausencia de la banda; los homocigotos dominantes presentan la banda al igual que los heterocigotos, por lo que no es posible distinguirlos. Esta desventaja se compensa con el hecho de que con la técnica es posible observar un número mayor de loci que los obtenidos con



enzimas o marcadores codominantes (Smith y Vuong, 1996; Breyne *et al.*, 1997; Otero *et al.*, 1997; Navarro, 1999).

Otras ventajas que posee la técnica, es el no requerir un conocimiento previo del genoma del organismo a estudiar. La técnica es relativamente simple de montar, es rápida y no requiere radioactividad y por tanto es más segura. El análisis del ADN es comparable entre tejidos, ocupándose una pequeña cantidad para obtener la concentración adecuada y no se presentan efectos por factores ambientales. Son marcadores neutros que muestrean todo el genoma incluyendo los sitios no codificantes en que teóricamente ocurre un mayor número de polimorfismos. Su utilidad abarca el mapeo de genomas, análisis de paternidad, hibridación, relaciones filogenéticas y genética de poblaciones. Además una sustitución en una base del decanucleótido produce un patrón de bandeo diferente lo que prueba la sensibilidad de la técnica (Williams *et al.*, 1990).

Las desventajas que posee la técnica es que las concentraciones de oligonucleótido y $MgCl_2$ junto con la temperatura de alineamiento y el contenido de G + C mayor al 60% producen alineamientos falsos si no son controlados. El ADN utilizado debe ser de alta calidad, libre de impurezas y poco degradado para obtener bandas reproducibles. La reproducibilidad del patrón de bandas puede ser pobre dependiendo del termociclador, del número de ciclos de amplificación y de las concentraciones de los reactivos (Taq polimerasa, dNTP's, oligonucleotidos). Además, aunque la comigración de bandas, es mínima ésta no interfiere con la determinación de la diversidad en las poblaciones estudiadas (Smith y Vuong, 1996). Por último, la intensidad de las bandas a menudo no es homogénea por lo que es importante establecer un criterio de lectura.

Además de las consideraciones mencionadas arriba, Linch y Milligan (1994) proponen otras en las que destacan que es esencial tener un mayor tamaño de muestra que cuando se examinan marcadores codominantes y que se debe evitar tomar en cuenta marcadores con una frecuencia mayor a $1-(3/N)$ donde N es el número de individuos muestreados. Sin embargo, recientemente algunos estudios han demostrado que cuando se cuenta con un buen número de bandas el número de individuos puede no ser tan grande (Zhivotovsky, 1999; Krauss, 2000), esta opción es favorable para especies cuya densidad poblacional es escasa incluyendo a las especies endémicas,



que de hecho existen pocos estudios de diversidad genética en estas últimas.

1.5 LOS DESIERTOS

La mayor parte de las plantas endémicas en el mundo se encuentran en los desiertos y en ellos habitan el 14% de las plantas vasculares que hay en México (Moreno y Sánchez, 1990; Rzedowski, 1991). Esto se entiende considerando que la mayor parte del territorio nacional es ocupado por desiertos (60%) prevaleciendo este tipo de especies y dominando el escenario ambiental de nuestro país (Valiente-Banuet *et al.*, 1995).

Los desiertos poseen gran fragilidad al deterioro ocasionado por cambios climáticos globales y la explotación inadecuada (Mostafa *et al.*, 1992). Se conoce poco acerca de los procesos que los llevan al deterioro y las formas en que se pueden revertir y poco menos se conoce sobre el tipo de estrategias que permitan conservar la diversidad que poseen (Valiente-Banuet *et al.*, 1995).

1.6 CACTÁCEAS

En los desiertos, dentro de las especies dominantes de este tipo de ecosistemas se encuentran las cactáceas, originarias del continente americano. En nuestro país se encuentran alrededor del 52% de los géneros y el 57% de las especies y se le considera como el grupo de mayor diversidad (Becerra, 2000). Diferentes factores como los niveles altos de endemismo, gran especificidad del hábitat, poblaciones reducidas, sobrecolecta y destrucción o modificación de su hábitat, determinan que una gran parte de sus especies estén incluidas en la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) como especies raras, vulnerables o en peligro de extinción (Sánchez-Mejorada, 1982; Arias, 1993 y Hunt, 1992). A pesar de esta problemática son muy pocos los estudios ecológicos y todavía más escasos los estudios de genética poblacional de esta familia, que podrían encaminar a estrategias de conservación adecuadas.



Un centro de diversidad de esta familia es el Valle de Tehuacán-Cuicatlán situado en el centro del país (Fig. 1). Este es considerado un centro de megadiversidad y endemismo de plantas y animales en el ámbito mundial (Dávila *et al.*, 1993). Es una zona semiárida cuya importancia biológica ha sido reconocida internacionalmente al ser nominada como Reserva de la Biosfera (Diario Oficial, 1998). Parte de su diversidad son los grupos étnicos existentes como los Mazatecos, Ixcatecos, Chochos, Popolocas y Cuicatecos; todos de origen Mixteco descendientes de los Olmécas (www.tehuacán.com., 2001). Estos grupos étnicos conviven con gran variedad de animales y plantas endémicos de esta región, cuya vegetación se ha definido como matorral xerófilo, con dominancia de cactáceas columnares (Zavala, 1982; Villaseñor *et al.*, 1990; Rzedowski, 1991; Arias *et al.*, 1997; Valiente-Banuet *et al.*, 1995; Valiente-Banuet *et al.*, 2000).

Las cactáceas presentan un crecimiento muy lento, siendo el periodo más crítico de su ciclo de vida el establecimiento de las plántulas, algunas especies se desarrollan estrictamente en microhabitats bajo la sombra de árboles o arbustos en un fenómeno de nodricismo (Valiente-Banuet, 1991a; Godínez-Álvarez, 2000).

La familia cactaceae presenta gran complejidad taxonómica que genera una riqueza importante de especies, siendo México uno de los centros de diversidad para varios grupos taxonómicos, como las tribus Cactaceae, Hylocerae y Pachycerae. Esta última presenta 13 géneros y 58 especies de cactáceas columnares (Arias, 1993; Cornejo y Simpson, 1997). Un ejemplo de esta tribu es el género *Neobuxbaumia* que comprende 9 especies endémicas de México distribuidas en las regiones semiáridas y cálidas secas del nordeste, centro y sur del territorio (Cuadro 1), aunque la mayor riqueza de especies se encuentra al sur del eje volcánico, incluyendo parte de la depresión del Balsas, la costa del Pacífico sur, las serranías meridionales y el Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Bravo-Hollis, 1978).

1.7 EL GÉNERO *NEOBUXBAUMIA*

En el género *Neobuxbaumia*, son muy pocos los estudios moleculares realizados y dominan más los estudios morfológicos y de viabilidad de las semillas (Loza y Terrazas, 1997; Guzmán *et al.*, 1997; Rojas, *et al.*, 1997). Un primer trabajo de diversidad genética en estas cactáceas



utilizando la técnica de RAPD, se realizó con *N. tetetzo* en el laboratorio de Bioquímica Molecular de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO), encontrando que algunas poblaciones presentan flujo génico aunque existe un proceso de incipiente estructuración de la población del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Martínez-García *et al.*, enviado).

Cuadro 1. Especies de *Neobuxbaumia* y su distribución en la República (tomado de Arias *et al.*, 1997).

GÉNERO	ESPECIE	DISTRIBUCIÓN
<i>Neobuxbaumia</i>	<i>mezcalaensis</i> (Bravo) Backeb	Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca y Puebla
<i>Neobuxbaumia</i>	<i>tetetzo</i> (J. Coult.) Backeb	Oaxaca y Puebla
<i>Neobuxbaumia</i>	<i>macrocephala</i> (F. A. C. Weber) Dawson	Puebla
<i>Neobuxbaumia</i>	<i>multiareolata</i> (E. Y. Dawson) Bravo	Guerrero
<i>Neobuxbaumia</i>	<i>polylopha</i> (DC.) Backeb.	Guanajuato, Hidalgo, Querétaro y San Luis Potosí
<i>Neobuxbaumia</i>	<i>sanchez-mejoradae</i> A. Lau	Oaxaca
<i>Neobuxbaumia</i>	<i>scoparia</i> (Poselger) Backeb	Oaxaca y Veracruz
<i>Neobuxbaumia</i>	<i>squamulosa</i> Scheinvar & Sánchez-mej	Colima, Guerrero y Michoacán
<i>Neobuxbaumia</i>	<i>euphorbiodes</i> (Haw.) Buxb.	San Luis Potosí, Tamaulipas, Veracruz y Puebla

De las nueve especies que presenta el género *Neobuxbaumia* en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, cohabitan *N. mezcalaensis*, *N. tetetzo* y *N. macrocephala* presentando diferentes áreas de distribución.

N. macrocephala también es conocida como falso teteche (Bravo-Hollis, 1978) y es la más restringida y estricta endémica de este Valle. Es una planta hermafrodita, polinizada exclusivamente por murciélagos nectarívoros (*Choeronycteris mexicana*, *Leptonycteris curasoae* y *Leptonycteris nivalis*) que distribuyen sus semillas al igual que en el 60% de las cactáceas del Valle (Valiente-Banuet *et al.*, 1997). Sobre esta especie, se han realizado estudios de dinámica poblacional, encontrando que vive más de 200 años, que presenta baja tasa de crecimiento individual, alta mortalidad de plántulas y juveniles que generan dificultad para incrementar su crecimiento poblacional, además de baja densidad poblacional, es decir un número reducido de individuos en un área geográfica limitada, por lo que se ha sugerido colocarla como especie rara e incluirla en la norma oficial mexicana (NOM-ECOL-059) (Valiente-Banuet *et al.*, 1997; Esparza, 1998; Vilchis, 2000).



Las consideraciones descritas arriba hacen necesario que además de estos datos demográficos se integren datos genéticos a la historia biológica de *N. macrocephala* que permitan orientar la forma de conservación de esta especie endémica. Además, dada su longevidad, un estudio comparativo entre el flujo génico que existe entre los adultos y los juveniles, proporcionaría información de cómo es que se está comportando a través del tiempo, por medio de la estimación de la estructura genética poblacional que presenta. Esta información permitirá entender su situación ecológica y genética, logrando un mejor uso de este recurso y encaminando formas de conservación adecuadas.

1.8 HIPÓTESIS

- ◆ Si las condiciones de polinización y distribución de semillas realizadas por quirópteros en *N. tetetzo* son las mismas para *N. macrocephala* entonces, se espera encontrar un índice de variabilidad genética menor o al menos similar al de *N. tetetzo*, aun cuando *N. macrocephala* presenta un área de distribución más restringida y limitada al Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

- ◆ Si los quirópteros han tenido un efecto de homogenización entre las poblaciones de *N. macrocephala* a través del tiempo, entonces no existirán diferencias significativas entre la estructura genética de adultos y juveniles.



1.9 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la estructura genética poblacional de *N. macrocephala*.

OBJETIVOS PARTICULARES

Estimar la diversidad genética intra e inter poblacional de *N. macrocephala* mediante marcadores moleculares RAPD.

Establecer la relación genética entre las poblaciones de *N. macrocephala* estudiadas.

Estimar el índice del flujo génico entre las poblaciones de *N. macrocephala*, mediante el uso de RAPD.

Determinar la estructura genética poblacional de *N. macrocephala*.



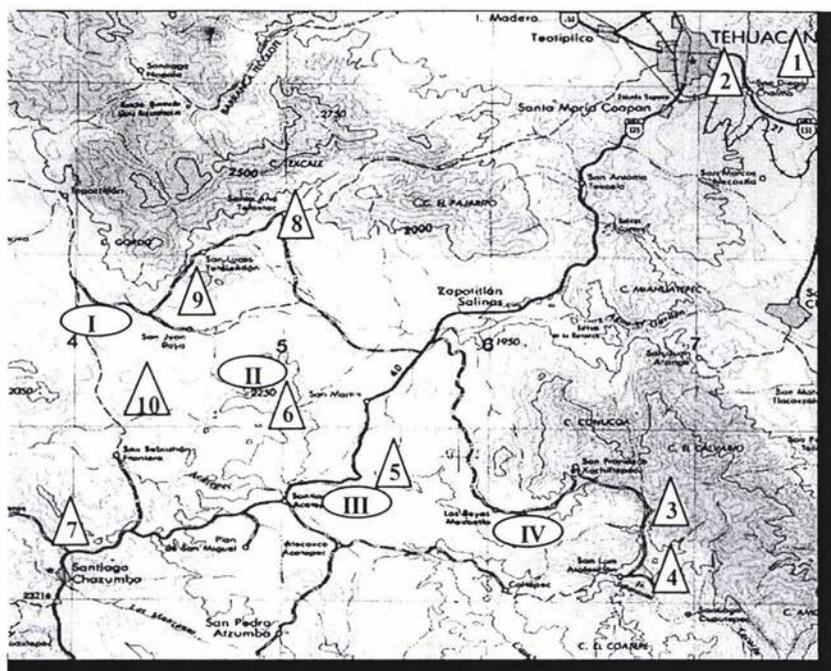
2. METODOLOGÍA

2.1 ÁREA DE ESTUDIO

Se localiza en la Reserva de la Biosfera del Valle de Tehuacán-Cuicatlán entre la parte sureste del estado de Puebla y noroeste del estado de Oaxaca, entre los 17° 39' y 18° 53' de latitud norte y los 96° 55' y 97° 44' de longitud oeste (Villaseñor *et al.*, 1990). Presenta un clima semiárido con una precipitación media anual de 400 mm y una temperatura media anual de 21°C (García, 1973). Se encuentra delimitado al este por la Sierra Madre Oriental, conocida localmente como Sierra Zongolica y por la Sierra de Juárez al sur. Los suelos son someros y pedregosos y pueden corresponder a cambisoles cálcicos, xerosoles cálcicos o litosoles (Zavala, 1982). La flora de este lugar esta compuesta por entre 2,700 y 3,000 especies de plantas vasculares, de las cuales aproximadamente el 30% son endémicas de la región (Dávila *et al.*, 1993; www.tehuacán.com, 2001). En el Valle existen 81 especies de la familia cactaceae, de las cuales 20 son endémicas (www.tehuacán.com, 2001) incluyendo a *N. macrocephala*.

En el mapa de la figura 1 se señalan con un triángulo los sitios reportados por Arias *et al.*, (1997), en los que se han colectado ejemplares de *N. macrocephala*. El número 1 indica una población en Puebla, a 6.7 Km al suroeste de Santa Catalina Oxolotepec (Arias y Guzmán-Cruz 1048 MEXU, herbario nacional de México), el 2 una población en el mpio. de Tehuacán en el Cerro de Tochapa (Bravo, s. n. MEXU), el 3 una población en el Cerro Viejo al sureste de San Francisco Xochiltepec (Sánchez-Mejorada *et al.*, 70-0401 MEXU), el 4 una población por la desviación a San Luis Atolotitlán, 18°14'N, 97°26'O (Valiente *et al.*, s.n. MEXU), el 5 una población entre Zapotitlán Salinas y Santiago Acatepec (Bravo, s.n. MEXU), el 6 una población 5 Km al norte de Santiago Acatepec (Guzmán-Cruz *et al.*, 835 MEXU), el 7 una población entre Tehuacán y Huajuapán de León (Bravo, s.n. MEXU), el 8 una población al norte de Santiago Acatepec 18° 18' N, 97° 35'O (Guzmán-Cruz *et al.*, 893 MEXU), el 9 una población aproximadamente 2 Km antes de San Juan Raya (Gama *et al.*, 27 MEXU) y el 10 una población al Km al oeste de San Juan Raya (Valiente *et al.*, 788 MEXU).





- △ Sitios en que se han reportado individuos de *N. macrocephala*
- Sitios de colecta de *N. macrocephala*: I San Juan Raya, II Cerro "La Yerba", III San Martín, IV Los Reyes Metzontla.

Figura 1. Mapa que muestra los sitios de distribución de *N. macrocephala* en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán.



2.2 *Neobuxbaumia macrocephala* (Weber) Dawson

Especie endémica del Valle de Tehuacán-Cuicatlán que se distribuye en forma de manchones y que es conocida en el Valle como el “cactus del zopilote”. Habita en bosque tropical caducifolio y matorral xerófilo sobre suelos calizos en laderas con distinta orientación geográfica (Bravo-Hollis, 1978 y Godínez *et al.*, 1997). Presenta una densidad de 200 individuos por hectárea en elevaciones de 1600-2300 m (Arias *et al.*, 1997).

Son plantas columnares que ramifican con la edad y llegan a medir de 7 a 15 m de alto, con tronco leñoso muy sólido de 30 a 60 cm de ancho de color verde oscuro, ligeramente arqueadas o erectas que presenta de 17 a 26 costillas obtusas, con espinas rígidas, al principio rojizas o rosadas, tornándose grises o negruzcas con la edad. Puede presentar una longevidad mayor a 160 años (incluso más de 200), el mayor aporte reproductivo se da en un intervalo de 95-99 años y la edad promedio a la que los padres tienen a su descendencia es a los 131.3 años (Vilchis, 2000).

Presentan un cefalio terminal rojo con pelos abundantes amarillos, cerdas blancas o rosas, translúcidas y espinas escasas. A este cefalio deben su nombre y en él se presentan sus flores hermafroditas de color rojo-púrpura, dispuestas en círculo alrededor del ápice (Fig. 2). Las flores miden de 4.2 a 5.2 cm de largo, son cilíndrico-infundibuliformes, acampanuladas y perduran únicamente una noche (Valiente-Banuet *et al.*, 1997). Florecen en un periodo de marzo a julio y fructifican de abril a agosto (Valiente-Banuet *et al.*, 1997).

Su fruto es globoso cubierto de escamas gruesas, sus semillas son oblicuamente reniformes, de menos de 2.5 mm de largo, con testa casi negra (Arias *et al.*, 1997). El establecimiento de esta cactácea endémica del Valle se facilita bajo la cobertura de arbustos, como los de *Lippia graveolens* (Esparza, 1998), *Mimosa luisana* y bajo la cobertura de especies del género *Agave* y otros (Valiente-Banuet, 1991a; Valiente-Banuet y Ezcurra 1991b).





Figura 2. Individuo de *Neobuxbaumia macrocephala* sin ramificar, se puede apreciar su cefalio rojo y alrededor del ápice sus inflorescencias. En el recuadro se observa un individuo ramificado.



2.3 TRABAJO DE CAMPO:

Se seleccionaron los sitios de colecta basándose en la distribución de las poblaciones y realizándose muestreos en 4 zonas localizadas en San Juan Raya (SJR), el Cerro “La Yerba” (CY), San Martín (SM) y Los Reyes Metzontla (MZ) (Fig. 1 y Cuadro 2).

En las zonas de colecta, se trazaron 12 cuadrantes de 50 m² en donde se seleccionaron al azar de 6 a 15 individuos por cuadrante de acuerdo a la densidad de las poblaciones. La distancia entre cuadrantes fue de 800 m.

Se tomaron datos morfométricos como altura total con un clinómetro y perímetro con una cinta métrica, para distinguir entre adultos y juveniles, de acuerdo a datos reportados por Vilchis (2000) que mencionan que la edad reproductiva de *N. macrocephala* comienza después de los 95 años de edad, momento en el que miden aproximadamente tres metros de altura aunque, de acuerdo a Valiente-Banuet (*et al.*, 1997) aún no producen semillas viables. Fueron considerados individuos adultos los que median más de 4 metros y que presentaban ramificaciones, por debajo de esta altura se consideraron juveniles. El total de individuos colectados fue de 90 (Cuadro 2). Los individuos juveniles se diferencian de los adultos por una J mayúscula, el cuadrante es señalado en No. arábigo, seguido del No. del individuo.

Se utilizaron 6 individuos de *N. mezcalaensis* como individuos externos. Estos individuos fueron colectados en San Juan Raya, el número romano indica el cuadrante y el arábigo el No. de individuo.

De cada organismo, se colectaron aproximadamente 15 cm de costilla a una altura de 1.50 m de la base. Estas muestras fueron almacenadas y transportadas en frío al laboratorio.

2.4 TRABAJO DE LABORATORIO

De cada muestra, se tomó una fracción de tejido parenquimático (10-15 g) el cual se cortó en fracciones delgadas congelándose con nitrógeno líquido y almacenándose a -70°C hasta su procesamiento.



2.4.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN genómico se utilizó el método de Dellaporta *et al.*, (1983) con las siguientes modificaciones. El tejido congelado de cada muestra, se pulverizó utilizando nitrógeno líquido en un mortero frío. Posteriormente se colocó 1 gr de tejido pulverizado en un tubo eppendorf de 1.5 ml conteniendo 500 µl de buffer de lisis compuesto de Tris 100mM, EDTA 50mM, NaCl 500mM y Mercaptoetanol 10mM, se le agregó 34 µl de SDS al 20%, se homogenizó la mezcla y se colocó 10 min en baño de inmersión a 65°C. Posteriormente se le agregó 167 µl de acetato de potasio 5 M, se homogenizó y se mantuvo a -20°C durante 20 min. Pasado este tiempo, se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 15 min, el sobrenadante se desechó y la pastilla seca se resuspendió en 600 µl de agua desionizada estéril. A continuación se le agregó 500 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se homogenizó por inversión, dejándose reposar de 2 a 3 min, se volvió a agitar y se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 20 min y posteriormente se recuperó la fase acuosa, sin traer la fase fenólica. A la fase acuosa se le agregó 50 µl de Acetato de Sodio 3 M, nuevamente se agitó y se le añadió 1 ml de etanol absoluto frío colocándose durante 60 min a -20°C. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 14000 r.p.m. durante 30 min. El sobrenadante se desechó y la pastilla se lavó con etanol frío al 70%. El ADN así purificado se almacenó en agua desionizada estéril a 4°C.

Para verificar la integridad del ADN genómico a partir de las extracciones, se usó una alícuota de 5 µl, que se corrió en gel de agarosa 0.8% en una cámara de electroforesis a 100 mV, en buffer de TBE 0.5X, por aproximadamente 40 min. El gel contenía 2 µl de bromuro de etidio [10 mg/ml]. Los geles fueron visualizados en un digitalizador de imágenes Multimage™ Light Cabinet con luz UV, con el programa AlphaImager 2000.

La cuantificación de ADN se realizó en un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer lambda 2S, a una absorbancia de 260 nm. también se cuantificó la cantidad de proteínas a 280 nm y la cantidad de contaminantes como fenoles a 320 nm. Para obtener la concentración de ADN se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\mu M}{\mu l} = (A_{260} - A_{320}) \times 50$$



Donde A_{260} y A_{320} representan las lecturas a estas absorbancias y 50 es el coeficiente de extinción Molar del ADN.

2.4.2 Amplificación

La reacción de amplificación se realizó en un termociclador GeneAMP PCR System 9700 programado con un ciclo inicial a 94°C para la desnaturalización de ADN durante 2 min seguido de 40 ciclos de 1 min a 94°C para desnaturalizar, 1 min a 37°C para la alineación de los oligonucleotidos y 1 min a 72°C para la polimerización. Por último se da un ciclo final de 15 min a 72°C de polimerización complementaria. En cada reacción se emplearon de 300 a 600 ng de ADN genómico, H₂O desionizada, buffer para PCR, MgCl₂ (50 mM), Taq polimerasa (5 U/μl) y mezcla de dNTP's (200 μM de cada uno) todos de GibcoBRL. Los oligonucleótidos utilizados fueron OPB10 (5' CTGCTGGGAC 3'), OPC07 (5' GTCCCGACGA 3'), OPC08 (5' TGGACCGGTG 3') OPJ05 (5' CTCCATGGGG 3'), OPJ13 (5' CCACACTACC 3') y OPE14 (5' TGCGGCTGAG 3') de las series OPERONTM y se agregaron por separado a la reacción en una concentración de 5 picomoles/μl.

Los productos de la amplificación (marcadores moleculares) se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.2% en las mismas condiciones descritas arriba. Se utilizó un marcador de peso molecular de una kilo base (1Kb) para estimar el tamaño de los fragmentos. Las imágenes fueron almacenadas con el programa AlphaImager 2000 para su posterior análisis.

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las bandas fueron codificadas como datos binarios y se construyeron matrices de presencia/ausencia, en donde la presencia de la banda en los individuos es (1) y la ausencia (0) (Crisci y López, 1983).

2.5.1 Distancia Genética

A partir de la matriz de presencia/ausencia se estimó la similitud genética mediante el índice de Jaccard, uno de los más recomendados cuando se trabajan con este tipo de datos (Vierling y Nguyen, 1992). Las relaciones entre individuos fueron establecidas por el método de



ligamiento promedio aritmético no ponderado (UPGMA) y visualizadas a través de un dendrograma.

El número de grupos significativos en el dendrograma se determina con la prueba del mejor corte sobre 1000 permutaciones (Strauss, 1982). La prueba determina la significancia estadística o robustez de los grupos que se forman en el dendrograma.

Para corroborar que el dendrograma es una buena representación de las relaciones genéticas observadas entre las poblaciones o individuos se calculo el coeficiente de correlación cofenética. Para ello, a partir de la matriz que da origen al dendrograma se construyó una matriz cofenética, la cual es comparada con la matriz de similitud de Jaccard por medio de la prueba no paramétrica de Mantel (Mantel, 1967). La prueba de Mantel se basa en el supuesto de que dos matrices de diferencias o distancias no están correlacionadas y se busca comprobar que la relación entre estas no se debe al azar. Para esto se realiza una permutación al azar de posiciones de ambas matrices, repitiendo el proceso de comparar la matriz 1 con la matriz 2 de 1000 a 10 000 veces obteniendo el estadístico Z y un coeficiente de correlación. Una correlación alta indica escasa distorsión y viceversa, finalmente se obtiene una gráfica de dispersión de los datos.

2.5.2 Relaciones Espaciales

Un análisis complementario que permite resumir las relaciones entre los individuos es el de coordenadas principales (PCO), que representa en forma gráfica las relaciones entre los organismos en un espacio multidimensional. El PCO junto con el análisis de tendido mínimo (MST) sobrepuesto, definen las conexiones entre poblaciones cercanas genéticamente. Ambos métodos fueron utilizados en el análisis de datos de *N. macrocephala*. Todos los análisis anteriormente mencionados se realizaron con el programa Ntsys Versión 2.0.

2.5.3 Estructura Genética

Una forma de estimar la diversidad genética sin la suposición de Hardy-Weinberg es considerar la diversidad fenotípica de las bandas de cada individuo como un genotipo distinto y estimar las similitudes y diferencias con base en las mismas (Huff y Smouse, 1993; Whitkus *et al.*, 1998). Bajo este supuesto a partir de la matriz de datos de presencia ausencia se estimó la



estructura genética de *N. macrocephala* mediante un AMOVA, de acuerdo al modelo propuesto por Crow y Aoki (1984) donde el equivalente multialélico de Φ_{ST} es análogo a la F_{ST} de Wright, un equivalente al índice de diversidad, que es definida por la fórmula

$$\Phi_{ST} = \frac{1}{(4N_e m a + 1)}$$

Donde $a = [n/(n-1)^2]$ y n es el número de poblaciones. Una Φ_{ST} igual a 1 indica la igualdad genética entre poblaciones.

De esta fórmula puede estimarse el número efectivo de impacto en la población por generación ($N_e m$) a través de la fórmula:

$$N_e m = \left[\left(\frac{1}{4a} \right) \right] \left[\left(\frac{1}{\Phi_{ST}} \right) - 1 \right]$$

Donde N_e es el número efectivo de la población y m el número de inmigrantes por generación. Este valor es inversamente proporcional a la de Φ_{ST} y si $N_e m$ es mayor a 1 existe flujo génico en la especie.

Estos análisis se realizaron en individuos adultos y juveniles tanto de forma separada como integrada.

Para ver la significancia de la Φ_{ST} se aplicó el estadístico de Bartlett, que es una prueba no paramétrica de varianza molecular que indica la homogeneidad de la varianza entre los pares de poblaciones comparadas y cuyo resultado permite probar si la estimación de la diversidad genética para *N. macrocephala* es estadísticamente significativa o resultado del azar.

2.5.4 Diversidad Genética

La diversidad genética para cada población también se estimó con el índice de Shannon para cada locus RAPD, a partir de la relación

$$H_o = - \sum_{i=1}^n P_i \log_2 P_i$$



Donde P_i es la frecuencia del i -ésimo locus generada por todos los marcadores RAPD en la población. El promedio de la diversidad para todas las poblaciones fue calculado para cada locus como:

$$H'_{pop} = \frac{1}{n} \sum H'_j$$

La diversidad de la especie fue calculada para cada locus como:

$$H'_{sp} = -\sum p_s \log_2 p_s$$

Donde p_s es la frecuencia del marcador RAPD en la muestra total.

De esta forma, para cada locus los componentes de diversidad dentro de las poblaciones es:

$$H'_{pop} / H'_{sp}$$

y la diversidad entre poblaciones es

$$\frac{(H'_{sp} - H'_{pop})}{H'_{sp}}$$

Que es equivalente a la G_{ST} ; un índice de diversidad que provee una estimación relativa del grado de variación entre cada localidad (Hartl, *et al.*, 1994; Bussell, 1999). Una G_{ST} igual a 1 equivale a la igualdad genética entre poblaciones. Este análisis se realizó para todos los individuos y agrupando adultos y juveniles.

2.5.5 Distancia Genética vs. Distancia Geográfica

La teoría de Nei (1972), indica que en una distribución geográfica las poblaciones más cercanas geográfica o espacialmente son las más cercanas genéticamente. A este principio se le conoce como aislamiento por distancia, ya que infiere que los individuos tienden a aparearse con aquellos más cercanos geográficamente. Para comprobar este principio se realiza una correlación entre la matriz de Φ_{ST} pareadas obtenidas con el AMOVA (que indican las distancias genéticas) y una matriz de las distancias geográficas. La comparación de las matrices se realiza con la prueba de Mantel y con 1,000 permutaciones.



3. RESULTADOS

3.1 TRABAJO DE CAMPO

Se colectaron 31 individuos juveniles de menos de 4 m siendo el individuo más pequeño de 0.88 m y 59 individuos adultos de 4 m o más, siendo el más alto de 12.83 m.

Cuadro 2. Regiones, cuadrantes y número de individuos analizados de *N. macrocephala*

Zona	Localización	No. De cuadrante	Juveniles analizados	Adultos analizados	Total individuos
San Martín (SM)	18° 15' 39" N 97° 32' 41" W	1	1	7	8
	18° 15' 19" N 97° 32' 41" W	2	4	3	7
	18° 14' 56" N 97° 32' 55" W	3	6	4	10
	18° 14' 55" N 97° 33' 21" W	4	5	5	10
San Juan Raya (SJR)	18° 19' 29" N 97° 39' 10" W	1	1	3	4
	18° 19' 18" N 97° 38' 46" W	2	1	4	5
	18° 19' 08" N 97° 38' 21" W	3	4	1	5
	18° 19' 03" N 97° 37' 55" W	4	0	5	5
	18° 19' 45" N 97° 35' 09" W	5	1	4	5
	18° 19' 48" N 97° 35' 10" W	6	0	4	4
Los Reyes Metzontla (MZ)	18° 15' 08" N 97° 29' 40" W	1	3	12	15
Cerro "La Yerba" (CY)	18° 16' 42" N 97° 33' 52" W	1	1	5	6
Total 4		12	27	57	84



3.2 TRABAJO DE LABORATORIO

3.2.1 Extracción de ADN

Se extrajo el ADN de los 90 individuos, dificultándose la extracción en los que presentaron mucilago y formaban una solución viscosa; en algunos casos difícil de manejar. Esta característica se observó sobre todo en individuos juveniles y en algunos adultos. Para evitar esta situación se disminuyó la cantidad de tejido a utilizar disminuyendo en forma proporcional la cantidad de ADN extraído. La cantidad de ADN extraído fue de 300 a 4900 ng de ADN/ μ l.

3.2.2 Amplificación

Se probaron 24 oligonucleotidos en 4 individuos, de los cuales se seleccionaron 6 basándose en el grado de polimorfismo presentado y en función de la reproducibilidad cualitativa del patrón de bandas entre los individuos. Los 6 oligonucleotidos seleccionados se probaron en los 90 individuos de *N. macrocephala* y en los 6 individuos externos de *N. mezcalaensis*. Solo se analizaron 27 juveniles y 57 adultos de *N. macrocephala* por problemas en la amplificación, obteniendo un total de 84 individuos (Cuadro 2) y seis de *N. mezcalaensis*. Se obtuvieron un total de 134 marcadores o bandas polimórficas, de las cuales 4 son exclusivas de *N. mezcalaensis* (Cuadro 3). Para el oligonucleotido OPB 10 se obtuvieron 22 marcadores que varían de 2926 a 219 pb, para OPC 07 se amplificaron 20 marcadores de 2382 a 393 pb, con OPC 08 se obtuvieron 28 marcadores de 2008 a 186 pb, siendo el primer con el mayor número de bandas, con OPJ 05 se amplificaron 20 marcadores que van de 2393 a 265 pb, para OPJ 13 el número de marcadores fue de 21 variando de 1817 a 264 pb y finalmente para OPE 14 se visualizaron 23 marcadores con un peso molecular de 2264 a 360 pb.



Cuadro 3. Secuencia de los decanucleotidos utilizados, numero y peso molecular de cada producto amplificado.

OLIGONUCLEOTIDOS	SECUENCIA	No. DE MARCADORES	RANGO DE PESO MOLECULAR (pb)
OPB 10	(5' CTGCTGGGAC 3')	22	2926, 2245, 1858, 1659, 1481, 1426, 1322, 1226, 1115, 1074, 977, 958, 905, 839, 778, 735, 695, 632, 564, 523, 458, 219.
OPC 07	(5' GTCCCGACGA 3')	20	2382, 2290, 2160, 1883, 1674, 1579, 1404, 1376, 1273, 1248, 1087, 1046, 967, 894, 666, 654, 581, 527, 487, 459.
OPC 08	(5' TGGACCGGTG 3')	28	2008, 1692, 1481, 1372, 1321, 1224, 1092, 1012, 938, 903, 853, 806, 761, 732, 679, 641, 606, 561, 520, 482, 455, 414, 391, 355, 323, 283, 238, 186.
OPJ 05	(5' CTCCATGGGG 3')	20	2393, 2252, 1995, 1732, 1387, 1278, 1180, 1089, 1025, 965, 908, 837, 698, 671, 594, 516, 476, 448, 373, 265.
OPJ 13	(5' CCACACTACC 3')	21	1817, 1656, 1482, 1376, 1255, 1165, 1123, 1023, 950, 835, 790, 747, 707, 644, 598, 566, 516, 462, 421, 377, 265.
OPE 14	(5' TGC GGCTGAG 3')	23	2264, 1760, 1598, 1537, 1423, 1218, 1128, 1024, 985, 911, 843, 781, 722, 708, 669, 619, 584, 540, 500, 454, 420, 389, 360.
Total bandas analizadas		134	

En la Fig.3 se muestra un ejemplo del producto de amplificación con el primer OPB 10, dando un patrón de bandeo que diferencia a los individuos analizados de *N. macrocephala* y *N. mezcalaensis*. En el patrón de bandeo obtenido con este primer se diferencian claramente las especies en estudio.



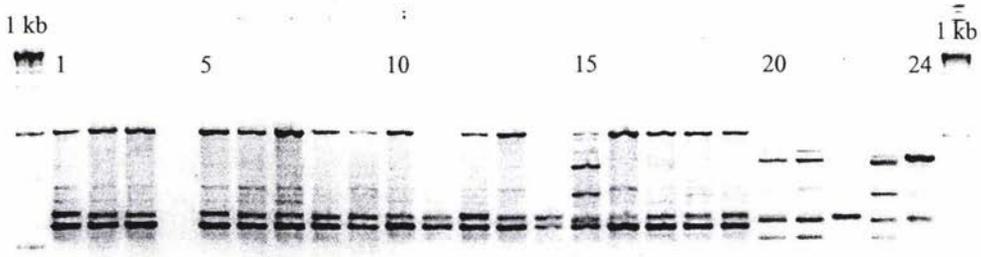


Figura 3. Polimorfismos obtenidos con el oligonucleotido **OP B10** para dos especies del género *Neobuxbaumia*. Los números indican los carriles, 1Kb es un marcador de peso molecular de una Kilobase. Carriles 1-19 son individuos de *Neobuxbaumia macrocephala* carriles 20-24 individuos de *N. mezcalaensis*. En el carril 4 no hubo amplificación.

3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

3.3.1 Distancia Genética

La matriz binaria en la que se codificaron las bandas fue realizada con 90 OTUs (Unidades Taxonómicas Operativas), por 134 marcadores. La similitud genética entre los individuos, obtenida por el índice de Jaccard se incluye en el anexo 1. En el dendrograma (Fig. 4) se visualiza la similitud genética entre los individuos y en forma general no se observa agrupación por sitio de colecta, si no que se da una interacción entre los individuos de las diferentes localidades, tampoco se da un agrupamiento entre individuos juveniles o adultos.

Se presentan 6 agrupaciones para *N. macrocephala* y 1 que agrupa a los individuos de *N. mezcalaensis*. Las agrupaciones son señaladas en el dendrograma con números romanos Un individuo de cada una de las zonas no se agrupo (SM3.7-J, Mz7, CY4 y SJR 2.3), pero se unen a los individuos de *N. macrocephala* a una distancia de 0.33, 0.27, 0.24 y 0.21 respectivamente siendo los últimos tres, los individuos más variables con este análisis.

El **primer** grupo esta conformado por 4 individuos de San Juan Raya, 4 de los 6 individuos analizados de Cerro "La Yerba", 5 de San Martín y 5 de los Reyes Metzontla, uniéndose a una distancia de 0.38. El **segundo** grupo integra 7 individuos de San Juan Raya, 8 de San Martín y 7 de Metzontla, uniéndose a una distancia de 0.40 aproximadamente. Estos dos grupos se unen en



una distancia de 0.35. El **tercer** grupo se forma por 1 individuo de Cerro “La Yerba”, 6 de San Juan Raya y 15 individuos de San Martín que se unen en una distancia de 0.40. El **cuarto** grupo se integra por 1 individuo de Metzontla y 3 de San Juan Raya, uniéndose a una distancia de 0.40 e integrándose al tercer grupo en una distancia de 0.34 y a 0.33 se unen a los grupos 1 y 2. El **quinto** grupo se forma por 1 individuo de Metzontla, 4 de San Martín y 2 de San Juan Raya unidos en una distancia de 0.30 e integrándose a los grupos 1, 2, 3, 4 en una distancia de 0.29. El **sexto** grupo se integra por 4 individuos de San Juan Raya y 2 de San Martín unidos en una distancia de 0.34 y a 0.28 se integra a los otros grupos. Y finalmente el **séptimo** grupo se integra por los seis individuos de *N. mezcalaensis* que forman el grupo externo uniéndose entre sí a una distancia de 0.36 e integrándose al grupo de *N. macrocephala* en una distancia de 0.19.

El valor obtenido con la prueba del mejor corte fue de $t = 0.33$. Este valor se visualiza en el dendrograma como una línea roja y prácticamente todas las agrupaciones son significativas. La robustez del árbol fue estimada con la prueba de Mantel y esta dada por el coeficiente $r = 0.78338$ que indica escasa distorsión, con una probabilidad de $p = 1.00$.



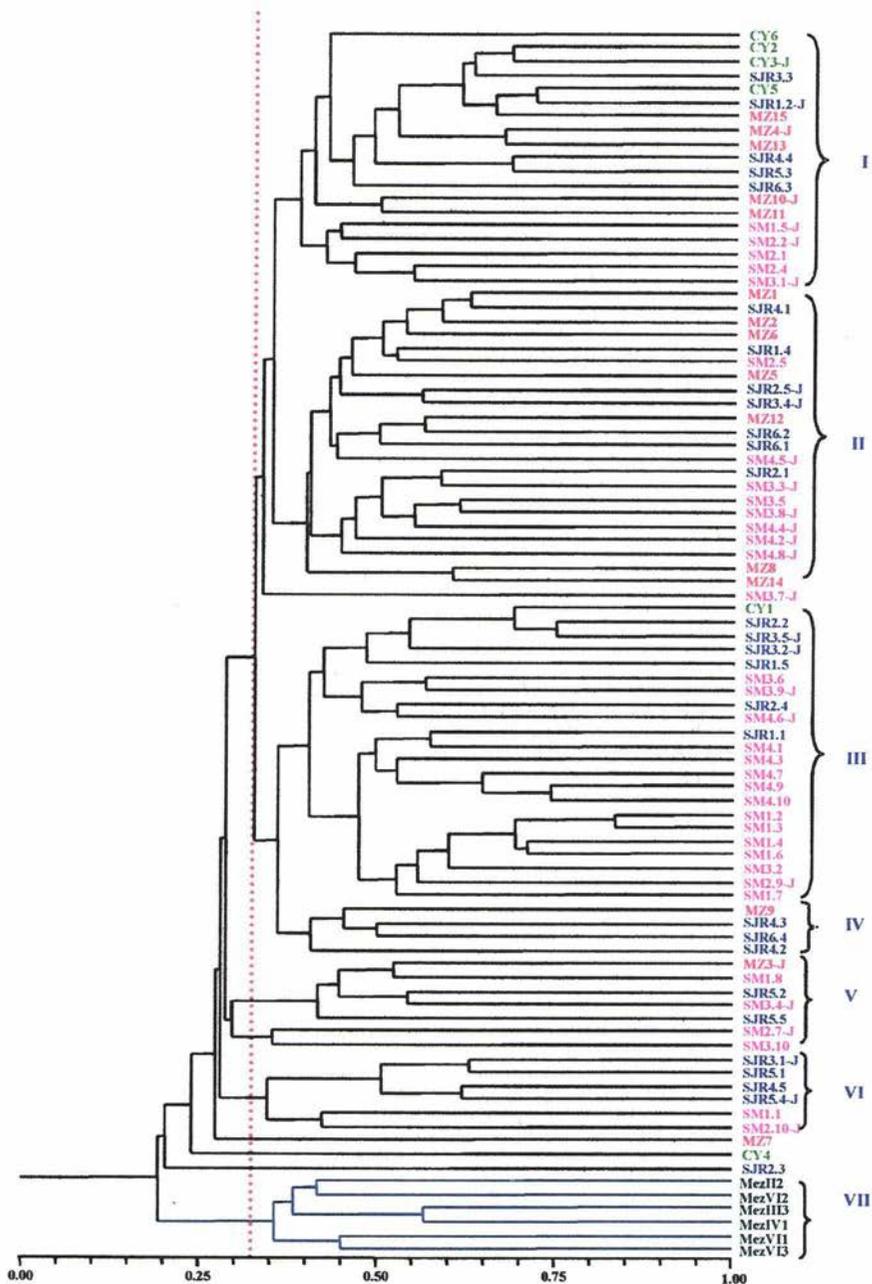


Figura 5. Dendrograma de *N. macrocephala*. Cerro "La Yerba" (CY verde), Los Reyes Metzontla (MZ vino), San Martín (SM morado), San Juan Raya (SJR azul). Valor de la prueba de mejor corte de $t = 0.33$, visualizado con una línea roja. Coeficiente de correlación de $r = 0.7833$ y la probabilidad de $p = 1.00$.



3.3.2 Relaciones Espaciales

En el Cuadro 4 se presentan el porcentaje acumulado de cada componente utilizado para realizar el PCO. Se observa que con los primeros tres componentes se alcanza un porcentaje acumulado de 17.59 y que se alcanza el 80% con 45 componentes.

IZT.

Cuadro 4. Porcentaje de componentes principales empleados en el análisis de ordenación, para todos los individuos.

COMPONENTES	VALOR DEL COMPONENTE	PORCENTAJE DE VARIANZA	PORCENTAJE ACUMULADO
1	4.35995812	7.1712	7.1712
2	3.42607255	5.6351	12.8063
3	2.93524236	4.8278	17.6341
4	2.42840865	3.9942	21.6283
5	2.10066870	3.4551	25.0835
6	1.97733983	3.2523	28.3357
7	1.83771308	3.0226	31.3584
8	1.66913816	2.7454	34.1037
9	1.43362200	2.3580	36.4617
10	1.30859990	2.1524	38.6141
"	"	"	"
"	"	"	"
40	0.48443412	0.7968	76.4450
41	0.47610933	0.7831	77.2281
42	0.47166069	0.7758	78.0039
43	0.46191288	0.7597	78.7636
44	0.45258591	0.7444	79.5081
45	0.43280704	0.7119	80.2199



En el análisis de PCO para *N. macrocephala*, se observó una tendencia similar al dendrograma de la Fig. 4, ya que no existe un agrupamiento entre individuos de un sitio de colecta, si no una integración de todos los sitios (datos no mostrados).

En la Fig. 5 se observa el análisis de ordenación con red de tendido mínimo (MST) sobrepuesto en los 27 individuos juveniles analizados de *N. macrocephala*. En este análisis se ve que a excepción de algunos individuos de San Martín, no existe agrupación entre sitios de colecta. La agrupación de los individuos de San Martín puede deberse a que en este sitio se



colecto un mayor número de individuos. Sin embargo en forma general la agrupación tiende a ser homogénea entre todos los sitios. En el PCO con MST sobrepuesto para los 57 adultos analizados, tampoco se aprecia ninguna agrupación (Fig. 6). Pero se ve en el extremo izquierdo individuos de San Juan Raya, Cerro “La Yerba” y los Reyes Metzontla, siendo un individuo de San Juan Raya un eje principal en la unión con estos individuos, que también se une a individuos de San Martín. (A partir de estas gráficas ya no se incluyen a los individuos de *N. mezcalaensis*).



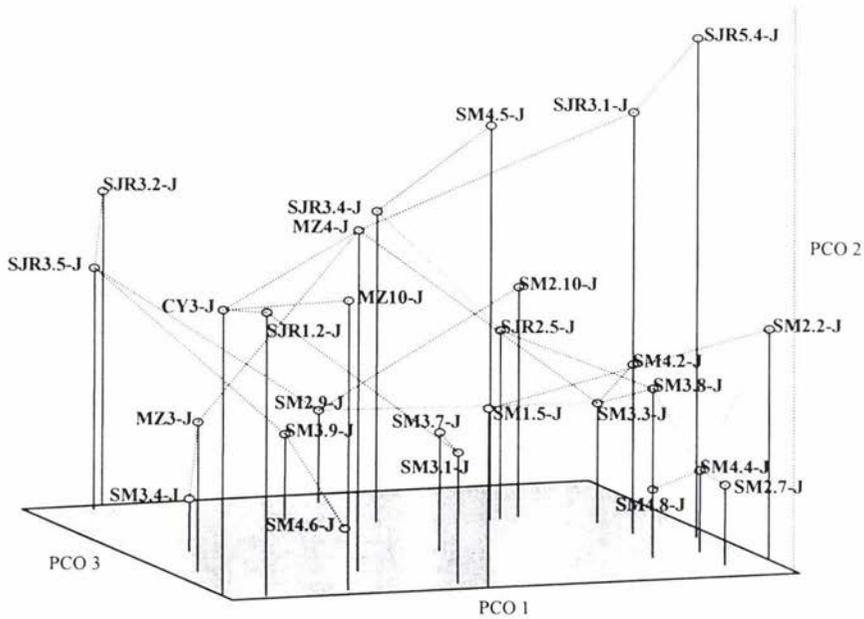


Figura 5. PCO con MST sobrepuesto en los individuos juveniles. No existe agrupamiento de acuerdo a los sitios de colecta.

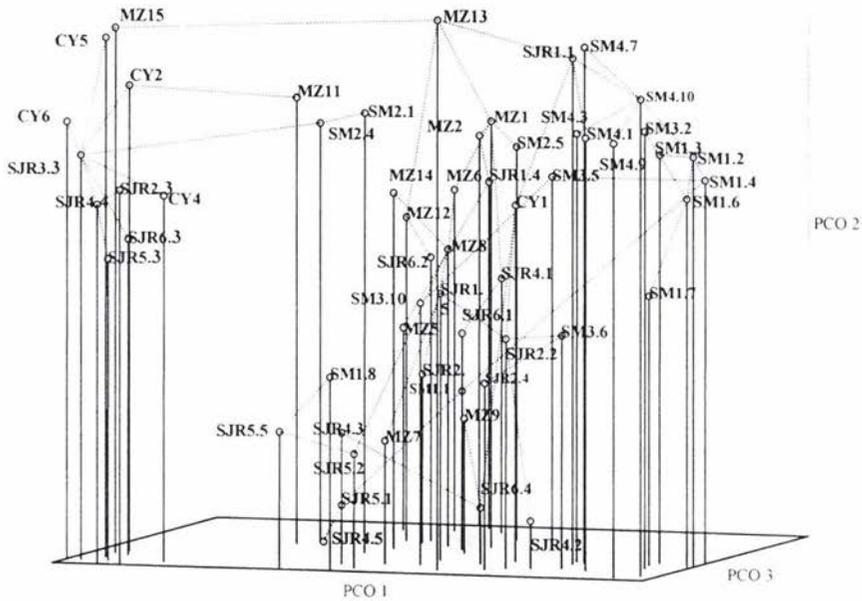


Figura 6. PCO con MST sobrepuesto en los individuos adultos. No existe agrupamiento de acuerdo a los sitios de colecta.



3.3.3 Estructura Genética

El AMOVA realizado con todos los individuos de *N. macrocephala* y contemplando las cuatro poblaciones, indica que 89.38% de la variación total se encuentra dentro de las poblaciones (o entre los individuos) y solo el 10.62% de la variación esta dada entre las poblaciones (Cuadro 5). Estos resultados indican que no existe una estructuración entre las poblaciones de *N. macrocephala*, pues no existe diferenciación entre los sitios en los que se hizo el muestreo.

Cuadro 5. Resultados del análisis molecular de varianza (AMOVA) para 84 individuos de *N. macrocephala* de los cuales 27 son individuos juveniles y 57 adultos, agrupados dentro de las cuatro poblaciones estudiadas.

Origen de variación	g. l.	V. C.	%total de V.	Φ_{ST}	P
Población total (n =4)					
Entre poblaciones	3	1.9	10.62	0.106	< 0.001
Dentro de las poblaciones	80	15.7	89.38		
$N_e m = 1.19$					
Adultos (n =4)					
Entre poblaciones	3	2.24	12.68	0.127	< 0.001
Dentro de las poblaciones	53	15.43	87.32		
$N_e m = 0.97$					
Juveniles (n =4)					
Entre poblaciones	3	1.24	7.25	0.073	< 0.001
Dentro de las poblaciones	23	15.96	92.75		
$N_e m = 1.79$					

g.l. grados de libertad, V.C. varianza total de los componentes, %total de V porcentaje total de varianza, Φ_{ST} , P probabilidad de que sean productos al azar después de 1000 permutaciones, n el número de poblaciones y $N_e m$ el flujo génico estimado entre poblaciones.

Para estimar la variabilidad genética se utilizó el índice de Shannon obteniendo la variabilidad genética por sitios y por oligonucleotidos (Cuadro 6), con este análisis se obtiene que muy poca variabilidad esta contenida entre las poblaciones ($G'_{ST} = 0.226$), estos resultados siguen la misma tendencia que en el AMOVA. Con este análisis la zona más variable fue San Martin (7.18), seguida de San Juan Raya (6.74), los Reyes Metzontla (5.59) y Cerro "La Yerba" (3.754).



Cuadro 6. Valores de diversidad genética, obtenidos con el índice de Shannon, para cada uno de los iniciadores usados y las poblaciones estudiadas de *N. macrocephala*

	CY	MZ	SJR	SM	Hpop	Hsp	Hpop/Hsp	G _{ST}
OPB 10	3.486	6.681	6.701	7.321	6.047	7.424	0.815	0.185
OPC 08	2.686	10.299	9.932	9.685	8.150	10.607	0.768	0.232
OPJ 13	4.315	3.941	4.549	6.358	4.791	5.736	0.835	0.165
OPE 14	5.207	4.034	6.052	7.412	5.676	7.181	0.790	0.210
OPC 07	3.486	4.531	7.383	6.483	5.471	7.845	0.697	0.303
OPJ 05	3.344	4.092	5.825	5.824	4.771	6.327	0.754	0.246
Promedio	3.754	5.596	6.741	7.180	5.818	7.520	0.774	0.226

A partir del AMOVA, la Φ_{ST} fue de 0.106, este resultado y el obtenido con el índice de Shannon caen dentro de los valores observados en especies de fecundación cruzada las cuales presentan un mayor diversidad dentro de sus poblaciones y poca diferenciación genética entre poblaciones (Hamrick y Godt, 1996; citado por Bussell, 1999).

Para observar las relaciones entre las poblaciones se graficaron las Φ_{ST} pareadas de las 4 poblaciones obtenidas con el AMOVA (Cuadro 7) utilizando PCO de dos dimensiones con MST sobrepuesto (Fig. 7). En esta gráfica se aprecia un centro de unión en San Juan Raya. El promedio de la Φ_{ST} entre SJR y MZ es de 0.077. SJR y SM, 0.091 y entre SJR y CY 0.106. El hecho de que San Juan Raya sea el centro de unión habla de que esta población contiene mucha más información genética que comparte con las poblaciones aun cuando San Martin es el que presenta mayor variabilidad según el análisis de Shannon.

Cuadro 7. Matriz de Φ_{ST} pareadas entre las poblaciones muestreadas de *N. macrocephala* a partir del AMOVA.

	CY	MZ	SJR	SM
CY	0			
MZ	0.122	0		
SJR	0.106	0.077	0	
SM	0.199	0.138	0.091	0



Para observar las relaciones entre los cuadrantes de cada zona se realizó un dendrograma a partir de una matriz de disimilitud (Fig. 8) con las Φ_{ST} pareadas de estos, observándose una agrupación entre los cuadrantes de San Martín, siendo mayor el parecido entre los sitios del centro que entre los extremos, este es el grupo menos parecido y se une a los demás cuadrantes a una distancia de 0.13.

En el segundo grupo formado por los cuadrantes de San Juan Raya, la zona de Los Reyes Metzontla tiene mayor afinidad con el primer cuadrante, esta relación también se observa en la Fig. 7, a la unión de estos dos sitios se integran todos los cuadrantes restantes de San Juan Raya que en términos de distancia genética presentan mayor parecido que los cuadrantes de San Martín, pues la mayor distancia es de más de 0.05, y la menor de 0.01 en donde se unen el cuadrante 2 y 4 que son los más cercanos en el dendrograma. En esta zona no se presenta un acomodo de los cuadrantes en base a la distancia geográfica como en el caso de San Martín.

Como en el caso de la Fig. 7 la zona Cerro “La Yerba” es la más separada o menos parecida de todas las zonas, la distancia es de 0.20 y se une a los otros dos grupos formados a aproximadamente 0.15.

Los valores a los que se unen los sitios y cuadrantes muestreados son muy pequeños encontrando una diferencia no mayor al 20% sin dejar de existir un gran parecido entre las zonas.

Al graficar las Φ_{ST} pareadas en un PCO con MST sobrepuesto (Fig. 9) se observa una unión cercana y progresiva entre los cuadrantes de San Martín, siendo esto semejante a lo observado en el dendrograma. Cabe destacar que la unión con los cuadrantes de San Juan Raya (específicamente el segundo), se da a través del tercer cuadrante de San Martín, hecho que no es posible observar con el dendrograma.

Los cuadrantes de San Juan Raya presentan mayor interacción al unirse entre ellos, lo que indica que la información genética está más distribuida en esta zona compartiéndose entre los cuadrantes, esto no se observa en San Martín.



Los Reyes Metzontla y Cerro “La Yerba” se unen a los cuadrantes de San Juan Raya a través del primer cuadrante.

El sitio de Los Reyes Metzontla es el más afectado por el segundo componente, seguido del primer cuadrante de San Martín y Cerro “La Yerba”.

Con estas relaciones podemos observar que aunque no se este dando una fragmentación entre los sitios por lo menos existen diferencias en cuanto a información genética en las zonas que es suficiente para distinguir dos grupos el de San Martín y el de San Juan Raya, siendo este último el que posee mayor interacción o movimiento de la información que favorece la integración de Cerro “La Yerba” y Los Reyes Metzontla.

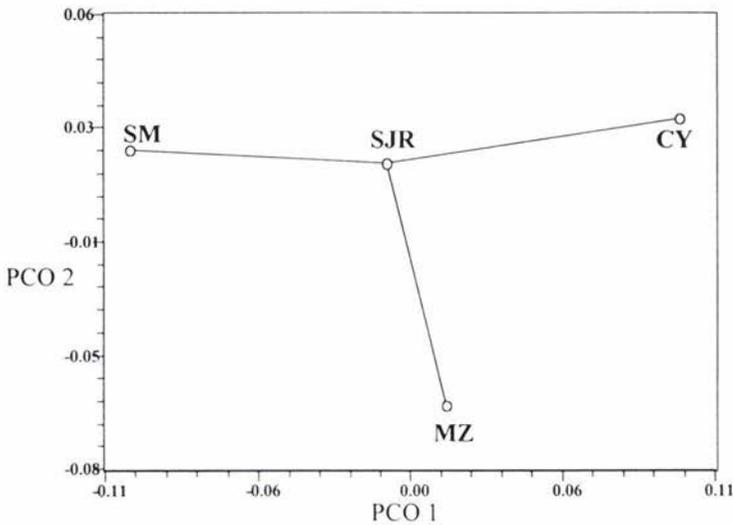


Figura 7. PCO en dos dimensiones con MST sobrepuesto para las cuatro poblaciones de *N. macrocephala* analizadas con AMOVA a partir de las ϕ_{CT} pareadas entre poblaciones. Se observa la integración de todas las zonas con San Juan Raya (SJR).



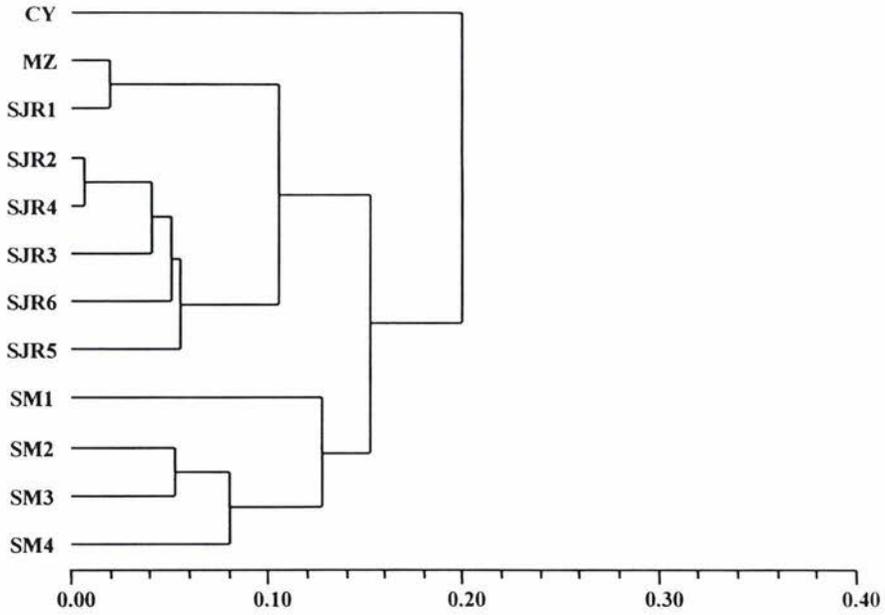


Figura 8. Dendrograma de todas las poblaciones obtenido a partir de las Φ_{ST} pareadas entre los sitios de colecta. El coeficiente de correlación fue de $r = 0.72517$ y $p = 1.00$.

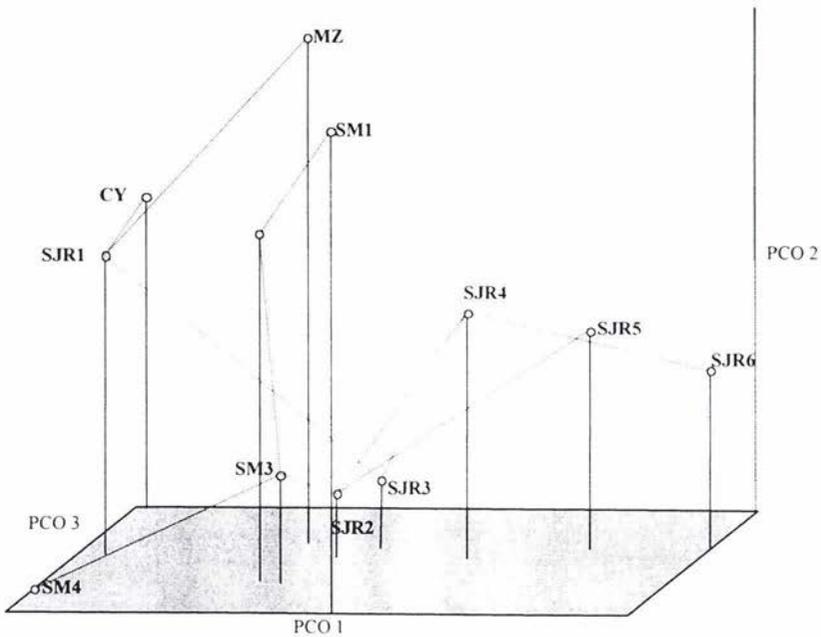


Figura 9. PCO con MST sobrepuesto en los sitios de colecta que contiene a todos los individuos.



Para estimar la estructura poblacional de los adultos y juveniles y además observar como es que contribuyen a la estructura genética de *N. macrocephala*, se realizó el AMOVA por separado para cada categoría.

El AMOVA realizado para los Adultos se realizo en las cuatro poblaciones indicando que el 87.32% de la variación esta contenida dentro de las poblaciones y solo el 12.68% entre las poblaciones (Cuadro 5), estos valores indican que no existe estructuración entre los adultos.

Al realizar el análisis de la variabilidad genética con el índice de Shannon (Cuadro 8) se observa que poca variabilidad se encuentra entre las poblaciones $G'_{ST} = 0.217$ el valor obtenido es ligeramente menor que en el total de la población. Al contrario de los resultados con todos los individuos en este análisis es San Juan Raya más variable que San Martín, pero no de forma significativa siendo los valores de 6.781 y 6.273 y de igual forma que en el análisis de toda la población sigue los Reyes Metzontla (5.325) y Cerro “La Yerba” (3.754), en esta última población no se separo al individuo juvenil para el análisis y por ello se obtiene el mismo valor.

Cuadro 8 Valores de diversidad genética, obtenidos con el índice de Shanonn, para las poblaciones de adultos y juveniles de *N. macrocephala*

	CY	MZ	MZ-J	SJR	SJR-J	SM	SM-J	Hpop	Hpop- J	Hsp	Hsp-J	Hpop/ Hsp	Hpop/ Hsp-J	G'_{ST}	G'_{ST} - A
B10	3.486	5.337	0.810	6.695	0.763	5.826	0.813	5.336	0.795	7.039	7.163	0.758	0.111	0.242	0.889
C08	2.686	9.899	7.095	9.960	7.590	9.508	9.583	8.013	8.089	9.050	10.12	0.885	0.799	0.115	0.201
J13	4.315	4.027	2.893	4.585	3.445	5.596	6.305	4.631	4.214	5.085	5.756	0.911	0.732	0.089	0.268
E14	5.207	3.862	2.755	5.844	5.012	5.829	6.467	5.186	4.745	7.724	6.561	0.671	0.723	0.329	0.277
C07	3.486	4.554	2.755	7.734	4.718	6.534	5.740	5.577	4.404	7.042	7.033	0.792	0.626	0.208	0.374
J05	3.344	4.269	1.837	5.864	4.426	4.344	5.474	4.455	3.912	6.446	6.165	0.691	0.635	0.309	0.365
Prom	3.754	5.325	3.024	6.781	4.326	6.273	5.730	5.533	4.360	7.064	7.133	0.783	0.611	0.217	0.389

La Φ_{ST} fue de 0.127 a partir del AMOVA y este valor es mayor al obtenido para el total de la población indicando menor variación en los adultos.

Las relaciones de las cuatro poblaciones se graficaron con las Φ_{ST} pareadas y la única diferencia que se encontró es que la distancia entre Cerro “La Yerba” y San Juan Raya es menor



que cuando se analiza toda la población, siendo más parecida a esta que los Reyes Metzontla que tiene mayor parecido con San Juan Raya en el análisis de todos los individuos. San Martín es la población más alejada (Fig. 10.).

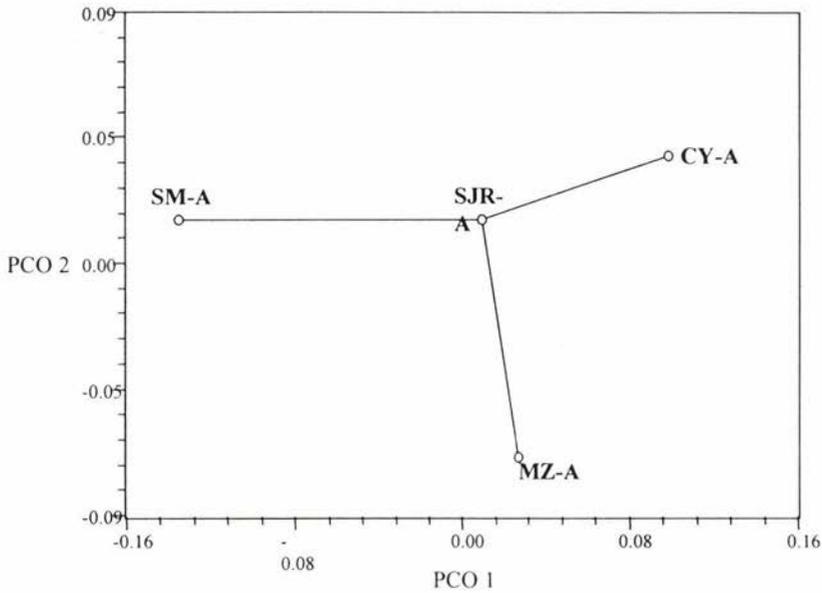


Figura 10. PCO en dos dimensiones con MST sobrepuesto para las cuatro poblaciones de *N. macrocephala* de individuos adultos, analizadas con AMOVA a partir de las ϕ_{ST} pareadas entre poblaciones.

La relación entre los 12 cuadrantes, conteniendo un solo individuo el tercero de San Juan Raya, se observó en un dendrograma. (Fig. 11.). El 4° y el 1° de San Martín son los menos parecidos y se unen a una distancia de 0.34 y 0.28 respectivamente uniéndose a una distancia de 0.17 a los dos grupos formados por los cuadrantes y zonas restantes.

Dentro de estos grupos la zona más alejada es Cerro “La Yerba” que se une al grupo formado por los cuadrantes de San Juan Raya y de la zona Los Reyes Metzontla la cual se une en una distancia muy corta (0.03) con el primer cuadrante de San Juan Raya.

Los cuadrantes 2 y 4 de San Juan Raya presentan la menor diferencia (0.01) y a ellos se agrega el cuadrante 5 y 6 en una distancia muy corta lo que indica que existe poca diferencia



entre estos cuadrantes. En el siguiente grupo el cuadrante 3 de San Juan Raya se une al cuadrante 3 de San Martín a una distancia de menos de 0.04 siendo un punto de unión entre estas dos zonas y por último se agrega el cuadrante 2 de San Martín.

Por lo observado en esta gráfica podemos interpretar que en general la diversidad genética es alta, como lo indica el AMOVA, la mayor distancia que marca el dendrograma de 0.33 no es significativa confirmando con esto que no se está dando una estructuración entre los adultos. Y la unión del tercer cuadrante de San Juan Raya al grupo de San Martín indica que la información genética es compartida en un porcentaje alto entre los cuadrantes muestreados.

Al graficar las Φ_{ST} pareadas con PCO y MST (Fig. 12.) se puede observar que la zona de Cerro "La Yerba" es la más afectada por el segundo componente, situando a esta localidad por encima de las demás, seguida del cuadrante 2 de San Juan Raya que es al que se une, junto con todos los demás cuadrantes de San Juan Raya a excepción del tercer cuadrante que se une primero a Los Reyes Metzontla.

Este tercer cuadrante de San Juan Raya se une al tercer cuadrante de San Martín que es el centro de unión de todos los cuadrantes de esta zona. El cuarto cuadrante de esta zona es el más alejado de todos los sitios de colecta en la gráfica.

En esta gráfica la tendencia de agrupamiento es similar a la gráfica 10, observándose la unión a partir de los cuadrantes de San Juan Raya. Una diferencia que se observa es que los adultos de San Martín tienen mayor interacción, y están más cercanos a San Juan Raya



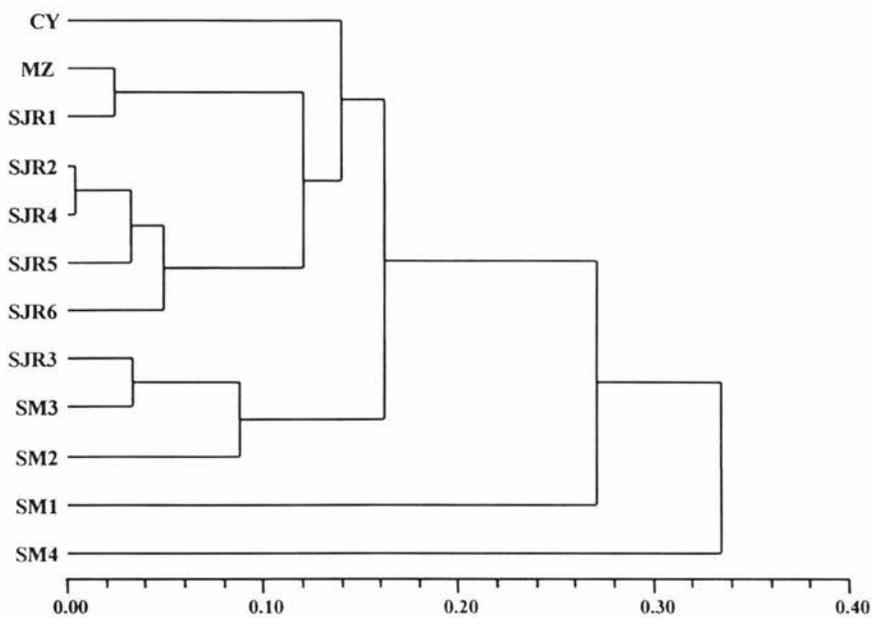


Figura 11 Dendrograma obtenido a partir de los individuos adultos el coeficiente de correlación de $r = 0.81765$ y $p = 0.99$.

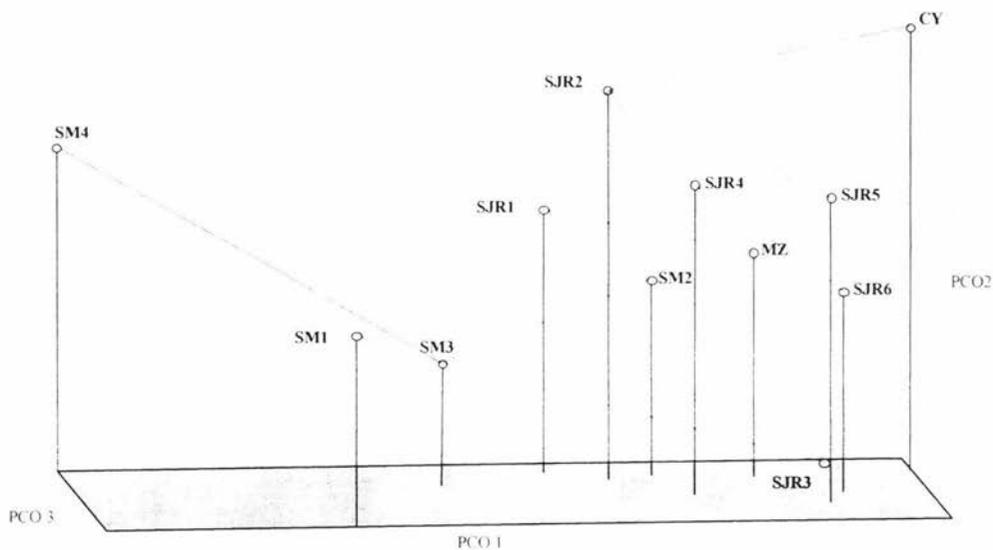


Figura 12. PCO con MST sobrepuesto, sobre las poblaciones de individuos adultos.



Con el AMOVA no se encontró estructura genética poblacional para los individuos juveniles, siendo la varianza dentro de las poblaciones de 92.75% y solo 7.25% se encuentra entre las poblaciones por lo que existe una mayor homogeneidad entre los individuos juveniles que entre adultos (Cuadro 5). Para este análisis en Cerro “La Yerba” solo se colectó un individuo juvenil.

Para el índice de Shannon (Cuadro 8) se eliminó Cerro “La Yerba” por contener solo un individuo cuya variabilidad se contempló en el análisis de adultos. Se observa con este análisis que poca variabilidad esta contenida entre las poblaciones siendo la $G'_{ST} = 0.389$ que es mayor que la observada en los adultos y en el total de la población.

En las poblaciones de juveniles la mayor variabilidad está en San Martín (igual que cuando se analiza el total de la población) siendo de 5.73, la siguiente población es San Juan Raya con 4.326 y después Los Reyes Metzontla con 3.02. Las diferencias entre San Martín y San Juan Raya son mayores a las observadas en los individuos adultos.

La Φ_{ST} fue de 0.073 a partir del AMOVA siendo este valor menor al obtenido para el total de la población y para los adultos indicando una mayor variación que en los adultos. Para el análisis de AMOVA se analizó la población de Cerro “La Yerba” con el juvenil siendo esta la única población con un individuo.

También se graficaron las Φ_{ST} pareadas para las cuatro zonas de juveniles y podemos apreciar que San Juan Raya sigue siendo el centro de unión de estas. Cerro “La Yerba” al igual que con los adultos es la más cercana a San Juan Raya y a diferencia de los otros análisis San Martín es el siguiente en unirse seguido de Los Reyes Metzontla que es el más alejado del grupo (Fig. 13.).



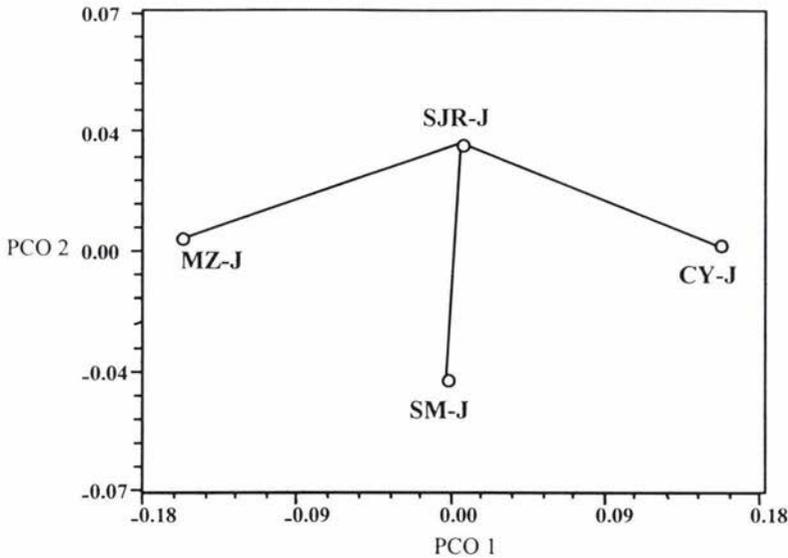


Figura 13. PCO de dos componentes con MST sobrepuesto en las cuatro zonas de individuos juveniles de *N. macrocephala*

Para analizar las relaciones entre los cuadrantes de los individuos juveniles se realizaron agrupaciones entre cuadrantes de las mismas zonas ya que existían mas de dos cuadrantes con un solo individuo (Cuadro 2). Estos agrupamientos se realizaron ya que el AMOVA no se puede realizar con más de una población con un solo individuo, que en este caso fue el de Cerro “La Yerba”. Las agrupaciones fueron las siguientes: El cuadrante 1 y 2 además el cuadrante 3 y 5 de San Juan Raya y el cuadrante 1 y 2 de San Martín. En San Juan Raya solo se dieron estos dos grupos ya que en los otros cuadrantes no se colectaron juveniles, para San Martín se analizaron los cuadrantes 3 y 4 además de la agrupación ya mencionada, en los Reyes Metzontla solo se analizó tres juveniles y en Cerro “La Yerba” uno.

En el dendrograma realizado con las Φ_{ST} pareadas del AMOVA (Fig. 14.) Cerro “La Yerba” es la zona con mayor distancia genética 0.20, la zona que sigue es la de Los Reyes Metzontla a la que se une en 0.12 y se integra a las otras zonas en 0.08. Se ve una agrupación por cuadrantes de la misma zona en San Juan Raya que tienen un mayor parecido y en los cuadrantes de San Martín en los que no se observa diferencia en los cuadrantes 3 y 4.



De este dendrograma se obtiene que Cerro “La Yerba” se comporta de igual manera que cuando se analiza el total de la población. No así Los Reyes Metzontla que tiene un comportamiento más parecido entre los adultos y el total de la población, uniéndose al primer cuadrante de San Juan Raya y con los juveniles se observa una integración a los grupos de San Juan Raya y San Martín. Los cuadrantes de San Juan Raya mantienen su integración que es igual a la que se observa cuando se analiza el total de la población. De igual forma los cuadrantes de San Martín se mantienen integrados como en los otros análisis aunque su comportamiento se parece al total de la población integrándose más a los grupos, en cambio con los adultos presentan las mayores distancias genéticas.

Al utilizar el PCO con MST sobrepuesto (Fig. 15.) se observa un centro de unión en el conjunto de individuos de San Juan Raya de los cuadrantes 1 y 2, a este se unen el conjunto de los cuadrantes 3 y 5 de San Juan Raya, el 4° de San Martín y Los Reyes Metzontla. Otro centro de unión es San Martín 1-2 ya que a este se une la zona Cerro “La Yerba” y San Juan Raya 1-2. En la gráfica se aprecia que el 3° y 4° de San Martín si presentan diferencias y no son idénticos como se apreciaba en el dendrograma, ya que los componentes del PCO les afectan de forma diferente en esta gráfica.

Como se mencionaba anteriormente San Juan Raya es un sitio con alta variabilidad aunque también lo es San Martín e incluso con el análisis de Shannon son los más variables, aunque pareciera que San Juan Raya tiene mayor relación con las otras zonas y en esta gráfica se observa claramente que el cuadrante en que se agruparon los cuadrantes 1 y 2 de esta zona, comparten una gran parte de la información genética de toda la población de *N. macrocephala*, formando un centro de unión para casi todos los sitios muestreados.

Lo que es importante destacar es que la zona menos parecida en los adultos es San Martín a diferencia de los juveniles que es Cerro “La Yerba”, y Los Reyes Metzontla también presenta mayor diferenciación en los juveniles que en los adultos. San Martín tiene distancias más cortas en los juveniles, es decir esta más integrada su información que en los adultos y San Juan Raya presenta un pool genético más variable en los juveniles que en adultos.



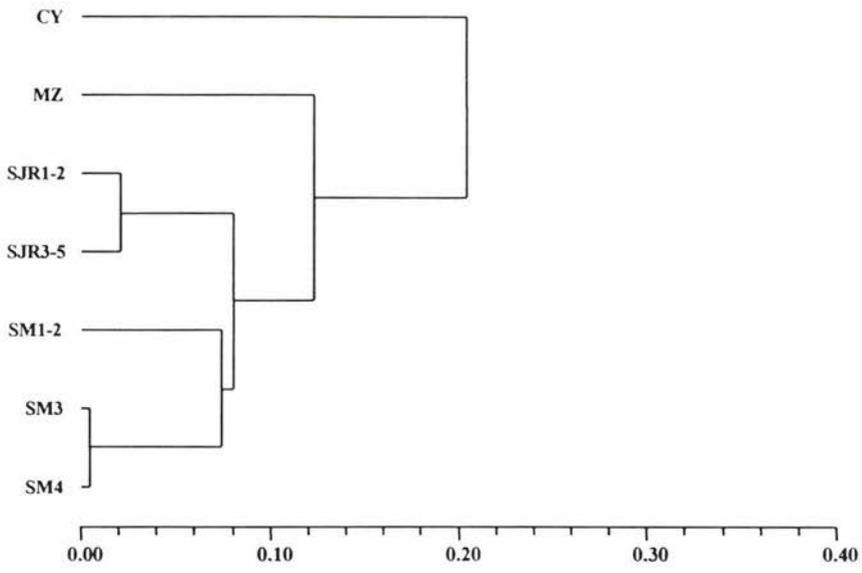


Figura 14. Dendrograma para los individuos juveniles coeficiente de correlación $r = 0.76983$ $p = 0.99$.

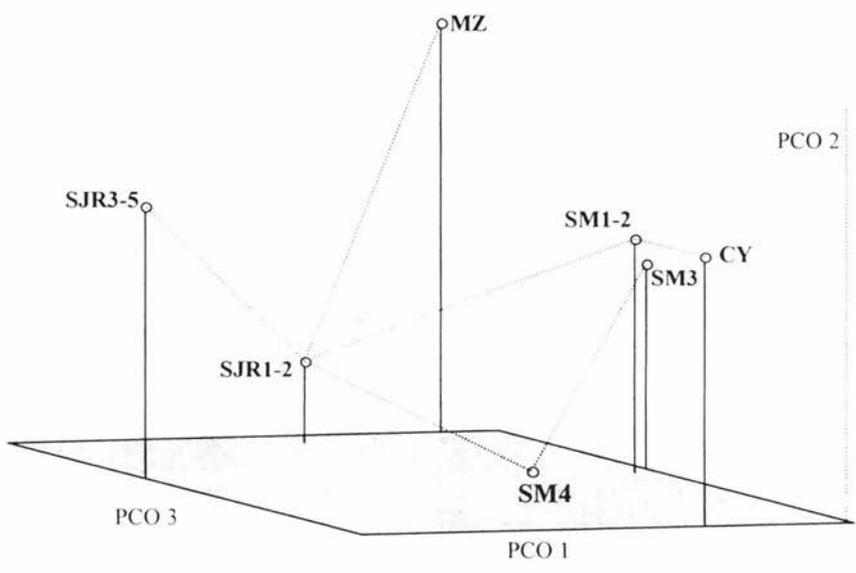


Figura 15. PCO con MST sobrepuesto en las poblaciones de individuos juveniles.



Para observar de una mejor manera la relación espacio temporal entre jóvenes y adultos se realizó el PCO con MST a partir de las Φ_{ST} pareadas del AMOVA (Cuadro 9). En esta nueva relación se ve que no existe en general una agrupación por edades (Fig. 16.).

Cuadro 9 Matriz de Φ_{ST} pareadas de poblaciones de individuos adultos y juveniles de *N. macrocephala* a partir del AMOVA.

	CY-A	CY-J	RM-A	RM-J	SJR-A	SJR-J	SM-A	SM-J
CY-A	0							
CY-J	0.197	0						
RM-A	0.129	0.061	0					
RM-J	0.023	0.315	0.010	0				
SJR-A	0.070	0.004	0.075	0.035	0			
SJR-J	0.095	0.048	0.075	0.085	0.023	0		
SM-A	0.199	0.132	0.163	0.147	0.120	0.130	0	
SM-J	0.172	0.146	0.134	0.118	0.061	0.065	0.037	0

Los adultos de Cerro “La Yerba” comparten mayor información genética con los juveniles de Los Reyes Metzontla y los juveniles de Cerro “La Yerba” se unen con el cuadrante 2 de individuos adultos de San Martín y con el cuarto cuadrante de adultos de San Juan Raya. Por otro lado existe una clara separación por edades en Cerro “La Yerba”, observándose que para los juveniles el segundo componente le afecta muy poco y los adultos de este sitio son los más afectados por este componente; aunque esto se puede deber a que solo se tiene un individuo en la población juvenil, si se observa una clara diferencia incluso en las relaciones que tienen los adultos y juveniles.

En los Reyes Metzontla no se da una separación tan grande y sus individuos adultos y juveniles se relacionan en la gráfica compartiendo información con cuadrantes de San Juan Raya. Los adultos con el grupo de juveniles de los cuadrantes 1 y 2 y los juveniles con el cuadrante 5 de adultos de San Juan y con Cerro “La Yerba”.

Los individuos de San Juan Raya se unen entre ellos, a la vez que se unen a todas las demás zonas formando un centro de unión sin distinción entre juveniles y adultos.

Los individuos de San Martín forman un pequeño grupo en la parte inferior de la gráfica uniéndose juveniles y adultos entre sí, a excepción del cuadrante 1 y 4 de individuos adultos que



se encuentran en diferentes extremos por la forma en que les afecta el primer y tercer componente, a pesar de ello se relacionan ambos con el tercer cuadrante de individuos adultos formando una agrupación sucesiva en estos cuadrantes que, a excepción del segundo, se agrupan todos los cuadrantes de adultos, siendo el tercer cuadrante de San Martín un centro de integración de adultos y juveniles a excepción del grupo del primer y segundo cuadrante de juveniles que se une al segundo de adultos.

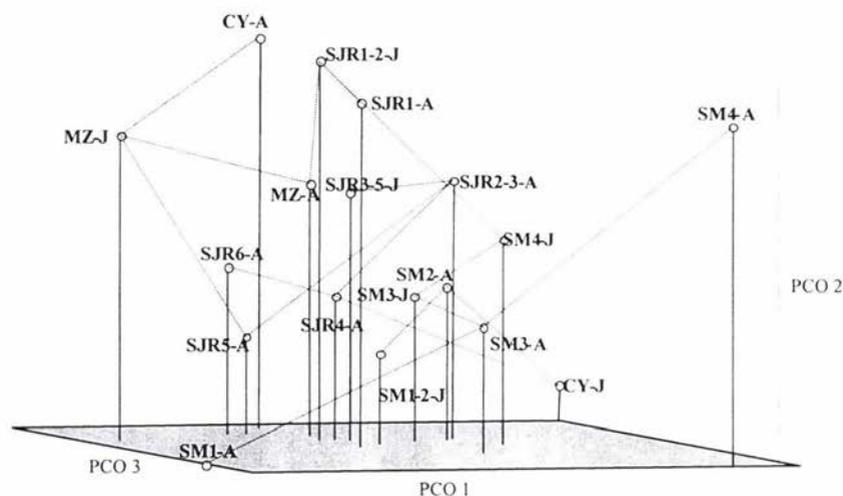


Figura 16. PCO con MST sobrepuesto en las poblaciones de individuos juveniles diferenciados con una J mayúscula al final y adultos diferenciados con una A mayúscula al final.

Es claro observar que San Martín a pesar de compartir información genética con las demás zonas, presenta una compactación entre sí, aunque no por ello se está separando de las demás zonas debido al alto flujo génico que presenta *N. macrocephala*.

Con los datos del AMOVA se observa que la Φ_{ST} de los adultos es mayor a la de los juveniles, en cambio con el análisis de Shannon se observa lo contrario (Cuadro 10). Aunque existe mayor variabilidad en los adultos, el flujo génico no es tan alto como en los juveniles.



Con estos resultados se observa que existe mayor flujo génico entre los juveniles, la diversidad genética es menor a la que se presenta en adultos. Esto puede deberse a que la información que los nuevos individuos deben a portar, se pierde al morir estos individuos.

Las diferencias que existen entre adultos y juveniles no son excesivas y no afectan la alta diversidad que presenta la especie ni el flujo genético que se observa por lo que no existen problemas de información genética entre las poblaciones.

Cuadro 10 Valores de diversidad y estructura genética obtenidos para la población de *N. macrocephala* y para las poblaciones conformadas por individuos adultos y juveniles.

	V. C.	Φ_{ST}	G'_{ST}	$N_e m$
TOTAL	10.62	0.106	0.229	1.19
ADULTOS	12.68	0.127	0.2168	0.97
JUVENILES	7.25	0.073	0.388	1.79

V. C. varianza total de los componentes entre poblaciones, Φ_{ST} equivalente al índice de diversidad, G'_{ST} índice de diversidad genética y $N_e m$ flujo génico

La prueba de Barlett indica una diferencia significativa alta ($p = < 0.0010$) por lo que las varianzas obtenidas para las poblaciones de *N. macrocephala* no son producto del azar.

3.3.4 Distancia Genética vs. Distancia Geográfica

Para estimar si existe aislamiento por distancia, se realizó la comparación entre la matriz de Φ_{ST} pareadas obtenidas con el AMOVA (que indican las distancias genéticas) y una matriz de las distancias geográficas (Cuadro 11) mediante la prueba de Mantel (Fig. 17) y se obtuvo un coeficiente de correlación de $r = 0.10154$ que indica que no existe relación entre la distancia genética y geográfica para las zonas muestreadas de *N. macrocephala* la probabilidad fue de $p = 0.814$.



Cuadro 11. Matriz de correlación entre las Φ_{ST} pareadas y la distancia geográficas. En el triangulo inferior se encuentran las distancias genéticas obtenidas por el AMOVA a partir de las Φ_{ST} pareadas y en el triangulo superior las distancias geográficas para cada zona.

	Y	RM	SJ1	SJ2	SJ3	SJ4	SJ5	SJ6	SM1	SM2	SM3	SM4
Y	--	7.7	10.7	9.8	9.05	8.25	6	6.15	3.4	3.7	4.3	4.65
RM	0.1228	--	18.25	17.5	16.75	15.95	12.6	12.72	5.55	5.75	5.7	5.9
SJ1	0.1015	0.0188	--	0.8	1.6	2.5	7.1	7.12	13.55	13.8	14.3	14.65
SJ2	0.1697	0.1175	0.0523	--	0.8	1.6	6.1	6.12	12.8	13.1	13.55	13.9
SJ3	0.1457	0.1269	0.0441	0.0558	--	0.8	5.65	5.67	11.95	12.25	12.75	13.1
SJ4	0.1725	0.0952	0.0781	0.0065	0.0252	--	4.95	5	11.3	11.65	12.45	12.5
SJ5	0.1574	0.1344	0.1448	0.0352	0.0666	0.0508	--	0.1	9.15	9.7	10.3	10.7
SJ6	0.2206	0.1183	0.1388	0.0832	0.0543	0.0144	0.0678	--	9.3	9.85	10.5	10.85
SM1	0.3503	0.2176	0.1845	0.2081	0.2328	0.1727	0.2187	0.2455	--	0.7	1.3	1.65
SM2	0.2191	0.1392	0.0852	0.098	0.145	0.0856	0.1249	0.1607	0.0834	--	0.65	1
SM3	0.2446	0.1755	0.1006	0.0462	0.1125	0.0959	0.118	0.1671	0.131	0.0519	--	0.4
SM4	0.2778	0.2094	0.1059	0.0854	0.1403	0.1509	0.2149	0.2213	0.1682	0.0969	0.0649	--

De igual forma se realizó una regresión lineal obteniendo una r^2 de 0.0103 confirmando que no existe correlación (Fig. 18). Estos datos se obtuvieron de forma general y al realizarlos por edades no se obtuvo diferencia. Los datos aportados con esta prueba reflejan el hecho de que en el análisis de coordenadas principales y en todos los anteriores análisis no existe una agrupación de acuerdo a la distancia geográfica, permitiendo la integración de las zonas estudiadas en una sola población de *N. macrocephala* dentro del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.



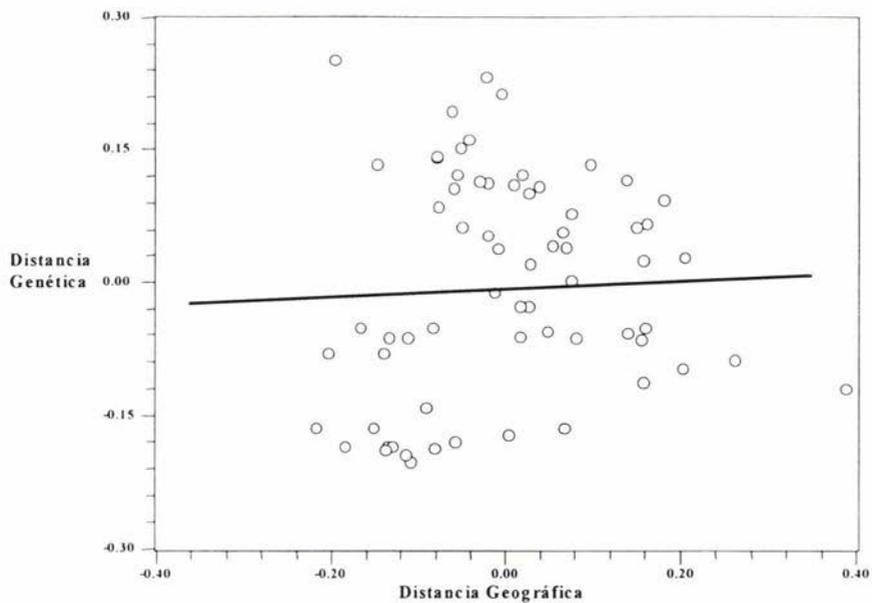


Figura 17. Gráfica de dispersión de datos de distancia geográfica a partir de la matriz de Mantel después de 1, 000 permutaciones, $r = 0.10154$.

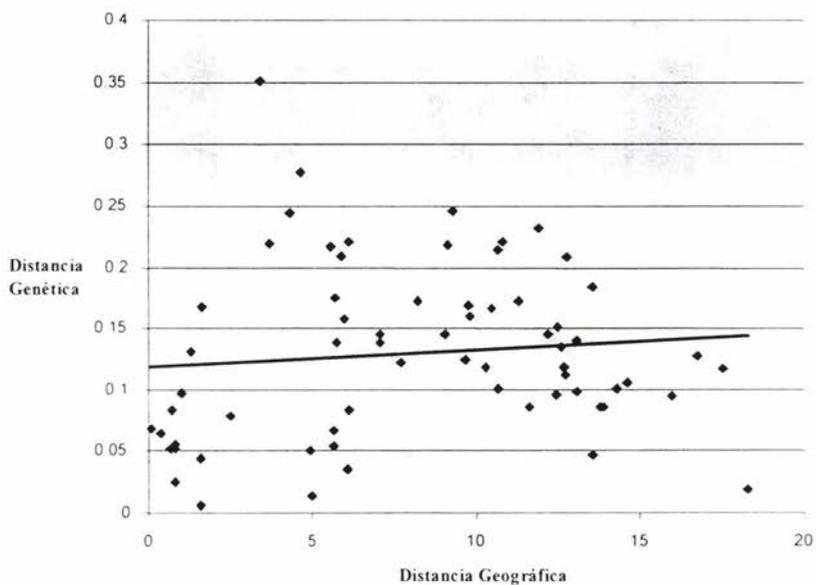


Figura 18. Gráfica de dispersión de los datos analizados con regresión lineal $r^2 = 0.0103$



4. DISCUSIÓN

Estructura Poblacional de *Neobuxbaumia macrocephala*

Los estudios genéticos pueden ser empleados para plantear estrategias de conservación en diversas especies utilizando técnicas moleculares como los RAPD. A partir de estas técnicas se puede estimar la estructura y flujo génico entre poblaciones (Archibald *et al.*, 2001, Hannan y Orick, 2000). Estas características, de acuerdo a los biólogos evolucionistas y de conservación, están influenciadas por la historia evolutiva y las características de historia de vida sobre todo en especies raras y se deben considerar cuándo se desarrollan planes para la conservación de este tipo de especies (Hannan y Orick, 2000).

La planeación de estrategias de conservación son apremiantes en especies endémicas que habitan lugares como los desiertos, estos ecosistemas poseen gran diversidad de flora y fauna (Bravo-Hollis, 1978). Entre la gran gama de especies que habitan estos ecosistemas las cactáceas son de las especies dominantes que poseen un elevado índice de endemismo, tal es el caso de *Neobuxbaumia macrocephala*, que es la más restringida de las tres especies del género que cohabitan en el Valle de Tehuacan-Cuicatlán y además es estricta endémica del Valle. *N. macrocephala* presenta baja tasa de crecimiento individual, alta mortalidad de plántulas y juveniles que generan dificultad para incrementar su crecimiento poblacional además tiene baja densidad poblacional. Por estas características se abordó su estudio genético con la hipótesis de que la variabilidad genética de esta especie podría ser menor o igual a la de su congénere *N. tetetzo* que ha sido determinada recientemente (Martínez-García *et al.*, enviado).

Cabe mencionar que no se encontraron individuos de menos de 80 cm. Esto concuerda con los datos reportados por Godínez-Álvarez (2000) y Vilchis (2000), que mencionan que el establecimiento de nuevos individuos de cactáceas columnares ha decrecido últimamente. De igual forma, Zavala-Hurtado y Díaz-Solís (1995) reportan que hace más de 100 años hubo condiciones favorables que permitieron el establecimiento de cactáceas como *N. macrocephala* y *Cephalocereus columna-trajani*, esto favoreció el establecimiento de nuevos individuos pero al parecer actualmente las condiciones ambientales ya no son favorables.



La extracción de ADN de los individuos colectados se realizó de manera similar para cada categoría, aunque el exceso de mucilagos fue una situación que dificultó este proceso ya que en general impide manipular la muestra. De forma natural, en las cactáceas los mucilagos sirven para almacenar agua (Bravo-Hollis, 1978) y al hidratar el tejido en el laboratorio se forma una solución viscosa. Esta observación fue más evidente en los individuos juveniles sobre todo en los de menor tamaño (aproximadamente 1 a 2 m). Para disminuir esta formación se disminuyó la cantidad de tejido para la extracción, reduciendo en forma proporcional la cantidad de ADN obtenido, aun así se obtuvo una concentración de 300 a 4900 ng de ADN/ μ l que es suficiente para la técnica de RAPD. Esta situación también repercutió en la amplificación, sobre todo en los juveniles, lo que hace suponer que estos contaminantes impidieron que se realizara la alineación y polimerización en forma adecuada para algunos individuos, que posteriormente tuvieron que ser eliminados del análisis.

De un total de 134 marcadores RAPD, 130 estuvieron presentes en *N. macrocephala* y cuatro fueron exclusivas de *N. mezcalaensis* que fue utilizado como grupo externo. El número promedio de marcadores por iniciador fue de 22 en un rango de 2926 a 186 pb (Cuadro 3) que concuerdan con los resultados obtenidos para *N. tetetzo* (Chávez, 2000). Este número de marcadores es adecuado para el análisis de la estructura poblacional de *N. macrocephala*, incluso en un estudio realizados por Krauss (2000) menciona que el tener un gran número de marcadores compensa el utilizar un número menor de individuos y para el presente trabajo también el número de individuos fue el adecuado (84).

En el dendrograma obtenido se observó que no existe agrupación entre los individuos por población ni por edad. Los individuos SM3.7-J, Mz7, CY4 y SJR2.3, no presentaron agrupación alguna entre las poblaciones analizadas, cada uno de estos individuos pertenece a una de las zonas estudiadas, además un rasgo que comparten estos es que tienen mayor diferenciación genética en comparación con los otros individuos. Algo semejante ocurre en poblaciones de *Banksia saxicola* (Proteaceae) que es una endémica rara de Australia la explicación que dan es que los individuos pueden ser resultado de introgresiones de otras especies, aunque la hibridación no es muy común, o que incluso sean una baja representación de alelos raros (Evans *et al.*, 2001). La hibridación en cactáceas columnares se da en forma natural (Vite *et al.*, 1997) por lo que es de



esperarse que también ocurran procesos de introgresión o hibridación en *N. macrocephala*.

La variabilidad genética que se encontró entre las poblaciones fue del 23% ($G'_{ST} = 0.229$). Este valor es menor al que se reporta para *N. tetetzo* ($G'_{ST} = 0.357$) (Martínez-García *et al.*, enviado), indicando que existe mayor variabilidad en *N. macrocephala* a pesar de tener un mayor grado de endemismo. De acuerdo al trabajo de Bussell (1999) el valor de variabilidad de *N. macrocephala* es comparable con los valores que se reportan para especies de polinización cruzada (15-38%), que en general presentan mayor variabilidad que las especies con autofecundación.

Por otro lado, el AMOVA no mostró ningún tipo de estructuración genética en las poblaciones (Cuadro 5), ya que el mayor porcentaje de la varianza (del 87 al 93%) se encuentra dentro de las cuatro poblaciones estudiadas. De acuerdo a estos resultados, tampoco se encontró correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica. Estas observaciones son comparables con lo que se reporta para otro tipo de especies endémicas que no presentan estructuración por la alta variabilidad que existe entre las poblaciones (Kim *et al.*, 2001).

De las cuatro zonas estudiadas de *N. macrocephala* la más variable fue la de San Martín (He 7.18), enseguida la de San Juan Raya (He 6.74) y después le siguieron la de Los Reyes Metzontla (He 5.59) y Cerro "La Yerba" (He 3.75). La población de San Juan Raya presentó una alta interacción con las zonas restantes, en cambio San Martín, presentó menor interacción con las poblaciones y mayor interacción entre los sitios muestreados en esta zona. Estas relaciones se observaron gráficamente en las figuras 8, 10, 13 y 16. Esta organización puede estar relacionada con una estructuración inicial en la población de San Martín que aun no es significativa.

El valor de la Φ_{ST} para la especie, fue de 0.106, esto indica que existe flujo génico ($N_e m > 1$) entre ellas explicando la alta variabilidad observada. Por otro lado el valor de la Φ_{ST} reportado para *N. tetetzo* fue de 0.288 y el flujo génico menor a 1 ($N_e m = 0.47$), aunque cabe destacar que existe intercambio genético entre algunas poblaciones de tetecho, (Martínez-García *et al.*, enviado).



Por otro lado, la amplia dispersión de semillas y polen, en términos generales impide la estructuración (Kaliz *et al.*, 2001) y en *N. macrocephala*, el hecho de que se presente alta variabilidad y flujo génico, probablemente se debe al proceso de polinización y dispersión de semillas realizado por tres especies de murciélagos, quienes favorecen el intercambio genético entre las poblaciones y en tetecho este efecto se ve disminuido ya que solo son dos especies. Estos resultados son favorables para *N. macrocephala* ya que la diversidad genética generalmente se asocia de forma positiva con la habilidad de resistir las enfermedades aumentando las oportunidades de sobrevivencia (Olfelt *et al.*, 2001).

Este mismo fenómeno se observa para otro tipo de especies raras o endémicas en que la variabilidad y flujo génico varían según el polinizador, por ejemplo para la cactácea columnar *Lophocereus schottii* se encontró una diferencia substancial entre poblaciones ($G'_{ST} = 0.130$), el estudio se realizó con isoenzimas (Parker y Hamrick, 1992). Para *Agave victoriae-reginae* en un estudio con isoenzimas, no se encontró flujo génico ($N_e m 0.655$ y $F'_{ST} 0.236$) esto sugiere que los polinizadores de *A. victoriae-reginae* no son muy efectivos para promover el flujo génico entre las poblaciones aisladas de esta especie (Martinez-Palacios *et al.*, 1999). En *Sedum integrifolium* (Crassulaceae) combinando marcadores RAPD y morfológicos se encontró bajo flujo génico que se atribuye a la pequeña distancia a la que vuelan sus polinizadores (abejas y moscas) ya que solo pueden desplazarse 1000 m (Olfelt *et al.*, 2001). En la especie endémica *Calystegia collina* (Convolvulaceae) se estimó una $N_e m < 1$ sugiriendo que el flujo génico entre poblaciones es inadecuado para contrarrestar los efectos de la deriva génica en las poblaciones locales de esta especie (Wolf *et al.*, 2000). Un estudio con isoenzimas en *Iris cristata* reveló que existe flujo génico ($N_e m = 13.72$) entre sus poblaciones (Hannan y Orick, 2000). Y en el trigo sarraceno *Eriogonum ovalifolium var. williamsiae* cuyas flores son visitadas por un grupo diverso de insectos que incluye abejas, avispas, moscas y mariposas, siendo las últimas tres las encargadas de dispersar a distancias más grandes el polen y por ende favorecer el flujo génico entre las poblaciones analizadas (Archibald *et al.*, 2001). También se observó la eficiencia del polinizador en un estudio realizado en *Agave subsimplex* y *A. cerulatas* ya que existe flujo génico entre las poblaciones de cada una (Navarro, 1999).



Como se puede observar el hecho de que *N. macrocephala* sea polinizada por tres especies de murciélagos (*Choeronycteris mexicana*, *Leptonycteris curasoae* y *Leptonycteris nivalis*) favorece el flujo génico en esta especie ya que la distancia a la que se pueden desplazar es mayor al área de distribución de *N. macrocephala*. Estos murciélagos pueden volar más de 30 km por noche y abarcar 200 km² en tan solo una semana (Rojas, 1996), por lo que pueden transportar el polen a todas las poblaciones de *N. macrocephala* evitando su estructuración. Actualmente, se están proponiendo estudios de las rutas de forrajeo de los murciélagos, que permitirán esclarecer como es que la información genética de las poblaciones es transportada por estas especies (Valiente-Banuet, comunicación personal).

El efecto de los polinizadores permite que las características genéticas de *N. macrocephala* no sean acordes a las predicciones teóricas que se han establecido para especies endémicas. De hecho la variabilidad de *N. macrocephala* es mayor a la que se presenta en *N. tetetzo* a pesar de que *tetetzo* tiene una distribución más amplia. Teóricamente las especies endémicas deberían poseer bajos niveles de variabilidad genética entre sus poblaciones, originada por diversos factores como la deriva genética y/o ausencia de flujo génico. Estas determinaciones se basan en el tamaño y la distribución poblacional, ya que según la teoría, estos factores son proporcionales a la variabilidad genética (Stebbins, 1980; Hamrick y Godt, 1990; Archibald *et al.*, 2001; Hannan y Orick, 2000; Wolf *et al.*, 2000). Sin embargo, una diferencia que existe entre ambas especies es que aunque son polinizadas por murciélagos, a *tetetzo* la polinizan dos especies (*Lectonycteris curasoae* y *Choeronycteris mexicana*) y a *N. macrocephala* la polinizan tres especies, lo que favorece aun más el flujo génico en *N. macrocephala* aunque presenta menor distribución que *N. tetetzo*.

Por otro lado, en una revisión reciente realizada por Gitzendanner y Soltis (2000) donde comparan especies cercanas que difieren en su distribución geográfica concluyen que los valores promedio de diversidad en las especies más restringidas son muy cercanos a los que se observa en sus congéneres que presentan mayor distribución. Esto probablemente está influenciado por la historia de vida de cada género, siendo imposible generalizar si existe mayor o menor variabilidad en las especies endémicas.



Al realizar el análisis en las poblaciones de adultos y juveniles de *N. macrocephala*, el AMOVA mostró que no existe estructura genética en estas poblaciones. Por otro lado, existe menor diversidad en adultos ($\Phi_{ST} = 0.127$), que en juveniles ($\Phi_{ST} = 0.073$) (Cuadro 8). Así mismo, el flujo génico entre las poblaciones de juveniles ($N_e m = 1.78$) es mayor al que existe entre poblaciones de adultos ($N_e m = 0.96$), explicando por que los adultos presentan un menor índice de diversidad pues el flujo génico en estos es ligeramente menor. Sin embargo, al estimar la variación con el índice de Shannon se observó que las poblaciones de adultos presentan mayor variabilidad ($G'_{ST} = 0.217$) comparada con la que presentan los juveniles ($G'_{ST} = 0.388$).

Esta diferencia en flujo génico en los adultos puede deberse a que el polinizador no era tan eficiente en otros tiempos o bien que la densidad poblacional de murciélagos era menor. Aunque no existen diferencias significativas entre estos valores.

En cuanto a los juveniles, el hecho de que se esté perdiendo la variabilidad genética se explica en base al escaso establecimiento de nuevos individuos, ya que son estos los que aportan información genética a la población. Por ello, a pesar de que los murciélagos cumplen con transportar el polen y ayudar a la dispersión de semillas, esto no es suficiente si los nuevos individuos no alcanzan la edad adulta para poder aportar información genética a la población. Así mismo, se ha encontrado que la muerte de los juveniles puede favorecer la estructura de las poblaciones por la pérdida de diversidad alélica que se origina (Kalisz *et al.*, 2001). De esta forma, es imprescindible establecer programas de conservación para evitar que la variabilidad genética se pierda a través de las siguientes generaciones, como se observa en estos resultados para *N. macrocephala*.

En cuanto al porcentaje de germinación de las semillas, este es muy alto (Vilchis, 2000) y no se ve afectado por la ingestión que realizan los dispersores ya que el principal papel de estos es transportar las semillas a sitios en que no exista radiación solar directa y deficiencia del agua ya que estos factores afectan la germinación (Godínez-Álvarez y Valiente-Banuet, 1998). Por otro lado, el establecimiento de las plántulas de forma natural se ve afectada por la depredación de frutos o semillas que ocurre por la interacción de insectos, roedores y factores ambientales que también afectan a otras especies (Steebergh y Lowe, 1977; Godínez-Álvarez, 2000). De esta



forma, una plántula ya establecida proviene de una cohorte de 116 plántulas y alcanza una talla de 15 cm después de 15 años y de 50 cm después de 25 años (Esparza, 1998). En esta etapa son menos propensas a la depredación pero todavía deben pasar por un proceso de selección y supervivencia para alcanzar la etapa adulta. Así mismo, Godínez-Álvarez (2000) y Vilchis (2000) han reportado la ausencia de retoños en campo, mencionando que el establecimiento de nuevos individuos no ha sido tan exitoso como solía ser en otros años, además estiman que la cantidad de muertes podría superar el número de nacimientos en algún momento dado. El establecimiento de plantas esta limitado por heladas invernales, sequías insectos y roedores (Vilchis, 2000).

Así mismo, la densidad de *N. macrocephala* esta limitada a 200 Ind/ha que es muy pequeña en comparación con la densidad que presentan *N. tetetzo* (1200 Ind/ha) y *N. mezcalaensis* (1680 Ind/ha) (Valiente-Banuet *et al.*, 1997). Su escasa densidad y la restringida distribución en forma de manchones, sugieren que las condiciones edáficas y climáticas restringen el establecimiento de las plántulas a ciertas áreas dentro del Valle. No obstante que la dispersión de las semillas es realizada por los murciélagos en un área considerable (*L. curasoae* puede abarcar 200 km² en una semana Rojas, 1999) depositándolas en el suelo al momento de perchar, las semillas sólo se establecen bajo la copa de arbustos perennes que sirven como nodrizas (Valiente-Banuet *et al.*, 1996a; Godínez-Álvarez *et al.*, 1999).

Datos proporcionados por el laboratorio de edafología (UBIPRO, FES-Iztacala), sobre análisis de sitios cercanos a donde se establece *N. macrocephala*, indican que los suelos son franco-areno-arcillosos, con una porosidad promedio del 53% lo que permite que exista disposición del agua para las plantas, el pH del suelo es de 7.76 cercano a la neutralidad. Estos suelos presentan un intercambio catiónico de 27.35% lo que indica que los nutrientes pueden asimilarse fácilmente y también presentan un porcentaje de materia orgánica de 4.55% presentándose carbono disponible. Estas características son más adecuadas para su crecimiento comparadas con las presentes en zonas en que crece *N. tetetzo* siendo suelos Franco-areno-limosos con una porosidad promedio del 55%, pero un pH que va de 6.57 a 9.66 presentando condiciones más agrestes. De estos datos podemos considerar que *N. tetetzo* resiste más que *N. macrocephala* y debido a las características del suelo, se cree que estas podrían estar limitando el establecimiento de las semillas de *N. macrocephala* a estos impidiendo su establecimiento en



lugares aledaños que pueden ser menos favorables. Esto se observa en que la mayor mortandad de plántulas o individuos juveniles se debe a las condiciones climáticas del Valle y a la presión por la obtención de recursos como el agua. Además cabe destacar que para el establecimiento de las plántulas es necesario que existan plantas nodrizas que las protejan de las radiaciones solares y de la depredación en las primeras etapas de crecimiento (Valiente-Banuet y Ezcurra, 1991) teniendo mayor oportunidad de establecerse las semillas que caen bajo la sombra de otras plantas (Godínez-Alvaréz *et al.*, 1999). Por lo anterior sería interesante realizar un estudio que relacione los requerimientos nutricionales necesarios para el crecimiento, desarrollo y establecimiento de *N. macrocephala*, ya que esto permitirá conocer más sobre su comportamiento en estado natural.

Por otro lado, también se realizó un ensayo con la interpolación de superficies climáticas y el modelo bioclimático propuesto por Téllez y Dávila (2001), en el que se encontró que los sitios en que se distribuyen las poblaciones de *N. macrocephala*, presentan un pequeño rango de diferencia entre las condiciones climáticas que poseen. Por ejemplo la temperatura media anual varía de un máximo de 19.5°C a un mínimo de 18.3°C y en el periodo más caluroso de 30.7°C a 29.3°C (poco menos de un grado centígrado de diferencia) y la precipitación del periodo más húmedo va de 538 mm a 491mm y el periodo más seco de 33mm a 32mm; en cambio estos mismos parámetros son mas flexibles para *N. tetetzo*, por lo que nuevamente las condiciones que necesita o que tolera *N. macrocephala* son muy estrechas. De estos datos se concluye que solo se establece en sitios con condiciones ambientales y edáficas óptimas para su desarrollo. Esto se debe a que como menciona Téllez y Dávila (2001) el clima y la topografía son los que modelan la actividad biológica y por ende la distribución de los organismos.



Método de Evaluación del Riesgo de Extinción de las Especies Silvestres en México (MER), una propuesta para *Neobuxbaumia macrocephala*.

Por los resultados obtenidos para *Neobuxbaumia macrocephala* en los índices de diversidad y por los problemas de establecimiento que presenta, se cree adecuado incluirla dentro de alguna categoría de la NOM-059-Ecol, ya que es el documento más importante en México que avala y clasifica a las especies en una categoría a fin de promover su protección a través de la SEMARNAT. Cabe destacar que esta cactácea aunque no esta incluida en la NOM-059-ECOL, sí está incluida en el Apéndice II del Convenio sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre (CITES). Este convenio pretende evitar que el comercio internacional de animales y plantas silvestres amenacen su sobrevivencia.

Por otro lado, en los últimos años varios investigadores se dieron a la tarea de revisar y actualizar la lista de las especies que se encuentran en la norma mexicana y determinaron que era conveniente emplear un nuevo método de evaluación que unificara los criterios de decisión fue propuesto el "Método de Evaluación del Riesgo de Extinción de las Especies Silvestres en México" (MER) dentro del Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-059-ECOL-2000 (Diario Oficial, 2000).

Después de ponerse en consideración por los especialistas fue aprobada la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 y fue dada a conocer el 6 de marzo del 2002 en el Diario Oficial de la Federación. La aplicación de esta norma debe realizarse, a diferencia de la NOM-059-ECOL-1994, bajo criterios establecidos, de acuerdo a evidencias factibles que se basan en la información proporcionada por los especialistas y del actual uso del suelo (Diario Oficial, 2002). Este método se basa en la evaluación de cuatro diferentes variables bajo los cuales se ha evaluado a *N. macrocephala* encontrando lo siguiente:

El primer criterio de evaluación se refiere a la **amplitud de distribución del taxón**. Se refiere al tamaño relativo del ámbito de distribución natural actual en México. Este criterio considera cuatro gradaciones:

Muy restringida con un valor de **cuatro**. Se aplica tanto para especies microéndemicas como



para especies principalmente extralimitales con escasa distribución en México. (menor al 5% del territorio nacional).

Restringidas con un valor de **tres**. Incluye especies cuyo ámbito de distribución en México se encuentra entre el 5 y el 15% del territorio nacional.

Medianamente restringida o amplia con un valor de **dos**. Incluye aquellas especies cuyo ámbito de distribución es mayor al 15%, pero menor que el 40% del territorio nacional.

Ampliamente distribuida o muy amplia con un valor de **uno**. Incluye aquellas especies cuyo ámbito de distribución es igual o mayor al 40% del territorio nacional.

IZT.

La distribución de *N. macrocephala* se restringe a la Reserva de la Biosfera del Valle de Tehuacan-Cuicatlán, presentando Puebla una extensión territorial de 33,919 km² (www.upaep.mx/puebla/edopue.html). Esta especie es endémica de este estado el cual ocupa menos del 2% del territorio nacional (1'953,162 km² Extensión territorial www.conabio.gob.mx). Por los datos anteriores la distribución de *N. macrocephala* abarca menos del 5% del territorio ya que presenta aproximadamente 6 poblaciones distribuidas en manchones dentro del Valle, en donde al parecer encuentra las condiciones climáticas y edáficas apropiadas para establecerse. Por otro lado, el que la población de *N. macrocephala* se distribuya dentro de una Reserva, es sólo el primer paso de conservación *in situ*, sin embargo, esto no le asegura su conservación de manera automática, ya que el uso del suelo o sus condiciones a mediano o largo plazo pueden cambiar y no se llevaría a cabo su conservación de manera eficiente. Por tanto debido a que presenta una distribución muy restringida se considera que esta especie es rara y por su status de microendémica obtiene un valor de **cuatro**.

El segundo criterio se refiere al **estado del hábitat con respecto al desarrollo natural del taxón**. Este es el conjunto de efectos actuales del hábitat particular, con respecto a los requerimientos para el desarrollo natural del taxón que se analiza, en términos de condiciones físicas y biológicas. Cuando una especie es de distribución muy amplia, se realiza una estimación integral del efecto de la calidad del hábitat para todo su ámbito. Considera tres valores:

Hostil o muy limitante	con un valor de tres
Intermedio o limitante	con un valor de dos
Propicio o poco limitante	con un valor de uno



Los requerimientos físicos en cuanto al tipo de suelo que requiere *N. macrocephala* para poder germinar y el hecho de que la mayor mortandad de las plántulas o individuos juveniles se debe a las condiciones climáticas del Valle por la presión de recursos como el agua, la necesidad de nodrizas que las protejan de las radiaciones solares en las primeras etapas, el hecho de que no exista reclutamiento de individuos de menos de 5 cm por la depredación de roedores y/o insectos junto con condiciones climáticas ocasiona que su hábitat sea hostil. Por tanto el valor asignado para este criterio es de **tres**.

El tercer criterio se refiere a la **vulnerabilidad biológica intrínseca del taxón**. En este criterio se evalúan factores relacionados con la historia o forma de vida propias del taxón que lo hacen vulnerable. Dependiendo de la disponibilidad de información específica, algunos ejemplos de tales factores pueden ser: estrategia reproductiva, parámetros demográficos más relevantes, historia de vida, fenología, intervalos de tolerancia, parámetros fisicoquímicos, aspectos alimentarios, variabilidad genética, grado de especialización, tasa de reclutamiento, efecto nodriza. El MER considera tres gradaciones numéricas de vulnerabilidad:

Vulnerabilidad alta	con un valor de tres
Vulnerabilidad media	con un valor de dos
Vulnerabilidad baja	con un valor de uno

Para *N. macrocephala* podemos contemplar que la estrategia reproductiva es 100% dependiente de los murciélagos, su demografía que según Vilchis (2000) y Esparza (1998) presenta ciertas limitantes, su gran longevidad unida a su lento crecimiento, la dependencia de especies que juegan el papel de nodriza en las primeras etapas de su desarrollo y que su variabilidad genética se esta perdiendo en los juveniles por la falta de reclutamiento de nuevos individuos a la población. Todos estos factores proporcionan que esta especie tenga una alta vulnerabilidad por lo que obtiene un valor de **tres**.

El último criterio se refiere al **impacto de la actividad humana sobre el taxón**. Es una estimación numérica de la magnitud del impacto y la tendencia que genera la influencia humana sobre el taxón que se analiza. Considera aspectos como la presión por asentamientos humanos,



fragmentación del hábitat, contaminación, uso, comercio, tráfico, cambio del uso de suelo, introducción de especies exóticas, realización de obras de infraestructura, entre otros. Se asignan tres posibilidades:

Alto impacto con un valor de **cuatro**

Impacto medio con un valor de **tres**

Bajo impacto con un valor de **dos**

En general estas cactáceas presentan presión por el comercio y tráfico de sus individuos. Además, *N. macrocephala* se encuentra en un hábitat fragmentado y es utilizada por los campesinos de la región para proveer forraje y agua al ganado caprino en época de secas (Esparza, 1998), por lo que se le asigna el valor de **tres**, presentando impacto medio.

El MER asume los siguientes intervalos de asignación de categorías de riesgo. Una especie o población cuya suma total se sitúe entre **12** y **14** puntos, será considerada como **“en peligro de extinción”**. Aquella cuya suma total de puntos se halle entre **10** y **11** se considerará como **amenazada**.

La sumatoria de todos los criterios establecidas al evaluar a *N. macrocephala*, es de **13** lo que nos permite sugerir que se coloque a esta especie en la categoría de **“en peligro de extinción”**.



PERSPECTIVAS SOBRE LA CONSERVACIÓN DE *Neobuxbaumia macrocephala*.

El hecho de que una especie crezca exclusivamente en cierta región hace que el sitio y la especie sean importantes, ya que no importa que se trasplanten a otro sitio con condiciones similares, nunca se repetirán las mismas formas de expresión morfológicas ni se podrá contener toda la diversidad genética en un solo fragmento de la población (Eguiarte, 1993). Además, la diversidad que podemos encontrar en las especies esta contenida en la información genética y una de las cualidades que se tiene es la recombinación de caracteres que hacen única a cada plántula y al momento de preservar solo un fragmento de la población se pierde mucha información genética.

En el caso particular de *Neobuxbaumia macrocephala*, además de ser endémica pertenece a la familia Cactaceae, que es explotada y amenazada por la extracción y comercialización de sus individuos desde la época de la conquista. Además para llegar a una forma adulta, pasan cientos de años ya que el crecimiento de estas especies es muy lento. De igual forma la polinización de *N. macrocephala*, su dispersión y el establecimiento de las semillas, dependen de interacciones bióticas muy específicas por lo que es más vulnerable su permanencia.

La importancia de *N. macrocephala*, dentro de un contexto ecológico, radica en que es fuente de alimento en verano, de tres especies de murciélagos que se presume son residentes del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Estos murciélagos consumen el néctar de las flores de *N. macrocephala* y otras especies del Valle, favoreciendo la polinización y flujo génico. Además se alimentan de los frutos y dispersan las semillas.

La madera de *N. macrocephala*, también es utilizada para la construcción de casas por los lugareños e incluso como fuente de forrajeo y agua en casos de extrema sequía. Este último uso en forma desmedida puede provocar daños a la especie, pero si se realiza de forma consciente se convierte en un almacén excelente del vital líquido.

De igual forma, el implemento de técnicas para evaluar posibles fuentes de alimento para los animales del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, también es realizado en UBIPRO, institución en la que se realizó el presente trabajo. Por lo que se están planeando nuevas alternativas de manejo de



esta reserva sin que por ello los pobladores se vean afectados, si no al contrario que se beneficien con los descubrimientos obtenidos.

Por otro lado, diversos organismos también utilizan a este tipo de cactáceas como hábitat un ejemplo es el pájaro carpintero que realiza en estas especies sus nidos (Arizmendi y Espinosa, 1996), además de que permiten crear microclimas y retienen el suelo, que es un problema constante en este tipo de ecosistemas.

N. macrocephala forma parte integral y activa del sistema ecológico del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, y el hecho de que exista flujo génico en esta especie y alta variabilidad, le provee de un arma eficaz para resistir enfermedades, aumentando sus oportunidades de sobrevivencia (Olfel *et al.*, 2001). Pero las dificultades que se presentan para el establecimiento de nuevos individuos ponen en peligro la presencia de la especie en el Valle, que es el sitio al que se ha restringido la distribución de esta especie.

Como una estrategia de conservación *ex situ* a corto plazo, se propone preservar el germoplasma de las poblaciones para futuras estrategias de propagación y reintroducción en la población original para promover la conservación *in situ*. Para llevar a cabo la preservación del germoplasma pueden utilizarse los métodos establecidos de recolección y procesamiento del mismo, para un almacenamiento a largo plazo en el banco de semillas de la UBIPRO-FES Iztacala (FAO/IPGRI, 1994). La reintroducción de los organismos debe realizarse bajo la sombra de plantas que funcionen como nodrizas, para asegurar a sobrevivencia y establecimiento de los mismos (Godínez-Alvarez *et al.*, 1999). De igual forma, ya que la depredación de los nuevos individuos se ve afectada por el ganado, sería oportuno mantener un control sobre los individuos introducidos.

De acuerdo a las características de las semillas, se puede utilizar la germinación directa de estas, para obtener los nuevos individuos y de esta forma evitar la pérdida de variabilidad que pueda producirse por otros medios.



Los resultados sobre la variabilidad genética nos permiten afirmar que no existe distinción entre las poblaciones que aquí se evaluaron, por lo que la obtención del germoplasma puede realizarse en cualquiera de los sitios que forman la población de *N. macrocephala* en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

De igual forma, basándose en los datos de variabilidad que se obtuvieron se puede proponer que la colecta de germoplasma sea de San Juan Raya y de San Martín. Estos sitios presentan una alta variabilidad y la forma de estructuración es diferente ya que en San Juan Raya se presenta mayor interacción con las demás zonas, en cambio San Martín tiene una estrecha relación entre sus individuos, además ambas zonas presentan mayor densidad poblacional que Cerro “La Yerba” o Los Reyes Metzontla. Así mismo, es deseable conservar las poblaciones genéticamente distintas, para mantener un máximo de diversidad genética entre las especies raras (Evans *et al.*, 2001), como es el caso de *N. macrocephala*.



5. CONCLUSIONES

- ◆ No se encontró agrupación alguna entre sitios de colecta y edades.
- ◆ Los parámetros de diversidad genética obtenidos para el total de la población fueron: 10.62% de la varianza contenida entre poblaciones, por lo que no existe estructuración, 23% de variabilidad contenida entre las poblaciones ($G'_{ST} = 0.229$), el equivalente al índice de diversidad de $\Phi_{ST} = 0.106$ y flujo génico mayor a 1 ($N_e m = 1.19$).
- ◆ Comparativamente en adultos y juveniles tampoco existe estructuración, la variabilidad fue mayor en adultos ($G'_{ST} = 0.2168$) que en juveniles ($G'_{ST} = 0.388$), de igual forma lo fue el equivalente al índice de diversidad (para adultos $\Phi_{ST} = 0.127$ y para juveniles $\Phi_{ST} = 0.073$), pero no así el flujo génico que fue mayor en juveniles ($N_e m = 1.79$) que en adultos ($N_e m = 0.97$).
- ◆ Los parámetros de diversidad genética fueron mayores a los observados en *N. tetetzo*, su congénere más ampliamente distribuido.
- ◆ Dado que muy poca de la varianza esta contenida entre poblaciones, se estima que no existe estructuración entre las poblaciones de *N. macrocephala*, ni de forma espacial ni temporal.
- ◆ Los murciélagos son un factor importante en el mantenimiento del flujo génico de *N. macrocephala*.
- ◆ La evaluación bajo los criterios del MER de *N. macrocephala*, permite sugerir que se le catalogue como en peligro de extinción.



6. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez-Buylla, E. R.,** García-Barrios, R. Lara-Moreno, C. and Martínez-Ramos, M. 1996. Demographic and genetic models in conservation biology: applications and perspectives for tropical rain forest species. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 27: 387-421.
- Apóstol, B.,** Black, W. C., Reiter, P. and Miller, B. R. 1996. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aede aegypti* in Puerto Rico. *Heredity*. 76: 325-334.
- Archibald, K. J.,** Wolf, G. P., Tepedino, J. V. and Bair, J. 2001. Genetic relationships and population structure of the endangered Steamboat buckwheat, *Eriogonum ovalifolium* var. *williamsiae* (Polygonaceae). *American Journal of Botany*. 88: 608-615.
- Arias, M. S.** 1993. Cactáceas: conservación y diversidad en México. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. 44: 109-115.
- Arias, M. S. Gama, L. S. y Guzmán-Cruz, L. U.** 1997. Cactaceae. *In*: P. Dávila et al. (eds.) *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. Fascículo 14. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 147 pp.
- Arizmendi, M. C. y A. Espinosa de los Monteros.** 1996. Avifauna de los bosques de cactáceas columnares en el Valle de Tehuacán, Puebla. *Acta Zoológica Mexicana. Acta Zoológica Mexicana*. 67: 25-46.
- Ayres, D. R. and Ryan F. J.** 1997. The clonal and population structure of a rare endemic plant, *Wyethia reticulata* (Asteraceae): allozyme and RAPD analysis. *Molecular Ecology* 6: 761-772.
- Ayres, D. R. and Ryan, F. J.** 1999. Genetic diversity and structure of the narrow endemic *Wyethia reticulata* and its congener *W. bolanderi* (Asteraceae), using RAPD and allozyme techniques. *American Journal of Botany* 86(3): 344-353.
- Becerra, R.** 2000. Las cactáceas, plantas amenazadas por su belleza. *Biodiversitas*. Año 6, núm. 18.
- Becerra, V. V. y Paredes C. M.** 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura técnica (Chile)*. 60(3): 270-281.
- Bergelson, J., Eli, S. Dudek, S. y Kreitman, M.** 1998. Genetic Variation Within Among Populations of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 148: 1311-1323.
- Bonnin, I., Prospero, J. M. and Oliveri, I.** 1996. Genetics Markers and Quantitative Genetic Variation in *Medicago truncatula* (leguminosae): A Comparative Analysis of Population Structure. *Genetics*. 143: 1795-1805.
- Bravo-Hollis, H.** 1978. Las cactáceas de México. 2a. ed. Vol. 1. UNAM. México D.F. 743 pp.



- Breyne, P., Buyschaert, C., Kremer, A., Van, M. M. and Van, G. A.** 1997. Distribution of genetic diversity within pilot species of the tropical forest. *Belg. J. Bot.* 129-160.
- Brummer, E. C. Bouton, J. H. and Kochert, G.** 1995. Analysis of annual *Medicago* species using RAPD markers. *Genome.* 38(2): 362-367.
- Bussell, J. D.** 1999. The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). *Molecular Ecology.* 8: 775-789.
- Condit, R. and Hubbell, S. P.** 1991. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genome. *Genome.* 34: 66-71.
- Cornejo, O. D. and Simpson, B. B.** 1997. Analysis of form and function in North american columnar cacti (Tribe Pachycereae). *American Journal of Botany.* 84(11): 1482-1501.
- Chávez, S. B.** 2000. Estudio de la variabilidad genética poblacional del cactus columnar *Neobuxbaumia tetetzo* en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla, México. Tesis de licenciatura. UNAM. ENEP-Iztacala. 36
- Chávez, S. B., Alejos, V. L. P. Campos, C. J. E., Martínez-García M., Mendoza, H. A., Simpson, J. y Zúñiga, B. G.** 1999. Estudio de la variabilidad genética intra específica para *Neobuxbaumia Tetetzo* en la región del Valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. Cactáceas y otras suculentas. II Congreso Mexicano. I Congreso Latinoamericano y del Caribe. Oaxaca, México. pág. 37.
- Crow, J. F. and Aoki, K.** 1984. Group selection for a polygenic behavioral trait: Estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 81: 6073-6077.
- Crisci, J. V. y López, A. M. F.** 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Cátedra de introducción a la Taxonomía. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de la Plata. La Plata, Argentina. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, D. C. 132 pp.
- Cruzan, B. M.** 1998. Genetic markers in plant evolutionary ecology. *Ecology.* 79(2): 400-412.
- Dávila, P. Villaseñor, J. L., Medina, R., Ramírez, A., Salinas, A., Sánchez-Ken, J. y Tenorio, P.** 1993. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Listados Florísticos de México X. Instituto de Biología, UNAM. México. D. F. 195 pp.
- Dellaporta, S. L., Wood, J. and Hicks, J. B.** 1983. A plant ADN miniprep: Version II. *Plant Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.
- Diario Oficial de la Federación.** 16 de mayo de 1994.
- Diario Oficial de la Federación.** 16 de Octubre del 2000. Primera sección. 10-11.



- Diario Oficial de la Federación.** 6 de marzo del 2002. Segunda sección. pp.1-84.
- Eguiarte, F. L. E. y Piñero, D.** 1990. Genética de la conservación: Leones vemos, genes no sabemos. *Ciencias especial.* (4): 34-46.
- Eguiarte, F. L. E.** 1993. El arca de Noé y la genética de la conservación. *La Jornada Ecológica.* 12-13.
- Esparza, O. L.** 1998. Estudio poblacional de *N. macrocephala*. Análisis matricial. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias UNAM. 69 pp.
- Evans, K. M., Ladiges, P. Y., Newbigin, E. y Ades P. K.** 2001. Genetic variation in *Banksia saxicola* (Proteaceae), a rare Australian plant with a markedly disjunct distribution. *Plant Systematics and Evolution.* 227: 105-115.
- FAO/IPGRI.** 1994. Gene bank standards, rome, food and agriculture organization of the united nations/international plant genetic. Resource institute.
- Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra, A., Seung-Chul K. and Crawford, D. J.** 2000. Plant genetic diversity in the Canary islands: a conservation perspective. *American Journal of Botany.* 87: 909-919.
- Gabrielsen, T. M., Bachmann, K., Jakobsen, K. S. and Brochmann, C.** 1997. Glacial survival does not matter: RAPD phylogeography of Nordic *Saxifraga oppositifolia*. *Molecular Ecology.* 6: 831-842.
- García, E.** 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de geografía. UNAM. México. 153 pp.
- Gepts, P.** 1990. Genetic diversity of seed storage proteins in plants. *In:* Brown, H. D., Clegg, M. T., Kahler, A. L. and Weir, B. S. (Eds.) *Plant population genetics, breeding and genetic resources.* Sunderland. Massachusetts, U.S.A. 64-82.
- Gitzendanner, M. A. and Soltis P. S.** 2000. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany.* 87: 783-792.
- Godínez-Álvarez, H. and Valiente-Banuet, A.** 1998. Germination and early seedling growth of Tehuacan Valley cacto species: the roles of soils and seed ingestions by dispersers on seedling growth. *Journal of Arid Enviroments.* 39: 21-31.
- Godínez-Álvarez, H., Valiente-Banuet, A. and Valiente, B. L.** 1999. Biotic interactions and the population dynamics of the long-lived columnar cactus *Neobuxbaumia tetetzo* in the Tehuacán Valley, México. *Canada Journal of Botany.* 77: 203-208.
- Godínez-Álvarez, H. O.** 2000. Dispersión biótica de semillas de *Neobuxbaumia tetetzo* (Coulter) Backeberg en el Valle de Tehuacán, Puebla. Tesis de Doctorado. Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del C. C. H. Instituto de Ecología. 200 pp.



- Guzmán, A. L.** 1993. El conocimiento de la biodiversidad en México. La Jornada Ecológica. 4-5.
- Guzmán, C., Aranda, U. D.** 1997. Propagación por semilla de diversas cactáceas. I Congreso Nacional sobre cactáceas. Colegio de postgraduados, Montecillo, Estado de México. pág 40.
- Hagen, M. J. y Hamrick, L.** 1998. Genetic Variation and population Genetic Structure in *Trifolium pratense*. The journal of Heredity 89(2): 178-181.
- Hamrick, J. L. and Godt, M. J. W.** 1990. Allozyme diversity in plant species. In: Plant population Genetics, Breeding and Genetic Resources (eds Brown ADH, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS). Sinauer Associates. Sunderland. M. A. 43-63.
- Hannan, G. L. and Orick, M. W.** 2000. Isozyme diversity in *Iris cristata* and the threatened glacial endemic *I. lacustris* (Iridaceae). *American Journal of Botany*. 87: 293-301.
- Hartl, G. B., Willing, R. and Nadlinger, K.** 1994. Allozymes in mammalian population genetics and systematics: Indicative function of a marker system reconsidered. In: B. Schierwater, B. Streit, G. P. Wagner, R. De Salle (eds.): Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications. Experientia Supplementum 69. Birkhäuser Verlag, Basel: 299-310.
- Hongwen, H., Dane, F. and Kubisiak, T. L.** 1998. Allozyme and RAPD analysis of the genetic diversity and geographic variation in wild populations of the *American chestnut* (fagaceae). *American Journal of Botany*. 85(7): 1013-1021.
- Hu, J., Van, E. J. and Quiros, C. F.** 1995. Generation of ADN-based markers in specific genome region by two-primer RAPD reactions. *PCR Methods Appl*. 4(6): 346-351.
- Huff, D. R., and Smouse, P. E.** 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss *Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm. *Theoretical and Applied Genetics*. 87: 416-422.
- Hunt, D.** 1992. Cites Cactaceae. Check List. Edit. Royal Botanic Gardens KEW. U. K. 190 pp.
- Kalisz, S., Nason, J. D., Hanzawa, F. M. and Tensor, S. J.** 2001. Spatial population genetic structure in *Trillium grandiflorum*: the roles of dispersal, mating, history, and selection. *Evolution*. 55(8): 1560-1568.
- Karron, J. D.** 1987. A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners. *Evolutionary Ecology*. 1: 47-58.
- Kim, I. S., Hyun, J. O. and Hong, K. N.** 2001. Genetic structure of *Abies koreana* based on RAPD marker analysis. Conference of the Western Forest Genetics Association. A Forest Tree Genome Database.
- Krauss, S. L.** 2000. Accurate gene diversity estimates from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Molecular Ecology*. 9: 1241-1245.



- Linch, M.** and Milligan, B. G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD marker. *Molecular Ecology*. 3: 91-99.
- Loza, C.** y Terrazas, T. 1997. Características epidérmicas en Cactoideae. I Congreso Nacional sobre Cactáceas. Colegio de postgraduados, Montecillo, Estado de México. pág 42.
- Luna, R. R.,** Epperson, B. y Oyama N. K. 2001. Estructura genética espacial de dos especies de palmas simpátricas del género *Chamaedorea* (*C. tepejilote* y *C. elatior*) con historias de vida contrastantes. XV Congreso Mexicano de Botánica. Los retos de la botánica en el presente siglo. Querétaro, Querétaro. pág 110.
- Mantel, N.** 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27: 209-220.
- Martín, C.,** González-Benito, M. E. and Iriondo, J. M. 1997. Genetic diversity within and among populations of a threatened species: *Erodium paularense* fer. Gonz. and Izco. *Molecular Ecology*. 6: 813-820.
- Martínez-García M.,** Chávez, B., Zúñiga, G., Valiente-Banuet, A. and Campos J. E. 2002. Genetic diversity an *Neobuxbaumia tetetzo* (Cactaceae) using RAPD markers. *American*
- Martínez-Palacios, A.,** Eguiarte, L. E. and Glenn, R. F. 1999. Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert. *American Journal of Botany*. 86: 1093-1098.
- Montalvo, M. A.,** Conard, S. G., Thompson, C. M. and Hodgskiss, D. P. 1997. Population structure, genetic diversity, and clone formation in *Quercus chrysolepis* (Fagaceae) *American Journal of Botany* 84(11): 1553-1564.
- Moreno, C. P,** y Sánchez, R. G. 1990. La enseñanza de la ecología en México. *Ciencias especial* 4: 96-111.
- Mostafa, K. T.,** Osama, A., El-kholi, E. El-hinnawi, Holdgate, M. W., Memichael, D. F. and Munn, R. E. 1992. *The World Environment 1972-1992: Two Decades of Challenge.* Chapman and Hall. pág. 884.
- Navarro, Q. A. R.** 1999. Estructura genética y procesos de especiación de *Agave cerulata* (Trel.) y *Agave subsimplex* (Trel.) en el desierto Sonorense a partir de RAPD's. Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Ciencias. 96 pp.
- Nei, M.** 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*. 106(949): 283-292.
- Olfelt, J. P.,** Furnier, G. R. and Luby J. J. 2001. What data determine whether a plant taxon is distinct enough to merit legal protection? A case study of *Sedum integrifolium* (Crassulaceae). *American Journal of Botany*. 88: 401-410.



- Otero, A. A., Cruz, M. y Oyama K. 1997. El uso de los RAPDS como marcadores moleculares en plantas. Boletín de la Sociedad Botánica. México. 60: 85-117.
- Parker, C. K. and Hamrick, J. L. 1992. Genetic diversity and clonal structure in a columnar cactus, *Lophocereus schottii*. American Journal of Botany 79(1): 86-96.
- Persson, H. A., Lundquist, K. and Nybom, H. 1998. RAPD analysis of genetic variation within and among populations of *Turk's-cap lily* (*Lilium martagon* L.). Hereditas. 128: 213- 220.
- Ranker, T. A. 1994. Evolution of high genetic variability in the rare Hawaiian fern *Adenophorus periens* and implications for conservation management. Biological Conservation. 70: 19-24.
- Rojas, A., Vázquez, Y. y Orozco, S. 1997. Efecto de la temperatura en la germinación de siete especies de cactáceas del Valle de Zapotitlán-Salinas, Puebla, México. I Congreso Nacional sobre Cactáceas. Colegio de postgraduados, Montecillo, Estado de México. pág 73.
- Rojas, M. A. 1996. Estudio poblacional de tres especies de murciélagos nectarívoros considerados como migratorios y su relación con la presencia estacional de los recursos florales en el Valle de Tehuacán. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM. 88 pp.
- Rojas-Martínez, A., Valiente-Banuet, A., Arizmendi, M. C., Alcántara-Eguren, A. y Arita H. T. 1999. Seasonal distribution of the long-nosed bat (*Leptonycteris curasoae*) in North America: does a generalized migration pattern really exist?. Journal of Biogeography. 26: 1065-1077.
- Rzedowski, J. 1991 Vegetación de México. Limusa México. México, D.F. 432 pp.
- Sánchez-Mejorada, H. 1982. Mexico's problems and programmes monitoring trade in common and endangered Cacti. The Cactaceae Succulent Journal (GB). 42(2): 36-38.
- Simpson, J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms (AFLP's). Boletín de la Sociedad Botánica. México. 60: 119-122.
- Smith, J. F., and Vuong P. T. 1996. Genetic diversity of the narrow endemic *Allium aaseae* (Alliaceae). American Journal of Botany. 83(6): 717-726.
- Sostuyo, V. J. S. 1999. Estructura genética de tres especies endémicas de *Caesalpinia* (Leguminosae; Carsalpinioideae) en la depresión del Río Balsas y Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. 90 pp.
- Stebbins, G. L. 1980 Rarity of plant species: a synthetic viewpoint. Rhodora. 82: 77-86.
- Steenbergh, W.F. and Lowe, C. H. 1977. Ecology of the Saguaro: II. Reproduction, germination, establishment, growth, and survival of the young plant. US National Park Service, Monograph Series Number 8, US Government Printing Office, Washington, DC.



- Stewart, C. N. Jr.** and Excoffier, L. 1996. Assessing population genetic structure and variability with RAPD data: Application to *Vaccinium macrocarpon* (American cranberry). *Journal of Evolutionary Biology* 9: 153-171.
- Strauss, R. E.** 1982. Statical significance of species clusters in association analysis. *Ecology*. 63: 634-639.
- Tarayre, M.,** Saumitou-Laprade, P. Cuguen, J. Couvet, D. and Thompson, J. D. 1997. The espacial genetic structure of cytoplasmic (cpADN) and nuclear (alloenzyme) markers within and among populations of the gynodioecious *Thymus vulgaris* (Labiatae) in Southern France. *American Journal of Botany* 84(12): 1675-1684.
- Tellez, V. O.** y Dávila, A. P. 2001. Nuevos enfoques y resultados para la conservación de la biodiversidad en la zona árida mexicana. XV Congreso Mexicano de Botánica. Los retos de la botánica en el presente siglo. Querétaro, Querétaro. Pág. 60.
- Tohme, J.,** González, O., Beebe, S. and Duque, M. 1996. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. *Crop Science* 36: 1375-1384.
- Valiente-Banuet, A.** 1991a. Dinámica del Establecimiento de Cactáceas: Patrones Generales y Consecuencias de los Procesos de Facilitación por Plantas Nodrizas en Desiertos. Tesis Doctoral, UACPyP-CCH. Centro de Ecología. UNAM. México.
- Valiente-Banuet, A.** and Ezcurra, E. 1991b. Shade as a cause of the association between the cactus *Neobuxbaumia tetetzo* and the nurse shrub *Mimosa luisiana*. *J. Vegetation. Sciencie.* 2: 11-14.
- Valiente-Banuet, A.,** Dávila, P., Arizmendi, M. C., Rojas, A. y Casas, A. 1995. Bases Ecológicas del desarrollo sustentable en zonas áridas: El caso de los bosques de cactáceas columnares en el Valle de Tehuacán y Baja California Sur, México. Enb: G. M. Anaya y C. Díaz Editores. Memorias del IV curso sobre desertificación y desarrollo sustentable. PNUMA, FAO. Colegio de postgraduados, Chapingo, México. 20-36.
- Valiente-Banuet, A.,** Arizmendi, M. C. y Rojas-Martínez, A. 1996a. Nectar-feeding bats in columnar cacti forest of Central Mexico. *Bats* 14:12-15.
- Valiente-Banuet, A.,** Arizmendi, M. C., Rojas-Martínez, A. and Dominguez-Canseco, L. 1996b. Ecological relationships between columnar cacti and nectar-feeding bats in México. *J. Trop. Ecol.* 11: 1-17.
- Valiente-Banuet, A.,** Rojas-Martínez, A., Arizmendi M. C. and Dávila, P. 1997. Pollination biology of two columnar cacti (*Neobuxbaumia mezcalaensis* and *Neobuxbaumia macrocephala*) in the Tehuacán Valley, central México. *American Journal of Botany.* 84(4): 452-455.
- Valiente-Banuet, A.,** Casas, A. Alcántara, P. Dávila, Noe Flores-Hernández, M. C. Arizmendi, J. Ortega Ramírez y J. A. Soriano. 2000. La Vegetación del Valle de Tehuacán-



Cuicatlán. Aceptado en el Boletín de la Sociedad Botánica de México 67.

- Van, H. A. W.,** and Bachmann, K. 1992. Genotype relationships in *Microseris elegans* (Asteraceae, Lactuceae) revealed by ADN amplification from arbitrary oligonucleotidos (RAPDs). *Plant Systematics and Evolution*. 179: 221-233.
- Vierling, R. A.** and Nguyen, H. T. 1992. Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of diploid wheat genotypes. *Theoretical and Applied Genetics*. 87: 835-838.
- Vilchis, A. B. E.** 2000. Estudio poblacional por edades de *Neobuxbaumia macrocephala* (Cactaceae) en Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de ciencias. 63 pp.
- Villaseñor, J. L.,** Dávila, P. y Chiang, F. 1990. Fitogeografía del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica*. México. 50: 135-149.
- Vite, G.,** Portilla, G., Zavala, H., Valverde, P., Díaz, S. y Arias, M. 1997. *X Cephalobuxbaumia zapotitlana*, un híbrido natural de dos especies de cactáceas columnares de la región de Tehuacán-Cuicatlán. I Congreso Nacional sobre Cactáceas. Colegio de postgraduados, Montecillo, Estado de México. 26 al 29 de noviembre. 61 pp.
- Wachira, F. N.,** Waugh, R., Hackett, C. A. and Powell, W. 1995. Detection of genetic diversity in tea (*Camellia sinensis*) using RAPD markers. *Genome*. 38(2): 201-210.
- Wang, Z. Y.,** Second, G. and Tanskley, S. D. 1992. Polymorphism and phylogenetic relationships among species in the genus *Oryza* as determined by analysis of nuclear RFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*. 83: 565-581.
- Whitkus, R.,** de la Cruz, M., Mota-Bravo, L. and Gómez-Pompa, A. 1998. Genetic diversity of tropical crops maintained by ancient cultures: an example in Cacao. *Theoretical and Applied Genetics*. 96(5): 621-627.
- Williams, J. G. K.,** Kubelik A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1990. ADN polymorphisms amplified by arbitrary oligonucleotidos are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18(22): 6531-6535.
- Wolf, A. T.,** Howe, R. W. and Hamrick J. L. 2000. Genetic diversity and population structure of the serpentine endemic *Calystegia collina* (Convolvulaceae) in northern California. *American Journal of Botany*. 87: 1138-1146.
- Wong, K. C. and** Sun, M. 1999. Reproductive Biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). *American Journal of Botany*. 86(10): 1406-1413.
- Zavala-Hurtado, J. A.** 1982. Estudios ecológicos en el Valle de Zapotitlán, Puebla. I. Clasificación numérica de la vegetación basada en atributos binarios de presencia de las especies. *Biotica* 7: 99-120.



- Zavala-Hurtado, J. A.** and Díaz-Solis, A. 1995. Repair, growth, age and reproduction in the gigant columnar cactus *Cephalocereus columna-trajani* (Karwinki ex. Pfeiffer) Schuman (Cactaceae). *Journal of Arid Enviroments*. 31: 21-31
- Zoro, B., I.** Maquet, A. and Baudoin, J-P.1997. Spatial patterns of allozyme variants within three wild populations of *Phaseolus lunatus* L. From the central Valley of Costa Rica. *Belg. Journ. Bot.* 129 (2): 149-155.
- Zhivotovsky, L. A.** 1999. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology*. 8: 907-913.



ANEXO.

Matriz de similitud con el índice de Jaccard.

CY6	CY1	CY2	CY3	J	CY4	CY5	MZ1	MZ2	MZ3	J	MZ4	MZ5	MZ6	MZ7	MZ8	MZ9	MZ10	J	MZ11	MZ12	MZ13	MZ14	MZ15																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
SJR1	1	SJR1	2	J	SJR1	4	SJR1	5	SJR2	1	SJR2	2	SJR2	3	SJR2	4	SJR2	5	J	SJR3	1	J	SJR3	2	J	SJR3	3	SJR3	4	J	SJR3	5	J	SJR4	1	SJR4	2	SJR4	3	SJR4	4	SJR4	5	SJR5	1	SJR5	2	SJR5	3	SJR5	4	SJR5	5	SJR6	1	SJR6	2	SJR6	3	SJR6	4	SM1	1	SM1	2	SM1	3	SM1	4	SM1	5	J	SM1	6	SM1	7	SM1	8	SM2	1	SM2	2	J	SM2	4	SM2	5	SM2	7	J	SM2	9	SM2	10	J	SM3	1	J	SM3	2	SM3	3	J	SM3	4	J	SM3	5	SM3	6	SM3	7	J	SM3	8	J	SM3	9	J	SM3	10	SM4	1	SM4	2	J	SM4	3	SM4	4	J	SM4	5	J	SM4	6	J	SM4	7	SM4	8	J	SM4	9	SM4	10	MezII	2	MezIII	3	MezIV	1	MezVII	1	MezVII	2	MezVII	3	MezVII	4	MezVII	5	MezVII	6	MezVII	7	MezVII	8	MezVII	9	MezVII	10	MezVII	11	MezVII	12	MezVII	13	MezVII	14	MezVII	15	MezVII	16	MezVII	17	MezVII	18	MezVII	19	MezVII	20	MezVII	21	MezVII	22	MezVII	23	MezVII	24	MezVII	25	MezVII	26	MezVII	27	MezVII	28	MezVII	29	MezVII	30	MezVII	31	MezVII	32	MezVII	33	MezVII	34	MezVII	35	MezVII	36	MezVII	37	MezVII	38	MezVII	39	MezVII	40	MezVII	41	MezVII	42	MezVII	43	MezVII	44	MezVII	45	MezVII	46	MezVII	47	MezVII	48	MezVII	49	MezVII	50	MezVII	51	MezVII	52	MezVII	53	MezVII	54	MezVII	55	MezVII	56	MezVII	57	MezVII	58	MezVII	59	MezVII	60	MezVII	61	MezVII	62	MezVII	63	MezVII	64	MezVII	65	MezVII	66	MezVII	67	MezVII	68	MezVII	69	MezVII	70	MezVII	71	MezVII	72	MezVII	73	MezVII	74	MezVII	75	MezVII	76	MezVII	77	MezVII	78	MezVII	79	MezVII	80	MezVII	81	MezVII	82	MezVII	83	MezVII	84	MezVII	85	MezVII	86	MezVII	87	MezVII	88	MezVII	89	MezVII	90	MezVII	91	MezVII	92	MezVII	93	MezVII	94	MezVII	95	MezVII	96	MezVII	97	MezVII	98	MezVII	99	MezVII	100



0.357	0.309	0.449	0.302	0.455	0.311	0.471	0.404	0.170	0.327	0.467	0.391	0.309	0.354	0.417	0.457	1.000			
0.157	0.360	0.208	0.194	0.103	0.186	0.286	0.218	0.237	0.277	0.245	0.250	0.313	0.328	0.417	0.189	0.170	0.288	0.258	
0.258	0.194	0.327	0.183	0.245	0.271	0.400	0.447	0.185	0.367	0.333	0.375	0.542	0.314	0.346	0.438	0.358	1.000		
0.279	0.391	0.333	0.346	0.277	0.375	0.333	0.286	0.380	0.411	0.295	0.310	0.405	0.328	0.455	0.311	0.289	0.340	0.345	
0.321	0.346	0.353	0.396	0.265	0.326	0.304	0.391	0.111	0.286	0.362	0.319	0.273	0.370	0.404	0.383	0.360	0.373	1.000	
0.378	0.315	0.489	0.510	0.340	0.553	0.316	0.273	0.333	0.483	0.231	0.339	0.222	0.333	0.291	0.347	0.300	0.429	0.373	
0.421	0.510	0.310	0.609	0.278	0.280	0.333	0.315	0.426	0.296	0.315	0.278	0.283	0.628	0.377	0.333	0.316	0.242	0.377	
1.000																			
0.225	0.234	0.317	0.255	0.200	0.224	0.319	0.295	0.235	0.352	0.378	0.346	0.262	0.340	0.289	0.233	0.209	0.295	0.283	
0.333	0.231	0.212	0.271	0.333	0.275	0.396	0.289	0.200	0.239	0.349	0.514	0.306	0.326	0.395	0.283	0.378	0.362	0.250	
0.314	1.000																		
0.282	0.283	0.310	0.275	0.170	0.271	0.370	0.318	0.208	0.345	0.368	0.315	0.227	0.333	0.255	0.286	0.233	0.318	0.278	
0.302	0.226	0.231	0.265	0.295	0.238	0.447	0.283	0.196	0.234	0.372	0.629	0.300	0.349	0.356	0.277	0.370	0.300	0.271	
0.333	0.571	1.000																	
0.188	0.294	0.240	0.333	0.216	0.333	0.273	0.226	0.449	0.306	0.255	0.322	0.298	0.411	0.294	0.245	0.176	0.226	0.288	
0.226	0.286	0.315	0.278	0.231	0.283	0.389	0.347	0.192	0.383	0.375	0.255	0.309	0.383	0.308	0.340	0.373	0.358	0.308	
0.339	0.265	0.235	1.000																
0.333	0.300	0.488	0.511	0.298	0.523	0.278	0.306	0.346	0.404	0.261	0.351	0.224	0.322	0.300	0.333	0.311	0.391	0.293	
0.471	0.420	0.296	0.511	0.235	0.261	0.345	0.300	0.356	0.255	0.300	0.260	0.246	0.524	0.367	0.347	0.327	0.203	0.396	
0.682	0.298	0.292	0.327	1.000															
0.273	0.186	0.205	0.213	0.146	0.233	0.279	0.282	0.167	0.347	0.375	0.340	0.150	0.306	0.275	0.211	0.184	0.250	0.271	
0.245	0.213	0.167	0.227	0.289	0.158	0.333	0.214	0.175	0.163	0.275	0.485	0.188	0.220	0.233	0.209	0.310	0.239	0.233	
0.250	0.621	0.455	0.196	0.200	1.000														
0.256	0.289	0.286	0.306	0.256	0.333	0.265	0.239	0.465	0.281	0.275	0.296	0.233	0.246	0.318	0.293	0.209	0.213	0.236	
0.259	0.280	0.260	0.298	0.217	0.214	0.241	0.261	0.149	0.239	0.318	0.191	0.208	0.295	0.333	0.255	0.292	0.231	0.364	
0.314	0.227	0.170	0.442	0.356	0.175	1.000													
0.143	0.444	0.298	0.340	0.220	0.288	0.408	0.391	0.273	0.404	0.318	0.453	0.224	0.368	0.354	0.250	0.283	0.488	0.415	
0.389	0.246	0.400	0.259	0.340	0.289	0.370	0.383	0.196	0.306	0.383	0.340	0.291	0.280	0.457	0.467	0.568	0.246	0.288	
0.345	0.298	0.378	0.302	0.360	0.227	0.271	1.000												
0.233	0.409	0.318	0.388	0.234	0.422	0.500	0.452	0.241	0.481	0.341	0.480	0.188	0.415	0.409	0.357	0.333	0.564	0.440	
0.440	0.333	0.396	0.383	0.429	0.279	0.365	0.378	0.234	0.298	0.409	0.333	0.308	0.356	0.524	0.400	0.500	0.283	0.391	
0.420	0.261	0.341	0.245	0.383	0.308	0.261	0.512	1.000											
0.342	0.333	0.514	0.535	0.366	0.512	0.362	0.283	0.327	0.389	0.325	0.263	0.196	0.304	0.277	0.410	0.350	0.341	0.321	
0.346	0.435	0.300	0.432	0.289	0.262	0.327	0.277	0.273	0.255	0.304	0.318	0.269	0.553	0.348	0.326	0.362	0.245	0.292	
0.438	0.302	0.326	0.280	0.465	0.195	0.302	0.400	0.333	1.000										
0.146	0.488	0.277	0.273	0.200	0.269	0.333	0.286	0.327	0.362	0.295	0.310	0.311	0.400	0.455	0.255	0.234	0.400	0.321	
0.396	0.207	0.380	0.241	0.319	0.357	0.327	0.488	0.154	0.400	0.362	0.292	0.400	0.286	0.535	0.512	0.388	0.429	0.500	
0.304	0.304	0.298	0.333	0.314	0.205	0.364	0.396	0.455	0.319	1.000									
0.220	0.283	0.279	0.250	0.146	0.245	0.340	0.289	0.255	0.298	0.333	0.291	0.286	0.358	0.283	0.317	0.262	0.261	0.302	
0.278	0.250	0.255	0.240	0.267	0.268	0.308	0.204	0.170	0.261	0.311	0.390	0.226	0.261	0.245	0.250	0.313	0.275	0.245	
0.236	0.410	0.514	0.260	0.240	0.297	0.196	0.216	0.255	0.213	0.271	1.000								
0.172	0.453	0.304	0.339	0.177	0.317	0.397	0.357	0.344	0.415	0.296	0.413	0.286	0.452	0.400	0.263	0.291	0.333	0.450	
0.403	0.317	0.547	0.270	0.339	0.321	0.387	0.375	0.177	0.333	0.351	0.316	0.339	0.288	0.274	0.444	0.397	0.431	0.362	
0.303	0.237	0.276	0.350	0.270	0.200	0.281	0.333	0.375	0.230	0.386	0.423	1.000							
0.185	0.460	0.327	0.339	0.211	0.316	0.400	0.385	0.322	0.419	0.320	0.371	0.283	0.410	0.404	0.283	0.314	0.358	0.456	
0.383	0.295	0.529	0.267	0.365	0.347	0.414	0.377	0.150	0.358	0.377	0.365	0.317	0.309	0.271	0.423	0.400	0.411	0.364	
0.302	0.232	0.273	0.305	0.267	0.216	0.255	0.333	0.377	0.268	0.339	0.373	0.833	1.000						
0.154	0.500	0.275	0.271	0.161	0.291	0.460	0.360	0.321	0.377	0.265	0.397	0.280	0.390	0.353	0.280	0.340	0.360	0.463	
0.362	0.293	0.542	0.263	0.314	0.348	0.345	0.408	0.140	0.388	0.380	0.314	0.316	0.259	0.315	0.489	0.431	0.364	0.340	
0.279	0.226	0.294	0.304	0.286	0.184	0.275	0.412	0.438	0.241	0.392	0.467	0.750	0.667	1.000					
0.300	0.298	0.429	0.429	0.250	0.462	0.368	0.304	0.274	0.391	0.288	0.323	0.232	0.359	0.213	0.353	0.417	0.304	0.400	
0.292	0.455	0.317	0.400	0.309	0.340	0.339	0.254	0.273	0.259	0.321	0.286	0.212	0.460	0.288	0.271	0.300	0.212	0.246	
0.361	0.228	0.340	0.279	0.328	0.167	0.167	0.185	0.298	0.333	0.226	0.365	0.348	0.328	0.328	1.000				
0.173	0.458	0.294	0.288	0.200	0.309	0.396	0.353	0.339	0.371	0.340	0.367	0.300	0.431	0.429	0.275	0.280	0.380	0.455	
0.429	0.267	0.563	0.281	0.360	0.370	0.339	0.429	0.138	0.353	0.346	0.308	0.407	0.302	0.333	0.479	0.396	0.434	0.309	
0.295	0.245	0.288	0.321	0.281	0.157	0.269	0.377	0.373	0.259	0.412	0.396	0.735	0.620	0.711	0.302	1.000			
0.191	0.444	0.220	0.203	0.151	0.218	0.380	0.333	0.228	0.290	0.234	0.305	0.250	0.345	0.354	0.250	0.283	0.362	0.364	
0.316	0.203	0.489	0.214	0.313	0.318	0.321	0.444	0.089	0.333	0.354	0.286	0.392	0.280	0.367	0.435	0.380	0.420	0.367	
0.254	0.196	0.292	0.278	0.214	0.174	0.271	0.360	0.413	0.189	0.396	0.292	0.509	0.434	0.600	0.242	0.622	1.000		



0.217	0.300	0.298	0.340	0.151	0.314	0.211	0.231	0.522	0.290	0.208	0.242	0.250	0.300	0.275	0.250	0.283	0.231	0.230
0.316	0.291	0.296	0.283	0.167	0.234	0.233	0.275	0.173	0.208	0.204	0.212	0.224	0.280	0.241	0.294	0.232	0.246	0.396
0.370	0.196	0.216	0.353	0.360	0.174	0.419	0.259	0.300	0.260	0.340	0.265	0.379	0.357	0.358	0.305	0.327	0.308	1.000
0.333	0.352	0.380	0.436	0.255	0.415	0.400	0.385	0.300	0.467	0.320	0.349	0.193	0.365	0.281	0.333	0.396	0.358	0.431
0.339	0.411	0.368	0.382	0.365	0.294	0.367	0.327	0.278	0.333	0.352	0.365	0.254	0.440	0.316	0.321	0.375	0.274	0.293
0.390	0.255	0.296	0.283	0.310	0.216	0.211	0.310	0.327	0.340	0.271	0.346	0.397	0.377	0.404	0.417	0.421	0.333	0.288
1.000																		
0.357	0.269	0.319	0.286	0.240	0.308	0.400	0.354	0.224	0.397	0.341	0.345	0.245	0.362	0.222	0.271	0.333	0.300	0.382
0.310	0.309	0.291	0.278	0.391	0.283	0.316	0.269	0.216	0.250	0.347	0.362	0.241	0.327	0.360	0.241	0.296	0.286	0.308
0.250	0.348	0.370	0.207	0.211	0.310	0.192	0.211	0.347	0.280	0.283	0.370	0.328	0.305	0.327	0.444	0.321	0.278	0.278
0.426	1.000																	
0.385	0.370	0.475	0.468	0.283	0.512	0.489	0.442	0.308	0.500	0.400	0.415	0.261	0.357	0.313	0.381	0.390	0.409	0.431
0.304	0.438	0.360	0.467	0.452	0.333	0.358	0.340	0.255	0.319	0.432	0.386	0.211	0.512	0.327	0.333	0.457	0.255	0.327
0.385	0.311	0.364	0.314	0.347	0.268	0.229	0.294	0.370	0.356	0.300	0.364	0.368	0.370	0.373	0.471	0.365	0.294	0.222
0.510	0.457	1.000																
0.224	0.353	0.383	0.364	0.226	0.315	0.587	0.545	0.233	0.424	0.378	0.473	0.231	0.323	0.278	0.306	0.340	0.333	0.386
0.339	0.316	0.345	0.333	0.523	0.265	0.368	0.327	0.161	0.308	0.533	0.367	0.250	0.333	0.392	0.296	0.460	0.271	0.315
0.300	0.300	0.320	0.259	0.263	0.261	0.275	0.309	0.438	0.264	0.291	0.294	0.448	0.455	0.407	0.397	0.351	0.358	0.286
0.356	0.377	0.429	1.000															
0.217	0.182	0.271	0.268	0.151	0.288	0.353	0.280	0.273	0.333	0.289	0.283	0.224	0.238	0.182	0.250	0.229	0.208	0.250
0.210	0.246	0.186	0.283	0.286	0.184	0.276	0.204	0.130	0.280	0.327	0.313	0.164	0.306	0.264	0.179	0.278	0.203	0.314
0.298	0.271	0.348	0.255	0.259	0.256	0.245	0.172	0.275	0.260	0.264	0.378	0.311	0.310	0.333	0.375	0.281	0.236	0.360
0.310	0.438	0.320	0.412	1.000														
0.122	0.422	0.224	0.273	0.154	0.269	0.333	0.313	0.255	0.362	0.239	0.310	0.255	0.328	0.362	0.229	0.261	0.400	0.370
0.321	0.207	0.438	0.241	0.319	0.357	0.304	0.391	0.154	0.400	0.362	0.292	0.373	0.260	0.320	0.477	0.388	0.321	0.269
0.304	0.224	0.271	0.333	0.288	0.178	0.250	0.457	0.422	0.240	0.404	0.326	0.549	0.471	0.614	0.246	0.636	0.523	0.340
0.364	0.236	0.300	0.365	0.314	1.000													
0.133	0.277	0.167	0.138	0.167	0.148	0.280	0.229	0.161	0.271	0.262	0.286	0.279	0.327	0.364	0.222	0.227	0.311	0.296
0.273	0.179	0.300	0.212	0.318	0.262	0.232	0.224	0.098	0.255	0.277	0.318	0.245	0.157	0.265	0.245	0.306	0.347	0.240
0.150	0.333	0.295	0.164	0.145	0.225	0.143	0.212	0.250	0.137	0.292	0.425	0.389	0.392	0.367	0.241	0.417	0.286	0.167
0.291	0.280	0.271	0.314	0.235	0.409	1.000												
0.375	0.280	0.429	0.458	0.333	0.500	0.308	0.313	0.302	0.411	0.357	0.333	0.229	0.328	0.333	0.372	0.349	0.286	0.298
0.321	0.400	0.302	0.489	0.378	0.267	0.352	0.280	0.304	0.340	0.306	0.348	0.228	0.465	0.245	0.300	0.283	0.228	0.294
0.404	0.277	0.298	0.283	0.367	0.262	0.277	0.218	0.333	0.409	0.222	0.298	0.362	0.389	0.315	0.407	0.286	0.218	0.340
0.415	0.360	0.548	0.392	0.340	0.294	0.240	1.000											
0.193	0.481	0.281	0.297	0.197	0.362	0.373	0.310	0.323	0.394	0.273	0.348	0.241	0.406	0.375	0.241	0.246	0.310	0.450
0.359	0.277	0.547	0.290	0.293	0.321	0.323	0.426	0.159	0.333	0.328	0.316	0.361	0.288	0.317	0.472	0.397	0.361	0.295
0.303	0.217	0.276	0.306	0.250	0.158	0.259	0.379	0.328	0.250	0.317	0.370	0.614	0.571	0.585	0.309	0.635	0.481	0.290
0.419	0.286	0.345	0.377	0.290	0.519	0.364	0.295	1.000										
0.196	0.280	0.304	0.321	0.154	0.320	0.447	0.432	0.302	0.463	0.500	0.407	0.283	0.453	0.362	0.283	0.289	0.400	0.370
0.370	0.273	0.380	0.314	0.442	0.326	0.587	0.333	0.154	0.400	0.488	0.442	0.273	0.400	0.375	0.383	0.478	0.346	0.320
0.327	0.364	0.356	0.388	0.340	0.325	0.250	0.396	0.362	0.319	0.320	0.326	0.411	0.442	0.392	0.288	0.412	0.340	0.241
0.415	0.360	0.444	0.365	0.340	0.467	0.292	0.404	0.362	1.000									
0.196	0.296	0.294	0.310	0.158	0.286	0.233	0.255	0.500	0.328	0.212	0.224	0.327	0.317	0.296	0.275	0.255	0.232	0.290
0.290	0.288	0.271	0.327	0.259	0.340	0.317	0.400	0.200	0.408	0.321	0.214	0.333	0.327	0.263	0.365	0.254	0.310	0.286
0.386	0.222	0.264	0.542	0.377	0.135	0.347	0.281	0.250	0.236	0.309	0.288	0.328	0.328	0.375	0.281	0.345	0.304	0.490
0.286	0.194	0.291	0.262	0.281	0.358	0.172	0.358	0.328	0.358	1.000								
0.200	0.380	0.354	0.316	0.161	0.340	0.521	0.511	0.254	0.448	0.348	0.473	0.280	0.414	0.302	0.280	0.340	0.417	0.436
0.386	0.293	0.345	0.333	0.489	0.348	0.444	0.353	0.182	0.417	0.500	0.367	0.250	0.388	0.392	0.400	0.490	0.316	0.268
0.345	0.300	0.320	0.304	0.558	0.234	0.182	0.385	0.408	0.264	0.315	0.435	0.448	0.481	0.551	0.350	0.453	0.358	0.241
0.404	0.352	0.458	0.462	0.385	0.449	0.340	0.340	0.424	0.543	0.400	1.000							
0.304	0.245	0.357	0.286	0.281	0.366	0.345	0.209	0.452	0.267	0.264	0.213	0.286	0.354	0.356	0.302	0.279	0.364	0.365
0.246	0.264	0.435	0.306	0.341	0.421	0.346	0.525	0.118	0.538	0.419	0.372	0.396	0.395	0.432	0.476	0.354	0.426	0.370
0.296	0.239	0.289	0.354	0.231	0.190	0.239	0.333	0.386	0.255	0.400	0.318	0.407	0.440	0.478	0.281	0.468	0.488	0.231
0.358	0.300	0.378	0.388	0.306	0.500	0.341	0.313	0.434	0.432	0.353	0.447	1.000						
0.293	0.348	0.289	0.308	0.208	0.306	0.347	0.326	0.264	0.351	0.310	0.276	0.267	0.316	0.292	0.357	0.333	0.298	0.263
0.241	0.283	0.288	0.354	0.364	0.310	0.340	0.378	0.160	0.356	0.409	0.304	0.236	0.386	0.362	0.313	0.320	0.308	0.391
0.340	0.234	0.255	0.294	0.275	0.186	0.289	0.250	0.348	0.277	0.333	0.255	0.328	0.352	0.353	0.321	0.296	0.383	0.300
0.377	0.294	0.465	0.353	0.300	0.306	0.250	0.422	0.328	0.391	0.373	0.380	0.452	1.000					



0.279	0.306	0.333	0.346	0.224	0.404	0.478	0.432	0.255	0.436	0.425	0.407	0.311	0.453	0.362	0.283	0.318	0.370	0.423
0.370	0.296	0.327	0.340	0.409	0.326	0.460	0.333	0.176	0.370	0.524	0.442	0.273	0.432	0.404	0.383	0.447	0.321	0.375
0.304	0.333	0.356	0.360	0.340	0.293	0.224	0.340	0.391	0.319	0.347	0.386	0.263	0.364	0.392	0.310	0.385	0.314	0.218
0.389	0.478	0.444	0.365	0.396	0.404	0.292	0.347	0.386	0.610	0.309	0.614	0.432	0.362	1.000				
0.220	0.439	0.375	0.383	0.341	0.326	0.313	0.318	0.255	0.345	0.238	0.268	0.350	0.286	0.341	0.256	0.293	0.349	0.327
0.302	0.300	0.362	0.348	0.326	0.368	0.333	0.439	0.170	0.487	0.439	0.295	0.327	0.415	0.386	0.466	0.370	0.300	0.386
0.333	0.250	0.244	0.370	0.348	0.171	0.279	0.380	0.341	0.295	0.326	0.244	0.370	0.400	0.375	0.246	0.340	0.319	0.240
0.346	0.212	0.395	0.375	0.240	0.419	0.267	0.386	0.321	0.419	0.314	0.404	0.568	0.372	0.419	1.000			
0.140	0.245	0.240	0.286	0.216	0.259	0.250	0.250	0.268	0.209	0.204	0.258	0.220	0.197	0.245	0.271	0.224	0.204	0.226
0.206	0.220	0.246	0.232	0.255	0.229	0.250	0.294	0.127	0.327	0.294	0.208	0.180	0.300	0.236	0.314	0.321	0.220	0.283
0.293	0.192	0.189	0.346	0.302	0.122	0.240	0.302	0.269	0.280	0.236	0.235	0.328	0.328	0.352	0.279	0.298	0.278	0.327
0.328	0.207	0.288	0.352	0.353	0.360	0.164	0.333	0.328	0.360	0.370	0.404	0.354	0.347	0.333	0.432	1.000		
0.277	0.380	0.250	0.293	0.204	0.291	0.304	0.283	0.213	0.400	0.240	0.266	0.280	0.390	0.327	0.255	0.260	0.333	0.436
0.317	0.250	0.574	0.333	0.264	0.319	0.279	0.380	0.204	0.333	0.278	0.288	0.442	0.283	0.315	0.259	0.281	0.364	0.291
0.238	0.226	0.222	0.237	0.200	0.160	0.161	0.241	0.255	0.175	0.291	0.347	0.474	0.455	0.407	0.227	0.510	0.412	0.180
0.356	0.304	0.296	0.267	0.200	0.392	0.426	0.446	0.527	0.365	0.262	0.357	0.478	0.278	0.340	0.347	0.237	1.000	
0.189	0.286	0.283	0.300	0.193	0.298	0.462	0.449	0.222	0.403	0.354	0.448	0.241	0.328	0.309	0.241	0.269	0.340	0.344
0.281	0.219	0.305	0.271	0.429	0.226	0.421	0.286	0.193	0.340	0.469	0.373	0.238	0.315	0.345	0.304	0.490	0.322	0.276
0.286	0.333	0.327	0.310	0.316	0.271	0.283	0.339	0.333	0.250	0.276	0.353	0.359	0.407	0.386	0.313	0.311	0.271	0.210
0.339	0.357	0.460	0.491	0.316	0.298	0.296	0.370	0.318	0.480	0.311	0.549	0.315	0.385	0.423	0.327	0.310	0.295	1.000
0.196	0.357	0.286	0.302	0.241	0.258	0.404	0.389	0.209	0.358	0.302	0.333	0.291	0.348	0.288	0.291	0.273	0.339	0.365
0.365	0.262	0.446	0.274	0.370	0.302	0.349	0.357	0.161	0.339	0.357	0.254	0.302	0.293	0.322	0.328	0.333	0.323	0.300
0.288	0.220	0.217	0.270	0.254	0.140	0.241	0.317	0.333	0.233	0.279	0.237	0.468	0.475	0.407	0.275	0.424	0.386	0.254
0.338	0.379	0.351	0.456	0.274	0.345	0.276	0.322	0.422	0.368	0.254	0.407	0.442	0.382	0.300	0.352	0.333	0.456	0.410
1.000																		
0.250	0.302	0.383	0.364	0.226	0.365	0.460	0.388	0.276	0.448	0.378	0.397	0.333	0.439	0.353	0.333	0.370	0.333	0.411
0.411	0.364	0.345	0.385	0.396	0.292	0.444	0.302	0.204	0.333	0.438	0.396	0.210	0.388	0.365	0.346	0.352	0.339	0.420
0.368	0.327	0.375	0.304	0.333	0.289	0.250	0.309	0.408	0.288	0.315	0.404	0.500	0.481	0.462	0.373	0.375	0.333	0.333
0.379	0.490	0.400	0.490	0.500	0.365	0.288	0.449	0.400	0.511	0.328	0.520	0.360	0.380	0.578	0.404	0.404	0.333	0.463
0.431	1.000																	
0.286	0.385	0.282	0.277	0.163	0.333	0.487	0.432	0.204	0.380	0.343	0.435	0.225	0.314	0.317	0.324	0.297	0.432	0.391
0.280	0.304	0.311	0.326	0.444	0.306	0.400	0.421	0.190	0.293	0.421	0.405	0.304	0.359	0.436	0.410	0.450	0.333	0.333
0.340	0.389	0.417	0.289	0.326	0.387	0.250	0.390	0.500	0.300	0.302	0.308	0.327	0.300	0.356	0.245	0.292	0.326	0.188
0.300	0.318	0.341	0.386	0.239	0.333	0.209	0.273	0.302	0.400	0.240	0.419	0.359	0.350	0.400	0.342	0.261	0.245	0.362
0.308	0.386	1.000																
0.237	0.333	0.333	0.292	0.268	0.318	0.277	0.250	0.245	0.291	0.256	0.236	0.308	0.302	0.273	0.244	0.220	0.279	0.320
0.245	0.240	0.326	0.311	0.256	0.400	0.300	0.333	0.156	0.528	0.366	0.227	0.292	0.410	0.289	0.425	0.277	0.265	0.261
0.327	0.209	0.233	0.364	0.283	0.154	0.209	0.255	0.244	0.286	0.289	0.293	0.315	0.314	0.340	0.283	0.362	0.311	0.157
0.288	0.250	0.390	0.235	0.283	0.381	0.227	0.349	0.365	0.381	0.280	0.370	0.447	0.302	0.381	0.452	0.333	0.340	0.269
0.346	0.400	0.231	1.000															
0.169	0.418	0.345	0.400	0.233	0.379	0.414	0.400	0.258	0.409	0.268	0.406	0.237	0.422	0.279	0.259	0.263	0.305	0.397
0.419	0.292	0.509	0.328	0.382	0.315	0.359	0.393	0.213	0.400	0.418	0.246	0.355	0.328	0.379	0.491	0.414	0.313	0.270
0.318	0.213	0.190	0.344	0.306	0.136	0.233	0.306	0.345	0.267	0.333	0.271	0.525	0.459	0.466	0.343	0.458	0.373	0.266
0.369	0.367	0.411	0.518	0.306	0.404	0.246	0.379	0.500	0.404	0.303	0.491	0.351	0.345	0.404	0.389	0.390	0.441	0.517
0.533	0.518	0.296	0.412	1.000														
0.279	0.280	0.395	0.400	0.304	0.347	0.333	0.400	0.232	0.386	0.390	0.288	0.229	0.328	0.208	0.283	0.318	0.260	0.321
0.345	0.296	0.278	0.340	0.319	0.239	0.404	0.280	0.200	0.340	0.391	0.319	0.207	0.400	0.347	0.300	0.333	0.186	0.320
0.352	0.333	0.326	0.259	0.340	0.262	0.250	0.314	0.280	0.378	0.222	0.298	0.295	0.339	0.291	0.310	0.286	0.241	0.264
0.415	0.417	0.383	0.420	0.426	0.294	0.192	0.404	0.362	0.500	0.263	0.392	0.313	0.362	0.435	0.356	0.388	0.315	0.396
0.418	0.543	0.273	0.381	0.429	1.000													
0.176	0.500	0.275	0.271	0.182	0.291	0.304	0.283	0.233	0.355	0.216	0.246	0.255	0.344	0.278	0.208	0.235	0.333	0.362
0.362	0.230	0.542	0.309	0.314	0.378	0.322	0.500	0.204	0.417	0.353	0.196	0.415	0.283	0.420	0.556	0.327	0.339	0.291
0.279	0.182	0.158	0.281	0.263	0.115	0.275	0.333	0.302	0.241	0.420	0.200	0.448	0.429	0.490	0.209	0.481	0.440	0.286
0.311	0.281	0.296	0.357	0.274	0.479	0.241	0.291	0.527	0.365	0.328	0.407	0.447	0.353	0.291	0.375	0.281	0.490	0.339
0.456	0.357	0.271	0.370	0.541	0.392	1.000												
0.158	0.500	0.340	0.373	0.224	0.305	0.362	0.321	0.290	0.406	0.236	0.299	0.296	0.419	0.316	0.250	0.278	0.345	0.417
0.441	0.286	0.600	0.300	0.327	0.417	0.355	0.471	0.183	0.480	0.389	0.237	0.421	0.321	0.400	0.583	0.362	0.373	0.305
0.313	0.203	0.180	0.339	0.279	0.103	0.268	0.345	0.316	0.281	0.400	0.263	0.579	0.536	0.547	0.279	0.509	0.418	0.322
0.344	0.295	0.310	0.414	0.258	0.481	0.259	0.328	0.552	0.400	0.339	0.439	0.451	0.339	0.328	0.440	0.362	0.491	0.393



0.589	0.464	0.264	0.438	0.717	0.400	0.745	1.000												
0.163	0.200	0.170	0.241	0.170	0.193	0.250	0.275	0.164	0.306	0.255	0.258	0.173	0.317	0.245	0.196	0.176	0.250	0.246	
0.246	0.220	0.203	0.190	0.255	0.113	0.316	0.179	0.148	0.204	0.200	0.255	0.125	0.204	0.153	0.196	0.273	0.220	0.236	
0.210	0.148	0.145	0.207	0.190	0.196	0.148	0.190	0.200	0.164	0.193	0.167	0.266	0.242	0.217	0.200	0.213	0.232	0.169	
0.305	0.250	0.288	0.237	0.302	0.236	0.231	0.236	0.246	0.283	0.138	0.259	0.226	0.294	0.283	0.235	0.228	0.237	0.288	
0.311	0.327	0.184	0.224	0.281	0.333	0.237	0.254	1.000											
0.163	0.179	0.265	0.241	0.148	0.236	0.296	0.275	0.203	0.266	0.255	0.258	0.220	0.317	0.222	0.271	0.250	0.275	0.246	
0.288	0.263	0.224	0.278	0.280	0.204	0.316	0.200	0.148	0.226	0.245	0.231	0.125	0.275	0.214	0.196	0.296	0.180	0.236	
0.293	0.192	0.235	0.228	0.278	0.146	0.170	0.190	0.200	0.185	0.153	0.189	0.227	0.222	0.197	0.322	0.194	0.169	0.232	
0.242	0.228	0.241	0.327	0.327	0.214	0.208	0.259	0.227	0.308	0.233	0.327	0.204	0.222	0.308	0.235	0.296	0.177	0.310	
0.290	0.352	0.208	0.224	0.323	0.308	0.197	0.274	0.373	1.000										
0.077	0.066	0.151	0.164	0.130	0.117	0.190	0.208	0.148	0.194	0.234	0.222	0.154	0.258	0.161	0.154	0.113	0.164	0.154	
0.230	0.164	0.129	0.172	0.212	0.115	0.254	0.083	0.130	0.185	0.204	0.167	0.076	0.143	0.155	0.100	0.211	0.145	0.155	
0.175	0.220	0.148	0.169	0.214	0.174	0.109	0.115	0.102	0.125	0.117	0.127	0.159	0.152	0.091	0.222	0.123	0.079	0.115	
0.169	0.150	0.158	0.220	0.236	0.136	0.235	0.155	0.111	0.288	0.123	0.200	0.103	0.140	0.196	0.148	0.150	0.143	0.230	
0.197	0.200	0.096	0.157	0.209	0.241	0.108	0.147	0.380	0.568	1.000									
0.143	0.096	0.082	0.145	0.082	0.135	0.151	0.143	0.170	0.161	0.163	0.255	0.156	0.186	0.140	0.182	0.133	0.143	0.117	
0.117	0.145	0.127	0.154	0.146	0.111	0.245	0.118	0.082	0.143	0.140	0.250	0.105	0.167	0.204	0.115	0.196	0.212	0.180	
0.179	0.262	0.200	0.220	0.200	0.211	0.205	0.132	0.118	0.146	0.135	0.174	0.161	0.133	0.143	0.211	0.121	0.132	0.200	
0.172	0.220	0.160	0.185	0.277	0.180	0.222	0.204	0.161	0.229	0.140	0.164	0.191	0.239	0.157	0.149	0.245	0.143	0.264	
0.224	0.231	0.225	0.159	0.159	0.255	0.143	0.167	0.326	0.298	0.304	1.000								
0.122	0.185	0.200	0.207	0.132	0.179	0.172	0.212	0.232	0.197	0.239	0.226	0.180	0.262	0.255	0.229	0.184	0.212	0.175	
0.194	0.250	0.190	0.218	0.240	0.163	0.217	0.185	0.132	0.189	0.185	0.192	0.148	0.189	0.179	0.161	0.236	0.250	0.245	
0.237	0.154	0.151	0.308	0.241	0.152	0.250	0.155	0.185	0.192	0.158	0.151	0.234	0.210	0.183	0.226	0.200	0.196	0.264	
0.172	0.153	0.204	0.246	0.264	0.222	0.170	0.222	0.179	0.222	0.220	0.183	0.212	0.231	0.158	0.245	0.308	0.145	0.213	
0.219	0.203	0.191	0.160	0.231	0.179	0.183	0.203	0.417	0.417	0.367	0.311	1.000							
0.102	0.086	0.135	0.169	0.113	0.161	0.175	0.216	0.172	0.164	0.244	0.250	0.115	0.226	0.167	0.160	0.140	0.127	0.159	
0.197	0.190	0.153	0.158	0.196	0.098	0.241	0.086	0.135	0.127	0.167	0.173	0.078	0.148	0.161	0.085	0.218	0.169	0.140	
0.161	0.180	0.111	0.218	0.200	0.130	0.180	0.119	0.086	0.151	0.121	0.111	0.182	0.156	0.111	0.190	0.145	0.119	0.158	
0.194	0.155	0.185	0.186	0.222	0.102	0.130	0.182	0.164	0.204	0.109	0.167	0.107	0.189	0.161	0.111	0.241	0.129	0.217	
0.242	0.186	0.170	0.140	0.234	0.204	0.148	0.188	0.426	0.396	0.404	0.450	0.383	1.000						

