



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

Estructura poblacional y genética
del cactus columnar *Cephalocereus
totolapensis* (Bravo et MacDougall) en el
estado de Oaxaca, México

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(**BIOLOGÍA AMBIENTAL**)

P R E S E N T A

BIOL. NICOLÁS PALLEIRO DUTRENIT

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA DEL CARMEN MANDUJANO SÁNCHEZ

MÉXICO, D. F.

FEBRERO 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por su ayuda para que logremos hacer las cosas, como: Paty, Yolanda y Lilia, muchas gracias por ser el faro que nos guía hacia la salida; y por supuesto que a la UNAM por todos los años de una excelente formación, muchas gracias.

A CONACYT por su apoyo con la beca de maestría.

El agradecimiento a los Proyectos de PAPIIT IN205500 y CONACYT-Semarnat 0350 a María del Carmen Mandujano.

A Meli por toda tu ayuda a lo largo de todos estos años, muchísimas gracias, esto finalmente se terminó de cocinar, ya seguiremos en otra receta.

A Luis Eguiarte, por todo su conocimiento, su apoyo y paciencia, correcciones, consejos y ayuda, muchísimas gracias por todo, y ahí seguimos caminando.

A Arturo Flores-Martínez por todos sus comentarios, ayudas, correcciones y aclaraciones, muchas gracias.

A Ana Laura por la velocidad de respuesta y la ayuda, las correcciones y toda la disposición, muchísimas gracias.

A Tere por los años de amistad, por las buenas vibras y las buenas platicadas, muchas gracias.

Para Dolores

Para mis Padres
Para Juan
Para María Rebeca

A María Rebeca, por la maravillosa vida que llevamos y llevaremos, porque aquí no cabe para poderte agradecer, por ser y por hacerme ser y dejarme soñar y estar ahí justo en el momento.
A mis padres por el apoyo incondicional que siempre ha existido, el amor y el cariño.
A Juan por seguir siendo una increíble persona tan querida y tan cercana.
A Floren, Fede y especialmente a Mateo por toda esa alegría.
A mis tíos, a mis primos.
A toda mi familia de acá y de allá ...
A Bilbo (Tito) por todos esos años y esperarme...
A Mango por todas las sonrisas mañaneras.
A José Antonio por su invaluable ayuda.
A Anita por ser siempre Anita.
Y a todos los que se me olvida, los quiero.

A la bola de cuates, sin orden en particular, ya saben como es esto:

Al Tuinky porque aquí seguiremos en el jamming, a Eli por domar a semejante león, a Carlos porque la vida nos une, a Ale por ser una querida hermanita, a Daniella por todos los años y las sonrisas y las que faltan todavía, a Kor estoy tan apenado... a Lorena por esa chispa incansable, a Lucia por todas las buenas copas y la temible mojiganga, a Thar por lo mismo... a Mauricio parecido... a Paco por ser el otro carnal que uno siempre quiere tener, a Julián por la música y las albercas, a Neto por todas las bicicleteadas y mentadas, a Tamara por ser siempre tan entrañable y extrañable, a Camou por la chora interminable, a Bernardo porque hay pocos seres tan queridos como tú, a Argelia por aquellos años y las europas, a Román por los chistes y las chelas, a Rashida por los choros antropológicos y las risas, a Misha por todos esos discos y demás, a Raful porque así esta bueno trabajar, a Bárbara por esa buena y larga amistad, a Enriquena por esa hermosa amistad punketona, a Margara por la pura buena onda, a Ale Carrera por tu ayuda y por todo tu cariño, a Xanic por los años de amista, a Richy por los momentos mágico-musicales, a Rodrigo por sus frases y a Tatiana por su hijo, a Gibrán carnalito...

Y a todos los que se me olvidaron no es falta de cariño sino de memoria.

A la banda del laboratorio...

A Lucy porque sin ti esta última parte (y en muchísima otras) jamás me habría salido, a Mariana por toda la buena vibra y la buena onda de todos estos años, a Eric porque si ti tampoco lo habría logrado en el tiempo o en ningún tiempo, a Cesar por todos los años de amistad y salidas divertidas al campo así como su apoyo en el laboratorio, a Ángeles por ser parte de la historia y la lagrima Remi, a Adriana por todas las sonrisas y las buenas reseñas de películas, a Israel por su incondicional apoyo a lo largo de todos estos años y por toda su paciencia (a volar escoba), a Ale González por las pláticas y las risas, a Gisela por las sonrisas y los años de amistad, a Ale Vázquez por todos los años de amistad, a Chibebo por los interminables chistes... Seguro que se me olvidó alguien, siempre es así, por favor no es nada personal, es meramente cerebral.

A mis padrinos Don Ramón y Mauricio, porque sin ellos ahí todo habría sido muy diferente, así como al Halcón y Kado, gente así no se conoce todos los días, muchas gracias.

A todos mis compañeros del Revueltas.

A toda mi nueva familia de la escuela de rock.

ÍNDICE

| | |
|--------------------------------------|----|
| Resumen | 2 |
| Abstract | 3 |
| 1. Introducción | 4 |
| 2. Objetivos | 10 |
| 3. Metodología | 10 |
| 3.1. Sitio de estudio | 10 |
| 3.2. Especie de estudio | 14 |
| 3.3. Estructura poblacional | 15 |
| 3.4. Variación y estructura genética | 16 |
| 4. Resultados | 21 |
| 4.1. Estructura poblacional | 21 |
| 4.2. Variación y estructura genética | 25 |
| 5. Discusión | 30 |
| 5.1. Estructura poblacional | 30 |
| 5.2. Variación y estructura genética | 32 |
| 6. Conclusiones | 35 |
| 7. Literatura citada | 37 |
| 8. Anexos | 44 |
| 8.1. Anexo I | 44 |
| 8.2. Anexo II | 46 |
| 8.3. Anexo III | 51 |
| 8.4. Anexo IV | 54 |
| 8.5. Anexo V | 55 |

Resumen

Las cactáceas son plantas muy características de México, tanto de las zonas áridas como de muchos de los ecosistemas de nuestro país. Lamentablemente la fragmentación del hábitat es un problema que está en crecimiento por el cambio de uso de suelo con fines pecuarios, ganaderos y expansión de la mancha urbana. En particular, en el Istmo de Tehuantepec, Oaxaca, este es un problema importante que ha llevado a la desaparición de muchas hectáreas de hábitats silvestres, sobre todo en la zona de la sierra, que han sido desmontadas para la siembra de maguey enfocado en la producción de mezcal. Una de las áreas más afectadas es la región del bosque tropical caducifolio en la región de Istmo, ya que con el desmonte para la siembra de maguey están desapareciendo muchas especies vegetales, entre ellas el cactus columnar *Cephalocereus totolapensis*, el cual es parte del mosaico vegetal de la zona y es una especie endémica de muy restringida distribución. En este trabajo se pretende describir la estructura poblacional y la estructura genética de *C. totolapensis* en tres fragmentos de selva que se han denominado como subpoblaciones, esta especie solamente se puede observar en pocos kilómetros de la carretera federal 190 Oaxaca-Juchitán. Con este objetivo se realizó un censo demográfico de los individuos presentes en las subpoblaciones y se colectaron muestras de tejido para analizar la variación genética utilizando marcadores moleculares de ADN llamados RAPDs. Encontramos que las 3 subpoblaciones presentan una estructura poblacional viable, con individuos en las clases pequeñas y adultos reproductivos, esto es con tendencia al crecimiento, especialmente la subpoblación 1. El primer evento reproductivo se observa cuando tienen más de 1.30 m de altura y en general, la mayoría de las plantas reproductivas alcanzan hasta 20 eventos reproductivos. Pudimos identificar en las 3 subpoblaciones estudiadas diferentes categorías, que contienen a varios individuos, por lo que si no destruyen su hábitat, se asegura la continuidad de esta especie en esa zona de en donde la especie es única en el mundo. En cuanto al análisis genético, se encontró un nivel de variación genética intraespecífica medio, en comparación a otras especies de cactáceas columnares, pero sin estructura subpoblacional, esto puede deberse a tres fenómenos: 1) La perturbación y fragmentación reciente, ya que la mutación no a tenido tiempo de actuar y diferenciar a las subpoblaciones, 2) La alta tasa de flujo génico entre las mismas, que es mantenida por los murciélagos que las polinizan, 3) Mantenimiento de los polimorfismos ancestrales. Finalmente esta investigación integra el análisis de la demografía y la genética de *Cephalocereus totolapensis* para contribuir a los planes de manejo y conservación de esta especie en donde resalta que debe protegerse el hábitat.

Abstract

Cacti species are important components of Mexican flora and are dominant elements in several arid ecosystems of North America. Unfortunately habitat fragmentation for cacti is a problem of mayor concern that is increasing as land use is changing towards cattle ranges, industry of city growth. In particular, in the Tehuantepec Isthmus, Oaxaca, it is an important problem that has taken to the disappearance of many hectares of wild habitats, mainly in the zone of the mountain range, where the native tropical deciduous forest have been dismantled for sowing *Agave* spp. to promote the mezcal (alcoholic product similar to tequila) production industry. Clearing of natural vegetation cover produce fragmentation and species populations reductions, among several species that face the problem, it's found one of the most rare species that inhabit tropical deciduous forest in Isthmus of Oaxaca, the columnar cactus *Cephalocereus totolapensis*. This species is very conspicuous because of the presence of a cephalium that grows forming a complete ring around the stem in reproductive plants. The species is disappearing and reducing continuously the area of its habitat. The aim of this work was to describe the population structure and the genetic structure of the cactus *C. totolapensis*, this specie presents a restricted distribution, it can only be observed in few kilometers of federal highway 190 Oaxaca-Juchitán. Towards this end, a population demographic census was conducted in 3 fragments (subpopulations) and a study of genetic variation using RAPD's molecular markers.

We found that the population presents a viable population structure but with a restricted distribution, the populations structure suggest a tendency to increase ins size as several small plants were registered, mainly in subpopulation one. First reproduction occurs when plants reach 130 cm and most plants showed until 20 reproductive events. We could identify in the 3 studied subpopulations different categories, they contain several individuals, reason why if their habitat it is not destroyed, the continuity of this species could be guaranty. As far as the genetic analysis, it is found medium levels of intraspecific genetic variation, which is similar to several columnar cacti species. However, there is no subpopulation structure, this can be due to three phenomena: 1) The disturbance and recent fragmentation, since has not had enough time to differentiate the subpopulations, 2) The high rate of genetic flow between the subpopulations as it was suggested by the high Nm values obtained, possibly genetic flow is maintained by pollinators (bats) that move pollen among subpopulations, 3) Maintenance of the ancestral polymorphisms. Finally this investigation integrates the analysis of the demography and the genetics of *C. totolapensis* to contribute to the plans management and conservation of this specie.

Introducción

Las cactáceas son plantas características de las zonas áridas o semiáridas de México, aunque se las puede encontrar en una gran variedad de ambientes como selva alta, selva baja, y con una gran variedad de formas de vida. La familia Cactaceae es originaria del continente Americano, y México es el centro de diversidad mundial con cerca de 84% de las especies endémicas ubicadas dentro del territorio nacional (Arias, 1993; Arias *et al.*, 2005; Glass, 1998). En la clasificación taxonómica se dividía a la Familia Cactaceae en 3 subfamilias de plantas: Pereskioideae, Cactoideae, y Opuntioideae (Britton & Rose, 1919-1923; Buxbaum, 1958; Barthlott & Hunt, 1993). Recientemente algunos autores la han separado en 4 subfamilias, las tres tradicionales mencionadas anteriormente y la cuarta subfamilia Maihuenioideae (Anderson, 2001).

De las 4 subfamilias, Pereskioideae es una subfamilia poco representada en el país con sólo un género (*Pereskia*) y tres especies: una especie nativa (*P. lichnidiflora*) y dos especies de Sudamérica cultivadas; por otro lado la Subfamilia Opuntioideae está representada en México por 5 géneros: *Pereskopsis*, *Nopalea*, *Gusonia*, *Opuntia* y *Cylindropuntia*, con una gran cantidad de especies (Anderson, 2001; Guzmán *et al.*, 2001); y la Cactoideae, que es la Subfamilia que más especies tiene y están clasificadas en 9 tribus que comprenden cerca de 92 géneros (Barthlott & Hunt, 1993) ó 64 géneros según Bravo-Hollis (1978). Finalmente, la Subfamilia Maihuenioideae es únicamente Sudamericana.

En la subfamilia Cactoideae las plantas presentan formas de vida muy variadas, dada la gran diversidad de especies que agrupa. Por ejemplo, en la tribu Cacteae, las especies son globosas o cespitosas como las de los géneros *Mammillaria* y *Coryphantha*, en cambio en la tribu Pachycereae existen plantas columnares de los géneros

Cephalocereus, *Carnegia* o *Neodawsonia* y rastreras como las del género *Stenocereus* (Bravo-Hollis, 1978; Gibson & Nobel, 1986, Barthlott & Hunt, 1993).

Hay reportes del uso y aprovechamiento de las cactáceas desde la época prehispánica, especies muy diferentes se han manejado con fines medicinales, mágico-religiosos y ornamentales (Bravo-Hollis, 1978; Casas, 2002; Casas *et al.*, 2003; Anderson, 2001). Este último aspecto es una de las razones por las que la diversas especies de las cactáceas se encuentran amenazadas o en peligro de extinción (Glass, 1998), aunque actualmente, la ganadería y el desmonte son los principales problemas al fragmentar los hábitats (Carrillo Ángeles *et al.*, 2005; Martorell & Peters, 2005).

La fragmentación del hábitat es algo cada vez más común debido al cambio de uso de suelo, porque aumentan las presiones sociales para dar uso a los terrenos con diversos fines. Al fragmentarse el hábitat natural de un sitio o de alguna población se pueden suscitar varios cambios como la pérdida de biodiversidad dentro de dicho hábitat (Terborg & Winter, 1980; Wilcox & Murphy, 1985; Farigh & Merriam, 1994; Kruess & Tschardtke, 1994; Noss & Csuti, 1997; Lande, 1998, 1999; Zschokke *et al.*, 2000; Kattan, 2002), así como la pérdida de diversidad genética al dividirse las poblaciones en pequeñas subpoblaciones y que disminuya así el intercambio genético entre los individuos de cada subpoblación (Templeton, 1990).

El aislamiento de las subpoblaciones o fragmentos va a depender de varios factores como: el tamaño del fragmento, la distancia entre los fragmentos, la posición espacial que ocupan, la forma del fragmento, el tiempo de formación del fragmento (Saunders *et al.*, 1991). Por lo tanto, en cuanto se da la fragmentación del hábitat se comienza a perder la diversidad de esa comunidad a nivel de especie y también a nivel genético (Dolan, 1994; Oostermeijer *et al.*, 1996; Foré & Gutman, 1999), sobre todo en las especies endémicas o

de distribución restringida (Wilcox, 1980; Bierregaard *et al.*, 1992; Noss & Csuti, 1997; Kattan, & Alvarez-López, 1994; Scariot, 1999; Metzger, 2000; Kattan, 2002).

Las poblaciones presentan cierta variación genética, la cual se ve afectada por varios factores, básicamente por las fuerzas evolutivas: la endogamia y la deriva génica que disminuyen la variación genética, así como también la fragmentación de las poblaciones, y por otro lado la mutación y el flujo génico o migración los cuales aumentan la variación; y claro que todo esto va pasando a la luz de la selección (Eguiarte *et al.*, 2000). Al darse la fragmentación del hábitat, el tamaño físico de las poblaciones va decreciendo al ir perdiendo terreno, y de ésta misma manera los individuos que ahora conforman las nuevas subpoblaciones separadas van quedando cada vez más aislados (Wilcox, 1980; Rolstad, 1991; Young *et al.*, 1996) este aislamiento por su parte plantea nuevos problemas, como dificultar la migración (Ledig, 1992).

Actualmente en México, y particularmente en Oaxaca, la industria de producción de mezcal es de gran importancia tanto económica como cultural, y en años recientes se ha visto amenazada su producción por plagas en sus cultivos (donde hubo cosechas que se perdieron totalmente), y además por el saqueo y venta de agaves para la producción de tequila en Jalisco, donde también hubo una importante pérdida de agaves para la producción de tequila, por lo que “importaron” agaves de la sierra oaxaqueña hacia la región de Tequila, Jalisco, para procesarlo como tequila con agaves “sembrados y cosechados” en Tequila, Jalisco (Jorge Larson, com. pers.).

La principal zona de producción de mezcal en Oaxaca se encuentra en la región del Istmo de Tehuantepec, donde existe un cactus columnar endémico de la sierra oaxaqueña, cerca de la región de Nejapa y Totolapan, donde la vegetación es selva baja caducifolia con varias especies de cactus que presentan distintas formas de vida.

Cephalocereus totolapensis es un cactus columnar de tallo simple que mide entre 6 y 8 metros de alto (foto 1), se distingue de las otras especies columnares de la zona porque presenta eventos reproductivos en un cefalio con forma de anillos a lo largo del tallo (Foto 2).

Cephalocereus totolapensis es un cactus columnar endémico de esa zona de Oaxaca, en un cálculo aproximado se podría decir que la especie se distribuye sobre la carretera federal 190, del Km 86 hasta el 123; la elevada tasa de deforestación en su hábitat está provocando la reducción del área que abarca la población de dicha planta, generando parches cada vez más pequeños, y provocando así la fragmentación de la población de este cactus.

Foto 1. Planta de *Cephalocereus totolapensis* en selva baja caducifolia.



Foto 2. Detalle del ápice de la planta de *Cephalocereus totolapensis*, con los eventos reproductivos en forma de anillos.



Con el objetivo de analizar la estructura genética de las tres subpoblaciones se realizaron RAPD's (por sus siglas en inglés "Random Amplified Polymorphic DNAs" y en español se traduce como polimorfismos de ADN amplificados al azar), son marcadores moleculares que permiten la detección de polimorfismos genéticos a diferentes niveles al comparar los tamaños de los fragmentos de ADN, los cuales son el resultado del proceso de hacer muchas copias de dichos fragmentos por medio de un protocolo llamado PCR por sus siglas en inglés "Polymerase Chain Reaction" (en español se llama protocolo de Reacción de Polimerasa en Cadena; Howland y Arnau, 1992; Otero *et al.*, 1997; Ramírez Corona, F. 2000). Dentro de las ventajas de utilizar a los RAPDs como marcadores moleculares se encuentran: que no se requiere conocimiento previo de la secuencia de ADN, no requiere de la construcción o el mantenimiento de una librería genómica, el número de loci que pueden ser examinados es indeterminado, no requiere de pruebas radioactivas, revelan altos

niveles de polimorfismo dentro y entre subpoblaciones, no presentan variabilidad estacional, se requiere de pequeñas cantidades de ADN, presentan una buena resolución, se pueden utilizar para realizar distintos tipos de análisis como identificación de individuos, de paternidad, filogenéticos entre otros, además de ser un método relativamente fácil y barato. En cambio, dentro de las desventajas de los RAPDs se encuentran: que son marcadores dominantes, la presencia de bandas erróneas o artefactos en los geles, la baja replicabilidad de los resultados y la comigración de bandas (Otero *et al.*, 1997; Ramírez Corona, F. 2000). Estas desventajas pueden superarse estandarizando la lectura de bandas, por ejemplo usar las bandas definidas y fácilmente registradas para el 90% o más del número total de bandas (Ramírez Corona, 2000) y pueden usarse para estimar diversidad genética y análisis estándar de genética de poblaciones suponiendo que los loci de RAPDs están en Hardy-Weinberg (Lynch y Milligan 1994).

El PCR es un método de amplificación de ADN *in vitro*, basado en la capacidad de la enzima Taq polimeraza de replicar cadenas de ADN. Se utilizan Oligonucleótidos (Primers) Arnau y Cooper, 1992, para servir de “molde” en el principio y final del fragmento de ADN que se copiará de la planta de estudio, este proceso se repite varias veces hasta que el ADN copiado es suficiente como para visualizarlo por medio de otras técnicas y realizar el análisis de los datos. Los Oligonucleótidos o Primers son secuencias aleatorias de 10 pares de bases (pb) de ADN, están compuestos por un 50-80% de Guanina-Citosina (G-C) y no deben ser palindrómicas (que no se lea igual hacia ambos lados), estos Primers se acoplarán a una hebra de ADN cuando éste se separe durante la etapa de calor en el PCR y a partir de ellos se comenzará a sintetizar una hebra complementaria a la secuencia del ADN molde utilizando para esto los nucleótidos disueltos en la reacción y se detendrá la síntesis del fragmento cuando baje la temperatura en el PCR. En este trabajo se

utilizaron los Primers de Operon: OPG-18, OPF-14 y OPA-11, los cuales ya han sido ocupados para amplificar ADN de cactus en otros trabajos (De la Cruz *et al.*, 1997).

Objetivo general

- Determinar la estructura poblacional y genética de *Cephalocereus totolapensis* en 3 subpoblaciones en la Sierra Oaxaqueña.

Objetivos particulares

- Determinar la estructura poblacional de cada una de las 3 subpoblaciones así como la estructura general de la población, para evaluar la posible viabilidad de la población.
- Determinar la variación genética y su estructura entre subpoblaciones por medio de marcadores moleculares RAPDs, para obtener la variación genética dentro de la población y en cada subpoblación, así como las medidas de diferenciación genética.

Metodología

Sitio de estudio

En la Sierra Oaxaqueña en la región de Nejapa y Totolapan se estudiaron tres subpoblaciones de *Cephalocereus totolapensis*, donde la vegetación es selva baja caducifolia, bosque tropical caducifolio según Rzedowski (1991), los cuales se encuentran en regiones de clima cálido y dominado por especies arborescentes que pierden sus hojas en la época seca del año durante un lapso variable, pero alrededor de los 6 meses. En México esta vegetación se encuentra entre los 0 y los 1900 m.s.n.m., frecuentemente por debajo de los 1500 m.s.n.m. Normalmente presentan dos estaciones bien marcadas, la lluviosa y la seca. En cuanto a la estructura del bosque lo más frecuente es que haya un solo estrato arbóreo; y en situaciones de poca perturbación el estrato herbáceo está poco desarrollado o puede faltar por completo; también hay muy pocas trepadoras o epífitas en general, aunque se pueden encontrar bromeliáceas del género *Tillandsia*, y algunos líquenes (Rzedowski, 1991). Por otro lado, resaltan mucho las cactáceas columnares y candelabrifórmes que se encuentran en las fases más secas de este bosque; así como plantas con hojas concentradas en rosetas (*Yucca*). De las gimnospermas sólo pueden citarse algunas zamias, que son más bien una rareza; y entre las angiospermas destaca la familia Leguminosae, tanto por la cantidad de especies como por el número de individuos y por su frecuente dominancia en los estratos arbóreos. También se encuentra el género *Bursera* (en esta zona existen por lo menos 4 especies de ese género, Rzedowski, 1991).

El clima en esta zona es (A) C (W0), semi cálido sub-húmedo del grupo C, temperatura media anual mayor a los 18°C, temperatura del mes más frío menor a 18°C, temperatura del mes más caliente 22°C. La precipitación del mes más seco es menor a los

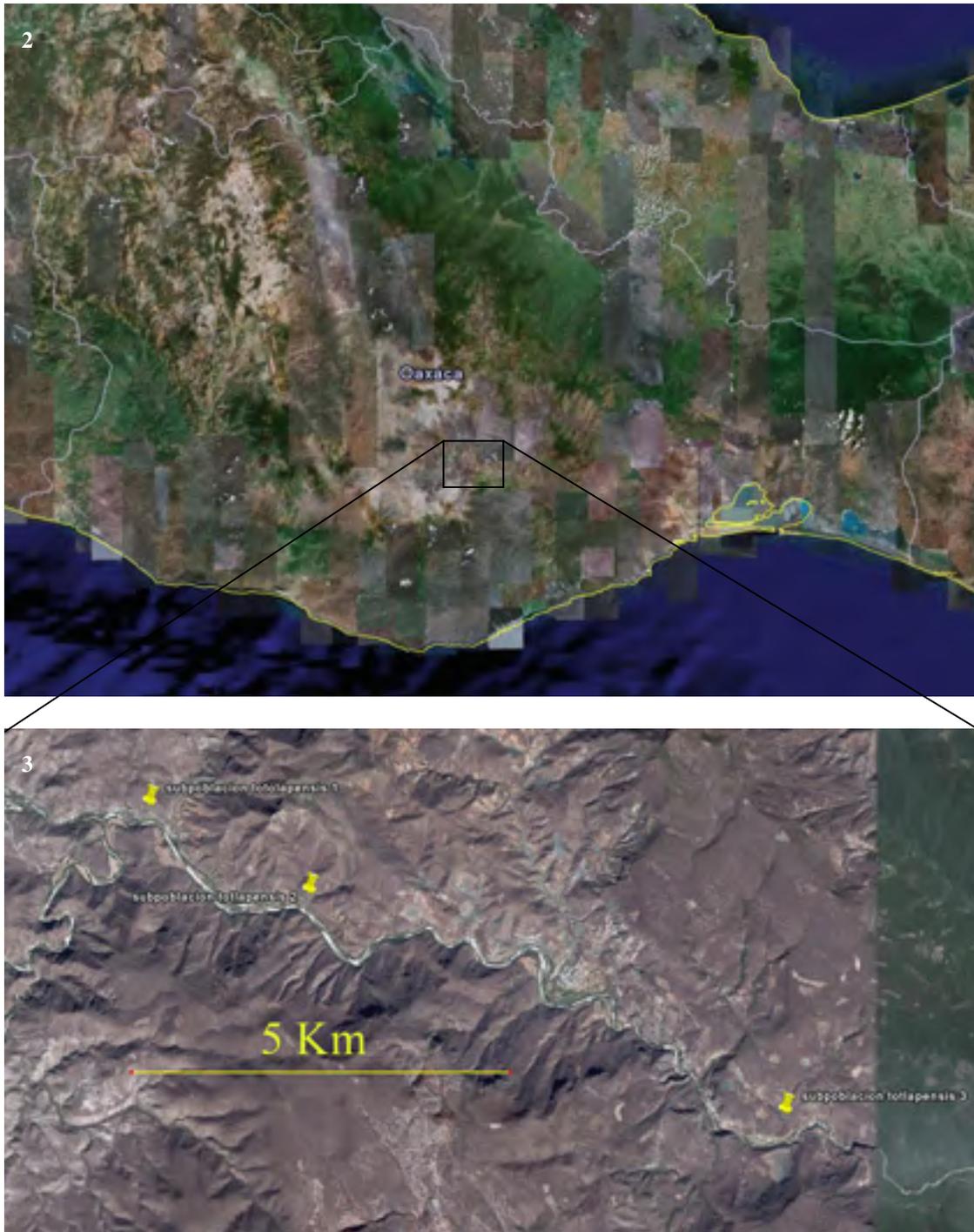
40 mm, lluvias de verano con índice P/T menor de 43.2 y porcentaje de lluvia invernal del 5% al 10.2 % del total anual (clima según E. García 1973).

Se estudiaron tres subpoblaciones de *Cephalocereus totolapensis*, cuyas coordenadas geográficas son las siguientes: N 16° 40' 72.0'' W 96° 09' 16.3'' subpoblación 1, N 16° 40' 04.5'' W 96° 07' 48.8'' subpoblación 2 y N 16° 38' 30.3'' W 96° 04' 16.6'' subpoblación 3 (Figuras 1, 2 y 3).

Figura 1. Mapa de la República Mexicana en donde se muestra marcado con una línea blanca el Estado de Oaxaca.



Figuras 2 y 3. 2-Mapa del Estado de Oaxaca, 3-Mapa del sitio de estudio con las tres subpoblaciones de *Cephalocereus totolapensis* estudiadas en Oaxaca, México.



Especie de estudio

Cephalocereus totolapensis = *Neodawsonia totolapensis*

Cephalocereus totolapensis Bravo et MacDoug.- Tallos simples, columnares, de 3 a 8 m de altura, de color verde grisáceo. Presenta aproximadamente 28 costillas, de 8 a 10 mm de alto, con arista robusta. Las areolas son de 4 mm de diámetro, con fieltro blanco grisáceo. Espinas radiales 10 a 13, aciculares, de 5 a 13 mm de longitud, blancas con la punta rojiza; las centrales con pelos. Los restos de este cefalio se conservan en el tallo en forma de anillos bien definidos que desaparecen con el tiempo. Flores tubular-campanuladas, de 3.5 cm de largo incluyendo el ovario, con segmentos del perianto de color rosa de tinte amarillento; pericarpelo con escamas triangulares y cerdas blancas, tubo receptacular con escamas acuminadas, cavidad del ovario pequeña, cavidad nectarial amplia de 5 mm de largo a 9 mm de ancho, casi cerrada por la base de los estambres, estilo grueso, lóbulos del estigma 5. Fruto globoso, de 2.5 a 3 cm de diámetro, al principio rosa y al secarse moreno, con espinas, pelos, se abre reventándose, exponiendo los funículos blancos y las semillas. Éstas son de 2 mm de largo, testa café oscuro, brillante, con ornamentación celular. Se distribuye en el Istmo de Tehuantepec, Oaxaca. En Totolapan y llega a Tequisistlán. Ocupa la falda de las montañas, entre 600 y 1000 m.s.n.m. formando parte de la selva baja caducifolia. Se distingue de otras especies a simple vista porque sus tallos presentan anillos lanosos bien definidos (Bravo-Hollis, 1978).

Estructura poblacional

Demografía

La estructura poblacional se determinó en cada subpoblación, para esto se realizó un muestreo de 80 individuos en tres parcelas de aproximadamente 5000 m² cada una, en donde a cada individuo se le tomaron los siguientes datos demográficos: altura total, altura al primer anillo floral (1^{er} evento reproductivo), número de anillos florales a lo largo del tallo (eventos reproductivos), número de ramificaciones (ramas) y los mismos datos en dichas ramificaciones, con el fin de determinar la estructura poblacional de cada uno de los tres sitios de muestreo y de la población en general.

Por otro lado se utilizaron imágenes de satélite Multi Spectral Scanner (MSS) multitemporal de la zona de estudio obtenidas con el apoyo del Instituto de Geografía de la UNAM; y con ayuda de Sistemas de Información Geográfica (SIG) y Percepción Remota se intentó determinar el tiempo de perturbación de la zona, así como la tasa de pérdida del hábitat de la especie de estudio, pero la definición de las imágenes no tuvo la resolución necesaria para llevar a cabo dicho análisis, por lo que fue descartado.

Para categorizar los intervalos de tamaño se consideró la biología observada de la especie, y se obtuvieron 5 categorías definidas como: plántula (0.1 – 20 cm de altura), juvenil (20.1 – 90 cm de altura), adultas 1 (90.1 – 140 cm de altura), adultas 2 (140.1 – 350 cm de altura) y adultas 3 (350.1 cm en adelante de altura); las primeras dos, son prereproductivos, ya que en los datos obtenidos del campo podemos observar que no hay eventos reproductivos antes de los 90 centímetros de altura. Por otro lado las tres categorías de adultos siguientes son reproductivas. La primera (adultas 1), incluye a los individuos que presentan menos de once eventos reproductivos (“nuevos” adultos). En la segunda

categoría (adultas 2) se encuentran los individuos “establecidos” con más de 11 eventos reproductivos hasta los 20, y la última categoría (adultas 3) se agrupan los individuos “más grandes” y que representan a las plantas más antiguas de la población con más de 21 eventos reproductivos observables (Tabla 1).

Tabla 1. Categorización de las plantas de *C. totolapensis* por tamaño y estado reproductivo para las 3 subpoblaciones estudiadas.

| Categoría | Altura (cm) | Estado |
|-----------|-----------------|-----------------|
| Plántula | 0.1 – 20 | No reproductiva |
| Juvenil | 20.1 – 90 | No reproductiva |
| Adultas 1 | 90.1 – 140 | Reproductiva |
| Adultas 2 | 140.1 – 350 | Reproductiva |
| Adultas 3 | 350 en adelante | Reproductiva |

Variación y estructura genética

Simultáneamente a la toma de datos demográficos se colectó una muestra de tejido de los individuos de cada subpoblación, estas muestras se colocaron inmediatamente en nitrógeno líquido con el fin de extraer el ADN, posteriormente amplificarlo por medio de la técnica de PCR, utilizando los marcadores moleculares llamados RAPDs (Ramírez Corona, 2000), para obtener el patrón de bandeo de los individuos y así poder realizar los análisis genéticos. Una vez en el laboratorio las muestras se metieron a un congelador a -20°C.

Extracción de ADN

El ADN se extrajo de 40 individuos por población de los 80 que se midieron en cada una de las tres subpoblaciones. Para dicha extracción de ADN de las plantas se utilizó un kit de extracción DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Valencia, California, USA) el cual

ha tenido buenos resultados utilizando en otras investigaciones con cactáceas (Nyffeler, 2002). El protocolo de extracción de ADN se describe en el Anexo I.

Una vez extraído el ADN de las plantas se procedió a cuantificarlo, para esto se utilizó un biofotómetro (“BioPhotometer Eppendorf”), con el cual se obtuvieron las concentraciones de ADN por muestra en unidades de nanogramos por microlitro (ng/μl). De esta cuantificación se escogieron muestras con valores muy similares de cada subpoblación, aproximadamente 9 ng/μl.

Amplificación y visualización de productos de PCR

La técnica del PCR consta de una cantidad de ciclos donde se aumenta y disminuye la temperatura de unas reacciones *in vitro* dentro de un termociclador de una manera muy precisa con el fin de permitir que la doble hebra de ADN se separe y puedan así entrar los Primers u oligonucleótidos y a partir de ellos que se comiencen a adherir las bases nitrogenadas correspondientes para polimerizar fragmentos complementarios de la cadena de ADN utilizada como molde.

Para seleccionar los primers empleados en el análisis molecular se probaron 5 primers en total de la series A, F y G de Operon Technologies, QUIAGEN, de los cuales se seleccionaron tres que proporcionaron 30 bandas polimórficas reproducibles (Ramírez Corona, F. 2000; Tabla 2). Para la realización de los PCR's en este trabajo se llevaron a cabo reacciones de 25.3 μl, las cuales constan de 2.6 μl de amortiguador para PCR 10X, 1.7 μl de Cloruro de magnesio 30 mM (MgCl₂), 1 μl de DNTP's mix 10 mM (mezcla de los 4 di-deoxinucleótidos) (MBI-Fermentas), 2 μl de Primer (0.2 μM) (Operon Technologies, QUIAGEN), 0.6 μl de Taq polimerasa (Amplificasa, Biotecnologías Universitarias). (0.4 ml = 1U), 2 μl de ADN a 9 ng/μl y 15.4 μl de agua bidestilada (SIGMA). A modo de

control negativo se preparó una mezcla de reacción a la cual no se le añadió el ADN, si no salían bandas en ese control entonces los reactivos no estaban contaminados.

Este PCR se realizó en un termociclador PTC-100, MJ Research, Inc., utilizando el siguiente programa: 94°C por 5 minutos (desnaturalización inicial), 44 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturalización), 38°C por 1 minuto (alineación del Primer con el ADN), 54°C por 30 segundos y 72°C por 2 minutos (extensión), para terminar con 72°C durante 13 minutos (extensión final), al finalizar se reduce la temperatura a 4°C.

Para poder observar los resultados de los PCR's se realizó electroforesis en geles de azarosa al 1.4% aproximadamente. Los geles se sumergieron en buffer TBE 0.5X (Tris-Borate-EDTA) dentro de una cámara de acrílico de electroforesis horizontal, en este gel sumergido es donde se corrieron las muestras amplificadas en el PCR. Se mezclaron 5µl de producto de PCR con 3µl de buffer de carga (azul de bromofenol 10X) porque dicha mezcla tiene mayor densidad que el TBE y así se desliza hasta el interior del pozo, además permite visualizar la carga en cada pozo dentro del gel.

En cada uno de los geles se colocó en el primer pozo una escalera de peso molecular de 100 pb (Invitrogen) y en el último pozo el control negativo de la reacción de PCR, posteriormente se corrió a 120 Volts entre tres y cuatro horas.

Finalmente los geles se tiñen con Bromuro de etidio, sustancia que se intercala entre las bases del DNA y permite después visualizarlo, ya que este ultimo carece de color. El gel es introducido en un contenedor con Bromuro de Etidio 1mg/ml por 15 minutos aproximadamente, se enjuaga en agua bidestilada por otros 15 minutos, y se enjuaga para eliminar el exceso de Bromuro de Etidio y que este interfiera en la visualización del mismo.

Los geles fueron visualizados en un transiluminador de rayos ultravioletas, los cuales revelan las bandas fluorescentes distribuidas en el gel, cada banda es un fragmento amplificado de DNA y se considera como un locus independiente con dos alelos (presencia 1, ausencia 0), posteriormente se toma una fotografía digital con el programa Worklab.

Utilizando las bandas obtenidas se realizaron los análisis de datos estadísticos para obtener indicadores de variación genética, ya que cada banda representa fragmento de DNA con un tamaño determinado de pares de bases y de esta forma se traducen los datos de la imagen a datos numéricos con los cuales se puede realizar el análisis (Ramírez Corona, 2000).

Análisis de datos

Con un programa llamado TFPGA (“Tools For Population Genetic Analysis” Ver. 1.3. Miller, 1997) se realizaron los análisis para calcular las frecuencias alélicas y se estimaron las siguientes variables: porcentaje de loci polimórficos ($%P$), el número de alelos promedio por locus (A) ($A = \sum (n_i / m)$, donde n_i es el número de alelos observados en el locus i y m es el número total de loci), se estimó la heterocigocidad observada (H_o) y heterocigocidad esperada (H_e) en equilibrio Hardy-Weinberg; los estadísticos o coeficientes F de Wright (Hedrick, 2000) utilizados para dar una aproximación de la diferenciación en las subpoblaciones, son 3 estimadores: el total (T), el de subpoblaciones (S) y el individual (I). A partir de estos coeficientes se calcula el efecto de la endogamia en la subestructura poblacional de la siguiente manera: F_{IS} , es el coeficiente de endogamia, mide la reducción en la heterocigosis de un individuo debido al apareamiento no azaroso dentro de su subpoblación y F_{IT} , es el coeficiente de endogamia total de un individuo, mide la reducción en la heterocigosis de ese individuo con respecto a la población total (Hartl y Clark, 1989), ambos coeficientes (F_{IS} y F_{IT}) pueden tener un valor positivo indicando que

existe deficiencia de heterocigotos o un valor negativo indicando un exceso de heterocigotos (Hedrick, 2000); F_{ST} , es el índice de fijación subpoblacional y mide la diferenciación genética entre las poblaciones. Su valor va de 0 (cuando todas las subpoblaciones están en equilibrio Hardy-Weinberg con las mismas frecuencias alélicas) a 1 (cuando las todas subpoblaciones son diferentes entre sí). En otras palabras la proporción F_{ST} es la variación alélica total que es atribuible a las diferencias entre las poblaciones y predice que la divergencia neutral del locus, es determinada por el número de alelos que se intercambian entre poblaciones en cada generación (Latta, 2004). Así que representa la diferenciación genética entre las poblaciones y es un estimador, en el equilibrio, de la migración, por lo tanto es un reflejo del aislamiento que existe entre las mismas (Ouborg *et al.*, 1999). En este trabajo se calculó la G_{ST} que según Nei (1972) es el equivalente a la F_{ST} .

También se calculó el flujo génico, de una manera indirecta a través de la F_{ST} con la siguiente fórmula $Nm = \{(1/F_{ST}) - 1\} / 4$. Cuando el valor de $Nm < 1$ se produce una gran diferenciación entre las subpoblaciones, mientras que si $Nm > 1$ entonces las subpoblaciones se comportan como una sola población panmíctica y se “diluye” el efecto de la deriva génica (Hartl & Clark 1989).

Con el programa Arlequin (versión 3.0 Excoffier *et al.* 2005) se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), el cual permite conocer la distribución de la varianza genética entre los distintos niveles jerárquicos planteados en el estudio (Excoffier *et al.* 2005).

RESULTADOS

Estructura poblacional

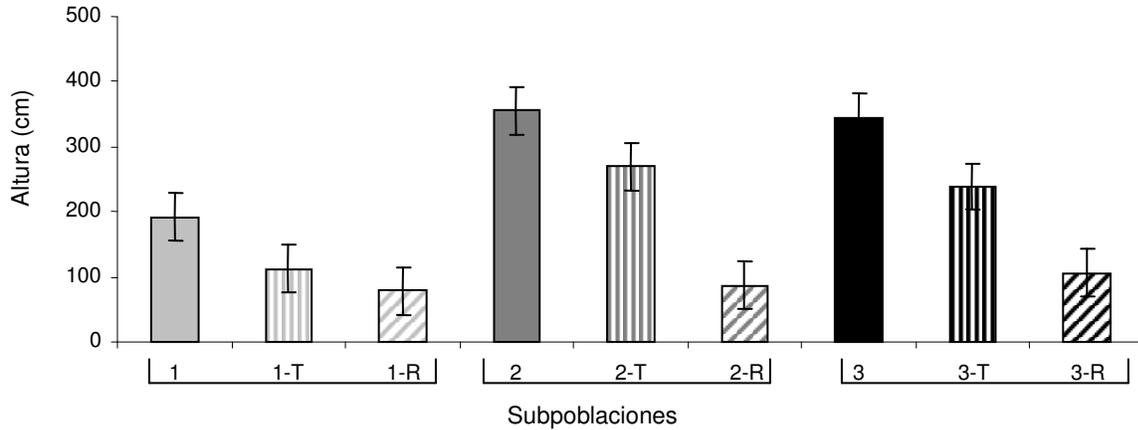
Demografía

Para el estudio poblacional se consideró la tasa de deforestación de la zona reportada por Flores-Martínez, A. (CIIDIR IPN, datos no publicados) donde las subpoblaciones están cada vez más separadas por cultivos, a unos 5 km de distancia aproximadamente, básicamente de agave (observaciones personales).

Al ser el *Cephalocereus totolapensis* un cactus columnar que ramifica primordialmente desde la base se podría decir que tiene dos partes básicas en su estructura, el tronco como la parte central de la planta y los ramas o pies, esta planta es poco común que ramifique en su parte alta (ramas) y mucho más común que ramifique desde la base de la planta (pies), los dos tipos de ramificación se consideran “ramas” en este trabajo.

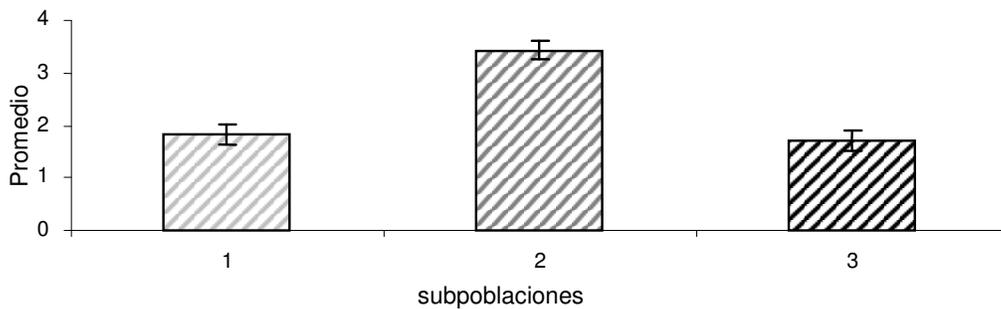
Dentro de los resultados poblacionales podemos observar que la subpoblación 1 es la que presenta las plantas de menor tamaño y la subpoblación 2 las de mayor tamaño, aunque la diferencia que hay en el tamaño de tronco es significativa, ya que en el promedio de tamaño de ramas por sitio no hay diferencias significativas, aunque la subpoblación 3 tuvo los ramas de mayor tamaño (Gráficas 1-3, ANEXO III Gráficas 1-3). También podemos observar que las plantas que presentan el tronco más alto se encuentran en la subpoblación 2, la población más “vieja” de las tres, pero respecto a la longitud de las ramas la subpoblación 3 fue la que presentó las ramas más largas (Gráfica 1, ANEXO III Gráficas 1-3).

Gráfica 1- Altura total, troncos (T) y ramas (R) de *C. totolapensis* en tres subpoblaciones (1, 2 y 3) de Oaxaca, México.



En cuanto a la cantidad de ramas por sitio se puede observar que la subpoblación 2 es la que presenta un mayor número de ramificaciones. (Gráfica 2)

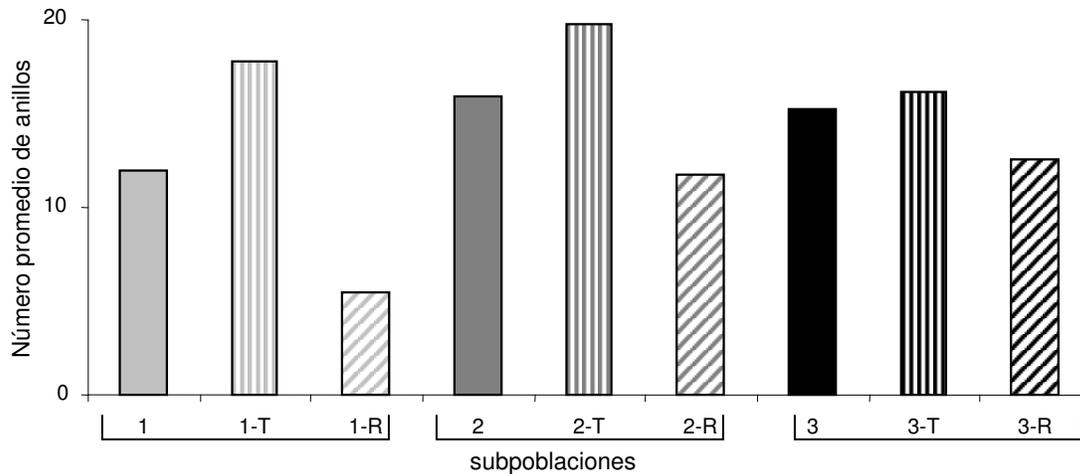
Gráfica 2- Número promedio de ramas por planta de *C. totolapensis* en tres subpoblaciones (1, 2 y 3) de Oaxaca, México.



La cantidad de eventos reproductivos a lo largo de las plantas (anillos) presentan poca diferencia entre las tres subpoblaciones en general, pero viendo la cantidad de anillos promedio por ramas por población si se puede observar una diferencia clara (Gráfica 3),

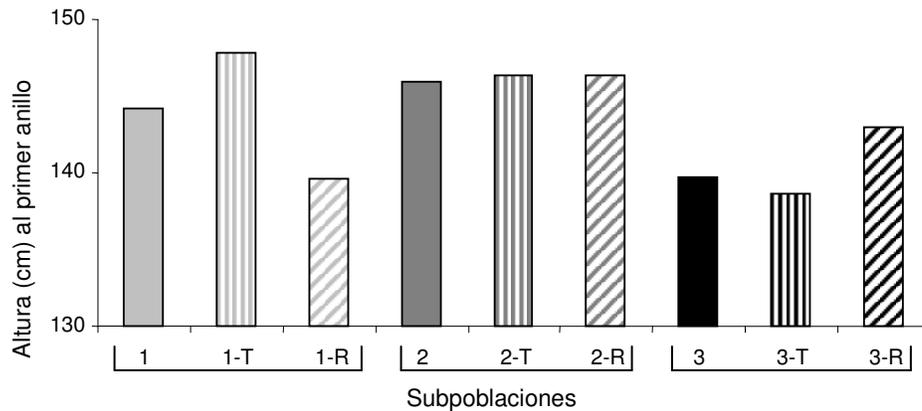
siendo la subpoblación 2 en la que se observan más eventos reproductivos y la subpoblación 1 en la que hay menos.

Gráfica 3- Número promedio de eventos reproductivos (anillos) en plantas, en troncos (T) y en ramas (R) de *C. totolapensis* en tres subpoblaciones (1, 2 y 3) de Oaxaca, México.



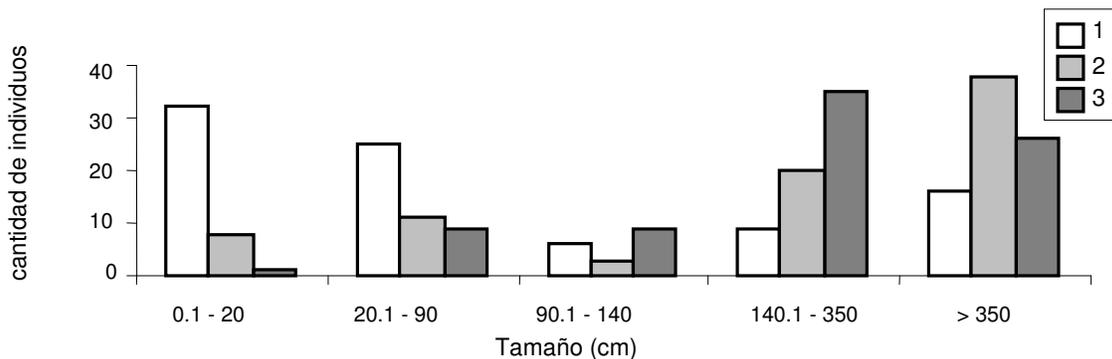
La altura promedio medida en centímetros del suelo al primer evento reproductivo en las subpoblaciones cambio de una manera clara, siendo en la subpoblación 3 donde las plantas tienen su primer evento reproductivo a menor altura promedio y la subpoblación 2 en donde las plantas tienen el primer anillo a mayor altura del suelo. Sin embargo podemos observar también que en la subpoblación 1 los troncos presentaron el primer anillo a mayor altura que en las ramas, en la subpoblación 2 las alturas promedio de troncos y ramas fueron casi idénticas mientras que en la subpoblación 3 se encontraron mayor altura en el primer anillo en las ramas que en el tronco (Gráfica 4).

Gráfica 4- Altura promedio (cm) del suelo al primer anillo reproductivo, en troncos (T) y en ramas (R) de *C. totalapensis* en tres subpoblaciones (1, 2 y 3) de Oaxaca, México.



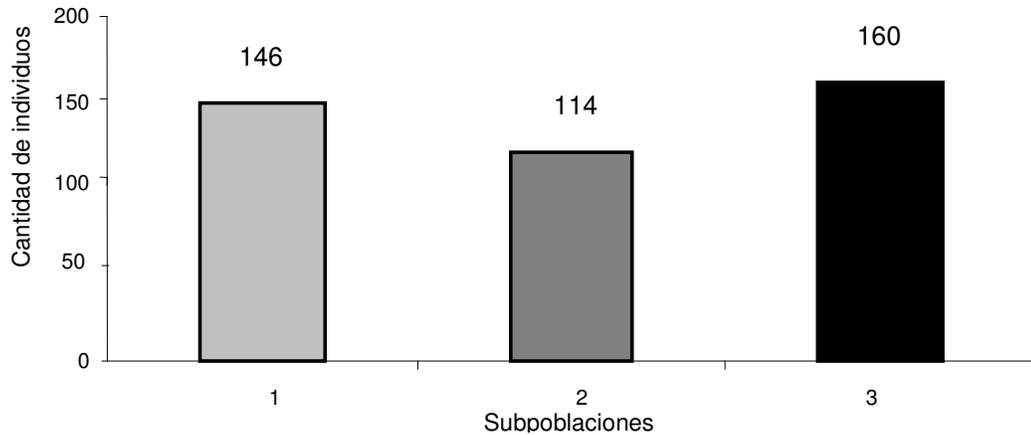
En cuanto a la estructura poblacional de tamaño total (el tamaño de los troncos mas el tamaño de las ramas) por subpoblación se puede observar que en la subpoblación 1 la mayor cantidad de plantas son menores a los 90 cm, en la subpoblación 2 la mayoría son mayores a los 140 cm de longitud al igual que en la subpoblación 3 (Gráfica 5).

Gráfica 5- Estructura poblacional por tamaño total (troncos mas ramas) de *C. totalapensis* en tres subpoblaciones (1, 2 y 3) de Oaxaca, México.



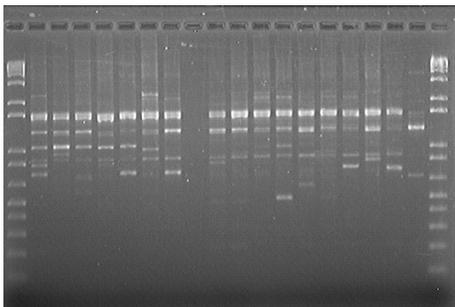
La densidad de plantas por sitio calculada a partir del muestreo realizado muestra que la subpoblación 3 es el que presenta la mayor concentración de plantas por hectárea mientras que la subpoblación 2 es el que presenta la menor densidad de plantas (Gráfica 6).

Gráfica 6- Cantidad de plantas por hectárea de *C. tototalapensis* en tres subpoblaciones (1, 2 y 3) de Oaxaca, México.



Variación y estructura genética

Se realizó el análisis de loci polimórficos utilizando 5 oligonucleótidos en 5 individuos, y se escogieron los 3 con mayor grado de polimorfismo. Con esos 3 oligonucleótidos se procedió a realizar los PCR's con los 30 individuos por población de las 3 subpoblaciones. Se obtuvieron un total de 30 bandas polimórficas. Para el "primer" OPG-18 se obtuvieron 8 fragmentos que varían su peso molecular entre los 1702 a 637 pares de bases (pb); para OPF-14 se obtuvieron 12 fragmentos, siendo éste el de mayor cantidad de marcadores, que varían entre los 2466 a 400 pb y para OPA-11 se obtuvieron 10 fragmentos que varían entre los 2600 a 490 pb (Tabla 2).



Las bandas se observan en estos gels de azarosa gracias a las luz ultravioleta.

Tabla 2. Datos de pesos moleculares (pb) de los fragmentos generados en el PCR de los tres primers probados en las tres subpoblaciones de *C. totolapensis* analizadas.

| Primer | <i>Pesos moleculares de los fragmentos encontrados en pares de bases</i> |
|--------|--|
| OPG 18 | 637, 731, 873, 1068, 1236, 1322, 1499, 1702 |
| OPF 14 | 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1100, 1200, 1350, 1700, 2000, 2466 |
| OPA 11 | 490, 550, 650, 720, 840, 880, 1300, 1608, 1720, 2600 |

La heterocigosis observada fue baja, el valor más elevado se presentó en la población 3 con el primer OPG 18 (0.3082, Tabla 3) con un porcentaje de loci polimórficos de 87.5 %; mientras que el valor más bajo fue de 0.1703 también en la población 3 pero con el primer OPA 11, con un porcentaje de loci polimórficos de 50 % (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de cada primer y de cada subpoblación de *C. totolapensis* sobre todos los loci.

| Primer | Población | N | H_e (sin sesgo) | H_o | % P (95% criterio) |
|-----------------|-----------------|----|-------------------|---------------|-----------------------|
| OPG18 | 1 | 30 | 0.2336 | 0.2297 | 87.5 |
| | 2 | 30 | 0.2544 | 0.2501 | 75 |
| | 3 | 30 | 0.3134 | 0.3082 | 87.5 |
| | <i>PROMEDIO</i> | | 0.2671 | 0.2627 | 83.3 |
| OPF14 | 1 | 30 | 0.2456 | 0.2415 | 58.33 |
| | 2 | 30 | 0.2693 | 0.2649 | 75 |
| | 3 | 30 | 0.2056 | 0.2022 | 66.67 |
| | <i>PROMEDIO</i> | | 0.2402 | 0.2362 | 66.7 |
| OPA11 | 1 | 30 | 0.2142 | 0.2106 | 60 |
| | 2 | 30 | 0.1874 | 0.1843 | 50 |
| | 3 | 30 | 0.1732 | 0.1703 | 50 |
| | <i>PROMEDIO</i> | | 0.1916 | 0.1884 | 53.3 |
| PROMEDIO | GENERAL | | 0.2330 | 0.2291 | 67.78 |

Donde N es el Número de individuos muestreados por población, H_e es la heterocigosis esperada, H_o es la heterocigosis observada y % P es el porcentaje de loci polimórficos.

El porcentaje de loci polimórficos más elevados los encontramos con el primer OPG 18 en la subpoblación 1 y 3 con un valor de 87.5 % (Tabla 4), mientras que el valor más bajo lo encontramos con el primer OPA 11 con un valor de 50 % en las subpoblaciones 2 y

3. El primer que tuvo el mayor valor en promedio de las tres subpoblaciones fue el OPG 18 con un valor promedio de 83.33 %, y el valor más bajo fue el obtenido en promedio de las tres subpoblaciones por el primer OPA 11 con un valor promedio de 53.33 %.

Tabla 4. Datos de porcentaje de loci polimórficos por primer y por subpoblación de *C. totolapensis*.

| % P (95% criterio) | Subpoblación | | | |
|--------------------|--------------|-------------|-------------|--------------|
| | 1 | 2 | 3 | Promedio |
| Primer | | | | |
| OPG 18 | 87.5 | 75 | 87.5 | 83.33 |
| OPF 14 | 58.3 | 75.0 | 66.7 | 66.67 |
| OPA 11 | 60 | 50 | 50 | 53.33 |
| Promedio | 68.6 | 66.7 | 68.1 | 67.78 |

El valor máximo de porcentaje de loci polimórficos se presentó en las subpoblaciones 2 y 3 con un 86.67%, mientras que en la subpoblación 1 fue del 83.33% (Tabla 5); el valor promedio de loci polimórficos totales fue de 85.56%.

Tabla 5. Porcentaje de loci polimórfico y número de alelos por subpoblación.

| Subpoblación | % de loci polimórfico | Número de alelos 30 loci | H _T |
|-----------------|-------------------------|-----------------------------|----------------|
| 1 | 83.33 | 1.80 | 0.3128 |
| 2 | 86.67 | 1.83 | 0.3011 |
| 3 | 86.67 | 1.80 | 0.3257 |
| PROMEDIO | 85.56 Es 1.11 | 1.81 | 0.3132 |

Donde la H_T es la heterocigosidad total.

El valor más elevado de heterocigosis observada ocurrió en la subpoblación 3 con el primer OPG 18 con un valor de 0.3082 mientras que el valor más bajo se encontró también en la subpoblación 3 pero con el primer OPA 11 con un valor de 0.1703; en cuanto a los promedios por subpoblación se encontró que el valor más elevado fue de 0.2331 en la subpoblación 2, mientras el más bajo fue de 0.2269 en la subpoblación 3. El primer que obtuvo el valor más elevado de heterocigosis observada en promedio fue el primer OPG 18

con un valor de 0.2627, mientras que el primer con el valor más bajo fue el OPA 11 con un valor de 0.1884 en promedio (Tabla 6).

Tabla 6. Heterocigosis observada promedio por cada Primer y por subpoblación.

| Primer | Subpoblación | | | |
|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | 1 | 2 | 3 | Promedio |
| OPG 18 | 0.2297 | 0.2501 | 0.3082 | 0.2627 |
| OPF 14 | 0.2415 | 0.2649 | 0.2022 | 0.2362 |
| OPA 11 | 0.2107 | 0.1843 | 0.1703 | 0.1884 |
| Promedio | 0.2273 | 0.2331 | 0.2269 | 0.2291 |

La tabla 7 muestra los resultados de AMOVA realizado con el software ARLEQUIN versión 3.0, donde se puede ver que la varianza entre las poblaciones es prácticamente nula, por lo tanto la varianza dentro de las poblaciones es el factor importante a nivel genético explicando el 99.92 % de la variación. Por otra parte, el índice de fijación es muy cercano a 0 lo que indica que la población se encuentra en equilibrio H-W pero con un leve exceso de heterocigos. Asimismo no se encuentra diferenciación entre las subpoblaciones estudiadas.

Tabla 7. Componentes de varianza y porcentaje de variación entre y dentro de las poblaciones.

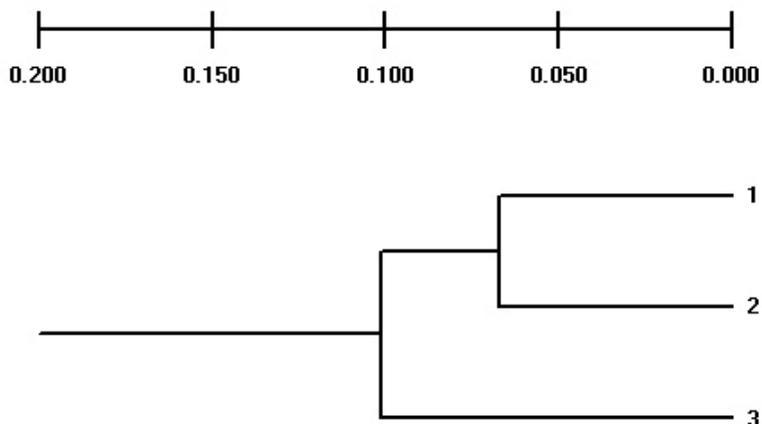
| Fuente de variación | Grados de libertad | Componentes de la varianza | Porcentaje de variación | Pruebas de significancia |
|---------------------------|--------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Entre las poblaciones | 2 | 0.00038 Va | 0.08 | 0.0000 |
| Dentro de las poblaciones | 87 | 0.49962 Vb | 99.92 | 0.0000 |
| Total | 89 | 0.50000 | 100 | |

Índice de fijación F_{ST} : 0.00077

Va y F_{ST} : P= 0.00000 (rand. value > obs. value)

Las distancias génica de Nei nos muestran un patrón que indica que las subpoblaciones 1 y 2 son las más parecidas en cuanto a su genética, mientras que la subpoblación 3 presenta la carga génica menos parecida de las 3 (Fenograma 1).

Fenograma 1. Distancias génicas de Nei para las 3 subpoblaciones.



El valor promedio de G_{ST} de los 3 primers fue 0.1437, mientras que el valor máximo del Bootstrap fue 0.1871 y el mínimo de 0.1021, en el análisis de Jackknife el valor obtenido fue de 0.1429 (Tabla 8).

Tabla 8. Los estadísticos F , en valores de Theta (G_{ST}) para cada primer y el promedio (Nei 1972), en el bootstrap con un intervalo de confianza de un 95% y en jackknife con su desviación estándar.

| Primer | Theta | Intervalos de confianza 95% para el estadístico Theta (BOOTSTRAP) | | Theta (JACKKNIFE) | |
|-----------------|-------------------------------|---|---------------|-------------------|---------------------|
| | | Máximo | Mínimo | Promedio | Desviación estándar |
| OPG18 | 0.1498 | 0.2767 | 0.0427 | 0.1572 | 0.0795 |
| OPF14 | 0.1931 | 0.3653 | 0.0699 | 0.1976 | 0.0926 |
| OPA11 | 0.1404 | 0.1746 | 0.0923 | 0.1429 | 0.0237 |
| PROMEDIO | 0.1437 ± 0.0229 | 0.1871 | 0.1021 | | |

Valor promedio de estimación indirecta del flujo génico como número de migrantes (N_m) entre subpoblaciones es de 3.4 individuos por generación.

Discusión

Estructura poblacional

Demografía

La estructura de tamaños de *C. totolapensis* muestra que la subpoblación 1 es el sitio más joven, ya que en este sitio se observan con mayor frecuencia plantas de menor tamaño, esto se ha asociado a la presencia de reclutamiento en las especies de cactáceas (Mandujano *et al.*, 2001, 2007; Godínez *et al.*, 2003) y se ha propuesto que implica que las poblaciones con esta distribución de tamaños tienen tendencia al crecimiento. La misma tendencia ha sido observada para *Neobuxbaumia mezcalaensis* (Esparza Olguín, *et al.*, 2007), una especie de cactácea columnar que también habita selvas secas (Bravo-Hollis & Sánchez Mejorada, 1978). En cambio las plantas de las otras dos subpoblaciones son de un tamaño significativamente mayor y con pocos individuos pequeños, lo que puede indicar que el establecimiento de dichas poblaciones es más antiguo y no se ha presentado en varios años (Mandujano *et al.*, 2007). La siguiente medida demográfica utilizada fue la cantidad promedio de ramas por subpoblación. En los resultados descritos en la Gráfica 2 podemos observar que la subpoblación 2 presenta una diferencia significativa respecto a las otras dos subpoblaciones, las cuales no presentan diferencias significativas entre sí. Esto se puede explicar porque las plantas de la subpoblación 2 se lastiman o laceran sus troncos con más frecuencia, esto provoca que las plantas produzcan más brazos para compensar su desarrollo. El crecimiento reiterado a manera de ramas se ha observado en otras especies de cactáceas al sufrir daños por cortes humanos o del ganado caprino y mular (Bravo-Hollis & Sánchez Mejorada, 1978; Jiménez Sierra *et al.*, 2007).

La cantidad de anillos promedio (Gráfica 3) fue relativamente homogénea entre los sitios estudiados, siendo un poco mayor en la subpoblación 2, lo que resulta lógico por la cantidad de anillos promedio que hay en los ramas de los sitios 3 y 2, donde es de un poco más del doble que en la subpoblación 1. La altura al primer evento reproductivo (Gráfica 4) fue significativamente menor en la subpoblación 3 que en las otras dos, esto podría sugerir que las plantas de ese sitio se reproducen más jóvenes, aunque a pesar de comenzar su reproducción sexual antes que las otras dos subpoblaciones sus plantas no presentan más eventos reproductivos que la subpoblación 2. Posiblemente las plantas se reproducen más rápido debido a condiciones ambientales o han destinado diferente cantidad de recursos a producir más ramas como se muestra en la grafica 2 y por lo tanto han crecido menos en altura. Parece que la altura del primer evento está correlacionada con el tamaño de las plantas en la mayoría de las especies columnares (Godínez *et al.*, 2003; Esparza Olguín, *et al.*, 2007). No obstante, en las otras especies de cactáceas columnares que se han estudiado demográficamente la reproducción se inicia a alturas mucho mayores (2 metros; Godínez *et al.*, 1999; 2003; Esparza Olguín, *et al.*, 2007) por lo que podría considerarse que *C. totalapensis* es una especie con reproducción temprana. La densidad de plantas por subpoblación difiere significativamente entre las subpoblaciones 3 y 1 de la subpoblación 2, lo que nos habla de un gran reclutamiento en la subpoblación 1 y de una “larga vida” o poca perturbación en la subpoblación 3 al presentar la mayor densidad de plantas de las 3 subpoblaciones así como un mayor tamaño promedio de altura total, tal vez sea la subpoblación más conservada, aunque con una baja tasa de reclutamiento. Al respecto, podemos concluir que esta especie debe considerarse rara demográficamente, ya que su densidad es mucho menor que las reportadas para especies columnares clasificadas como

raras (Godínez *et al.*, 1999; 2003; Esparza Olgún *et al.*, 2007) y en peligro de extinción porque se está perdiendo su hábitat.

Variación y estructura genética

El análisis de la estructura genética de *Cephalocereus totolapensis* muestra bajos niveles de variación genética, al comparar entre las subpoblaciones podemos observar que las diferencias genéticas entre ellas son mínimas (0.08%), esto se puede deber al poco tiempo transcurrido desde que la población original comenzó a dividirse o fragmentarse por la acción humana, principalmente para hacer huertos u otras acciones que originaron el cambio de uso de suelo. En general, la heterocigosis observada en *C. totolapensis* es muy similar a la reportada para otras cactáceas columnares polinizadas por murciélagos, como *Faqueiroa squamosa* (0.202), *N. tetetzo* (0.242), *Pilosocereus vilaboensis* (0.207 (Tabla 4.1 Jiménez Sierra, 2008) y por esfíngidos *Stenocereus gummosus* (Tabla 10), y similar al promedio de 0.28 reportado para una serie de 19 especies columnares revisadas por Jiménez Sierra (2008). Este nivel de variación genética es mayor al de 3 especies (*Escontria chiotilla* (0.079, Tabla 4.1 Jiménez Sierra, 2008), *Stenocereus eruca* y *S. thruberi* (Tabla 10) y menor al reportado para *N. mezcalaensis* (0.336, Tabla 4.1 Jiménez Sierra, 2008). De tal manera se puede concluir que presenta niveles de variación intermedios. Sin embargo, en muchos trabajos únicamente reportan la heterocigosis esperada, con respecto a la *He* 10 especies presentan diversidad similar (0.2 a 0.28), 4 especies menor a 0.15 y el resto tienen una diversidad más alta (Tabla 4.1 Jiménez Sierra, 2008, Tabla 10).

La baja diferenciación genética entre las subpoblaciones también puede ser causada por una alta tasa de migración, cuando el flujo génico es continuo entre las subpoblaciones, la diferenciación que pudiese generarse por entrecruzamiento y mutación es homogenizada

entre todas las subpoblaciones por los migrantes, lo importante de esta hipótesis es que biológicamente es probable, ya que los polinizadores de la especie estudiada (los murciélagos) tiene la capacidad de mover el polen a grandes distancias, y podrían ser los responsables de mantener dicho flujo génico. En esta especie no se ha estudiado este aspecto, otros trabajos con columnares como *N. tetetzo*, con flores similares son polinizadas por murciélagos (Hamrick *et al.*, 2002), estos murciélagos generalmente son especies migratorias que pueden viajar varios kilómetros. Sin embargo, las áreas de establecimiento se siguen reduciendo con el aumento de la fragmentación y sería esperable que se limite el reclutamiento de individuos en el largo plazo. Por último este mismo fenómeno podría ser solo el reflejo de los polimorfismos ancestrales, esto es, que la variación de esta especie antes de la fragmentación era tan abundante que después de la fragmentación únicamente se ha mantenido. Esto se ha observado en algunas especies en las que se ha evaluado el efecto de la fragmentación

Los marcadores moleculares utilizados han permitido analizar la variación genética, sin embargo en el futuro podrían realizarse estudios con otros marcadores que aporten más información sobre la demografía histórica de la especie.

En la tabla 10 se comparan los datos de la variación genética, y podemos observar que *C. totolapensis* presenta valores parecidos a algunas otras especies de cactáceas, la mayoría de hábito columnar, por lo que son un buen punto de comparación, podemos observar que el porcentaje de loci polimórficos es parecido a varias especies de la tabla sólo por debajo de *Stenocereus gummosus*; En cuanto a la cantidad promedio de alelos por locus vemos que prácticamente no hay diferencias entre las especies, por otro lado la heterocigosis observada de *C. totolapensis* es la más alta del registro presentado, en cambio

la heterocigosis esperada es un valor muy parecido al resto de estas plantas comparadas, al igual que el valor de theta, el cual sólo se encuentra por debajo de *Lophocereus schottii*.

Tabla 10. Comparación de especies de cactáceas con *Cephalocereus totolapensis* en sus datos de información genética, abreviaciones: % P- porcentaje de polimorfismo, A- Número promedio de alelos por locus, Ho- Heterocigosis promedio observada, He- Homocigosis promedio esperada, Theta- Coeficiente de diferenciación genética (Esparza-Olguín. 2004).

| Especie | % P | A | Ho | He | Theta | Referencias |
|--|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|------------------------------|
| <i>Carnegia gigantea</i> | 53.7 | 2.20 | 0.110 | 0.116 | 0.075 | Hamrick <i>et al.</i> (2002) |
| <i>Lophocereus schottii</i> | 49.5 | 2.33 | 0.142 | 0.144 | 0.242 | Hamrick <i>et al.</i> (2002) |
| <i>Pachycereus pringlei</i> | 62.1 | 2.50 | | 0.200 | 0.076 | Hamrick <i>et al.</i> (2002) |
| <i>Pereskia guamacho</i> | 63.4 | 2.42 | 0.169 | 0.202 | 0.112 | Hamrick <i>et al.</i> (2002) |
| <i>Stenocereus eruca</i> | 46.2 | 1.48 | 0.040 | 0.154 | 0.069 | Clark-Tapia (2000) |
| <i>Stenocereus griceus</i> | 57.1 | 2.36 | 0.139 | 0.167 | 0.096 | Hamrick <i>et al.</i> (2002) |
| <i>Stenocereus gummosus</i> | 75 | 1.96 | 0.103 | 0.261 | 0.102 | Clark-Tapia (2000) |
| <i>Stenocereus thurberi</i> | 62.4 | 2.36 | 0.157 | 0.169 | 0.128 | Hamrick <i>et al.</i> (2002) |
| <i>Cephalocereus totolapensis</i> | 67.8 | 1.81 | 0.229 | 0.233 | 0.144 | El presente trabajo |

El 99.9% de la varianza observada se da dentro de las subpoblaciones, y no entre ellas, lo que puede estar dado por la gran cantidad de heterocigosis observada dentro de las subpoblaciones y en la población en general, mientras que el valor obtenido de Nm fue de 3.4 que nos indica que existen una gran cantidad de migrantes los cuales logran reducir las variabilidad genética de la población en general.

El valor obtenido en este estudio de Theta fue de 0.144, lo que nos dice que las subpoblaciones se encuentran aparentemente cerca del equilibrio H-W, por lo que las fuerzas evolutivas casi no deben estar actuando.

La fragmentación del hábitat es algo cada recurrente en la región de Totolapan, Oaxaca, en este momento no se detectaron diferencias genéticas entre los fragmentos y todos son muy diversos. Sin embargo, debido al cambio de uso de suelo disminuye el hábitat potencial para el mantenimiento de la población, porque aumentan las presiones

sociales para dar uso a los terrenos para cultivar maguey. Al fragmentarse el hábitat natural la única localidad de *N. totolapensis*, es esperable que en la población se susciten varios cambios, como la disminución de la población y en el mediano plazo se reduzca la diversidad genética y el tamaño poblacional (Terborg & Winter, 1980; Wilcox & Murphy, 1985; Farigh & Merriam, 1994; Kruess & Tschardtke, 1994; Noss & Csuti, 1997; Lande, 1998, 1999; Zschokke *et al.*, 2000; Kattan, 2002). Generalmente, las especies de cactáceas columnares presentan densidades altas, las especies más raras que se han reportado tienen densidades de 200 individuos por hectárea. La especie de nuestro estudio presenta menor densidad y aunado a la fragmentación del hábitat y el bajo tamaño poblacional se puede proponer que la especie sufrirá un cuello de botella dada la rápida y drástica reducción de su zona de distribución, así la pérdida de diversidad genética al subdividir y disminuir pequeñas subpoblaciones tenderá a que disminuya el intercambio genético entre los individuos de cada subpoblación (Templeton, 1990).

Conclusiones

Cephalocereus totolapensis presenta una buena densidad de individuos en su sitio original de distribución pero también grandes amenazas de cambio de uso de suelo por parte de los dueños de los terrenos donde están sus subpoblaciones, además de presentar un área de distribución muy restringida.

La subpoblación 3 presentó la mayor densidad de plantas por hectárea, aunque fue la subpoblación donde se encontró la menor cantidad promedio de ramas pero estas fueron las ramas más largas de las 3 subpoblaciones.

La subpoblación 2 fue la que presentó las plantas de mayor tamaño así como los troncos de mayor tamaño y la mayor cantidad promedio de ramas, por otro lado, las ramas de mayor tamaño se encontraron en la subpoblación 3.

En la subpoblación 2 se promedió el mayor número de eventos reproductivos, mientras que la menor altura promedio del suelo al primer evento reproductivo se encontró en la subpoblación 3.

Las subpoblaciones no difieren entre sí genéticamente hablando, aparentemente fueron una gran población original con alta variación genética y ahora se encuentra fragmentada dicho polimorfismo se ha mantenido.

El flujo génico entre las subpoblaciones homogeniza la variaron entre las mismas, evitando su diferenciación, este abundante flujo es mantenido por la quiropterofilia o polinización por murciélagos.

Literatura citada

Bibliografía

- Anderson E. F. 2001. *The cactus family*. Timber Press. Portland, Oregon. 776 pp.
- Arias, S. 1993. Cactáceas: conservación y diversidad en México, México, Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural, No. 44, pp. 109-115.
- Arias-Montes, S., Guzmán, U., Mandujano, M. C., Soto, M., & Golubov, J. 2005. Las especies Mexicanas de Cactáceas en riesgo de extinción: una comparación entre los listados NOM-ECOL-2001 (México), la lista roja (UICN) y CITES. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. 50(4): 100-125.
- Arnau, I. & Cooper, S. 1992. Polymerase Chain Reaction. En "Genes in Ecology" the 33rd Symposium of the British Ecological Society University of East Anglia, 1991. Ed. [Berry, RJ; TJ. Crawford and GM. Hewitt]. Blackwell Science Ltd. London. pp. 456-459.
- Barthlott, W. & Hunt, DR. 1993. Cactaceae. En *The Families and Genera of Vascular Plants*. Ed. [Kubitzki, K.]. Vol II. 161-197.
- Bierregaard, R.O., Lovejoy, T.E., Kapos, V., dos Santos, A.A. & Hutchings, R.W. 1992. The biological dynamics of tropical rainforest fragments. *Bioscience* 42: 859-866.
- Bravo-Hollis, H. & Sánchez-Mejorada, H. 1978-91. *Las Cactáceas de México*, 2^{da} edn. 3 vols. México. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Britton, NL. & Rose, JN. 1919-1923. *The Cactaceae*. 4 Vols. Washington, D.C.: Carnegie Institution.
- Buxbaum, F. 1958. The phylogenetic division of the subfamily Cereoideae, Cactaceae. *Madroño* 14:177-206.

- Casas, A. 2002. Uso y manejo de cactáceas columnares mesoamericanas. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. Tomo XLVII. Año 47. No. 1 enero-marzo.
- Casas, A., A. Otero-Arnaiz. E. Pérez-Negrón & A. Valiente-Banuet. 2003. Manejo y domesticación de Cactáceas en Mesoamérica. *Zonas Áridas* 7: 75-104.
- Cockerham, C. Clark. 1969. Variance of Gene Frequencies. *Evolution*. Vol. 23, No. 1, pp. 72-84
- Cuartas, S. 2003. Efectos genéticos y ecológicos de la fragmentación en poblaciones de *Dieffenbachia seguine* L. en la región de Los Tuxlas. Posgrado en Ciencias Biológicas, Tesis de Maestría. UNAM. México.
- De la Cruz, M., F. Ramírez & H. Hernández. 1997. DNA isolation and amplification from cacto. *Plant Molecular Biology Reporter*. 15: 319-325.
- Dolan, R.W. 1994. Patterns of isozyme variation in relation to population size, isolation, and phytogeographic history in Royal catchfly (*Silene regia*; Caryophyllaceae). *American journal of Botany* 81(8): 965-972.
- Eguiarte, L.E., A. Silva & V. Souza 2000. Biología evolutiva de la familia Agavaceae: biología reproductiva, genética de poblaciones y filogenia. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 166: 131-150.
- Esparza-Olguín, L. G. 2004. ¿Qué sabemos de la rareza en especies vegetales? Un enfoque genético demográfico. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 75: 17-32.
- Esparza Olguín L., Valverde, T. & Mandujano, M. C. 2006. Comparative demographic analysis of three *Neobuxbaumia* species (Cactaceae) with differing degree of rarity. *Population Ecology*. 47 (3): 229-245.

- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. 2005. Arlequin ver 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Farigh, L. & G. Merriam. 1994. Conservation of fragmented populations. *Conservation biology*. Vol. 8. No. 1. pp. 50-59.
- Foré, S.A. & Guttman, S. 1999. Genetic structure of *Helianthus occidentalis* (Asteraceae) in a preserve with fragmented habitat. *American Journal of Botany* 86(7). 988-995.
- García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía. UNAM. México. 153 pp.
- Gibson, AC. & Nobel, PS. 1986. *The cactus primer*. Cambridge (Mass): Harvard Univ. Press.
- Glass, Ch. 1998. Guía para la identificación de cactáceas amenazadas de México. Fideicomiso Fondo para la Biodiversidad, CANTE, A.C.
- Godínez Alvarez, H., Valiente Banuet A. & L. Valiente. 1999. Biotic interactions and the populations dynamics of the long-lived columnar cactus *Neobuxbaumia tetetzo* in the Tehuacán Valley, Mexico. *Canadian Journal of Botany*. 77: 203:208.
- Godínez, Alvarez, H., Valverde T. & P. Ortega-Baes. 2003. Demographic trends in teh Cactaceae. *Botanical Review* 69:173-203.
- Hartl D.L., & Clark A.G., 1997. *principles of population genetics*. Third edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland Massachusets.
- Hamrick, JL., Nason JD., Fleming TH & Nassar, J. M. 2001. Genetic diversity in columnar cacti, pp. 122-133. En: TH. Fleming y A. Valiente-Banuet (compiladores) *Evolution, ecology and conseration of columnar cacti and their mutualists*. University of Arizona Press, AZ, USA.

- Hedrick, P. W. 2000. Genetics of populations. Second edition. Jones and Bartlett publishers.
- Howland, D. & Arnau, J. 1992. RAPDs: Random Amplified Polymorphic DNAs. En "Genes in Ecology" the 33rd Symposium of the British Ecological Society University of East Anglia, 1991. Ed. [Berry, RJ; TJ. Crawford and GM. Hewitt]. Blackwell Science Ltd. London. pp. 466-468.
- Jiménez-Sierra, CL. 2007. Estudios sobre la biología y demografía de *Echinocactus platyacanthus* Link et Otto, en Zapotitlán de las Salinas, Puebla, Tesis de doctorado, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Kattan, G.H. 2002. Fragmentación: patrones y mecanismos de extinción de especies. En: Ecología y conservación de bosques neotropicales. Pág. 561-590. Guariguata, M. & Kattan, G.H. (eds). Cartago. Libro Universitario Regional.
- Kattan, G.H., Alvarez-López, H. & Giraldo, M. 1994. Forest fragmentation and bird extinctions: San Antonio eighty years later. *Conservation Biology* 8(1): 138-146.
- Kruess, A. & FG, Tscharntke. 1994. Habitat fragmentation, species loss, and biological control. *Science*. 264(5165): 1581-1584.
- Lande, R. 1988. Demographic models on the northern spotted owl (*Strix occidentalis caurina*). *Oecologia* 75: 601-607.
- Lande, R. 1998. Anthropogenic, ecological and genetic factors in extinction and conservation. *Research on Population Ecology* 40(3): 259-269.
- Lande, R. 1999. Extinction risks from anthropogenic, ecological and genetic factors. En: Genetics and extinction of species. DNA and the conservation of biodiversity. Pág. 1-21.

- Ledig, F.T. 1992. Human impacts on genetic diversity in forest ecosystems. *Oikos* 63: 87-108.
- Lynch, M. & B. Milligan. 1994. Analysis of population structure with RAPDs markers. *Molecular Ecology* 3:91-99.
- Mandujano, M. C., C. Montaña, M. Franco, J. Golubov & A. Flores-Martínez. 2001. Integration of demographic annual variability in a clonal desert cactus. *Ecology* 82: 344-359.
- Mandujano, M. C., Golubov, J. & L. Huenneke. 2007. Effect of reproductive modes and environmental heterogeneity in the population dynamics of a geographically widespread clonal desert cactus. *Population Ecology* 49:141–153.
- Martorell, C. & E. M. Peters. 2005. The measurement of chronic disturbance and its effects on the threatened cactus *Mammillaria pectinifera*. *Biological Conservation* 124: 199–207.
- Metzger, J.P. 2000. Tree functional group richness and landscape structure in a Brazilian tropical fragmented landscape. *Ecological Applications* 10(4): 1147-1161.
- Miller, M.P. 1997. Tools for population genetic analysis (TFPGA) 1.3: Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Software distributed by author.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*. 106(949): 283-292.
- Norma Oficial Mexicana NOM-ECOL-059-2001, que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial y que establece especificaciones para su protección. 2002. Diario Oficial de la Federación. 16 de mayo.

- Noss, R.F. & Csuti, B. 1997. Habitat fragmentation. En: Principles of conservation biology. Segunda edición. Meffe, G.F. & Carroll, C.R. and contributors (eds). Pág. 269-304. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- Nyffeler, R. 2002. Phylogenetic relationships in the cactus family (Cactaceae) based on evidence from TRNK/MATK and TRNL-TRNF sequences. American Journal of Botany 89(2): 312-326.
- Oostermeijer, J.G.B., van Eijck, M.W., van Leeuwen, N.C. & den Nijs, J.C.M. 1996. Analysis of the relationship between allozyme heterozygosity in fitness in the rare *Gentiana pneumonanthe* L. Journal of Evolutionary Biology 8: 739-759.
- Otero, A., De La Cruz, M. & Oyama, K. 1997. El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. Boletín de la Sociedad Botánica, México. 60: 85-117.
- Ramírez Corona, F. 2000. Estudio sobre la variación genética en poblaciones naturales de dos especies endémicas y amenazadas de *Thelocactus* spp. (Cactaceae). Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rolstad, J. 1991. Consequences of forest fragmentation for the dynamics of bird populations: conceptual issues and the evidence. En: Metapopulation dynamics: Empirical and theoretical investigations. Pág. 149-163. Gilpin, M. & Hanski, I. (eds). The Linnean Society of London. Academic Press. Harcourt Brace Jovanovich Publishers.
- Rzedowski, J. 1991. Vegetación de México. Limusa México. México DF. 189-203 pp.
- Saunders, D.A., Hobbs, R. J. & Margules, C.R. 1991. Biological consequences of ecosystem fragmentation: A review. Conservation Biology 5(1): 18-32.
- Scariot, A. 1999. Forest fragmentation effects on palm diversity in central Amazonia. Journal of Ecology 87: 66-76.

- Templeton, A., Shaw, K., Routman, E. & Davis, S.K. 1990. The genetic consequences of habitat fragmentation. *Annual of the Missouri Botanical Garden* 77: 13-27.
- Terborg, J. & Winter, B. 1980. Some causes of extinction. En: *Conservation biology: an evolutionay-ecological perspective*. Soulé, M. & Wilcox, B.A. (eds). Pág. 119-134. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wilcox, B.A. & Murphy, D.D. 1985. Conservation strategy: the effects of fragmentation on extinction. *American Naturalist* 125: 879-887.
- Wilcox, B.A. 1980. Insular ecology and conservation. En: *Conservation biology: an evolutionay ecological perspective*. Soulé, M. & Wilcox, B.A. (eds) Pág. 95-118. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- Young, A., Boyle, T. & Brown, T. 1996. the population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution* 11(10): 413-419.
- Zschokke, S., Dolt, C., Rusterholz, HP., Oggier, P., Braschler, B., Thommen, GH., Lüdin, E., Erhardt, A. & Baur, B. 2000. Short-term responses of plants and invertebrates to experimental small-scale grassland fragmentation. *Oecologia*. (2000) 125:559-572.

ANEXOS

Anexo I

Protocolo de extracción “DNeasy Plant Mini Kit”, QIAGEN.

1. Moler la planta con nitrógeno líquido en mortero (120 mg máx.) Transferir el polvo obtenido y si aun tiene nitrógeno dejarlo evaporar dentro del tubo. No permitir que la muestra se seque.
2. Añadir 400 µl de buffer AP1 y 4 µl de RNasa A stock solution (100 mg/ml) a un máximo de 100 mg de tejido fresco o 20 mg de tejido seco y vortex vigorosamente. (No debe haber “aglomeraciones” de tejido visibles, sí hay removerlos con el vortex o por pipeteo, ya que las “aglomeraciones ” de tejido pueden bajar le productividad del ADN).
3. Incubar la mezcla por 10 min a 65° C. Mezclar 2-3 veces durante la incubación por medio de invertir los tubos. (este paso lisa las células).
4. Añadir 130 µl de buffer AP2 al lisado de células, mezclar por inversión e incubar por 5 min en hielo (este paso precipita detergentes, proteínas y polisacáridos). Opcional- Centrifugar el lisado por 5 min a 8000 RPM. Después añadir el sobrenadante a las columnas de spin QIAshredder.
5. Aplicar el lisado a las columnas spin (lilas) QIAshredder en un tubo colector de 2 ml (con el que viene) y centrifugar por 2 min a 8000 RPM, si se forma “pellet” no moverlo o disturbarlo al sacar la muestra para el próximo paso.
6. Transferir el “flow-through” del paso 5 a un nuevo tubo (no viene en kit) sin disturbar el “pellet”. (Normalmente se recuperan 450 µl del lisado, pero se tiene que determinar el mismo volumen para todos los tubos para el próximo paso).

7. Añadir 1.5 volúmenes de buffer AP3/E al lisado limpio y mezclar por pipeteo.
(Ejemplo: sí se recuperaron 450 µl del paso anterior se añaden 675 µl del buffer AP3/E. Es importante pipetear el buffer directo al lisado y mezclar inmediatamente).
8. Aplicar 650 µl de la mezcla del paso anterior, incluyendo cualquier precipitado que se pudo haber formado, a una DNeasy mini column spin puesta en un tubo colector de 2 ml (incluido). Centrifugar por 1 min a 8000 RPM y descartar el “flow-through”. Reusar el tubo colector para el paso 9.
9. Repetir el paso 8 con lo que sobró de muestra. Descartar el “flow-through” y el tubo colector.
10. Poner la DNeasy column en un nuevo tubo colector de 2 ml (incluido), añadir 500 µl de buffer AW a las columnas y centrifugar por 1 min a 8000 RPM. Descartar el “flow-through” y reusar el tubo colector para el paso 11.
11. Añadir 500 µl de buffer AW a las columnas DNeasy y centrifugar por 2 min a 8000 RPM para secar la membrana.
12. Transferir las DNeasy columns a un tubo de 1.5 a 2 ml (no incluido) y pipetear 100 µl del buffer AE precalentado directamente en la membrana de las columnas. Incubar por 5 min a temperatura ambiente y después centrifugar por 1 min a 8000 RPM para eluir.
13. Repetir la elusión del paso 12 una vez como se describe.
14. Los nombres de los buffers y tipos de tubo son específicos del kit de extracción de ADN (“DNeasy Plant Mini Kit”, QIAGEN).

Anexo II

Tablas de datos de primer OPG-18 en las tres subpoblaciones.

| Población 1 | | | | | | |
|-------------|-----------------|-------|-------|--------------|-----------------|----------------|
| Locus | heterocigocidad | alelo | # obs | freq alélica | # heterocigotos | freq de hetero |
| 1 | 0.4832 | 1 | 25 | 0.5918 | 14.4949 | 0.4832 |
| | | 2 | 5 | 0.4082 | 14.4949 | 0.4832 |
| 2 | 0.1591 | 1 | 5 | 0.0871 | 4.7723 | 0.1591 |
| | | 2 | 25 | 0.9129 | 4.7723 | 0.1591 |
| 3 | 0.2460 | 1 | 8 | 0.1437 | 7.3809 | 0.246 |
| | | 2 | 22 | 0.8563 | 7.3809 | 0.246 |
| 4 | 0.2460 | 1 | 8 | 0.1437 | 7.3809 | 0.246 |
| | | 2 | 22 | 0.8563 | 7.3809 | 0.246 |
| 5 | 0.00 | 1 | 30 | 1.000 | 0 | 0 |
| | | 2 | 0 | 0.000 | 0 | 0 |
| 6 | 0.2460 | 1 | 8 | 0.1437 | 7.3809 | 0.246 |
| | | 2 | 22 | 0.8563 | 7.3809 | 0.246 |
| 7 | 0.1591 | 1 | 5 | 0.0871 | 4.7723 | 0.1591 |
| | | 2 | 25 | 0.9129 | 4.7723 | 0.1591 |
| 8 | 0.2985 | 1 | 29 | 0.8174 | 8.9545 | 0.2985 |
| | | 2 | 1 | 0.1826 | 8.9545 | 0.2985 |
| promedio | 0.2297 | | | | | |

| Población 2 | | | | | | |
|-------------|-----------------|-------|-------|--------------|-----------------|----------------|
| Locus | heterocigocidad | alelo | # obs | freq alélica | # heterocigotos | freq de hetero |
| 1 | 0.4954 | 1 | 21 | 0.4523 | 14.8634 | 0.4954 |
| | | 2 | 9 | 0.5477 | 14.8634 | 0.4954 |
| 2 | 0.0974 | 1 | 3 | 0.0513 | 2.921 | 0.0974 |
| | | 2 | 27 | 0.9487 | 2.921 | 0.0974 |
| 3 | 0.0331 | 1 | 1 | 0.0168 | 0.9915 | 0.0331 |
| | | 2 | 29 | 0.9832 | 0.9915 | 0.0331 |
| 4 | 0.2985 | 1 | 29 | 0.8174 | 8.9545 | 0.2985 |
| | | 2 | 1 | 0.1826 | 8.9545 | 0.2985 |
| 5 | 0.3831 | 1 | 28 | 0.7418 | 11.4919 | 0.3831 |
| | | 2 | 2 | 0.2582 | 11.4919 | 0.3831 |
| 6 | 0.1286 | 1 | 4 | 0.0691 | 3.857 | 0.1286 |
| | | 2 | 26 | 0.9309 | 3.857 | 0.1286 |
| 7 | 0.0655 | 1 | 2 | 0.0339 | 1.9655 | 0.0655 |
| | | 2 | 28 | 0.9661 | 1.9655 | 0.0655 |
| 8 | 0.4994 | 1 | 23 | 0.517 | 14.9828 | 0.4994 |
| | | 2 | 7 | 0.483 | 14.9828 | 0.4994 |
| promedio | 0.2501 | | | | | |

| Población 3 | | | | | | |
|-------------|-----------------|-------|-------|--------------|-----------------|----------------|
| Locus | heterocigocidad | alelo | # obs | freq alélica | # heterocigotos | freq de hetero |
| 1 | 0.4649 | 1 | 18 | 0.3675 | 13.9473 | 0.4649 |
| | | 2 | 12 | 0.6325 | 13.9473 | 0.4649 |
| 2 | 0.1286 | 1 | 4 | 0.0691 | 3.857 | 0.1286 |

| | | | | | | |
|----------|--------|---|----|--------|---------|--------|
| | | 2 | 26 | 0.9309 | 3.857 | 0.1286 |
| 3 | 0.2997 | 1 | 10 | 0.1835 | 8.9898 | 0.2997 |
| | | 2 | 20 | 0.8165 | 8.9898 | 0.2997 |
| 4 | 0.4636 | 1 | 26 | 0.6349 | 13.9089 | 0.4636 |
| | | 2 | 4 | 0.3651 | 13.9089 | 0.4636 |
| 5 | 0.3831 | 1 | 28 | 0.7418 | 11.4919 | 0.3831 |
| | | 2 | 2 | 0.2582 | 11.4919 | 0.3831 |
| 6 | 0.3939 | 1 | 14 | 0.2697 | 11.8178 | 0.3939 |
| | | 2 | 16 | 0.7303 | 11.8178 | 0.3939 |
| 7 | 0.0331 | 1 | 1 | 0.0168 | 0.9915 | 0.0331 |
| | | 2 | 29 | 0.9832 | 0.9915 | 0.0331 |
| 8 | 0.2985 | 1 | 29 | 0.8174 | 8.9545 | 0.2985 |
| | | 2 | 1 | 0.1826 | 8.9545 | 0.2985 |
| promedio | 0.3082 | | | | | |

Resultados sobre todos los loci

| | | |
|-----------------------|------|----|
| % loci polimórfico | 99 % | 70 |
| | 95 % | 50 |

Tablas de datos de primer OPA-11 en las tres subpoblaciones.

| Población 1 | | | | | | |
|-------------|-----------------|-------|-------|--------------|-----------------|----------------|
| Locus | heterocigocidad | alelo | # obs | freq alélica | # heterocigotos | freq de hetero |
| 1 | 0.3939 | 1 | 14 | 0.2697 | 11.8178 | 0.3939 |
| | | 2 | 16 | 0.7303 | 11.8178 | 0.3939 |
| 2 | 0.00 | 1 | 30 | 1.00 | 0.00 | 0.00 |
| | | 2 | 0 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 3 | 0.00 | 1 | 30 | 1.00 | 0.00 | 0.00 |
| | | 2 | 0 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 4 | 0.4995 | 1 | 22 | 0.4836 | 14.9839 | 0.4995 |
| | | 2 | 8 | 0.5164 | 14.9839 | 0.4995 |
| 5 | 0.4499 | 1 | 17 | 0.3417 | 13.4968 | 0.4499 |
| | | 2 | 13 | 0.6583 | 13.4968 | 0.4499 |
| 6 | 0.3250 | 1 | 11 | 0.2042 | 9.7493 | 0.3250 |
| | | 2 | 19 | 0.7958 | 9.7493 | 0.3250 |
| 7 | 0.2460 | 1 | 8 | 0.1437 | 7.3809 | 0.2460 |
| | | 2 | 22 | 0.8563 | 7.3809 | 0.2460 |
| 8 | 0.1591 | 1 | 5 | 0.0871 | 4.7723 | 0.1591 |
| | | 2 | 25 | 0.9129 | 4.7723 | 0.1591 |
| 9 | 0.0331 | 1 | 1 | 0.0168 | 0.9915 | 0.0331 |
| | | 2 | 29 | 0.9832 | 0.9915 | 0.0331 |
| 10 | 0.00 | 1 | 0 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | | 2 | 30 | 1.00 | 0.00 | 0.00 |
| Promedio | 0.2107 | | | | | |

| Población 2 | | | | | | |
|-------------|-----------------|-------|-------|--------------|-----------------|----------------|
| Locus | heterocigocidad | alelo | # obs | freq alélica | # heterocigotos | freq de hetero |
| 1 | 0.4995 | 1 | 22 | 0.4836 | 14.9839 | 0.4995 |
| | | 2 | 8 | 0.5164 | 14.9839 | 0.4995 |
| 2 | 0.00 | 1 | 30 | 1.00 | 0.00 | 0.00 |

| | | | | | | |
|----------|--------|---|----|--------|---------|--------|
| | | 2 | 0 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 3 | 0.00 | 1 | 30 | 1.00 | 0.00 | 0.00 |
| | | 2 | 0 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 4 | 0.1889 | 1 | 6 | 0.1056 | 5.6656 | 0.1889 |
| | | 2 | 24 | 0.8944 | 5.6656 | 0.1889 |
| 5 | 0.4954 | 1 | 21 | 0.4523 | 14.8634 | 0.4954 |
| | | 2 | 9 | 0.5477 | 14.8634 | 0.4954 |
| 6 | 0.0974 | 1 | 3 | 0.0513 | 2.9210 | 0.0974 |
| | | 2 | 27 | 0.9487 | 2.9210 | 0.0974 |
| 7 | 0.4954 | 1 | 21 | 0.4523 | 14.8634 | 0.4954 |
| | | 2 | 9 | 0.5477 | 14.8634 | 0.4954 |
| 8 | 0.00 | 1 | 0 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | | 2 | 30 | 1.00 | 0.00 | 0.00 |
| 9 | 0.0331 | 1 | 1 | 0.0168 | 0.9915 | 0.0331 |
| | | 2 | 29 | 0.9832 | 0.9915 | 0.0331 |
| 10 | 0.0331 | 1 | 1 | 0.0168 | 0.9915 | 0.0331 |
| | | 2 | 29 | 0.9832 | 0.9915 | 0.0331 |
| promedio | 0.1843 | | | | | |

Población 3

| Locus | heterocigocidad | alelo | # obs | freq alélica | # heterocigotos | freq de hetero |
|----------|-----------------|-------|-------|--------------|-----------------|----------------|
| 1 | 0.3250 | 1 | 11 | 0.2042 | 9.7493 | 0.3250 |
| | | 2 | 19 | 0.7958 | 9.7493 | 0.3250 |
| 2 | 0.00 | 1 | 30 | 1.00 | 0.00 | 0.00 |
| | | 2 | 0 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 3 | 0.00 | 1 | 30 | 1.00 | 0.00 | 0.00 |
| | | 2 | 0 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 4 | 0.4777 | 1 | 19 | 0.3945 | 14.3318 | 0.4777 |
| | | 2 | 11 | 0.6055 | 14.3318 | 0.4777 |
| 5 | 0.0974 | 1 | 3 | 0.0513 | 2.9210 | 0.0974 |
| | | 2 | 27 | 0.9487 | 2.9210 | 0.0974 |
| 6 | 0.00 | 1 | 0 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| | | 2 | 30 | 1.00 | 0.00 | 0.00 |
| 7 | 0.4832 | 1 | 25 | 0.5918 | 14.4949 | 0.4832 |
| | | 2 | 5 | 0.4082 | 14.4949 | 0.4832 |
| 8 | 0.0655 | 1 | 2 | 0.0339 | 1.9655 | 0.0655 |
| | | 2 | 28 | 0.9661 | 1.9655 | 0.0655 |
| 9 | 0.0655 | 1 | 2 | 0.0339 | 1.9655 | 0.0655 |
| | | 2 | 28 | 0.9661 | 1.9655 | 0.0655 |
| 10 | 0.1889 | 1 | 6 | 0.1056 | 5.6656 | 0.1889 |
| | | 2 | 24 | 0.8944 | 5.6656 | 0.1889 |
| promedio | 0.1703 | | | | | |

Resultados sobre todos los loci

| | | |
|-----------------------|------|----|
| % loci polimórfico | 99 % | 70 |
| | 95 % | 50 |

Tablas de datos de primer OPF-14 en las tres subpoblaciones.

| Población 1 | | | | | | |
|-------------|-----------------|-------|-------|--------------|-----------------|----------------|
| Locus | heterocigocidad | alelo | # obs | freq alélica | # heterocigotos | freq de hetero |
| 1 | 0.0000 | 1 | 30 | 1 | 0 | 0 |
| | | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0.4994 | 1 | 23 | 0.5170 | 14.9828 | 0.4994 |
| | | 2 | 7 | 0.4830 | 14.9828 | 0.4994 |
| 3 | 0.2997 | 1 | 10 | 0.1835 | 8.9898 | 0.2997 |
| | | 2 | 20 | 0.8165 | 8.9898 | 0.2997 |
| 4 | 0.4994 | 1 | 23 | 0.5170 | 14.9828 | 0.4994 |
| | | 2 | 7 | 0.4830 | 14.9828 | 0.4994 |
| 5 | 0.4142 | 1 | 15 | 0.2929 | 12.4264 | 0.4142 |
| | | 2 | 15 | 0.7071 | 12.4264 | 0.4142 |
| 6 | 0.0331 | 1 | 1 | 0.0168 | 0.9915 | 0.0331 |
| | | 2 | 29 | 0.9832 | 0.9915 | 0.0331 |
| 7 | 0.2179 | 1 | 7 | 0.1244 | 6.5357 | 0.2179 |
| | | 2 | 23 | 0.8756 | 6.5357 | 0.2179 |
| 8 | 0.4777 | 1 | 19 | 0.3945 | 14.3318 | 0.4777 |
| | | 2 | 11 | 0.6055 | 14.3318 | 0.4777 |
| 9 | 0.3250 | 1 | 11 | 0.2042 | 9.7493 | 0.3250 |
| | | 2 | 19 | 0.7958 | 9.7493 | 0.3250 |
| 10 | 0.0331 | 1 | 1 | 0.0168 | 0.9915 | 0.0331 |
| | | 2 | 29 | 0.9832 | 0.9915 | 0.0331 |
| 11 | 0.0331 | 1 | 1 | 0.0168 | 0.9915 | 0.0331 |
| | | 2 | 29 | 0.9832 | 0.9915 | 0.0331 |
| 12 | 0.0655 | 1 | 2 | 0.0339 | 1.9655 | 0.0655 |
| | | 2 | 28 | 0.9661 | 1.9655 | 0.0655 |
| Promedio | 0.2415 | | | | | |

| Población 2 | | | | | | |
|-------------|-----------------|-------|-------|--------------|-----------------|----------------|
| Locus | heterocigocidad | alelo | # obs | freq alélica | # heterocigotos | freq de hetero |
| 1 | 0.0000 | 1 | 30 | 1 | 0 | 0 |
| | | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0.4499 | 1 | 17 | 0.3417 | 13.4968 | 0.4499 |
| | | 2 | 13 | 0.6583 | 13.4968 | 0.4499 |
| 3 | 0.4954 | 1 | 21 | 0.4523 | 14.8634 | 0.4954 |
| | | 2 | 9 | 0.5477 | 14.8634 | 0.4954 |
| 4 | 0.4954 | 1 | 21 | 0.4523 | 14.8634 | 0.4954 |
| | | 2 | 9 | 0.5477 | 14.8634 | 0.4954 |
| 5 | 0.4142 | 1 | 15 | 0.2929 | 12.4264 | 0.4142 |
| | | 2 | 15 | 0.7071 | 12.4264 | 0.4142 |
| 6 | 0.0655 | 1 | 2 | 0.0339 | 1.9655 | 0.0655 |
| | | 2 | 28 | 0.9661 | 1.9655 | 0.0655 |
| 7 | 0.2460 | 1 | 8 | 0.1437 | 7.3809 | 0.2460 |
| | | 2 | 22 | 0.8563 | 7.3809 | 0.2460 |
| 8 | 0.2733 | 1 | 9 | 0.1633 | 8.1996 | 0.2733 |
| | | 2 | 21 | 0.8367 | 8.1996 | 0.2733 |

| | | | | | | |
|----------|--------|---|----|--------|--------|--------|
| 9 | 0.1889 | 1 | 6 | 0.1056 | 5.6656 | 0.1889 |
| | | 2 | 24 | 0.8944 | 5.6656 | 0.1889 |
| 10 | 0.0655 | 1 | 2 | 0.0339 | 1.9655 | 0.0655 |
| | | 2 | 28 | 0.9661 | 1.9655 | 0.0655 |
| 11 | 0.1591 | 1 | 5 | 0.0871 | 4.7723 | 0.1591 |
| | | 2 | 25 | 0.9129 | 4.7723 | 0.1591 |
| 12 | 0.3250 | 1 | 11 | 0.2042 | 9.7493 | 0.3250 |
| | | 2 | 19 | 0.7958 | 9.7493 | 0.3250 |
| promedio | 0.2649 | | | | | |

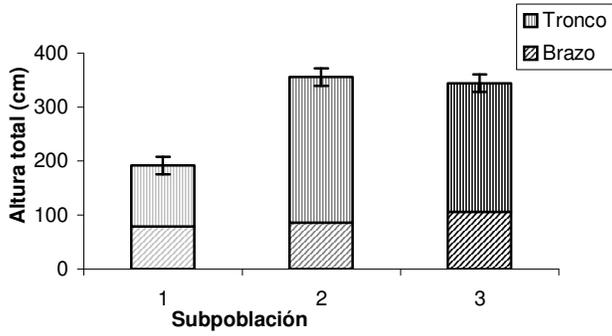
| Población 3 | | | | | | |
|-------------|-----------------|-------|-------|--------------|-----------------|----------------|
| Locus | heterocigocidad | alelo | # obs | freq alélica | # heterocigotos | freq de hetero |
| 1 | 0.3722 | 1 | 13 | 0.2472 | 11.1664 | 0.3722 |
| | | 2 | 17 | 0.7528 | 11.1664 | 0.3722 |
| 2 | 0.1591 | 1 | 5 | 0.0871 | 4.7723 | 0.1591 |
| | | 2 | 25 | 0.9129 | 4.7723 | 0.1591 |
| 3 | 0.2997 | 1 | 10 | 0.1835 | 8.9898 | 0.2997 |
| | | 2 | 20 | 0.8165 | 8.9898 | 0.2997 |
| 4 | 0.2733 | 1 | 9 | 0.1633 | 8.1996 | 0.2733 |
| | | 2 | 21 | 0.8367 | 8.1996 | 0.2733 |
| 5 | 0.2997 | 1 | 10 | 0.1835 | 8.9898 | 0.2997 |
| | | 2 | 20 | 0.8165 | 8.9898 | 0.2997 |
| 6 | 0.0655 | 1 | 2 | 0.0339 | 1.9655 | 0.0655 |
| | | 2 | 28 | 0.9661 | 1.9655 | 0.0655 |
| 7 | 0.4777 | 1 | 19 | 0.3945 | 14.3318 | 0.4777 |
| | | 2 | 11 | 0.6055 | 14.3318 | 0.4777 |
| 8 | 0.0655 | 1 | 2 | 0.0339 | 1.9655 | 0.0655 |
| | | 2 | 28 | 0.9661 | 1.9655 | 0.0655 |
| 9 | 0.1591 | 1 | 5 | 0.0871 | 4.7723 | 0.1591 |
| | | 2 | 25 | 0.9129 | 4.7723 | 0.1591 |
| 10 | 0.0655 | 1 | 2 | 0.0339 | 1.9655 | 0.0655 |
| | | 2 | 28 | 0.9661 | 1.9655 | 0.0655 |
| 11 | 0.0000 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 2 | 30 | 1 | 0 | 0 |
| 12 | 0.1889 | 1 | 6 | 0.1056 | 5.6656 | 0.1889 |
| | | 2 | 24 | 0.8944 | 5.6656 | 0.1889 |
| promedio | 0.2022 | | | | | |

Resultados sobre todos los loci

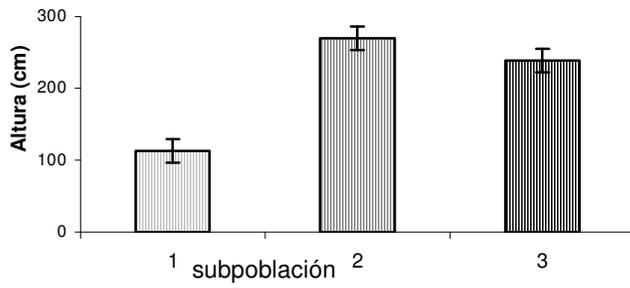
| | | |
|-----------------------|------|----|
| % loci polimórfico | 99 % | 70 |
| | 95 % | 50 |

Anexo III

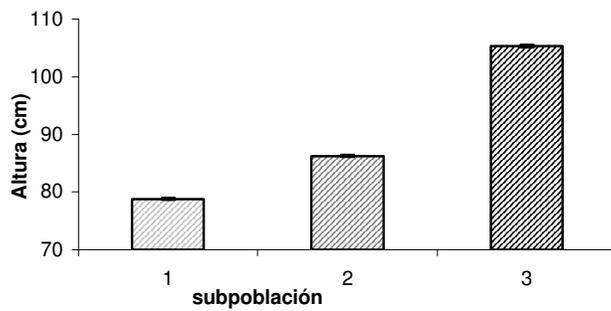
Gráfica 1- Altura total (troncos más ramas) de *C. totolapensis* en tres subpoblaciones (1, 2 y 3) de Oaxaca, México.



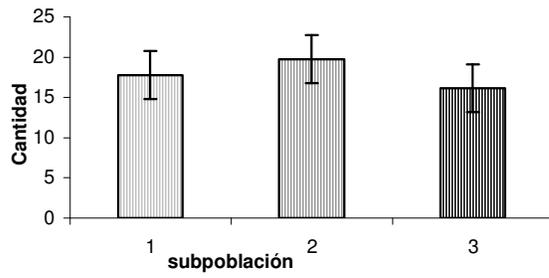
Gráfica 2- Altura promedio de troncos de *C. totolapensis* en tres subpoblaciones (1, 2 y 3) de Oaxaca, México.



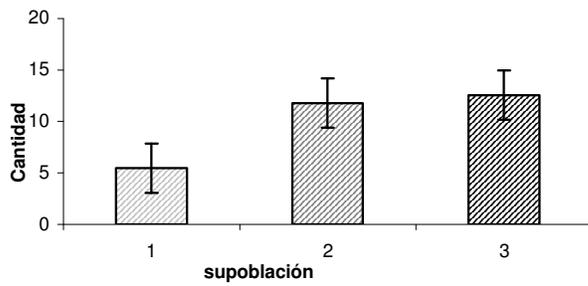
Gráfica 3- Altura promedio de ramas de *C. totolapensis* en tres subpoblaciones (1, 2 y 3) de Oaxaca, México.



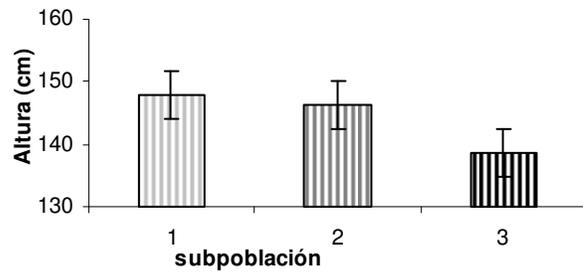
Gráfica 4- Cantidad promedio de anillos en troncos de *C. totolapensis* en tres subpoblaciones (1, 2 y 3) de Oaxaca, México.



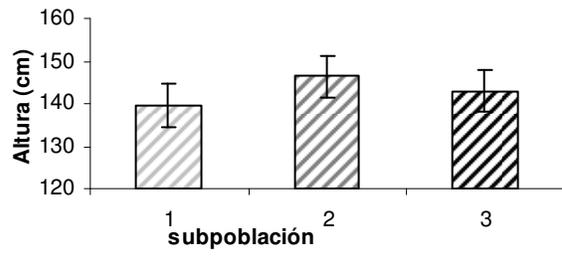
Gráfica 5- Cantidad promedio de anillos en ramas de *C. totolapensis* en tres subpoblaciones (1, 2 y 3) de Oaxaca, México.



Gráfica 6- Altura promedio al 1er anillo en troncos de *C. totolapensis* en tres subpoblaciones (1, 2 y 3) de Oaxaca, México.



Gráfica 6- Altura promedio al 1er anillo en ramas de *C. totolapensis* en tres subpoblaciones (1, 2 y 3) de Oaxaca, México.



Anexo IV

Distancias genéticas de Nei

GENETIC DISTANCES NEI'S (1972/1978) IDENTITIES/DISTANCES

G 18

| Populations compared | dist. | ident. | unbiased dist. | unbiased ident. | | 1 | 2 | 3 | |
|----------------------|--------|--------|----------------|-----------------|--------|---|--------|--------|--------|
| 1 vs. 2 | 0,0415 | | 0,9593 | 0,0373 | 0,9634 | 1 | ***** | 0,9593 | 0,9567 |
| 1 vs. 3 | 0,0443 | | 0,9567 | 0,0403 | 0,9605 | 2 | 0,0415 | ***** | 0,9570 |
| 2 vs. 3 | 0,0439 | | 0,9570 | 0,0402 | 0,9606 | 3 | 0,0443 | 0,0439 | ***** |

F 14

| Populations compared | dist. | ident. | unbiased dist. | unbiased ident. | | 1 | 2 | 3 | |
|----------------------|--------|--------|----------------|-----------------|--------|---|--------|--------|--------|
| 1 vs. 2 | 0,0230 | | 0,9772 | 0,0173 | 0,9829 | 1 | ***** | 0,9772 | 0,8813 |
| 1 vs. 3 | 0,1264 | | 0,8813 | 0,1215 | 0,8856 | 2 | 0,0230 | ***** | 0,9033 |
| 2 vs. 3 | 0,1017 | | 0,9033 | 0,0965 | 0,9080 | 3 | 0,1264 | 0,1017 | ***** |

A 11

| Populations compared | dist. | ident. | unbiased dist. | unbiased ident. | | 1 | 2 | 3 | |
|----------------------|--------|--------|----------------|-----------------|--------|---|--------|--------|--------|
| 1 vs. 2 | 0,1141 | | 0,8922 | 0,1087 | 0,8970 | 1 | ***** | 0,8922 | 0,9362 |
| 1 vs. 3 | 0,0659 | | 0,9362 | 0,0596 | 0,9421 | 2 | 0,1141 | ***** | 0,9662 |
| 2 vs. 3 | 0,0344 | | 0,9662 | 0,0278 | 0,9726 | 3 | 0,0659 | 0,0344 | ***** |

Anexo V

θ (Theta), de los tres RAPDs OPG18, OPF14 y OPA11

OPG18

| Análisis JACKKNIFE de todos los loci | | | | | |
|---|---------------|--|--------|---------------|--|
| Loci | Theta | | Loci | Theta | |
| 1 | 0,1789 | | 1 | 0,0345 | |
| 2 | 0,1586 | | 2 | -0,0119 | |
| 3 | 0,1582 | | 3 | 0,0571 | |
| 4 | 0,0721 | | 4 | 0,4097 | |
| 5 | 0,1520 | | 5 | 0,1338 | |
| 6 | 0,1611 | | 6 | 0,0586 | |
| 7 | 0,1548 | | 7 | 0,0139 | |
| 8 | 0,1545 | | 8 | 0,1269 | |
| Promedio | 0,1572 | | Theta | 0,1498 | |
| D. S. | 0,0795 | | | | |
| 95 % Intervalos de confianza del Bootstrap de todos los loci. | | | Máximo | 0,2767 | |
| replicas hechas: 1000 | | | Mínimo | 0,0427 | |

OPF14

| Análisis JACKKNIFE de todos los loci | | | | | |
|---|---------------|--|--------|---------------|--|
| Loci | Theta | | Loci | Theta | |
| 1 | 0,1022 | | 1 | 0,7486 | |
| 2 | 0,1938 | | 2 | 0,1883 | |
| 3 | 0,2050 | | 3 | 0,1016 | |
| 4 | 0,2033 | | 4 | 0,1291 | |
| 5 | 0,2158 | | 5 | 0,0042 | |
| 6 | 0,1963 | | 6 | -0,0133 | |
| 7 | 0,2022 | | 7 | 0,1116 | |
| 8 | 0,1941 | | 8 | 0,1833 | |
| 9 | 0,2052 | | 9 | 0,0177 | |
| 10 | 0,1963 | | 10 | -0,0133 | |
| 11 | 0,1959 | | 11 | 0,0467 | |
| 12 | 0,2016 | | 12 | 0,0546 | |
| average | 0,1976 | | Theta | 0,1931 | |
| D. S. | 0,0926 | | | | |
| 95 % Intervalos de confianza del Bootstrap de todos los loci. | | | Máximo | 0,3653 | |
| replicas hechas: 1000 | | | Mínimo | 0,0699 | |

OPA11

| Análisis JACKNIFE de todos los loci | | | |
|---|---------------|--------|---------------|
| Loci | Theta | Loci | Theta |
| 1 | 0,1556 | 1 | 0,0798 |
| 2 | 0,1404 | 2 | Sin definir |
| 3 | 0,1404 | 3 | Sin definir |
| 4 | 0,1370 | 4 | 0,1532 |
| 5 | 0,1298 | 5 | 0,1843 |
| 6 | 0,1417 | 6 | 0,1235 |
| 7 | 0,1251 | 7 | 0,1914 |
| 8 | 0,1443 | 8 | 0,0329 |
| 9 | 0,1435 | 9 | -0,0125 |
| 10 | 0,1432 | 10 | 0,0645 |
| Promedio | 0,1429 | Theta | 0,1404 |
| D. S. | 0,0237 | | |
| 95 % Intervalos de confianza del Bootstrap de todos los loci. | | Máximo | 0,1746 |
| Replicas hechas: 1000 | | Mínimo | 0,0923 |