

84
2e



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

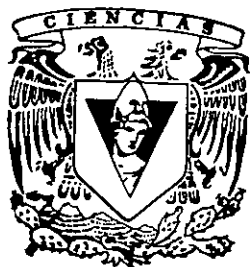
FACULTAD DE CIENCIAS

Estructura genética y procesos de especiación
de Agave cerulata (Trel.) y Agave subsimplex
(Trel.) en el desierto Sonorense a partir de
RAPD's

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
AURA ROCIO NAVARRO QUEZADA

280433



DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

TESIS CON
FALLA EN EL
ENCUEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

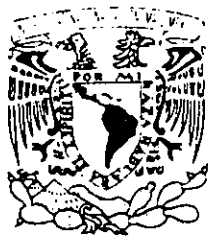


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Estructura genética y procesos de especiación de *Agave cerulata* (Trel.) y *Agave subsimplex* (Trel.) en el desierto sonorense: análisis a partir de RAPD's

realizado por Aura Rocío Navarro Ouezada

con número de cuenta 9550380-8 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Luis E. Equiarte Fruns

Propietario Dr. Francisco E. Molina Freaner

Propietario Dr. Juan S. Núñez Farfan

Suplente Dr. Daniel I. Piñero Dalmau

Suplente Dr. César A. Domínguez Pérez-Tejada

Luis E. Equiarte Fruns
Francisco E. Molina F.
Juan S. Núñez Farfan
Daniel Piñero
César A. Domínguez Pérez-Tejada

Edna M. Suárez D.

Consejo Departamental de Biología M. en C. Edna María Suárez Díaz

Para Andrea

Este proyecto se realizó en el laboratorio de Evolución Molecular y Experimental bajo la dirección del Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns, con apoyo de una beca de Fundación UNAM y del proyecto PAPIIT, DGAPA No. 211997.

Agradecimientos

A mis padres: Hugo R. Navarro Contreras y Ma. del Rocío Quezada de Navarro.

Al Dr. Luis Eguiarte por su asesoría en el trabajo de tesis y en mi formación en el campo de la genética evolutiva.

Al Biól. Jordan Golubov y Biól. Arturo Silva, por los comentarios críticos a las primeras versiones de esta tesis.

Al Dr. Francisco Molina por su ayuda en la colecta de campo y la revisión de la tesis, por esto último al Dr. César Domínguez, Dr. Daniel Piñero y al Dr. Juan Núñez.

A la Dra. Valeria Souza y M.en C. Claudia Silva por su motivación y ayuda.

Al Biól. Aldo Valera, Biól. Néstor Mariano, César Abarca, Gumersindo, José Luis Ibarra y Biól. Martha Rocha por su apoyo técnico en el laboratorio.

Al Biól. Jesús Vargas y Biól. Juan Fornoni por su ayuda en la realización de análisis y mapas.

A mis compañeros de laboratorio y compañeros y amigos de la Facultad de Ciencias (¡ya hagan su tesis!) por su apoyo psicológico, moral y anímico.

INDICE

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Genética de poblaciones y Evolución	3
Especiación	9
Bases genéticas de la especiación	14
Genética de poblaciones y conservación	15
El género <i>Agave</i> en México y en el desierto sonorense	16
Descripción general de las especies estudiadas	18
¿Qué son los RAPD's?	25
Objetivos e Hipótesis	29
Material y Métodos	31
Colecta de campo	31
Análisis genéticos	32
Análisis de datos	34
Resultados	41
Discusión	61
Frecuencias genéticas	61
Variación genética	62
Diferenciación y flujo génico	68
Interpretación de las distancias genéticas en el proceso de especiación	73
Evolución de <i>Agave cerulata</i> Trel. y <i>Agave subsimplex</i> Trel. en Sonora y la Península de Baja California	78
Conservación de <i>Agave subsimplex</i> y <i>Agave cerulata</i>	79
Conclusiones	81
Literatura citada	83

Resumen

Dentro del grupo Deserticolae (Gentry, 1982) *Agave cerulata* se distribuye a lo largo de la Península de Baja California y se divide en cuatro subespecies: *A. c. nelsonii*, *A. c. cerulata*, *A. c. subcerulata* y *A. c. dentiens*, ésta última endémica la Isla San Esteban en el Golfo de California. *Agave subsimplex* se encuentra en la costa de Sonora, entre los grados 28 y 30° de latitud N. Ambas especies se han relacionado con *Agave deserti*, una especie que ocupa el norte de Sonora, norte de Baja California y sur de California. Una hipótesis es que esta especie ancestral se derivaron las otras dos, que quedaron separadas al originarse el Golfo de California, hace aproximadamente 5- 10 millones de años. De esta manera surgieron dos especies distintas con una estructura de subespecies, que aparentemente tienen flujo génico limitado y que así promueven la especiación dentro de las subespecies. En particular se ha considerado que *A. c. dentiens* está en proceso de especiación.

A. cerulata y *A. subsimplex* por su distribución geográfica y sus características morfológicas son propicias para estudiar la estructura genética dentro de las poblaciones que conforman a las especies y subespecies. Se estimó la estructura genética: la heterocigosis y la F_{ST} , así como la distancia genética Nei (1972, 1978) y con estos datos se realizaron inferencias sobre el flujo génico y de la existencia de aislamiento por distancia.

Si se encuentra divergencia genética entre las poblaciones, ésta puede ser interpretada a la luz de la historia de las poblaciones y especies surgidas supuestamente por la separación de la península de Baja California.

El método de RAPD's (Random Amplified Polymorphic DNA, Williams et. al, 1990) se basa en la técnica de PCR y permite visualizar la variación genética en distintas partes del genoma, no solamente en las secuencias codificantes. Ha mostrado ser útil en genética de poblaciones, porque generalmente proporcionan suficientes loci para el análisis evolutivo.

Con estos análisis se encontró que tanto *Agave cerulata* y *A. subsimplex* tienen altos niveles de heterocigosis esperada ($H_s = 0.1812$ y 0.1429 , respectivamente). La diferenciación genética entre las poblaciones (F_{st}) tanto para *A. subsimplex* como para *A. cerulata* (0.08 ± 0.08 y 0.09 ± 0.04 respectivamente) sugieren un alto flujo génico. El flujo génico entre sus poblaciones tiende a homogeneizarlas genéticamente ($N_m = 2.56 - 3.5$) sin dejar que se den diferenciaciones a nivel local por selección natural. La distancia genética de Nei (1978) entre las dos especies resultó ser de 0.035 que es baja para lo que se espera entre especies de plantas, mientras que entre las subespecies de *A. cerulata* hubo distancias entre 0.0137 y 0.023. Entre las poblaciones hubo distancias entre 0.004 y 0.024. La distancia genética entre las especies nos habla ya sea de que el flujo génico alto tiende a mantener poca diferenciación entre ellas o que las especies no han divergido en el tiempo, debido a una evolución muy lenta.

En el análisis filogenético se esperaba que la población analizada de *A. deserti* fuera el grupo que enraizara el árbol. Sin embargo, dado que en la isla la diferenciación fue muy alta con respecto a las poblaciones continentales, esta población quedó agrupada con la población de *A. deserti*, mientras que cada una de las especies, *Agave cerulata* y *A. subsimplex*, formaron un clado particular a cada especie.

Abstract

A. cerulata and *A. subsimplex* are both suitable for studying the genetic structure inside populations conforming species and subspecies. Genetic structure, heterozygosis and F_{ST} was estimated as well as Nei's genetic distance (1972, 1978). We used this data to make inferences about gene flow and isolation by distance.

Inside the Deserticolae group (Gentry, 1982) *Agave cerulata* is distributed along Baja California including four subspecies: *A. c. nelsonii*, *A. c. cerulata*, *A. c. subcerulata* and *A. c. dentiens*, the last one being endemic to Isla San Esteban in the Gulf of California. *Agave subsimplex* is located on the Sonoran coast, between 28 and 30° N. Both species have been reallocated to *Agave deserti*, a species occupying the north of Sonora, north of Baja California and the south of California. An hypothesis is that from this ancestral species the other two were derived. This species split when the Gulf of California was formed, approximately 5- 10 millones years ago. Two species were formed with their subspecies. The subspecies apparently have low gene flow, which promotes speciation inside them. Specially it has been considered that *A. c. dentiens* is in a speciation process.

If genetic divergence was found among the populations, this could be interpreted considering history of the species that were apparently originated by the split of the Baja California Peninsula.

The method of RAPD's (Random Amplified Polymorphic DNA, Williams et. al, 1990) is based on the PCR technique and it permits to visualize the genetic variation in different parts of the genome, not only in coding regions. It has proven to be useful in population genetic analysis, generally providing a large amount of loci for the evolutionary analysis.

With this analysis we found that *Agave cerulata* and *A. subsimplex* have high levels of expected heterozygosis ($H_s = 0.1812$ y 0.1429 , respectively). Genetic differentiation between populations (F_{st}) for both *A. subsimplex* and *A. cerulata* (0.08 ± 0.08 y 0.09 ± 0.04 respectively) suggest high gene flow. Gene flow between their populations tends to homogenize them genetically ($Nm = 3.41 - 6.14$) avoiding local differentiations by natural selection. Nei's genetic distance (1972, 1978) between the two species was 0.035 which is low compared to that expected for plants, between subspecies of *A. cerulata* the distances laid between 0.0137 and 0.023. Between populations there were distances between 0.004 and 0.024. Genetic distance about populations tells us that gene flow has contributed to maintain little differentiation between them or that this species have not diverged in time due to slow evolution.

In the phylogenetic analysis we expected that the *A. deserti* population studied would root the tree. But since the island population was more differentiated from the rest of the populations, the island population grouped together with the population of *A. deserti*. The other two species, *Agave cerulata* and *A. subsimplex*, formed a special cluster for each species.

As far as the isolation by distance, there was a clear correlation between distance and geography in the species *A. cerulata*. This was not true for *A. subsimplex*, at least for the three populations surveyed.

INTRODUCCIÓN

Genética de poblaciones y evolución

La genética de poblaciones surge como resultado de los esfuerzos de unir la teoría Mendeliana y la Darwiniana, teorías centrales en la biología, dentro de una teoría evolutiva, y ha demostrado ser una herramienta esencial para la descripción de los procesos evolutivos en poblaciones naturales, para la reconstrucción de historias evolutivas y para obtener la estructura genética actual de las especies. Estudia como las leyes genéticas descubiertas por Mendel se aplican a poblaciones naturales.

La evolución en las poblaciones ocurre debido a aquellos cambios genéticos causados por: la mutación, recombinación y transposición, la endogamia, la deriva génica, la migración y la selección natural. Para poder describir la distribución de las frecuencias génicas se toma en cuenta el tamaño de las poblaciones y su distribución geográfica. En estos estudios se busca estimar las frecuencias génicas actuales, para poder explicar como han cambiado en el tiempo y busca predecir como van a ser en el futuro, cuando cambien las condiciones de las poblaciones, siempre y cuando existan restricciones biológicas a la evolución (Hartl y Clark, 1989).

Variación genética

La variación morfológica dentro de las especies fue descubierta desde los primeros taxónomos naturalistas, que realizaron numerosas descripciones de las variaciones morfológicas y en algunos casos clasificaron como especies distintas a algunas de ellas (Darwin, 1859). Sin embargo la base genética de la variación se descubre hasta los trabajos de Mendel, que descubre la herencia por segregación

de caracteres y distribución independiente de los mismos. No toda la variación es morfológica, de hecho la mayor parte de la variación es genética y no es visible. Para medir la variación genética no- evidente, se desarrollaron los métodos primero de isoenzimas y después los moleculares (RFLP's, RAPD's, microsatélites, etc.) para detectar polimorfismos de un gen o locus (se habla de un loci polimórfico, cuando este tiene más de una forma o alelo). De esa manera surgieron numerosos trabajos describiendo la variación genética en poblaciones naturales, la cuál resultó ser muy alta (Hartl y Clark, 1989).

La variación, al ser hereditaria, es la materia prima de la evolución. El cambio de una generación a otra de la proporción de variantes es lo que se llama evolución (Futuyma, 1998).

En un caso hipotético en el que todos los organismos dentro de una especie se aparearan con todos, el tamaño de las poblaciones fuera infinito y que no hubiera alteraciones al material genético, las frecuencias génicas en la población serían constantes, es decir no habría evolución.

Las llamadas "fuerzas evolutivas" causan cambios en las frecuencias génicas, promoviendo la evolución de las poblaciones, que a su vez forman a la especie. El estado en el que no hay evolución fue descrito por G.H. Hardy y W. Weinberg, y se convirtió en el principio central de la genética de poblaciones, el "equilibrio de Hardy-Weinberg", que describe un estado en el cuál no actúan las fuerzas evolutivas. En este estado existe una relación simple entre las frecuencias alélicas y genotípicas, las cuales se conocen como las proporciones de Hardy-Weinberg (Hartl y Clark, 1989). Para que se produzca este estado se requiere que la población sea infinita, que haya panmixia (apareamientos al azar) y que las generaciones no se sobrelapen. Las fuerzas evolutivas (que en Hardy- Weinberg no actúan) son: mutación, deriva génica, selección natural y migración (flujo génico).

Estas fuerzas evolutivas son también las productoras o eliminadoras de la variación genética. Mientras que dentro de poblaciones la mutación y la migración son promotoras de la variación genética, la selección natural y la deriva génica (que produce endogamia) disminuyen la variación. La selección natural puede también ser promotora de la variación, pero sólo en el caso que favorezca el establecimiento de los heterocigos (selección balanceadora).

La variación genética dentro de una población se estima comúnmente como la proporción de individuos heterocigos. La mayor variación se tiene cuando la frecuencia de heterocigos esperada (H) en la población es de 1. Este es el caso si se tiene una población con un tamaño efectivo infinito, con una alta tasa de mutación y por lo tanto un número infinito de alelos. En el caso de dos alelos, la frecuencia de heterocigos esperada máxima es de 0.5. La heterocigosis esperada se conoce también como heterocigosis promedio por individuo.

La variación genética ha sido estimada también por el parámetro P , que es la proporción de loci polimórficos dentro de las poblaciones o especies. Sin embargo, este parámetro es menos confiable que la proporción de heterocigos en la población debido a que es sensible al número de loci analizados. Si se analizan zonas al azar en el genoma la confiabilidad de este parámetro mejora.

Tal vez la variación más estudiada es aquella evidente geográficamente. Estos estudios han dado una mejor visión de los procesos evolutivos (Futuyma, 1998). En este estudio nos enfocamos a esta variación dentro de poblaciones y dentro de especies.

Se ha descubierto que individuos con el mismo genotipo pueden variar morfológicamente. Esta variación está determinada por el ambiente y se conoce como plasticidad fenotípica. Este tipo de variación se estudia por la genética cuantitativa (Hartl y Clark, 1989), pero al tener bases no sólo genéticas no se considera en este estudio.

Estructura Genética

La estructura genética resulta de las distintas fuerzas evolutivas que producen diferenciación genética a nivel local. Es importante entonces que haya una distribución de la variación a nivel geográfico para que exista una estructura dentro de una especie, entre varias poblaciones o en una población.

Es importante determinar la estructura genética de una especie, ya que una especie estructurada puede evolucionar de manera distinta que una no estructurada. En las poblaciones estructuradas no existe el apareamiento al azar (hay endogamia), algunas subpoblaciones se aparean preferencialmente con otras más cercanas, y entonces la población se subdivide en grupos genéticamente más parecidos entre sí, surgiendo así diferenciación dentro de la especie.

La subdivisión de las poblaciones (estructura genética) de las poblaciones se ve afectada por el tamaño, el número y edad de los individuos que contiene cada población (Hartl y Clark, 1989). Esta subdivisión crea un efecto tipo endogamia y por lo tanto se ha propuesto que se mida la reducción en heterocigosis para describir la estructura genética. Los parámetros más utilizados para describir la estructura son aquellos propuesto por Wright (1958) F_{IT} , F_{ST} y F_{IS} . El primer parámetro se conoce como el coeficiente de endogamia del individuo con respecto a la población y se calcula a partir de la heterocigosis observada en un individuo H_i y la heterocigosis promedio en la población total H_T si se mezclaran al azar todas las frecuencias alélicas por panmixia, por lo cuál este estimador nos da una idea del grado de endogamia, la fórmula es:

$$F_{IT} = H_T - H_i / H_T$$

El segundo parámetro se obtiene de H_T y H_s , que es la heterocigosis promedio esperada si la población se encuentra en Hardy-Weinberg. Se conoce como índice de fijación subpoblación- total o de diferenciación y nos da una idea si hay cruza al azar, o si este no es el caso, si hay fijación de alelos en las poblaciones

(diferenciación entre las poblaciones). Si es igual a cero se tiene que la población está en Hardy-Weinberg, si es igual a uno todas las poblaciones son diferentes entre sí, lo cual se explicaría si cada una de las poblaciones está fija para un alelo dado. Se obtiene con la siguiente fórmula:

$$F_{ST} = H_T - H_S / H_T$$

Otro parámetro utilizado para obtener el cálculo de diferenciación entre poblaciones es el llamado coeficiente de coancestría, abreviado con la letra griega θ (Cockerham, 1969), el cual se define como la relación que existe entre un par de genes entre individuos dentro de una o más poblaciones (Weir, 1996). La coancestría se incrementa con el tiempo de tal manera que indica que tan diferenciadas están las poblaciones. θ nos da una idea de la divergencia entre dos poblaciones así que puede servir como un indicador de distancia genética. Es un buen estimador en un modelo que supone que las poblaciones muestreadas representan a la especie y que tienen una historia evolutiva en común.

El último parámetro se le conoce como coeficiente de endogamia se obtiene a partir de H_I y H_S . Si F_{IS} es igual a uno, la población es totalmente endogámica. La fórmula para estimarlo es:

$$F_{IS} = H_S - H_I / H_S$$

El flujo génico puede restringir la evolución, previniendo la diferenciación por adaptación a condiciones locales (se dice, entonces, que evita la especiación) o promover la evolución dispersando genes nuevos o combinaciones de genes a lo largo del área de distribución de una especie. Esto depende de si actúan otras fuerzas evolutivas en conjunto, además de la distribución geográfica de la especie (Slatkin, 1987).

La estructuración se puede dar aunque haya apareamientos al azar, cuando la selección actúa preferentemente sobre individuos que interactúan ecológicamente.

Si existe una selección muy fuerte a nivel local, aunque exista alto flujo génico, las poblaciones tenderán a diferenciarse. Por otra parte, si las poblaciones estudiadas están sujetas a deriva génica por tener un bajo número de individuos, el flujo génico evitará la fijación de alelos y por lo tanto la diferenciación entre las poblaciones.

Como estimadores del flujo génico se han propuesto diversos métodos directos e indirectos (Slatkin, 1994). Los métodos directos consisten en estimar el flujo génico a partir de parámetros ecológicos, como son: la dispersión del polen, la dispersión de semillas, además de parámetros demográficos relacionados. Los métodos indirectos son aquellos en los que a partir de análisis con marcadores genéticos – isoenzimas o DNA - se obtienen los parámetros de diferenciación interpoblacional (F_{ST} , G_{ST} y θ), los cuáles permiten obtener una buena estimación del flujo génico existente en la naturaleza (Slatkin, 1994).

Una manera útil para relacionar genéticamente a distintas poblaciones es por medio de las distancias genéticas, que permiten agrupar a las poblaciones de tal manera que se observa claramente la jerarquización genética que existe entre ellas. Para la estimación de las distancias genéticas, se han propuesto varias medidas, de las cuáles tal vez la más conocida sea aquella propuesta por Nei (1972, 1978).

En una distribución geográfica se espera que las poblaciones más cercanas geográfica- o espacialmente sean las más cercanas genéticamente. A este principio se le conoce como aislamiento por distancia (Wright, 1958) que significa que los individuos tienden a aparearse con aquellos más cercanos geográficamente de lo que se esperaría por azar.

Especiación

Tal vez uno de los temas más polémico dentro de la biología moderna ha sido la definición del término "especie" y el surgimiento de las mismas. En el capítulo dos del "Origen de las Especies", Darwin discute la complejidad que implica delimitar claramente a una especie, según él: "... no ha sido marcada claramente la línea que divide una subespecie de una especie" y "... conforme se va conociéndolas mejor [a las especies], aparecen formas intermedias y aumentan las dudas de los límites específicos...". Con las "formas intermedias" Darwin se refiere a variedades muy similares a dos especies y que sin embargo no constituyen una ni la otra. En el capítulo dos, de la "Variación en la Naturaleza", menciona también que los taxónomos tratan como especies a variedades que difieren muy poco de la especie de la cuál surgieron. Más tarde, en el capítulo nueve, llega a la conclusión de que "... debemos tratar a la especie de la misma manera como los naturalistas tratan a los géneros, es decir que los géneros son combinaciones artificiales hechas a la conveniencia...".

150 años después no se ha llegado a una definición de la especie más clara. La definición más aceptada actualmente es la de Mayr (1940): "Una especie es un grupo de poblaciones naturales que potencial- o realmente se aparean y que están aisladas reproductivamente de otros grupos similares". Esta definición es conocida con el nombre de "especie biológica". Por lo menos en el caso de grupos zoológicos esta definición ha resultado muy apegada a la realidad más allá del concepto práctico. En el caso de las plantas no se puede encontrar una delimitación de especie tan clara. Algunos botánicos han llegado a la conclusión de que el concepto de especie biológica es obsoleto (Raven, 1976). Sin embargo se han realizado experimentos en plantas en los cuáles se ha obtenido concordancia con esta definición (Briggs y Walters, 1985).

En genética de poblaciones se ha adoptado el concepto de especie biológica, al reflejar de manera más adecuada el componente genético y reproductivo de la especie. Mayr (1963) menciona que este concepto tiene incluso un componente ecológico, al hablar de las poblaciones que comparten un ambiente.

La pregunta a responder es la siguiente: ¿Cómo surgen las especies?. Según la definición de especie, el evento crucial es el aislamiento reproductivo. Este aislamiento reproductivo puede surgir por una vía genética o una vía ecológica, y se han propuesto teorías que tratan de explicar este aislamiento.

Las teorías más aceptadas de especiación son la de especiación alopátrica (o geográfica), la especiación peripátrica, la especiación parapátrica y la especiación simpátrica consideradas como graduales (Mayr, 1982, Ridley, 1993).

Adicionalmente algunos autores hablan de la existencia de especiación abrupta, dentro de la cuál consideran a aquella surgida por poliploidías (Mayr, 1963). De está última sólo mencionaré que es un mecanismo de especiación que ha sido reconocido en plantas, al ser una barrera reproductiva efectiva que evita el intercambio genético entre las plantas poliploides y las que no lo son. Puede haber auto- y aloploidías. Las primeras son aquellas surgidas de la fusión del genoma completo de individuos de una misma especie y las segundas surgen de la fusión de los genomas de dos especies distintas. Haldane (1932) tiene buenos ejemplos de ésta: uno para aloploidía sería la planta *Primula kewensis* que surge de la fusión del genoma de una planta de *Primula floribunda* y del genoma de *Primula verticillata*. Una planta que se cree surgió por autoploidía es el trigo *Triticum vulgare*, originado al fusionarse dos genomas de *Triticum monococcum*.

La especiación geográfica (alopátrica) es, según Mayr (1963), el casi exclusivo método de especiación, al encontrar que la mayoría de los caracteres utilizados para diferenciar especies también tienen variación geográfica. Por lo tanto, podríamos tener poblaciones de una especie en sus dos extremos de distribución geográfica y serían muy diferentes entre sí. Sin embargo como no se

encuentran en el espacio no sabemos si tienen potencial de reproducción entre sí y constituyen especies distintas biológicamente.

Para la especiación geográfica es importante que surja una barrera *física* al flujo génico, como podría ser una cordillera o un río muy grande, o como en el caso estudiado, una entrada de mar. La mutación, la deriva génica o la selección causarían que se fijaran alelos distintos en las poblaciones separadas, si éstas logran persistir. Si la barrera desapareciera y las poblaciones se volvieran a reunir, el que fueran especies distintas dependería de si el tiempo de separación fue suficiente para que se diferenciaran genéticamente. Entonces serían incapaces de reproducirse entre sí y se podrían considerar especies distintas.

Para el establecimiento de dos especies a partir de dos poblaciones distintas es importante que el aislamiento reproductivo de estas poblaciones esté acompañado por un refuerzo. Un refuerzo es una barrera reproductiva que surge entre dos poblaciones distintas, dada la preferencia de cruzarse con su misma especie, al obtener así una mejor adecuación (Ridley, 1993). La existencia de refuerzos ha sido un tema de discusión importante entre los evolucionistas, ya que no se han encontrado evidencias claras de éstos y se requiere que haya una selección fuerte que favorezca el refuerzo. El surgimiento de refuerzos es muy importante en el caso de la especiación por mecanismos genéticos.

La especiación peripátrica (Mayr, 1982) es aquella que ocurre en las poblaciones periféricas de la especie, como resultado del "efecto de fundador". Mayr (1982) considera que es muy común en la naturaleza, ya que es más probable que una población sea aislada periféricamente a que surja una barrera física. Como mecanismo de esta especiación sugiere a las "revoluciones genéticas", que es un rearrreglo extenso de la poza génica – la constitución genética de la población- que sea provocado por las condiciones muy distintas de la periferia de la especie.

El "efecto fundador" podría ser un proceso de especiación muy importante según Mayr (1963). Este proceso consiste en fundar una población nueva a partir de unos pocos miembros de otra población original. Estos colonizadores sólo van a portar una fracción de la poza génica original. La evolución va a estar limitada a la fracción de genes que porten los individuos de la nueva población. El destino evolutivo diferirá del resto de las poblaciones, sobre todo si queda aislada de éstas y el flujo génico es escaso. En el caso de que la población sea muy pequeña entrará en juego la deriva génica y la determinación de los genes será azarosa. Además se corre el riesgo de que haya endogamia y que de esta manera se reduzca la variación. Si en la población original había algún alelo raro, al pasar a una población con un menor número de individuos tendrá una mayor probabilidad de fijación. Si el ambiente nuevo es muy uniforme, es probable también que la selección favorezca a la combinación de genes con mayor éxito en el ambiente, habiendo otra vez una tendencia a reducir la variación.

Por lo general se espera que las poblaciones que hayan sido producto del "efecto de fundador" diverjan mucho del resto de las poblaciones, conforme pasa el tiempo divergirán más. Se ha observado, en el caso de poblaciones de islas, que hay tasas de extinción muy altas para poblaciones fundadoras ya que si hay una homocigosis alta, cuando cambia el ambiente, la población es incapaz de adaptarse y se extingue (Mayr, 1983, Frankham, 1997).

La especiación simpátrica consiste en la división de una especie en dos sin que haya de por medio lejanía o alguna barrera geográfica. Esta teoría es la más débil, ya que es difícil saber como surgen las barreras a la reproducción. En teoría se requiere que la selección natural mantenga un polimorfismo estable para que surjan genotipos distintos, y que dentro de los genotipos se seleccionen genes para el apareamiento selectivo. Así este apareamiento (modelo de Seger, Ridley, 1993) permite que se aproveche mejor un cierto ambiente con características distintas, produciendo, p.e. dos caracteres extremos que no compiten entre sí y

así tienen un mayor éxito. Así se favorecerá que se fijen los caracteres extremos, por selección direccional, y la formación de agrupamientos de genes discordantes en dos poblaciones. Supuestamente la adecuación de los híbridos disminuye y así no se favorece se crucen entre sí (Dobzhansky, 1970). Hay ejemplos en la naturaleza en que dos especies naturales difieren sólo en sus hábitos, en un solo carácter o en el hospedero y que comparten hábitat, siendo estas especies posibles productos de especiación simpátrica (Ridley, 1993). Se cree que una mosca parásita de las manzanas (*Rhagoletis pomonella*) surgió a partir de moscas parásitas de otras frutas.

La especie parapátrica surge a partir de poblaciones que están contiguas, en la zona que se juntan se forman híbridos de ambas especies. La zona híbrida es una manifestación de que las especies que están a ambos lados de ésta no han especiado totalmente. Se ha observado que las zonas híbridas pueden ser zonas de clinas, ya sea gradientes de frecuencias genéticas escalonadas o como zonas en que las frecuencias de los genes de una especie van cambiando a las frecuencias de genes de la otra especie, conforme se avanza en el hábitat de una u otra. Las zonas híbridas también pueden surgir a partir de dos especies separadas geográficamente que vuleve a unirse al expandir su rango una u otra o ambas. La formación de una zona híbrida es el primer paso para la especiación parapátrica. El segundo paso es el refuerzo de los híbridos, para evitar se sigan reproduciendo con las especies originales. Este refuerzo surge si las formas híbridas tienen una ventaja adaptativa y la selección favorece que éstas se aislen reproductivamente. La existencia de especiación parapátrica en la naturaleza ha sido difícil de probar.

La existencia de refuerzos ha sido una controversia en la teoría de la especiación. Algo que se ha observado frecuentemente es que las especies que están alejadas geográficamente (alopátricas) tienen menores refuerzos a la hora de que se juntan artificialmente, mientras que las especies simpátricas tienden a

elegir con mayor frecuencia a sus conespecíficos para reproducirse, dando así una idea más clara de un refuerzo (Ridley, 1993).

El flujo génico tiene un papel muy importante en los mecanismos de especiación antes propuestos. Si hay un cese de flujo génico, ya sea por una barrera geográfica, por la evolución de mecanismos de aislamiento reproductivo o la acumulación de diferencias morfológicas o de comportamiento, se tiene un camino seguro a la especiación (Slatkin, 1987). Depende de la estabilidad demográfica de las poblaciones para que el flujo génico actúe como fuerza promotora de la especiación.

En cuanto a la base genética de la especiación, Templeton (1981) menciona que ésta se da por tres mecanismos: 1) a partir de muchos loci o genes que segregan cada uno con un efecto pequeño, 2) con uno o unos pocos loci o genes que segregan, comúnmente con modificadores epistáticos (de la acción conjunta de genes) y 3) por medio de loci complementarios o duplicados. Estos mecanismos genéticos están estrechamente ligados a la ecología de las poblaciones y/o especies y demuestra que para que haya especiación no es necesario que estén involucrados un gran número de genes.

Bases genéticas de la especiación

Ayala (1984) definió que la genética es una parte fundamental de la especiación, ya que las especies surgen de dos pozas génicas aisladas.

Se han realizado estudios para encontrar la base genética de la especiación desde el punto de vista poblacional, algunos trabajos han tratado definir las distancias genéticas que podrían diferenciar entre especies dentro de un género o dentro de poblaciones dentro de una especie (Avice y Aquadro, 1982). Sin embargo se ha visto que las distancias genéticas intergéneros e interespecies varían mucho, habiendo por ejemplo menor distancia intergéneros en el orden

Aves que en el orden Amphibia (Johns y Avise, 1997). Se dice entonces que las diferencias en las distancias genéticas intergéneros se pueden deber a 1) tasas de evolución distintas en cada grupo 2) que grados taxonómicos iguales en diferentes grupos difieren en edad 3) errores de clasificación, debido a que los taxónomos tienden a separar géneros con más detalle en algunos grupos, y tienden a unir sin demasiado detalle en otros 4) que hay diferencias biológicas relevantes, pero en el nivel molecular (detectada sobre todo al usar marcadores moleculares). En plantas los trabajos más conocidos son los de Crawford y Gottlieb con isoenzimas (Crawford, 1985), quienes encuentran distancias interespecies desde nulas hasta altas (géneros *Solanum* y *Chenopodium* 0- 0.65) e interpoblacionales desde nulas hasta medianamente altas (0- 0.31 en *Bidens discoidea*).

Hewitt (en Otte y Endler, 1989) menciona que para comprender la especiación sería muy útil tener tanta información posible de la estructura genética espacial de los taxa considerados como "buenas especies". En este caso el estudio a realizar busca describir la estructura genética espacial de dos especies del género *Agave* reconocidas prácticamente por todos los taxónomos.

Genética de poblaciones de plantas y conservación

Los estudios de Genética de Poblaciones han cobrado importancia como parte de la biología de la conservación (Eguiarte, 1990, Hamrick et al. 1991, Karron, 1991, Ellstrand y Ellam, 1993). Por medio de este tipo de estudios los programas de conservación de la biodiversidad cuentan con un criterio de variabilidad de las poblaciones a nivel genético. La genética evolutiva ayuda a analizar el destino evolutivo de las poblaciones naturales y así asientan las bases para las tomas de decisiones de si conservar *in situ* o *ex situ*.

Los criterios útiles para la conservación de las especies estudiadas son: si presentan alelos raros, frecuencias alélicas muy distintas o si representan

subespecies o especies incipientes interesantes (Eguiarte, 1990, Eguiarte et al. 1992). Existen pocos estudios sobre los patrones de variación genética de plantas mexicanas, a pesar de su importancia en proyectos de conservación (p.e. Eguiarte et al., 1992, Izquierdo, 1995, Martínez- Palacios et al., 1999).

Hormaza et al. (1998) enfatizan que si se entienden detalladamente las características y la extensión de la variación genética dentro de las especies, se cumple uno de los requisitos esenciales para la utilización de los recursos genéticos para la conservación y aprovechamiento agrícola. En el caso de aprovechamiento agrícola, el potencial para hacer mejoras por medio de selección artificial se ve limitado por la variación genética de la población.

El género *Agave* en México y en el desierto sonorense

El género *Agave* tiene su mayor centro de diversidad y riqueza en México, país que contiene el mayor número de especies y 58% de las especies son endémicas a México (García- Mendoza, 1995). El género ha sido muy estudiado por su importancia económica y biológica (Berger, 1915; Trelease, 1920; Gentry, 1972, 1982). El género fue dividido por Gentry (1982) en dos subgéneros: *Littaea* y *Agave*, basándose en el tipo de inflorescencia. *Littaea* presenta flores en pares en inflorescencia de tipo espigada, mientras que *Agave* tiene inflorescencias paniculadas y las flores están en agregados umbelados sobre pedúnculos laterales. Las especies analizadas en este estudio están comprendidas en el subgénero *Agave*.

Los agaves cumplen con las características generales de las agaváceas que se encuentran en zonas áridas de desierto: hojas que poseen abundantes fibras dúras, cutícula gruesa y abundantes dientes marginales como posibles adaptaciones al ambiente de clima seco y características de plantas con metabolismo CAM (Álvarez, 1989, ver también Nobel, 1988).

La península de Baja California, históricamente parte del desierto sonorense, es hábitat de 12 especies endémicas del subgénero *Agave*. El subgénero *Littaea* es inexistente en la península, por lo cuál se sugiere que este grupo surgió después de la separación de la península (Álvarez, 1989).

La diferenciación de las poblaciones, a partir de las cuales surgieron las especies continentales y de la península, pudo deberse a que la separación de la península del continente, hace aproximadamente 5- 10 millones de años, ocasionó una evolución independiente de las plantas del continente y las de la Península (García- Mendoza, 1995).

La hipótesis del origen continental y la diferenciación de las poblaciones es apoyada por los estudios de Álvarez (1989), que menciona que la dispersión de las diasporas del género *Agave* subgénero *Agave* no resulta eficaz ni siquiera para vencer distancias pequeñas como las que existen entre las islas de un archipiélago.

Los agaves son de hábito monocárpico o semélparo, es decir que la reproducción sucede una vez al final de su ciclo de vida. El tiempo que transcurre antes de la reproducción sexual es de 8 a 25 años. Sin embargo, la reproducción vegetativa prolonga la reproducción sexual del individuo por dos o tres generaciones más que la de cualquier planta con hábito monocárpico (Gentry, 1972). Algunos autores (Turner et al., 1995) sugieren que los agaves se reproducen fundamentalmente por propagación vegetativa, ya que varias especies del subgénero *Agave* son poliploides, mientras que hay una especie, *A. horrida*, que es exclusivamente sexual. Otros han propuesto que los bulbilos pueden ser importantes en la reproducción de los agaves (Arizaga y Ezcurra, 1995; Szarek y Holmesley, 1996). Los bulbilos son pequeñas rosetas aéreas que ocurren en los escapos de los agaves semélparos. Estas estructuras aseguran, que una vez que surgió el escapo panículado y que la muerte de la roseta es irreversible, la probabilidad de éxito reproductivo sea mayor, al ser los bulbilos la continuidad

genética de la roseta (Arizaga y Ezcurra, 1995). En *Agave subsimplex* se ha observado la reproducción por bulbilos (F.Molina, com. pers.).

Es importante mencionar que se ha considerado a los agaves como un buen ejemplo de coevolución con murciélagos, que son sus principales polinizadores, como los del género *Leptonycteris* fundamentalmente (Arita, 1991). Esto les confiere una alta capacidad de dispersión por polen. Se ha observado que las abejas y esfíngidos también son polinizadores importantes (Schaffer y Schaffer, 1977; Silva A. dnp.).

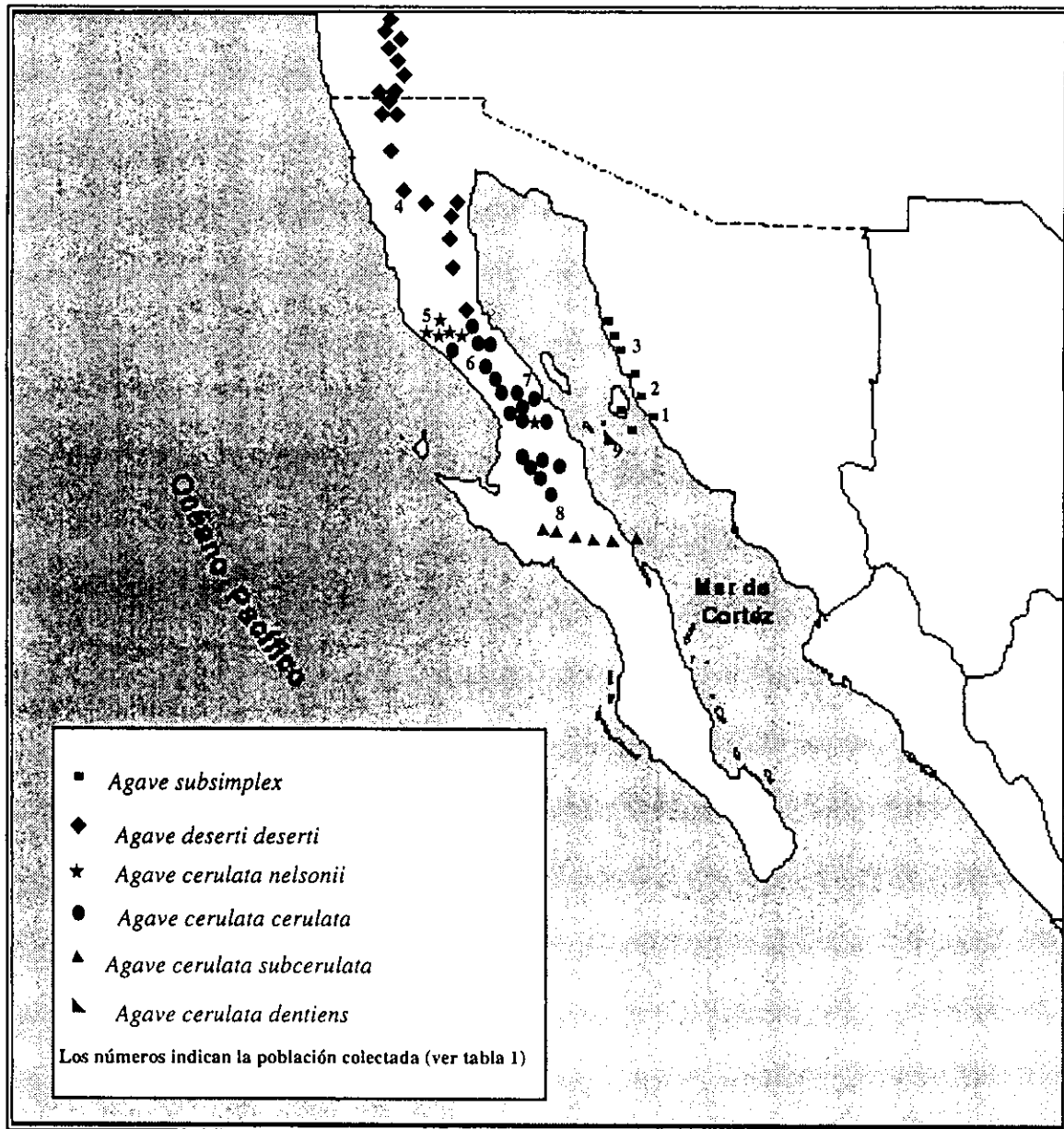
Genéticamente se ha observado mucha variabilidad en el complejo *Agave*, al haber diferencias en los números de ploidías, por lo que se ha hablado de un gran potencial para la evolución de la especie (Gentry, 1982, Cavallini et al., 1996). Existe la hipótesis de que en los agaves de Sonora la evolución es muy lenta porque se ha observado escasa segregación y recombinación (Gentry, 1972). Aunque en el mismo escrito menciona que la predilección por sitios rocosos de estos agaves ha resultado en distribuciones fragmentadas que pudieran favorecer la especiación.

Descripción general de las especies estudiadas

Las especies que estudiamos en este trabajo fueron consideradas como miembros del grupo *Deserticolae* por Gentry (1982). Son plantas que habitan el desierto sonorense (mapa 1). Su origen se sitúa en el norte del desierto sonorense, sur de Estados Unidos, a partir de *Agave deserti*. Se dice que algunas poblaciones migraron hacia el sur (hacia Sonora) y se diferenciaron. Estas poblaciones al separarse la Península de Baja California hace aproximadamente 5 -12 millones de años se diferenciaron resultando en especies distintas. Este sería el caso de *Agave cerulata* y *Agave subsimplex*. Su distribución se muestra en el

mapa 1. Por su distribución geográfica, su historia y su parecido morfológico, se considera que el grupo Deserticolae es filogenéticamente natural (Gentry, 1982).

Mapa 1. Distribución de las especies *Agave subsimplex* y *Agave cerulata*.



Diferenciar especies morfológicamente no es sencillo. Gentry (1982) menciona haber querido diferenciarlas por las flores, pero éstas son muy parecidas como para ser útiles. Las hojas, el tamaño, hábito y otros patrones de variación como es la distribución geográfica son criterios que sirven para diferenciar los taxa. En algunos casos en los que hay un parecido morfológico muy alto, los contenidos de sapogeninas - compuestos químicos de defensa- pueden ser el caracter distintivo.

Agave cerulata Trel.

Las poblaciones de este *Agave* probablemente sean las más grandes y abundantes del desierto sonorense, se distribuye de 27 a 30° N. Es endémico a México ya que sólo se encuentra en la península de Baja California y en el golfo de California. Son plantas que prefieren suelos de texturas gruesas de roca volcánica, aunque también crecen en suelos graníticos (Turner et al., 1995). Habita preferentemente en un ambiente marino de tierras altas y que es enfriado ligeramente por la brisa y las nieblas (Gentry, 1982).

Se dice que *Agave cerulata*, al tener cercanía con algunos de sus congéneres y límites no muy definidos pudiera tener intercambio genético con sus vecinos, como por ejemplo con *Agave deserti deserti* en la localidad de San Borja (Turner et al., 1995). Al ser tan parecidas morfológicamente, ambas especies incluso se han llegado a confundir, aunque se distinguen por poseer de tejido café en la base de los dientes característica de *Agave cerulata*.

Agave cerulata se reconoce como una especie polimórfica (Gentry, 1982, Turner et al., 1995) con cuatro subespecies (Gentry, 1982): *A.c. nelsonii* (Trel.), *A. c. cerulata* (Trel.), *A.c. subcerulata* (Trel.) y *A.c. dentiens*(Trel.). Para la distribución de las especies ver figura 1.

A.c. nelsonii se considera una subespecie muy parecida a *Agave deserti*, aunque difiere de ésta por las características distintivas de *Agave cerulata* (ver cuadro 2).

Algo característico de la especie *Agave cerulata cerulata* es que la forma de sus hojas varía conforme al clima (Turner et al., 1995).

Cuadro 1. Cuadro comparativo de las subespecies de *Agave cerulata*.

Subespecie	<i>A.c.nelsonii</i>	<i>A.c.cerulata</i>	<i>A.c.subcerulata</i>	<i>A.c. dentiens</i>
Caracter				
Tamaño roseta	50- 75 cm	50- 60 cm	15- 30 cm	50- 70 cm
Forma y tamaño de la hoja (largo x ancho)	Onduladas de 25- 40 cm x 6-8 cm.	Enteras de 25-40 cm x 4 - 7 cm.	Lanceoladas, tri-ángulares, 15-30 cm x 2.5- 7 cm.	Lanceoladas, 40- 70 cm x 4- 7 cm.
Color de hoja	Verde- azul –gris	amarillento	Glaucas	Azul- Grisáceo
Longitud dientes	3- 9 mm	1-4 mm	3-8 mm	1-2 mm, frágiles
Longitud, forma y color de la espina	2- 4 cm, plana y abóvedada en la parte superior. Café- grisácea	2- 4 cm. Café- grisácea	2- 4 cm, sinuosa. Café- grisácea	3-5 cm, aciculada, estrecha, acanalada. Café- gris.
Longitud panícula y # de umbelas	2- 3 m	2- 3.5 m con 6-12 umbelas laterales	2- 3 m, delgadas con 8 -10 umbelas laterales.	3- 4 m, anchas, con 8- 18 umbelas laterales.
Tamaño flores	45- 55 mm	45- 60 mm	45- 55 mm	49- 53 mm
Tamaño ovario y filamentos	25- 35 mm / 30-40 mm	22-32 mm / variable	23- 30 mm / 33- 40 mm	32- 35 mm / 28- 30 mm
Tamaño tépalos		16-22mm	17- 22 mm	15- 16 mm
Cápsulas	Oblonga piriforme, estipitadas de 4- 4.5 x 1.5 cm.		Obovoides, piriformes de 3.5 - 4 x 1 cm.	Oblongas y estipitadas de 40- 50 x 15- 20 mm

La subespecie *A. c. dentiens* es endémica de la Isla San Esteban del Golfo de California. Esta isla surgió al separarse una porción de tierra del continente al expandirse la corteza terrestre en el Pleistoceno (hace aproximadamente 11,000–2 millones de años).

Se ha encontrado que *A. c. dentiens* es morfológicamente muy similar a una variante de *A. c. subcerulata* localizada entre Punta Prieta y Bahía de Los Angeles, sin embargo Gentry (1982) dice que esta subespecie muy probablemente esté en proceso de especiación, al ser un genoma tan aislado.

Agave subsimplex

Agave subsimplex se distribuye en el norte hasta Puerto Libertad, Sonora y hacia el sur de Sonora hasta Bahía Kino (ver mapa 1). Puede crecer solitaria o formar clonas dependiendo de que tan favorables sean las condiciones.

La descripción morfológica puede ser observada en el cuadro 2.

Esta especie aparte de estar distribuida en Sonora, se reportó en la Isla Dátil - también llamada Isla Turner - y al sur de la Isla Tiburón en el Golfo de California (Moran, 1967). Sin embargo al visitar la Isla Tiburón en marzo de 1998, F. Molina-Freaner y A. Navarro-Quezada (esta tesis), no localizaron estas poblaciones.

A. subsimplex es una especie que morfológicamente es muy parecida a *Agave cerulata subcerulata* (Gentry, 1982).

Cuadro 2. Cuadro comparativo de las especies *Agave cerulata*, *Agave subsimplex*, *Agave deserti* y la subespecie *Agave deserti deserti*.

Subespecie	<i>A. cerulata</i>	<i>A. subsimplex</i>	<i>A. deserti</i>
Caracter			
Tamaño roseta	25- 70 cm	20-35 cm x 50-70 cm	30 -50 cm x40- 60 cm
Forma y tamaño de la hoja (largo x ancho)	Lanceoladas, 25- 70 cm x 4- 8 cm.	Lanceoladas, 12- 35 cm x 3- 6 cm.	25- 40 cm x 3- 4 cm
Color de hoja	Verde- pálido o gris amarillento	Amarillento - gris con tonos violetas.	Gris- claro.
Longitud y características de los dientes	1- 10 mm, frágiles, con tejido café en la base.	3- 15 mm, rectos o plegados, café- gris, amarillentos.	2-3 mm o 6-8 mm, grises y separados 15- 30 mm.
Longitud, y características de la espina	2- 4 cm, plana, acanalada, sinuosa Café- grisácea	2- 4 cm, sinuosa, ahuecada en el ápice y gris.	2- 4 cm, café claro- gris.
Longitud panícula y # de umbelas	2- 4 m, con 6- 18 umbelas.	2- 3.5 m de 5- 8 umbelas.	2.5 -4 m delgadas con 6- 15 umbelas.
Tamaño y color de flores	Entre 5- 20 mm. Amarillo claro.	40- 45 mm, amarillas- rosadas.	40- 60 mm amarillas
Tamaño ovario y filamentos	22- 35 mm / 28-40 mm	25 mm / 25- 28 mm.	22- 40 mm /
Cápsulas	Cerosas, ob-ovoides, oblongas o estipitadas.	40x15 ó 35x10 mm, estipitadas glaucas, oblongas.	3.5- 5 cm x 1.5- 1.8 cm, oblongas, obovoides.
Semillas	Redondas con muesca en ápice.	Alunadas, con muesca en la base	Redondas
Usos humanos	Sólo se consume <i>A.c. dentiens</i> .	Se consume y se usa para artesanías.	Comestible, se hace mezcal y se utilizan las fibras.

Agave deserti

Es la especie típica del grupo Deserticolae y por su posición fisiográfica se considera central del grupo (Gentry, 1982). Es una especie muy extendida geográficamente (ver mapa 1), a comparación del resto de los agaves del desierto sonorense, y habita desde los 90 a 1620 m de altura. Sin embargo, su hábitat es más que nada las zonas más áridas y calientes -es decir lejanas de la costa- de este desierto, para las cuáles está mejor adaptado que el resto de las especies (Turner et al., 1995).

Esta especie es un complejo variable que tiene límites difíciles de definir. Se trata de una especie con un conteo haploide de 59 cromosomas (contra 30 cromosomas diploides en *Agave cerulata*) (Turner et al., 1995).

En las poblaciones conviven *A. deserti* y *A. cerulata* se pueden encontrar individuos con características de ambos (Turner et al., 1995), tratándose de una posible hibridización.

Se ha observado que es una planta importante desde el punto de vista biológico, ya que, no sólo produce un néctar que atrae insectos y aves, sino que (Turner et al., 1985) sus rosetas sirven de protección a roedores, algunos como las ratas de la especie *Neotoma* hacen sus nidos entre las hojas, y se alimentan de las flores y las semillas. Otros animales, como los borregos cimarrones, se alimentan de los brotes florales. Gentry (1982) opina que, por lo tanto, es importante conservar a esta especie. La importancia de esta planta también es resaltada por Nobel (1984), que la considera altamente productiva para ser una planta CAM.

Según la clasificación de Gentry (1982) se trata de un *Agave* que comprende tres subespecies: *A. deserti deserti*, *A. deserti pringlei* y *A. deserti simplex*. Las últimas dos subespecies no serán descritas al no ser parte de este estudio.

A. deserti deserti

La descripción morfológica de esta subespecie se pueden observar en el cuadro 2, ya que morfológicamente tienen las características promedio de *Agave deserti*. Para su clasificación dentro del grupo vale la pena resaltar que el tubo floral mide de 4- 6 mm x 12- 15 mm de ancho. Se encuentra en el sur de California y el norte de Baja California.

¿Qué son los RAPD's?

El nombre RAPD's significa Random Amplified Polymorphic DNA (Williams et al. 1990), en español DNA polimórfico amplificado al azar. La técnica consiste en amplificar fragmentos al azar del DNA total de un organismo, utilizando primers de 9 ó 10 pb con secuencias al azar y elegidos arbitrariamente -con el requisito de que el contenido de G+C sea entre 50- 80% y que no sean secuencias palindrómicas

En una reacción de PCR se agregan: el primer, amortiguador de reacción, la enzima de amplificación (*Taq* polimerasa), cloruro de magnesio y nucleótidos junto con el DNA total. Esta mezcla se somete de 35 a 45 ciclos tipo PCR (Williams et al 1990, Welsh y McClelland, 1990) con la siguiente distribución de temperaturas y tiempos:

- | | |
|---------------------------|-----------------------------|
| Paso 1: 94 °C - 1 minuto | (Desnaturalización del DNA) |
| Paso 2: 36 °C - 1 minuto | (Alineamiento primer- DNA) |
| Paso 3: 72 °C - 2 minutos | (Polimerización) |

Una vez terminado el PCR, se corren los productos en un gel de agarosa al 1.4% y se tiñe con bromuro de etidio. Se espera obtener un patrón claro y definido de bandas si la concentración de DNA, primer y magnesio fueron las adecuadas.

Los polimorfismos obtenidos con la técnica de RAPD's son producidos por sustituciones de un nucleótido, inserciones y/o deleciones que alteran el sitio de reconocimiento del primer y que evita que el fragmento sea amplificado o altere su tamaño, no es posible diferencias entre estos casos, lo que se detecta es la ausencia de la banda para un cierto peso molecular. Por lo tanto, los RAPD's son marcadores dominantes, es decir que se va a producir la misma banda para el homócigo dominante y el heterócigo, y por lo tanto estos últimos no van a poder distinguirse.

Esta técnica se ha difundido ampliamente por las siguientes razones:

- Para iniciar estudios con esta técnica no se requiere de un conocimiento previo de la genética o del genoma del organismo a estudiar. (Williams, et al. 1990; Welsh y McClelland, 1990). La amplificación realizada es determinada por la secuencia, pero al mismo tiempo la elección de la secuencia es arbitraria. Se pueden obtener muchas bandas, sin preparación previa.
- La técnica es relativamente simple de montar, requiere de menos equipo sofisticado de laboratorio y es por lo tanto más barata. Es una técnica rápida que además es más segura que otras, ya que utiliza luminiscencia en vez de radióactividad (Williams, 1990).
- Se requieren cantidades muy pequeñas de tejido para obtener DNA, lo cuál los hace aptos para análisis de plantas raras o en peligro de extinción (Stewart y Porter, 1995).
- Se requiere una cantidad muy pequeña de DNA para obtener buenos amplificadores (Tingey et al. 1992). Por otra parte, las variaciones en la concentración, mientras no sean mayores de un orden de magnitud pueden resultar en amplificadores reproducibles (Weeden et al. 1992).
- Por lo general los RAPD's arrojan un mayor número de marcadores polimórficos que las enzimas, que es el método aún más barato y simple (Liu y Furnier, 1993).

- Los RAPD's son marcadores neutros que realizan un muestreo general del genoma de un organismo, se hace un muestreo tanto de genes como de secuencias espaciadoras, sitios de regulación, pseudogenes, etc, siendo así más sensibles a los polimorfismos, que teóricamente deberían ocurrir más frecuentemente en zonas no codificantes.
- Esta técnica fue creada para obtener polimorfismos útiles en el mapeo de genomas, en análisis de paternidad, de hibridización y posteriormente, se mostró su utilidad en genética de poblaciones y aún para establecer relaciones filogenéticas.
- Se observó que tan sólo una sustitución en una base del primer producía un patrón diferente de bandeo, lo cuál mostró la sensibilidad de la técnica (Williams et al. 1990).

Sin embargo, los RAPD's también han demostrado tener varias razones por las cuáles no son la técnica óptima para estudios genéticos. Estas desventajas son:

- Las concentraciones de primer y magnesio, así como las temperaturas de alineamiento en los ciclos de PCR pueden alterar el perfil de amplificación, probablemente permitiendo mayor número de alineamientos falsos (Williams, et al. 1993, Caetano- Anollés et al. 1992).
- Se requiere de DNA de alta calidad –es decir, libre de impurezas y poco degradado- para la que la amplificación produzca bandas reproducibles (Grosberg et al. 1996).
- La reproducibilidad de bandas puede ser pobre dependiendo del termociclador (Haig et al. 1996), del número de ciclos de amplificación (Hormaza et al., 1997), pero sobre todo de las concentraciones de los reactivos (Taq polimerasa, dNTP's, primers) (Williams et al. 1990, 1993).
- La comigración de bandas es un problema que también ha sido planteado frecuentemente (Lynch, 1988, Grosberg et al. 1996). Se supone que los

RAPD's amplifican bandas en distintos loci y que éstas deben de tener diferentes longitudes, sin embargo, en la práctica se pueden amplificar dos bandas que tengan el mismo tamaño y sería imposible identificarlas a menos de que se realice un Southern- blot.

- Para el análisis de RAPD's se parte de que se están analizando sistemas dialélicos, lo cuál puede ocultar variación, la llamada "críptica" - aquella que se lee como una ausencia- que no es detectada. Hay pocas maneras de tener una banda, sin embargo hay muchas maneras de perderla (Liu y Furnier, 1993).
- Se dice que los RAPD's subestiman la variación genética, ya que al ser marcadores dominantes, las frecuencias genéticas tienen que ser estimadas partiendo del supuesto de que se está en Hardy- Weinberg. Detrás de una lectura ausencia -a partir de la que se estima q, el "alelo recesivo"- puede haber variación "críptica", que como se explica anteriormente subestima la variación.
- La intensidad de las bandas no es homogénea. Un amplificado rara vez tiene bandas de la misma intensidad y cuando se tiene que leer el gel es importante determinar el criterio de lectura a seguir para leer siempre las bandas de la misma intensidad en diferentes geles (Grosberg et al. 1996). Se han observado bandas muy tenues que no son evaluadas y de esta manera disminuye la estimación de la variación genética (Smith et al. 1994). Estas bandas pueden revelarse al hacer un Southern- blot.

Para minimizar el efecto de estos problemas se ha propuesto soluciones bastante factibles que han mejorado tanto la reproducibilidad como la claridad de las bandas (Caetano- Anollés et al. 1992).

A pesar de sus desventajas los RAPD's han sido utilizados exitosamente en estudios que describen la estructura poblacional de distintas especies (e.g. Bonnin et al. 1996; Ayres y Ryan, 1997; Schierenbeck et al. 1997; Huff et al. 1993; Dawson et al. 1993).

Objetivos

Interpretar la magnitud del aislamiento producido por el surgimiento del Golfo de California sobre la divergencia genética de los *Agave*, sus consecuencias genéticas y evolutivas, sobre todo en el proceso de especiación.

Determinar la variación de dos especies de la familia Agavaceae por medio de marcadores moleculares.

Obtener para las mismas especies las estimaciones de la estructura genética, distancias genéticas y relaciones genealógicas.

Relacionar las distancias genéticas con el proceso de especiación.

Analizar los patrones de aislamiento por distancia, a partir de las estimaciones de flujo génico.

Hipótesis

Se espera que la población de *Agave deserti* sea la que enraice el árbol filogenético, al ser una población de la especie de la cuál se supone originaron las otras dos especies: *Agave subsimplex* y *Agave cerulata*.

Se espera que las poblaciones de *A. subsimplex* y *A. cerulata* peninsulares y del continente tengan una variación mayor a las poblaciones de las islas, ya que se espera que las poblaciones de las islas se hayan iniciado a partir de una población del continente y se de un "efecto de fundador".

Para la población de *A. deserti* se espera tenga una mayor variación genética que el resto de las poblaciones al ser la presunta especie ancestral.

La distribución de las especies *A. subsimplex* y *A. cerulata* es más restringida que la de la presunta especie ancestral *A. deserti* y las poblaciones se encuentran más cercanas entre sí y por esto se esperó encontrar un alto flujo génico entre estas poblaciones.

Se espera que haya un claro patrón de distancia genética y geográfica, así como diferenciación geográfica, debido a que hay una clara diferenciación morfológica relacionada con la distribución geográfica.

Material y Métodos

Colecta de Campo

Se colectaron cinco poblaciones de la especie *Agave cerulata*, una de cada subespecie (*A. c. nelsonii*, *A. c. dentiens* y *A. c. subcerulata*) y dos de la subespecie *A.c. cerulata*, además de tres poblaciones de la especie *Agave subsimplex* y una población de *Agave deserti deserti*, para dar un total de nueve poblaciones. Las localidades en las que se colectaron se muestran en la tabla 1, y en el mapa 1. Se trataron de colectar como mínimo 50 individuos por localidad para asegurar que se tuvieran mejores estimadores de polimorfismo una vez que se realizaran los análisis genéticos (Nei, 1987). Todas las poblaciones fueron colectadas en noviembre de 1997, a excepción de la población de *A. c. dentiens*, que fue colectada en marzo de 1998.

Se colectó procurando que cada planta estuviera alejada de la siguiente planta colectada por lo menos dos metros para evitar colectar el mismo genotipo. En algunas poblaciones, sobre todo las de la especie *Agave subsimplex*, los individuos estaban lo suficientemente alejados unos de otros y esto aseguraba que no se colectara el mismo individuo genético. Se procuró que cada localidad estuviera alejada entre 50 y 100 km. La posición geográfica de las localidades se determinó con la ayuda de un GPS (Ensign GPS de Tremble Navigation) y por cartas geográficas del INEGI (escala 1: 250 000).

Para el análisis genético se colectaron trozos de aproximadamente 25 cm³ de las hojas centrales, procurando elegir las más jóvenes. Se guardaban en bolsas de plástico previamente etiquetadas, las cuáles eran sumergidas en nitrógeno líquido hasta su llegada al laboratorio. En el laboratorio el tejido se almacenó a -80 °C hasta ser utilizado.

Tabla 1. Poblaciones de *Agave subsimplex* y *Agave cerulata* colectadas para este estudio, ver mapa 1.

Población	Ubicación	Localidad	Especie	N
1	N 28°54.082' W112°00.821'	Norte de Bahía Kino, Son.	<i>A. subsimplex</i>	57
2	N 29°20.99' W 112°12.21'	San Gabriel, Son.	<i>A. subsimplex</i>	50
3	N 29°48.269' W112.33.025'	La Placa (Punta de Cirios), Son.	<i>A. subsimplex</i>	53
4	N 31°31.010' W 115°47.869	Leyes de la Reforma Km. 105, B.C.	<i>A. deserti deserti</i>	50
5	N 30°02.330' W115°30.789'	Después de Rosario Km. 83, B.C.	<i>A. c. nelsonii</i>	50
6	N 29°43.300' W114°42.119'	Salida de Cataviña Km. 117, B.C	<i>A. c. cerulata</i>	50
7	N 29°03.254' W113°58.371'	Km. 19 a Punta Roca, B.C.	<i>A. c. cerulata</i>	50
8	N 27°17.576' W113°01.900'	Microndas Abulón Km. 88-14Sn. Ignacio, B.C.S.	<i>A. c. subcerulata</i>	50
9	N 28°40.33' W 112°35.99'	Isla San Esteban (Punta Oeste- Suroeste)	<i>A. c. dentiens</i>	51

Análisis genéticos

Se extrajo DNA de cada uno de los individuos por un método modificado del de Doyle y Doyle (1987). Los métodos de extracción de DNA se fundamentan en

la solubilización de las membranas y la digestión de proteínas celulares, así como la inactivación de nucleasas por medio de detergentes catiónicos como el SDS o el CTAB, seguidos de eliminación de las proteínas. Esto usualmente se realiza por medio de mezclas de cloroformo y algún alcohol aromático, como el fenol, el octanol o el alcohol isoamílico. Posteriormente se precipita el DNA con etanol por lo general, aunque cualquier alcohol polar es útil (Karp, 1998).

El método de extracción utilizado consistió en la molienda de cada muestra en un mortero con nitrógeno líquido, al cuál se le agregó el amortiguador de extracción CTAB 2X (CTAB al 2%, NaCl 1.4M, EDTA 20mM, PVP 1-2 %). Después de un ciclo de centrifugación e incubación a 60 °C, se extrajo el DNA con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se centrifugó y se precipitó el DNA del sobrenadante con isopropanol. Se dejaba 12 hrs a -20 °C, se recuperó la pastilla centrifugando, se limpió con etanol frío al 70%, se eliminó el etanol, se resuspendió la pastilla en amortiguador TE (Tris-HCl 1M pH 8 y EDTA 20mM) y se almacena a -20 °C. La limpieza del DNA es muy importante para la técnica de RAPD's (Weeden et al. 1992), así que en algunos casos en que al limpiar la pastilla con etanol, si ésta parecía turbia, se repitió el paso de limpieza. El DNA no fue utilizado inmediatamente después de su extracción y mientras se almacenó a -20°C.

La concentración de DNA de cada muestra se determinó con un espectrofotómetro Perkin- Elmer Lambda Bio UV/Vis por medio de la función DS DNA concentration, que cuantifica DNA de doble cadena.

Para la obtención de los RAPD's se siguió el protocolo de Williams et al. (1990, ver también Karp, 1998), aunque con pequeñas modificaciones en los volúmenes de los reactivos, ajustadas después de haber realizado ensayos con distintas concentraciones de DNA (5, 8, 10, 15, 20 y 25 µg/ml), amortiguador con MgCl₂ (7.5 y 6 %) y de primer (5 y 10 pM). En la reacción se agregan: 18.8 µL de H₂O bidestilada y estéril, 1.5 µL (6%) de amortiguador para PCR con 15 mM de

MgCl₂ (Perkin Elmer), 1 μL (4%) de amortiguador para PCR 1X (Perkin Elmer), 0.5 μL de PCR Nucleotide Mix (0.2 mM de una solución premezclada de dATP, dGTP, dTTP y dCTP Boehringer Mannheim), 1 unidad de Taq Polimerasa (Taq DNA Polimerasa recombinante Boehringer Mannheim), 2.5 ng del templado de DNA y 10 pM de primer (Operon Technologies) en un total de 25 μL. Como control en un tubo se agregó la mezcla de reacción omitiendo el templado de DNA, para observar que el primer sólo no amplificara bandas.

El PCR se realizó en un termociclador de ERICOMP modelo Deltacycler II™ System. El programa consistía en una temperatura inicial de 94°C durante un minuto, seguida por cuarenta y tres ciclos de: 94 °C durante un minuto (desnaturalización), 36 °C (alineamiento) durante un minuto y 72 °C durante dos minutos (polimerización). En el último ciclo se dejaba que la polimerización fuera de 15 minutos para obtener mayor cantidad de DNA (Williams et al., 1990, Weeden et al. 1992).

Una vez obtenidos los productos de polimerización, se corrió una electroforesis, que es el método estándar para separar, purificar e identificar DNA (Sambrook et al., 1989). La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1.4% el que se tiñó con Bromuro de Etidio al 0.5 % (Williams et al., 1990). La electroforesis en gel de agarosa es una de las técnicas más empleadas para observar los productos de PCR, sobre todo si el tamaño de los productos a separar queda entre 200 pb y 50 Kb, mientras que los geles de poliacrilamida se utilizan para productos más pequeños, de entre 5 y 500 pb (Sambrook, et al., 1989). En el gel se corre junto con las muestras un marcador de peso molecular que da una banda cada 100 pb (DNA molecular weight marker XIV Boehringer Mannheim), este marcador sirve para determinar el peso de las bandas amplificadas.

Una vez obtenido el gel se fotografió con una cámara digitalizadora de imágenes (Digital Camera 40, Kodak). La impresión de los geles se obtuvo por

medio del programa Bio Max 1D de Kodak Scientific Imaging Systems para Macintosh.

Para la amplificación se probaron 20 primers de la serie A y 20 primers de la serie B de Operon Technologies, estos primers son secuencias generadas azarosamente, tienen 9 ó 10 pb de largo, el contenido de G+C debe ser entre 50-80% y que no tengan términos de secuencias palindrómicas o complementarias (Williams et al. 1990). En este caso los primers eran de diez pares de bases y con un 60-70% de contenido G+C (Operon Technologies). Se eligieron dos primers - los que producían las mejores bandas en términos de resolución, definición y repetibilidad - el OPA-10 y OPB-20, cuyas secuencias son: 5'-GTGATCGCAG-3' y 5'-GGACCCTTAC-3' respectivamente.

Análisis de datos

A partir de los geles obtenidos, se realizó una lectura visual de los mismos, a partir de la cuál se realizó una matriz de presencia- ausencia (ceros y unos) de las bandas para cada locus por individuo.

Para los cálculos de las frecuencias génicas se obtenía la frecuencia de $x = q^2$, siendo $q = x^{1/2}$ el alelo recesivo, es decir la ausencia. La corrección a las frecuencias génicas se realizó de acuerdo a lo señalado por Lynch y Milligan (1994) con el programa Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA, Mark P. Miller, 1997 Northern Arizona University).

Según Lynch y Milligan (1994) para obtener parámetros de genética de poblaciones sin sesgo se recomienda utilizar aquellos marcadores que no sean demasiado frecuentes ($Nq^2 > 3$), i.e. en el caso de tener $N=50$, aquellos marcadores con frecuencia a partir de $p = 0.94$. Sin embargo no se obtuvo ningún marcador con esta frecuencia que tuviera que ser eliminado.

Se realizó un análisis de probabilidad combinada de Fisher (Fisher, 1954 , Sokal y Rohlf, 1995) para encontrar diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de todas las poblaciones juntas y de todas las poblaciones para cada especie. Este análisis lo realiza el programa TFPGA.

Estimación de la variación genética.

En el caso de los RAPD's, al ser marcadores dominantes se calcula la heterocigosis esperada a partir de las frecuencias génicas de p y q, mas no se puede obtener la heterocigosis observada.

La variación genética promedio dentro de las poblaciones se calcula como:

$$H_s = 1 - J_s$$

donde J_s es la identidad genética de las subpoblaciones $J_s = \sum x_i^2$, siendo x_i la frecuencia promedio del alelo p para todos los loci.

Otro índice de la variación que se obtiene por medio de TFPGA es la proporción de loci polimórficos (P), que es un buen índice de la variación cuando se muestrean loci al azar (Nevo, 1978 en Eguiarte, 1990).

Para evaluar si existen o no diferencias significativas entre los estimadores de variación se realizó un análisis de varianza para todas las poblaciones de ambas especies y para las poblaciones de cada una de las especies (incluyendo la población de *Agave deserti deserti* dentro de *Agave cerulata*, por su cercanía geográfica). Al no encontrarse diferencias significativas por este método se realizó un análisis no paramétrico (Wilcoxon/ Kruskal- Wallis), con el programa JMP.

En el caso del análisis de todas las poblaciones y de las poblaciones de *Agave cerulata*, al no encontrarse diferencias significativas por ninguno de los dos métodos, se realizó un ajuste al modelo log- lineal, con el mismo programa estadístico.

El análisis de log- lineal busca patrones de asociación entre varios factores o combinaciones de factores. Atribuyen los datos a un modelo lineal de manera similar a un anova, pero cuando se tienen más de dos dimensiones en los datos.

Obtención de distancias genéticas, diferenciación genética y flujo génico.

El programa TFGA calculó el estimador de diferenciación denominada θ (Theta), conocido como el coeficiente de coancestría (Cockerham, 1969). Al igual que la F_{ST} de Wright, es la correlación de alelos de diferentes individuos dentro de una población. TFGA realiza los cálculos de θ para cada locus y por medio del remuestreo, llamado jackknife, estima un intervalo de confianza asimétrico de θ incluyendo un bootstrap que estima la varianza para el conjunto de loci y las poblaciones.

El estimador θ se utiliza óptimamente para el caso de dos alelos por locus y considera el número de individuos y de localidades de las que se realizó un muestreo explícitamente. Este estimador se basa en el supuesto de que la población sea lo suficientemente grande y que el muestreo se lleva a cabo sin repeticiones, lo cuál es el caso de los muestreos realizados. θ se relaciona con G_{ST} - el estimador multialélico de diferenciación de Nei (1973)- de la siguiente manera $\theta = G_{ST}/[1-(1-G_{ST})/d]$ (Weir y Cockerham, 1987), donde d es el número de localidades muestreadas. Si d es infinito, θ es igual a G_{ST} . θ puede tener valores negativos, entonces se interpreta que la diferenciación es muy pequeña y no es posible detectar subdivisión en las poblaciones. El valor máximo de θ es uno, lo cuál sucede cuando los pares de genes que se muestrearon en varios individuos al azar en las poblaciones con totalmente diferentes.

Para la estimación del flujo génico se utilizó un método indirecto (Slatkin, 1989). Se ha observado que para números grandes de muestra y para niveles moderados de flujo génico θ y G_{ST} son buenos estimadores de F_{ST} . Slatkin (1989)

dice que θ es un buen estimador, ya que no introduce sesgo en los datos. Menciona que puede sobrestimar Nm , pero que esto sucede con muchos estimadores de F_{ST} similares a θ .

El flujo genético se calcula entonces según la fórmula del modelo de islas (Wright, 1951) con la apropiada corrección de Crow y Aoki (1984):

$$\theta = 1 / (4 \alpha Nm + 1)$$

donde $\alpha = (n/n-1)^2$ y n es el número de subpoblaciones. Si n es muy grande la fórmula corregida converge con la original. En el modelo de islas de Wright menciona que si Nm es mayor de uno se debe esperar muy poca diferenciación (Slatkin, 1995), ya que el flujo génico previene la deriva. Por otra parte Kimura (1983) menciona que en ciertos casos aún con valores de Nm mayores de 5 se puede detectar cierta diferenciación.

Se obtuvo la Nm por medio del análisis de alelos raros (Slatkin, 1985), para la cuál se utiliza la frecuencia promedio de alelos encontrados en una sola población p . La fórmula es la siguiente:

$$\text{Log}_{10}[\underline{p}(1)] = a \log_{10}(Nm) + b$$

donde a y b son variables de la pendiente que dependen del número de individuos muestreados por población.

Como resultado de varias simulaciones Slatkin (1985) encontró que para un total de 50 individuos colectados $a = -0.61$ y $b = -1.2$, mientras que para 25 individuos $a = -0.58$ y $b = -1.1$.

Los parámetros conocidos como F_{IS} (coeficiente de endogamia) y F_{IT} (coeficiente de endogamia total) que para ser calculados requieren de la heterocigosis observada, no se pueden obtener a partir de RAPD's.

Para las distancias genéticas el programa TFPGA construyó una matriz de distancias a partir de la matriz de datos. Tiene como posibles estimadores las distancias de Nei (1972), las distancias mínimas de Nei (1978), la distancia

modificada de Rogers (Wright, 1978) y por último la de coancestría (Reynolds, 1983).

La distancia de Nei es la medida más utilizada para estimar distancia genética se obtiene así:

$$D = - \ln(I)$$

Donde I es la identidad genética que se calcula:

$$I = J_{xy} / (J_x J_y)^{1/2}$$

y con la corrección de las distancias mínimas (Nei, 1978):

$$I = ((2n-1) J_{xy}) / ((2n J_x - 1) (2n J_y - 1))^{1/2}$$

J_x es la identidad genética de las subpoblaciones $J_x = \sum x_i^2$, siendo x_i la frecuencia promedio del alelo p para todos los loci en la subpoblación X y J_y es la identidad genética de las subpoblaciones $J_y = \sum y_i^2$, siendo y_i la frecuencia promedio del alelo p para todos los loci en la subpoblación Y. J_{xy} es la identidad genética promedio de las subpoblaciones $J_{xy} = \sum x_i y_i$, siendo $x_i y_i$ el producto de las frecuencia promedio del alelo p para todos los loci en la poblaciones X y Y.

Se realizaron las matrices de distancia de Nei (1972, 1978), y de distancias mínimas de Nei (1978) para ver si era posible detectar diferencias entre ellas debido a la corrección.

A partir de las distintas matrices de distancia genética TFGPA realizó un remuestreo de bootstrap y construyó un árbol de distancias genéticas con el algoritmo UPGMA.

Aislamiento por distancia

A partir de las posiciones geográficas de cada población localizadas en las cartas del INEGI se calculó por triangulación la distancia geográfica entre las poblaciones. Se construyó una matriz de distancia geográfica entre las poblaciones, la cuál se analizó junto con la matriz de distancia genética de Nei

(1978) obtenida anteriormente, para encontrar correlación entre distancia geográfica y genética por medio del método de matrices de Mantel (1967).

El método de matrices de Mantel se basa en el supuesto de que dos matrices de diferencias o distancias no están correlacionadas y se busca comprobar que la relación entre éstas no se debe al azar. Para esto se realiza una permutación azarosa de posiciones en ambas matrices. Repitiendo el proceso de comparar la matriz 1 con la matriz 2 de 1000 a 10 000 veces se obtiene el estadístico Z :

$$Z = \sum_i \sum_j m_{ij} e_{ij}$$

el cuál se compara con la distribución de Z, que es una distribución normalizada. Si las distancias entre las dos matrices tienen una correlación positiva, la Z observada tenderá a ser mayor que los valores obtenidos por aleatorización.

A partir de este análisis se obtiene el coeficiente de correlación de Pearson entre ambas matrices, sin embargo no puede ser interpretada la significancia de manera usual y por eso se interpreta a partir de la distribución de Z (Manly, 1991).

Este análisis se realizó con el programa TFGA, el cuál utiliza el método de aleatorización de las matrices para obtener la significancia estadística de Z (Sokal y Rohlf, 1995). Utilizamos 10 000 permutaciones para obtener una mejor estimación de la significancia (Manly, 1991).

El análisis se realizó para 1) todas las poblaciones. 2) todas las poblaciones, eliminando a la población de la isla (*A. cerulata dentiens*). Esta población se eliminó al haber observado que los puntos de las distancias genéticas y geográficas correspondientes a esta especie con respecto *Agave subsimplex* - que es cercana geográficamente, pero no genéticamente- estaban muy alejados de los demás puntos. 3) las poblaciones de *Agave subsimplex* y 4) las poblaciones de *Agave cerulata*, incluyendo a la población de la isla.

Resultados

Se probaron 40 primers de los cuáles cinco producían bandas: los primers OPA-4, OPA-8, OPA-10, OPB-17 y OPB-20. El primer OPA-4 producía una mayoría de bandas monomórficas, tal vez una o dos polimórficas. El primer OPA-8 producía escasas bandas y la reproducibilidad no era muy buena. Para el primer OPB-17 había algunos individuos que no producían bandas muy claras y por eso se eligieron los primers OPA-10 y OPB-20, que producían bandas definidas y repetibles (ver fig. 2).

Se obtuvo un total de 42 bandas polimórficas, 23 con el primer B-20 y 20 con el primer A-10 (tabla 2).

Aunque se extrajo DNA de todos los individuos colectados, muchas veces la cantidad o la calidad del DNA no resultó ser suficiente para obtener buenos amplificadores de RAPD's. Por esta razón el número de individuos analizados para la obtención de los parámetros de variación (heterocigosis esperada) y de estructura poblacional es menor a 50. El número de individuos analizados por población se muestra en la tabla 3. La restricción de Lynch y Milligan (1994) para obtener parámetros de genética de poblaciones sin sesgo, en la que se recomienda utilizar aquellos marcadores que no sean demasiado frecuentes, cambia entonces a aquellos marcadores con frecuencia a partir de $p = 0.92$. Tampoco se obtuvieron alelos con esta frecuencia.

Se evaluaron todos los loci por cada población para la obtención de los parámetros genéticos. Las frecuencias alélicas para cada loci se muestran en la tabla 2. Al comparar las frecuencias alélicas para todas las poblaciones, utilizando una prueba exacta de Fisher (1954), se encontraron diferencias significativas ($P < 0.05$) para la mayoría de los loci (38 de 42). Dentro de *Agave subsimplex*, encontramos diferencias significativas en sólo 12 de 42 loci, mientras que en *Agave cerulata* se encontraron diferencias significativas en 33 loci.

Figura 2.

Gel del primer OPB-20 (población de *Agave cerulata cerulata*)

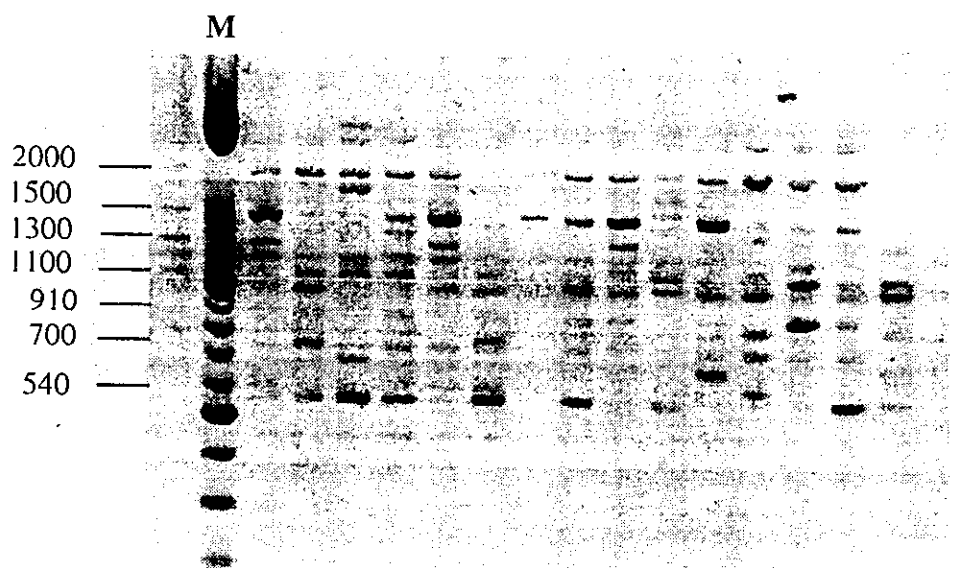
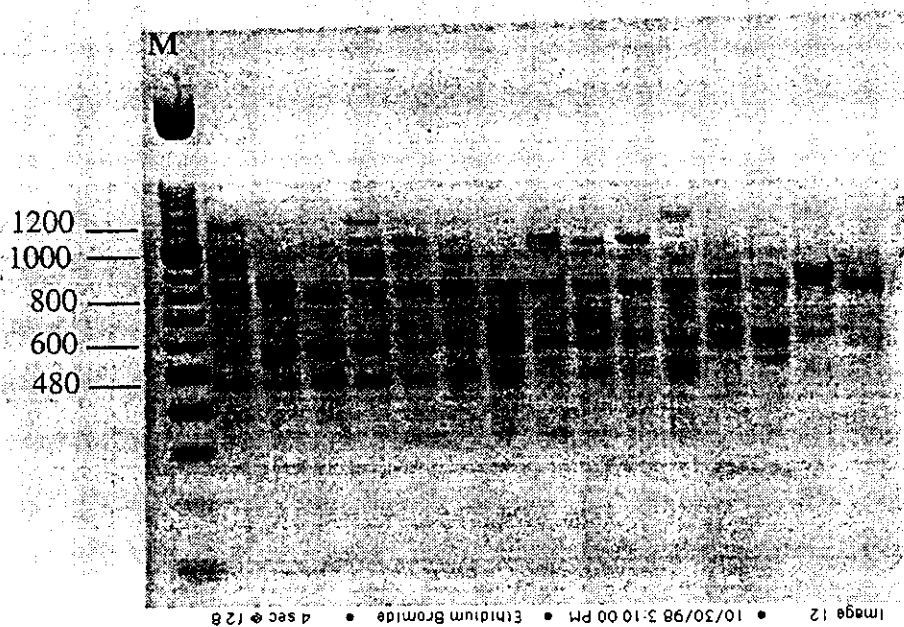


Image 2 • 11/17/98 7:58:02 PM • Etidium Bromide • 4 sec @ 128
M = marcador de 100 p.b.

Figura 2.1

Gel del primer OPA-10 (población de *Agave cerulata cerulata*)



M = marcador de 100 p.b.

Tabla 2. Frecuencias alélicas por locus para las 9 poblaciones.

Pob/locus	Bkino	SnGabriel	Placa	Reforma	Rosario	Cataviña	Proca	Abulón	SnEsteban	P de Fisher
B20,540	0.0260	0.0000	0.0152	0.0139	0.0485	0.0510	0.0911	0.0347	0.0000	0.0497 (± 0.0053)
B20,620	0.0392	0.0336	0.0462	0.0000	0.0000	0.0000	0.0775	0.0825	0.1115	0.0002 (± 0.0002)
B20,680	0.0392	0.0000	0.0000	0.0000	0.0866	0.2189	0.0775	0.0000	0.0782	0.0000 (± 0.0000)
B20,700	0.0527	0.0000	0.0000	0.0139	0.2424	0.1049	0.1049	0.1332	0.0782	0.0000 (± 0.0000)
B20,730	0.0527	0.1046	0.0621	0.3101	0.0362	0.1772	0.0911	0.0949	0.0782	0.0000 (± 0.0000)
B20,750	0.0260	0.0336	0.1115	0.0423	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000 (± 0.0000)
B20,800	0.0527	0.0000	0.0621	0.0568	0.0362	0.0775	0.0510	0.0000	0.0305	0.0926 (± 0.0097)
B20,880	0.0258	0.1046	0.0782	0.0280	0.0996	0.0000	0.0000	0.1075	0.0152	0.0000 (± 0.0000)
B20,910	0.0796	0.0336	0.0462	0.1654	0.1679	0.0380	0.0380	0.1075	0.0621	0.0091 (± 0.0027)
B20,980	0.1221	0.2232	0.1820	0.0715	0.1338	0.1331	0.2238	0.3578	0.0621	0.0000 (± 0.0000)
B20,1020	0.0796	0.1618	0.1460	0.1490	0.1969	0.2079	0.1189	0.2010	0.1638	0.3928 (± 0.0248)
B20,1050	0.0523	0.1046	0.0621	0.1017	0.1400	0.0911	0.0380	0.1596	0.1820	0.0581 (± 0.0087)
B20,1100	0.0796	0.0000	0.0621	0.0280	0.0996	0.1331	0.0911	0.0114	0.0305	0.0030 (± 0.0013)
B20,1120	0.1516	0.1424	0.2005	0.2713	0.0996	0.0510	0.0642	0.3940	0.1820	0.0000 (± 0.0000)
B20,1200	0.1077	0.0336	0.0305	0.0715	0.1996	0.0775	0.1331	0.0000	0.1286	0.0000 (± 0.0000)
B20,1250	0.0523	0.0509	0.0305	0.0000	0.0000	0.0000	0.0510	0.1732	0.1115	0.0000 (± 0.0000)
B20,1300	0.0659	0.0864	0.0305	0.0865	0.1538	0.0252	0.1049	0.1870	0.1460	0.0111 (± 0.0038)
B20,1400	0.0659	0.4469	0.4447	0.0280	0.0610	0.0380	0.1772	0.4738	0.0152	0.0000 (± 0.0000)
B20,1450	0.1516	0.0000	0.0000	0.1017	0.1400	0.1189	0.0252	0.0345	0.1820	0.0000 (± 0.0000)
B20,1500	0.1516	0.0000	0.0782	0.0715	0.1538	0.1049	0.1622	0.0345	0.1460	0.0035 (± 0.0031)

B20,1700	0.0523	0.0167	0.0000	0.0000	0.0240	0.0380	0.0125	0.0703	0.0000	0.0605	(± 0.0067)
B20,2000	0.1979	0.1424	0.2797	0.6191	0.2118	0.3844	0.4712	0.1202	0.4447	0.0000	(± 0.0000)
B20,2200	0.0128	0.0000	0.0305	0.0000	0.0000	0.0125	0.0380	0.0949	0.1820	0.0000	(± 0.0000)
B20,2500	0.1367	0.0336	0.0462	0.0423	0.0610	0.2238	0.1477	0.3070	0.0947	0.0000	(± 0.0000)
A10,450	0.1367	0.1046	0.3002	0.1017	0.2908	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	(± 0.0000)
A10,480	0.0128	0.0000	0.0305	0.2343	0.0000	0.3646	0.1475	0.1075	0.0621	0.0000	(± 0.0000)
A10,550	0.6008	0.5452	0.5017	0.0139	0.0000	0.0000	0.0000	0.0229	0.0000	0.0000	(± 0.0000)
A10,580	0.0000	0.0000	0.0000	0.1490	0.5320	0.6485	0.4712	0.5681	0.3227	0.0000	(± 0.0000)
A10,650	0.0796	0.0336	0.0305	0.1017	0.0000	0.1622	0.1331	0.3070	0.1460	0.0000	(± 0.0000)
A10,690	0.1516	0.1046	0.0462	0.1821	0.3077	0.1049	0.0510	0.1332	0.0947	0.0014	(± 0.0012)
A10,720	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1115	0.0000	(± 0.0000)
A10,750	0.2817	0.0336	0.1460	0.1991	0.0866	0.0000	0.0000	0.0229	0.1638	0.0000	(± 0.0000)
A10,775	0.0935	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1332	0.0000	0.0000	(± 0.0000)
A10,800	0.1822	0.5452	0.4182	0.2713	0.5074	0.5471	0.5205	0.1463	0.1460	0.0000	(± 0.0000)
A10,850	0.0000	0.0167	0.0621	0.0865	0.0240	0.0510	0.1331	0.1332	0.1115	0.0013	(± 0.0010)
A10,900	0.0523	0.1046	0.0782	0.1017	0.0000	0.0911	0.0510	0.1202	0.3930	0.0000	(± 0.0000)
A10,950	0.0128	0.0000	0.0000	0.0865	0.0000	0.0000	0.0000	0.1463	0.1115	0.0000	(± 0.0000)
A10,1000	0.5144	0.0000	0.0462	0.4428	0.2743	0.0911	0.0775	0.1075	0.2005	0.0000	(± 0.0000)
A10,1100	0.1077	0.5831	0.2331	0.1330	0.5074	0.2407	0.2734	0.2597	0.2391	0.0000	(± 0.0000)
A10,1150	0.0935	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1596	0.2591	0.0000	(± 0.0000)
A10,1200	0.1077	0.0167	0.0621	0.1172	0.0737	0.1622	0.1622	0.2918	0.3453	0.0000	(± 0.0000)
A10,1300	0.0935	0.0167	0.0305	0.0568	0.0119	0.0911	0.0000	0.0000	0.2005	0.0000	(± 0.0000)

Tabla 3. Variación genética (heterocigosis) por población y porcentaje de loci polimórficos

Población y especie	N	H _s (±E.S.)	Porcentaje de loci polimórficos
<i>A. subsimplex:</i>			
Bahía Kino, Son.	39	0.1617 (± 0.019)	92.85
San Gabriel, Son.	30	0.1221 (± 0.028)	64.26
La Placa, Son.	33	0.1450 (± 0.026)	78.57
Promedio	34	0.1429 (± 0.009)	78.56 (± 6.7)
<i>A. deserti deserti:</i>			
Leyes de Reforma, B.C.	36	0.1639 (± 0.024)	80.95
<i>A. cerulata:</i>			
Rosario, B.C.	42	0.1730 (± 0.026)	71.43
<i>A. c. nelsonii</i>			
Cataviña, B.C	40	0.1638 (± 0.023)	73.81
<i>A. c. cerulata</i>			
Punta Roca, B.C	40	0.1598 (± 0.023)	76.19
<i>A. c. cerulata</i>			
Promedio	40	0.1618 (± 0.023)	75.00
<i>A. c. cerulata</i>			
Microondas Abulón, B.C.S	44	0.2040 (± 0.023)	80.95
<i>A. c. subcerulata</i>			
Isla San Esteban, B.C.	33	0.2056 (± 0.025)	85.72
<i>A. c. dentiens</i>			
Promedio	40	0.1812 (± 0.009)	77.62 (± 1.7)
<i>A. cerulata</i>			
Promedio (± E.S.)	37.4 (± 1.5)	0.1665 (±0.0082)	78.3 (± 2.57)

Debido a que por medio de los RAPD's sólo se reconocen dos alelos, el porcentaje de loci polimórficos tiende a ser alto (Tabla 3). Sin embargo no es de 100% (tabla 3) ya que se evaluaron loci particulares de algunas poblaciones, que al no estar presentes en todas, estos loci tenían frecuencias de $p=0$ y $q=1$ (por el supuesto de Hardy-Weinberg). Estos eran los que se reconocían como loci monomórficos, a pesar de la posibilidad de variabilidad "críptica" y reducen la estimación de la variación genética.

La población que presentó los valores más altos de heterocigosis fueron las poblaciones de *A. cerulata subcerulata* y *A. cerulata dentiens* ($H= 0.2040$ y $H= 0.2056$ respectivamente, Tabla 3), la primera es la más sureña de la Península de Baja California y la segunda es la endémica de la isla San Esteban. La mayor proporción de loci polimórficos ($P= 92.85$) la tiene la población de Bahía Kino de *A. subsimplex* (Tabla 3). Otra población de esta misma especie – la población de San Gabriel- tiene la menor variación ($H= 0.1221$) y el menor porcentaje de loci polimórficos ($P= 64.26$) (Tabla 3).

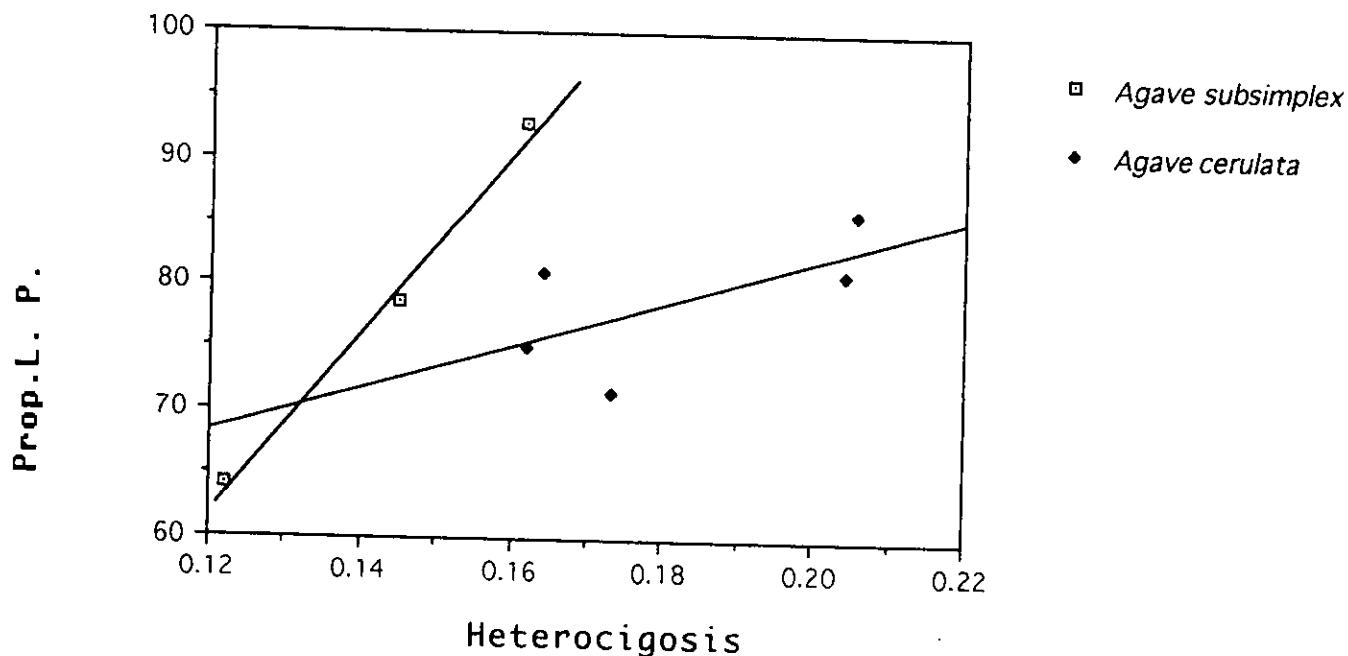
Se encontraron diferencias significativas al comparar la heterocigosis de todas las poblaciones ($p= 0.0493$, ajustando al modelo log- lineal, prueba no-paramétrica de Wilcoxon y Kruskal- Wallis $p= 0.0689$). Para *Agave subsimplex* se encontraron diferencias en la heterocigosis entre las poblaciones ($p= 0.0000$ con el modelo log- lineal $p= 0.0470$, prueba no- paramétrica de Wilcoxon y Kruskal- Wallis). No había diferencias significativas entre las poblaciones de *Agave cerulata* ($p=0.3873$ con log- lineal y $p= 0.3971$ con la prueba no- paramétrica de Wilcoxon y Kruskal- Wallis).

Observamos que los dos estimadores de variación genética están, en términos generales, correlacionados (Gráfica 1), es decir que a una mayor heterocigosis corresponde un mayor polimorfismo, pero las relaciones son diferentes para ambas especies. La pendiente es mucho mayor para *A. subsimplex* que para *A. cerulata* (Gráfica 1), aunque en esta especie la regresión

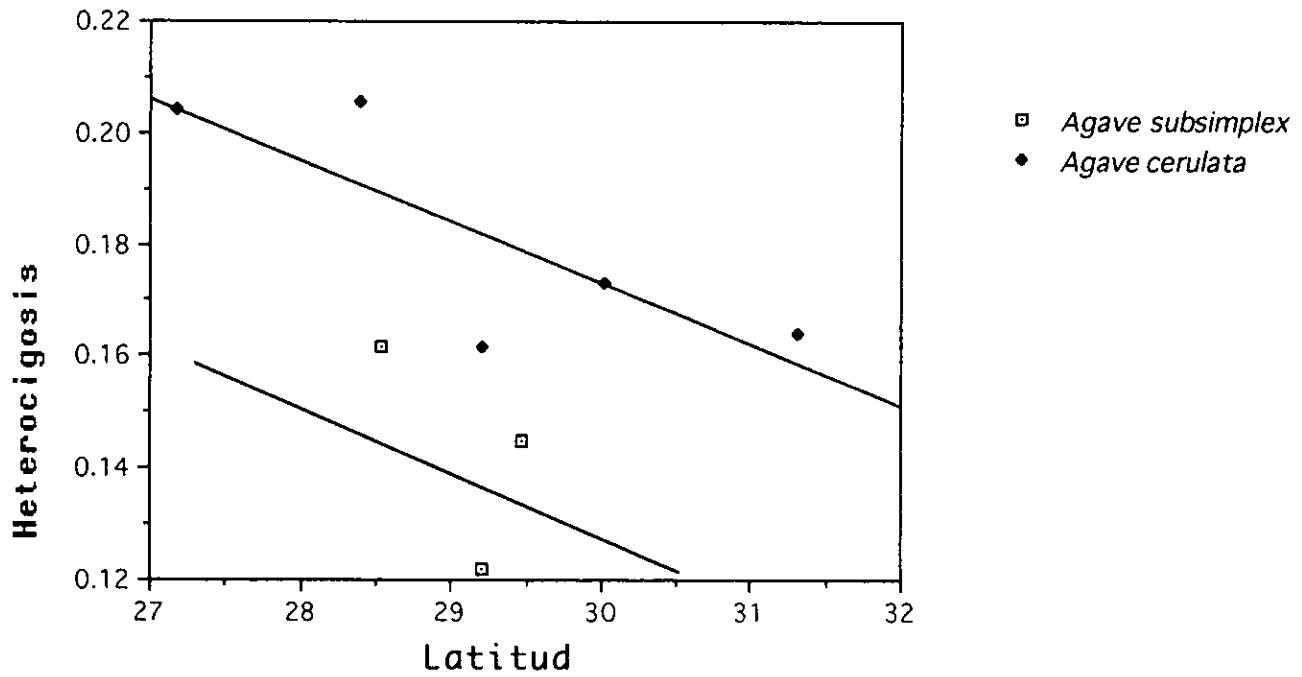
no es significativa. Esto nos habla posiblemente de una mayor posibilidad de fijación de alelos entre las poblaciones de *Agave subsimplex* y por lo tanto mayor heterocigosis para *Agave cerulata*.

Aparentemente, la variación genética disminuye con la latitud (Gráfica 2): entre más al norte, tienen menor variación genética ambas especies. Las pendientes son similares, pero *A. cerulata* a una latitud dada tiene mayor variación genética que *A. subsimplex*.

En ambas gráficas las regresiones por lo general no son significativas, esto se debe posiblemente al bajo número de poblaciones analizadas.



Gráfica 1. Relación de la heterocigosis y el porcentaje de loci polimórficos analizando para *A. cerulata* ($r= 0.424^*$, $y= 48.015 + 169.52x$) y *A. subsimplex* ($r= 0.992$ $p>0.01$, $y= -23.803 + 716.16x$).
* no significativo.



Gráfica 2. Relación entre la heterocigosis y la latitud analizando para *A. cerulata* ($r= 0.647 *$, $y= 0.504 - 1.101e-2x$) y *A. subsimplex* ($r= 0.379 *$, $y= 0.88 + 2.535e-2x$).

* no significativo

Tabla 4. Valores de θ y Nm para cada locus para todas las poblaciones.

Locus	θ (Theta) P	Nm
1	0.0129	24.2112
2	0.0269	11.4459
3	0.0369	8.2583
4	0.0642	4.6120
5	0.0585	5.0922
6	0.0475	6.3448
7	0.005	62.9648
8	0.0315	9.7282
9	0.0243	12.7044
10	0.0483	6.2344
11	0.0004	790.6992
12	0.0131	23.8367
13	0.022	14.0657
14	0.0766	3.8142
15	0.0368	8.2816
16	0.0597	4.9835
17	0.0224	13.8089
18	0.2396	1.0042
19	0.0459	6.5770
20	0.0225	13.7461
21	0.0132	23.6538
22	0.1199	2.3225
23	0.0752	3.8911
24	0.0694	4.2428
25	0.1497	1.7972
26	0.1477	1.8258
27	0.4825	0.3394
28	0.3032	0.7271
29	0.0784	3.7194
30	0.039	7.7966
31	0.1011	2.8132
32	0.0988	2.8861
33	0.0907	3.1721
34	0.1239	2.2373
35	0.0271	11.3591
36	0.1098	2.5653
37	0.0781	3.7349
38	0.1867	1.3783
39	0.0998	2.8540
40	0.1462	1.8478
41	0.0595	5.0013
42	0.0666	4.4344
Promedio	0.0848 (\pm 0.0137)	3.41 (\pm 0.0148)

* Intervalo: 0.0722 – 0.1517. S.D. 95%

Tabla 5. Heterocigosis, Diferenciación entre poblaciones y Flujo génico (\pm E.S.).

	H_s	$F_{ST}(\theta)$	Nm	Nm*
Todas las poblaciones	0.1665(\pm 0.0082)	0.0848 (\pm 0.007)	3.41 (\pm 18.7)	3.507
<i>A. subsimplex</i>	0.1429 (\pm 0.011)	0.0839 (\pm 0.046)	6.142 (\pm 0.0733)	3.83
<i>A. cerulata</i>	0.1812 (\pm 0.009)	0.0983 (\pm 0.017)	4.38 (\pm 0.0186)	3.36

*obtenida por medio del análisis de alelos raros de Slatkin (1985).

En la tabla 5 se muestra la heterocigosis esperada total para las 9 poblaciones y para *A. subsimplex* y *A. cerulata* por separado. Se muestran también las $F_{ST}(\theta)$, mientras que en la tabla 4 se muestran los valores de $F_{ST}(\theta)$ para cada locus para todas las poblaciones, así como la estimación de Nm a partir de éstos.

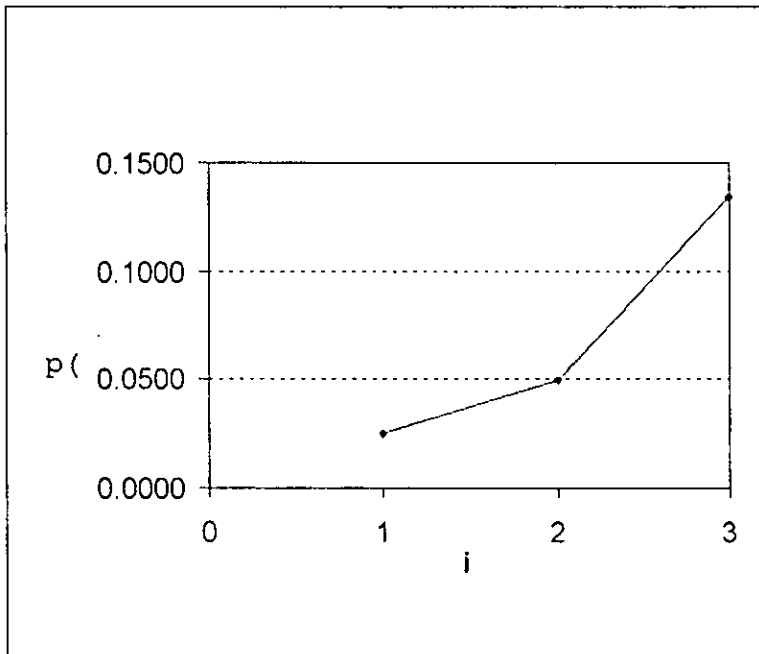
El intervalo de confianza para la $F_{ST}(\theta)$ de todas las poblaciones fue de 0.0722- 0.1517 con una confiabilidad del 95%. Para la especie *A. subsimplex* el intervalo de confianza resultó ser 0.0299- 0.1396, para la especie *A. cerulata* fue de 0.0556- 0.1018.

El valor de Nm calculado para *A. subsimplex* y *A. cerulata* con la fórmula de Crow y Aoki (1984) resultó distinto del que se estimó por el modelo de alelos raros de Slatkin(1985), para todas las poblaciones de ambas especies y para cada especie por separado.

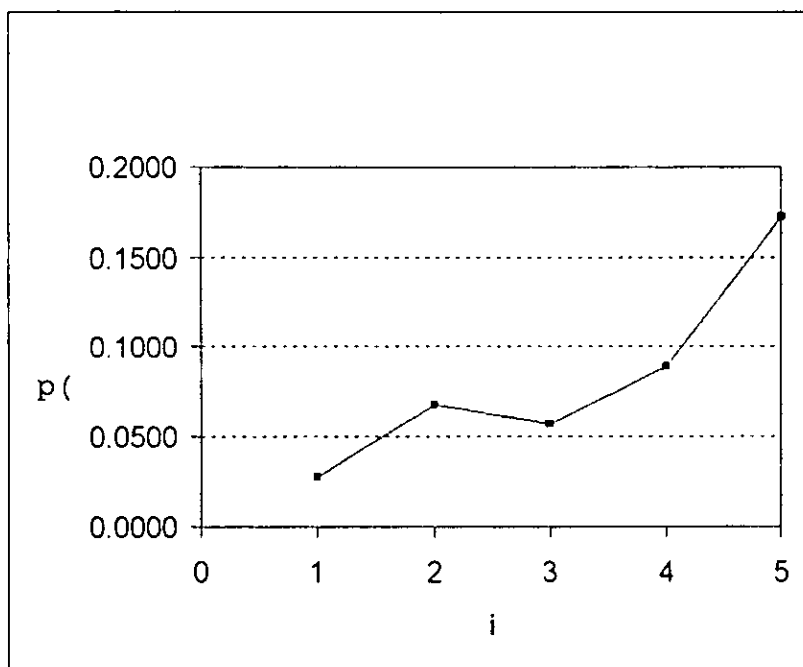
En la especie *Agave subsimplex* se obtuvieron 6 loci únicos para una población, los loci B20-680, B20-700, B20-1450, A10-775, A10-950 y A10-1150. Para la especie *Agave cerulata* se obtuvieron 4 loci raros o únicos.: A10-450, A10-580, A10-720 y A10-775. Para todas las poblaciones sólo hubo un locus único, el A10-720. Las frecuencias alélicas se pueden ver en la tabla 2.

Por último, del análisis de las frecuencias promedio condicionales ($p(i)$, Slatkin, 1981) se obtuvieron las gráficas 3.1 y 3.2. El comportamiento de los datos para *Agave cerulata* es similar al que Slatkin (1981) obtiene en una simulación del modelo de stepping- stone con $N= 25$, $\mu= 10^{-4}$, $d= 10$ (número de poblaciones) y $m= 0.1$, que significa que hay 2.5 migrantes por generación.

Para *Agave subsimplex* se ajusta al modelo de stepping- stone con $N= 25$, $\mu= 10^{-4}$, $d= 10$ (número de poblaciones) y $m= 0.05$, lo cuál es equivalente a 1.25 migrantes por generación.



Gráfica 3.1 Análisis de frecuencias promedio poblacionales para *Agave subsimplex*.



Gráfica 3.2 Análisis de frecuencias promedio poblacionales para *Agave cerulata*.

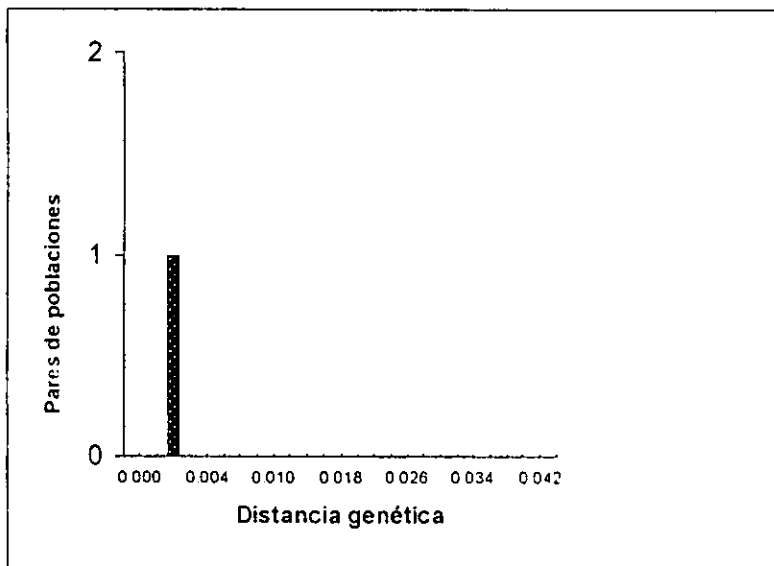
Para las distancias genéticas el programa de TFPGA ofrecía diferentes opciones con respecto a que estimador utilizar (ver método). Se calcularon las matrices de distancias a partir de las diferentes distancias genéticas de Nei (1972,1978). Como los resultados con ambos estimadores fueron muy similares se tomó como base para el análisis filogenético las distancias corregidas de Nei (1978), que son frecuentemente utilizadas en los estudios de estructura genética.

Tabla 6. Distancias genéticas de Nei (1978) para las poblaciones de *A. subsimplex*, *A. deserti* y *A. cerulata* a partir de 42 loci de los primers OPA-10 y OPB-20.

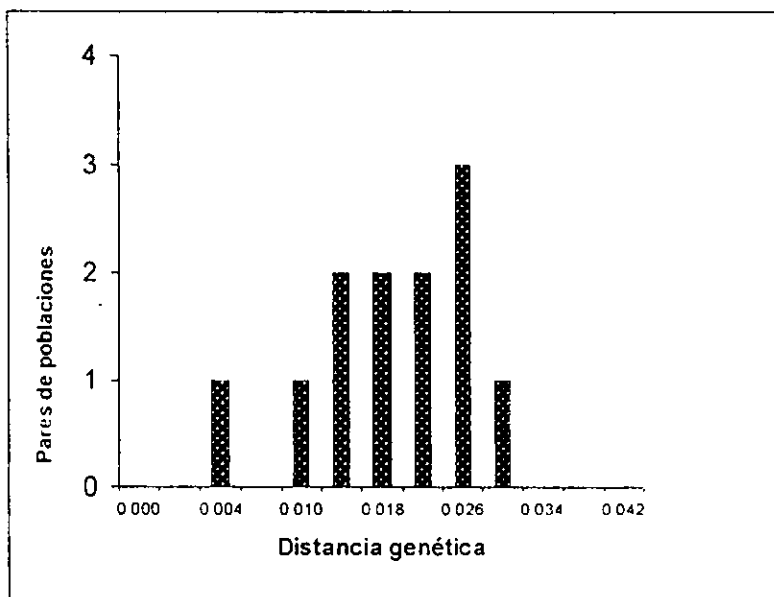
	Bahía Kino	San Gabriel	La Placa	Leyes de Reforma	Rosario	Cataviña	Punta Roca	Abulón	Isla Sn. Esteban
Bahía Kino <i>A. subsimplex</i>	0								
San Gabriel <i>A. subsimplex</i>	0.0243	0							
La Placa <i>A. subsimplex</i>	0.0144	0.0043	0						
Leyes de Reforma <i>A. deserti</i>	0.0193	0.0366	0.0246	0					
Rosario <i>A. cerulata nelsonii</i>	0.0313	0.0276	0.0278	0.0231	0				
Cataviña <i>A. cerulata cerulata</i>	0.0394	0.0351	0.0326	0.0191	0.0137	0			
Punta Roca <i>A. cerulata cerulata</i>	0.0321	0.0248	0.0210	0.0157	0.0115	0.002	0		
Abulón <i>A. cerulata subcerulata</i>	0.0414	0.0342	0.0316	0.0331	0.0284	0.023	0.0183	0	
Isla Sn. Esteban <i>A. cerulata dentiens</i>	0.0261	0.0393	0.0313	0.0138	0.0247	0.019	0.0153	0.0224	0

Las distancias genéticas varían dependiendo a que nivel se comparen las poblaciones, como se observa en los siguientes histogramas de frecuencias (gráfica 4).

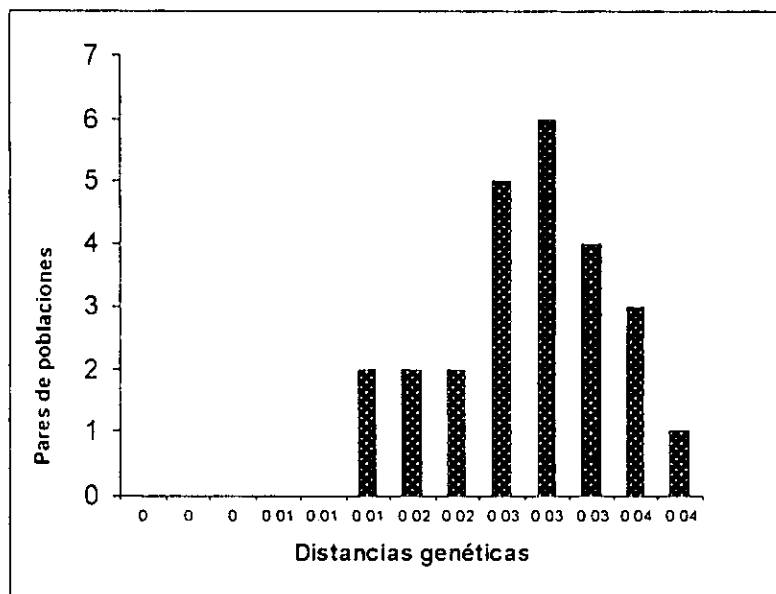
Para la comparación entre subespecies tenemos una categoría, ya que sólo se analizó un par de poblaciones de una misma subespecie (gráfica 4 a).



a)



b)



c)

Gráfica 4. Histogramas de frecuencias de distancias genéticas promedio obtenidas por RAPD's para a) pares de subespecies hermanas, b) dentro de una especie y c) entre especies de *Agave*.

En la comparación dentro de cada especie se observa que hay una tendencia de las distancias genética a aumentar, con respecto a las distancias entre las subespecies (gráfica 4 b).

Al comparar entre especies se observa una distribución tipo normal cuya media está en las distancias genéticas de 0.026- 0.03 (gráfica 4 c).

El árbol filogenético se obtuvo con el algoritmo UPGMA, después de un bootstrap de 10 000 permutaciones. Los valores de proporción de replicas apoyando cada nodo fue entre 0.3892 hasta 0.9883, con un promedio de 0.6, lo que indica un índice de consistencia relativamente bueno.

Se distinguen dos grupos, aquel que agrupa a las poblaciones de *A. subsimplex* y otro que agrupa a las poblaciones de *A. cerulata*.

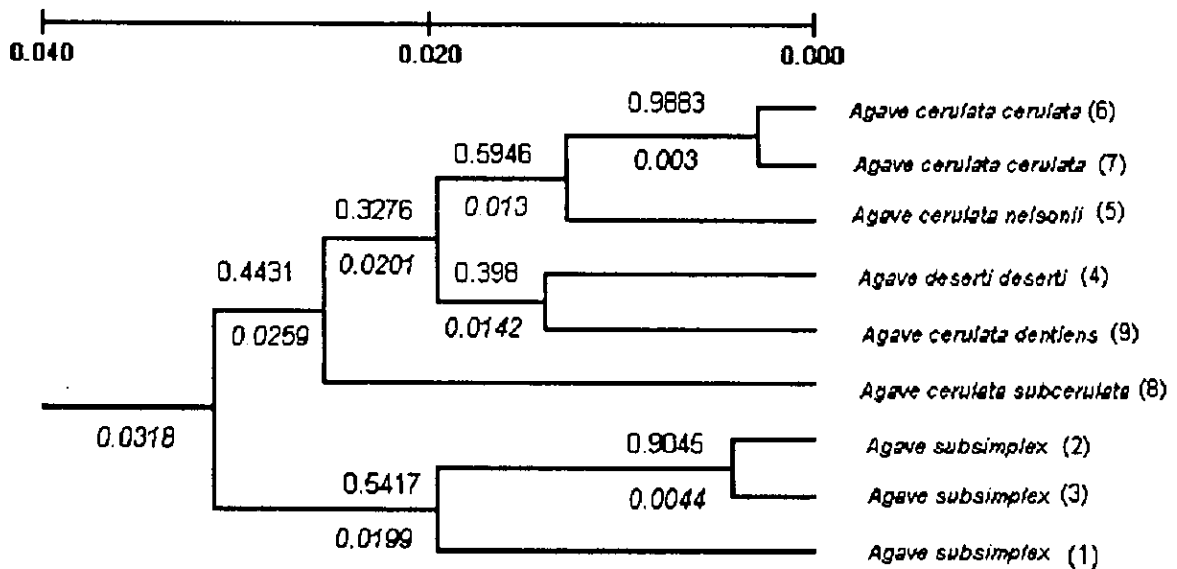


Figura 3. (UPGMA)

Fenograma construido con el algoritmo UPGMA a partir de distancias de Nei (1978). Sobre las ramas se muestra la proporción de replicas similares. En cursivas debajo de las ramas se muestran las distancias genéticas. Entre paréntesis se muestra el número de la población.

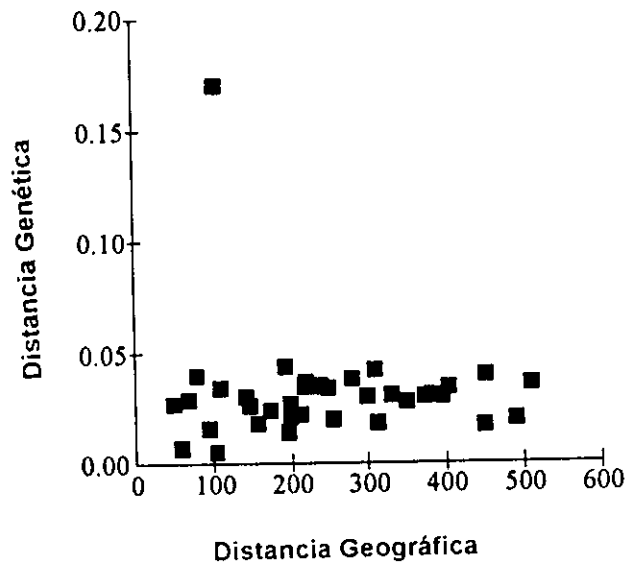
Tabla 7. Distancias geográficas en Km obtenidas a partir de distancias aéreas en mapas del INEGI (escala 1: 250 000).

	Bahía Kino	San Gabriel	La Placa	Leyes de Reforma	Rosario	Cataviña	Punta Roca	Abulón	Isla Sn. Esteban
Bahía Kino	0								
San Gabriel	48.1738	0							
La Placa	105.643	58.4101	0						
Leyes de Reforma	490.170	450.551	396.602	0					
Rosario	403.682	373.351	329.641	146.229	0				
Cataviña	308.743	279.648	238.957	211.820	95.1094	0			
Punta Roca	217.968	198.462	173.729	312.450	195.648	103.475	0		
Abulón	192.118	218.931	248.426	510.649	382.399	299.031	199.655	0	
Isla Sn. Esteban	68.7267	78.8716	109.519	448.910	349.288	254.411	156.810	141.594	0

En cuanto a la prueba de Mantel para determinar el aislamiento por distancia se obtuvieron las gráficas 7- 9 en todas se obtuvo la correlación, el valor de Z original y después de 1000 permutaciones y la significancia. En la primera gráfica al ajustar una recta ésta pasa muy lejos de todos los puntos y la correlación es negativa, lo cuál nos indica que los datos de distancia geográfica son independientes de los de distancia genética. La Z después de 1000 permutaciones resultó ser mayor que la Z original, por lo cuál esta correlación no es significativa y no se puede hablar de una relación entre las distancias. Sin embargo se observa un punto lejano al resto de los puntos que quedan agrupados en el fondo de la gráfica. Este punto pertenece a la distancia entre la población de la Isla San Esteban y una de las poblaciones de *Agave subsimplex* de Sonora, que genéticamente están muy alejadas, pero geográficamente están muy cercanas (distancia en línea recta).

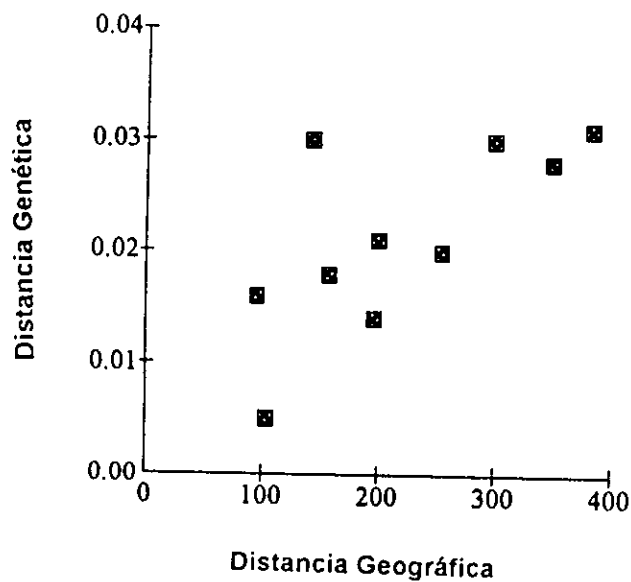
Al realizar este análisis de aislamiento por distancia para la especie *Agave subsimplex* pudimos observar que no hay una correlación entre las distancias

genéticas. El análisis no resultó ser significativo (Z original= 3.5053, después de 10 000 permutaciones $Z= 3.6052$, $r= - 0.1670$, $p= 0.6613$). La gráfica tenía sólo tres puntos, lo cuál puede explicar que no haya significancia y por esta razón no se muestra.



Gráfica 7. Análisis de aislamiento por distancia para todas las poblaciones.

(Z original = 269.362, Z después de 1000 permutaciones = 278.873, $r = -0.0799$, $p = 0.6470$).



Gráfica 8. Análisis de aislamiento por distancia para la especie *Agave cerulata*.

(Z original= 51.73, después de 10 000 permutaciones, Z= 46.3896, $r=0.6971$, $p=0.0092$).

Se observa (gráfica 8) que la correlación entre las distancias genéticas y geográficas es muy clara para *Agave cerulata*. Mejoró la correlación (r), la probabilidad aumentó y la Z original fue mayor a aquella después de las 10 000 permutaciones.

Discusión

Frecuencias genéticas

Los RAPD's han sido utilizados en varios trabajos como marcadores confiables para describir la diferenciación genética existente entre poblaciones (Latta y Mitton, 1997), para estimar la variación genética entre poblaciones (p.e., Le Corre et al. 1997, Ayres y Ryan, 1997, Bucci y Menozzi, 1993) y para determinar la estructura genética de las poblaciones (p.e., Bonnin et al. 1996).

Nei (1987) menciona que para estimar óptimamente las distancias genéticas se debería utilizar un gran número de loci, sobre todo cuando las distancias genéticas son pequeñas, lo cuál se aplica en nuestro caso. Según Nei (1987), para minimizar la posibilidad de obtener una identidad genética sesgada a menos de 0.05 se deben de analizar por lo menos 29 loci. En nuestro estudio analizamos 42 loci, lo cuál nos habla de que los cálculos de identidad genética, y por lo tanto de distancia genética, son bastante robustos.

El alto número de loci obtenidos con dos primers coincide con los resultados de Moodie et. al. (1997), que obtienen hasta 22 bandas por primer con la mostaza silvestre *Sinapis arvensis*, con Palacios y Candelas (1997) que obtienen hasta 21 marcadores con el primer OPA-4 en la especie *Limonium cavanillesii* y con los de Stewart y Porter (1995), los cuáles obtienen 35 bandas con dos primers con especies del género *Illiamna*.

Se puede hablar de loci polimórficos cuando la frecuencia del alelo más común es de 0.99 o menor, lo cuál es una definición arbitraria. Sin embargo se ha observado que cuando la muestra es menor de 50, este criterio es poco razonable, porque si se tuviera un alelo en la población con una frecuencia menor de $1/2n$ podría no estar representado en la muestra (Nei, 1987). En el caso de los RAPD's esto también se puede decir, ya que aunque sólo se están detectando dos alelos

(presencia y ausencia) podríamos decir que al tener menos de 50 individuos por población podríamos hablar de loci polimórficos con una frecuencia de 0.95 o menor. Sin embargo, en nuestro análisis no obtuvimos esas frecuencias para el alelo presente, aunque sí para el alelo ausente, lo que nos podría introducir un posible sesgo.

En poblaciones de plantas apomícticas se ha observado que comparando entre poblaciones se encuentran los mismos alelos presentes en frecuencias similares (Crawford, 1985). En este estudio obtuvimos que por lo general se tienen los mismos loci en todas las poblaciones que conforman a una especie. Sin embargo, encontramos que también hay loci raros (ver tabla 2), es decir que sólo aparecen en una población de la especie o subespecie estudiada o que son exclusivos para una especie. Las especies estudiadas se reproducen asexual y sexualmente, posiblemente haya una fijación de ciertos alelos en ciertas poblaciones, lo cuál nos habla una ligera diferenciación.

Es de notarse que en ambas especies *Agave subsimplex* y *Agave cerulata*, que tienen alelos raros también tienen diferencias significativas en sus frecuencias alélicas.

Variación genética

Los valores de variabilidad genética son medianamente altos, lo que coincide con los valores obtenidos en otras especies de la familia (similares a aquellos de *Yucca filamentosa* (Massey y Hamrick, 1998)). Sin embargo, son menores que los que se habían obtenido en un estudio preliminar con isoenzimas realizados a partir de 6 loci para *Agave subsimplex* (Salas- Benito, dnp). Para poder realizar una buena comparación con estos datos preliminares, éstos deberían de abarcar un mayor número de loci. Los valores de diversidad genética coinciden con lo que se esperaría para monocotiledóneas perennes, longevas, con

un patrón de distribución restringido (endémicas de la costa de Sonora y la Península de Baja California) y con un sistema predominante de fertilización cruzada, mismo que correlaciona con niveles altos de variación genética (Hamrick y Godt, 1989).

En la tabla 8 se presenta la heterocigosis (H) promedio esperada, ya que ésta se ve menos afectada por el número de muestra, y la proporción de loci polimórficos (P) reportados para otras especies de plantas con isoenzimas y RAPD's.

Tabla 8. Valores de heterocigosis y polimorfismo obtenidos en plantas con estimadores genéticos.

Especie	H esperada	P (%)	Referencia
<i>Manfreda brachystachya</i>	0.48†	100†	Eguiarte, et al., dnp.
<i>Yucca filamentosa</i>	0.20†	67.6†	Massey y Hamrick, 1998
<i>Agave lechugilla</i>	0.39†		Silva, A., dnp.
<i>Agave subsimplex</i>	0.28†	87.5†	Salas-Benito, M., dnp.
<i>Agave victoria-reginae</i>	0.335†	83†	Martínez-Palacios, et al. en prensa.
Promedio Agavaceae	0.25†	84.52†	
<i>Astrocaryum mexicanum</i>	0.135†	31.8†	Eguiarte, 1994
<i>Abies religiosa</i>	0.108†		Aguirre et al. en prensa
<i>Aechmea tuitensis</i>	0.155†	-	Izquierdo, 1995
<i>Erythroxylum havanense</i>	0.316†	70.6†	Domínguez et al. , dnp.
<i>Quercus petraea</i>	0.381†	-	Le Corre, et al. 1997
Coníferas	0.17†	52†	Ledig, 1986
Hierbas	0.14†	35†	Hamrick et al. 1979
<i>Agave subsimplex</i>	0.1422*	78.57*	Este estudio
<i>Agave cerulata</i>	0.1812*	77.62*	Este estudio

Especie	H esperada	P (%)	Referencia
<i>Agave deserti</i>	0.1963*	80.95*	Este estudio y González, R., dnp.
Promedio <i>Agave</i>	0.1732*	79.05*	
<i>Fagopyrum esculentum</i>	-	55*	Kump y Javornik, 1996
<i>Euphorbia esula</i>	0.417*	-	Rowe et al. 1997
<i>Allium aaseae</i>	0.343*	56.9*	Smith y Pham, 1996
<i>Chamaedorea alternans</i>	0.35*	45.5*	Otero, 1998
<i>Medicago truncatula</i>	0.1455*	62.5*	Bonnin et al. 1996
<i>Quercus petraea</i>	0.233*	-	Le Corre, et al. 1997
<i>Erythroxylum havanense</i>	0.4212*	-	Domínguez et al., dnp.
<i>Wyethia reticulata</i>	0.28*	100*	Ayres y Ryan, 1997
Plantas (RAPD's)	0.271*	69.63*	

*RAPD's, † isoenzimas

Los valores de variación genética son significativamente más bajos para *A. subsimplex*, que para *A. cerulata*. Ésta última tiene cuatro subespecies, lo cuál implica que tiene una mayor variación morfológica y si esta tiene bases genéticas, se espera que tenga una mayor variación genética dentro de las poblaciones que la componen. Además el rango geográfico de la especie es mucho mayor y una subespecie coloniza una isla.

En un estudio realizado por Selander (1976) en el que resumía la variación encontrada hasta entonces (con isoenzimas) en diferentes grupos de animales y plantas, mencionaba que el promedio de variación para plantas era de $H_{esp} = 0.17$ y el porcentaje de loci polimórficos P(%) era de 46.4%. En otro estudio de Hamrick et al. (1992) encontraron que el promedio de variación reportado hasta entonces para todas las plantas con isoenzimas era de $H_{esp} = 0.15$ y el P(%)= 50. Nosotros

obtuvimos para ambas especies un promedio de $H_{esp} = 0.17$ y para el porcentaje de loci polimórficos 78.3 (tabla 8).

La variación, tanto de cada especie por separado como de ambas especies juntas, es cercana al promedio de variación esperada en plantas, siendo ligeramente más alta en *A. cerulata* que en *A. subsimplex*. Al observar el porcentaje de loci polimórficos, este es mayor, lo cuál podría deberse a que hay mayor variación, pero que se requiere mayor tamaño de muestra para detectarla. Sin embargo creo que se debe más que nada a que los marcadores utilizados, los RAPD's detectan loci monomórficos sólo en el caso de que esté presente la banda ($p=1$), pero cuando está ausente es difícil saber si se debe a un mismo tipo de mutación que causa la ausencia de la banda. Por esta razón en el análisis por medio de RAPD's se usan más que nada los loci polimórficos. Por lo tanto se podría decir que los RAPD's sobrestiman el porcentaje de loci polimórficos (ver tabla 8).

En cuanto a la variación detectada con isoenzimas vs. RAPD's, se ha observado distintos resultados. En un estudio realizado por Le Corre et al. (1997) con *Quercus petraea* (ver tabla 8) se muestra que la heterocigosis calculada con isoenzimas es significativamente mayor que aquella calculada con RAPD's. En el estudio realizado por Domínguez et al. (dnp.) con *Erythroxylum havanense*, se obtiene que la variación es mayor al ser estimada por RAPD's que por isoenzimas. En el caso de este estudio al comparar con los datos preliminares para *Agave subsimplex* (Salas-Benito, dnp.) observamos los mismos resultados que LeCorre et al. (1997), al tener estimaciones menores de heterocigosis con RAPD's, lo cuál se debe más que nada a que sólo se detectan dos alelos por locus, y detrás del alelo ausencia puede haber la llamada variación "críptica".

Es de extrañarse que la variación genética obtenida sea relativamente baja, porque por lo general los RAPD's, al ser neutros deberían ser más susceptibles a los cambios a nivel del genoma. Sin embargo, también se dice que puede

subestimar a la variación genética, sobre todo en el alelo "ausencia". La poca variación genética detectada también podría deberse al bajo número de marcadores utilizados.

A. subsimplex y *A. cerulata* son endémicas del desierto sonorense y se dice que las especies endémicas tienden a tener menor variación (H_{esp}) que las especies que no lo son (Hamrick y Godt, 1996). Sin embargo, la extensión geográfica de estas especies, sobre todo de *Agave cerulata*, es bastante amplia, lo cuál permitiría que haya variación en este rango. Los valores de heterocigosis obtenidos son similares a aquellos que se predicen para plantas leñosas perennes y longevas ($H_{esp}= 0.149$, Hamrick et al. 1991), aunque los valores de *A. cerulata* se aproximan más a los de árboles tropicales comunes ($H_{esp}= 0.185$, Hamrick et al. 1991) y los de *A. subsimplex* a los de árboles tropicales no- comunes ($H_{esp}= 0.142$, Hamrick et al. 1991), lo cuál concuerda con lo observado en el campo, ya que por lo general *A. cerulata* tiene poblaciones mayores.

Los valores de variación genética obtenidos para ambas especies se acercan a aquellos obtenidos por medio de isoenzimas para *Yucca filamentosa* (Massey y Hamrick, 1998) comparando dentro de las Agavaceas, pero es aún menor. Comparando con otras plantas mexicanas, la variación es similar a aquellas estimadas con isoenzimas para una palma tropical *Astrocaryum mexicanum* (Eguiarte, 1994), y una bromeliaceaea tropical, *Aechmea tuitensis* (Izquierdo, 1995) lo cuál coincide con lo esperado según Hamrick et al. (1991) para plantas tropicales. Además ambas especies son monocotiledóneas, al igual que las especies estudiadas.

Es interesante que las poblaciones con mayor variación genética son aquellas que se encuentran más aisladas de la supuesta especie ancestral del grupo de origen, *Agave deserti*. Tanto en el caso de las poblaciones de *A. subsimplex*, como las poblaciones de *A. cerulata*, las poblaciones más sureñas - Bahía Kino y Microondas Abulón, respectivamente- tenían valores de

heterocigosis esperada ligeramente, aunque no significativamente, más altos (ver tabla 2, gráfica 2) que las otras poblaciones. En *A. subsimplex* las diferencias si son significativas entre las poblaciones, lo cuál podría explicarse porque tenemos un menor número de poblaciones muestreadas o que estas poblaciones son menos continuas que en el caso de las poblaciones de *Agave cerulata*.

El que las especies más sureñas tengan mayor variación contradice a una de nuestras hipótesis iniciales, es decir, que aquellas especies más alejadas del núcleo de origen tendrían menor variación, al ser más recientes. Se espera que las poblaciones más recientes que surgen de otras, tengan una menor variabilidad por un "efecto de fundador". Aunque estas poblaciones surgidas de otras se pueden recuperar, esto tomaría mucho tiempo (Nei, 1987). Lo que es de notar, es que por lo menos en el caso de especie *A. subsimplex*, la población sureña (Bahía Kino) era abundante, mientras que aquella con variación menor (San Gabriel), era, aunque abundante, relativamente más escasa, probablemente por su cercanía con asentamientos Seris que consumen este *Agave* frecuentemente (Felger y Moser, 1995).

Algo que extraña aún más es que la población de la isla (San Esteban) de *A. cerulata dentiens* sea la población que tiene mayor variación genética. Este resultado es contrario a lo que se espera para las poblaciones de islas según Frankham (1997), que realizó una revisión extensa de las diferencias de variación entre poblaciones de animales y plantas de tierra firme y de islas y encuentra que en 48 de 57 estudios comparativos entre tierra firme e islas, se encuentra una mayor heterocigosis en tierra firme. En plantas parece haber una mayor proporción de estudios que muestran que las islas tienen mayor variación: tres estudios de nueve, con las plantas *Atherosperma moschatum*, *Cryptomeria japonica* y *Quercus petraea*. La mayor variación en el caso de *Q. petraea* se debe a que tiene una alta capacidad de dispersión, que ya sea por polen o semillas favorecen la dispersión de genes de otras poblaciones hacia la isla. En el caso de

nuestros *Agave*, también hay una alta capacidad de dispersión del polen por medio de murciélagos (Arita, 1991), lo cuál podría explicar la mayor variación de la población de la isla.

Nuestra subespecie de la isla es endémica y por esto se predeciría menor variación. En cuanto a especies endémicas de islas, la revisión de Frankham (1997) contiene un estudio en el que una población de *Hosta jonesii*, que habita una isla tiene mayor variación que una población de *Hosta capitata* de tierra firme, pero este resultado es justificado por que la especie de la isla tiene un mayor número poblacional. La Isla San Esteban es pequeña, aún así podría albergar una población bastante grande de plantas que evitarían la deriva génica y la reducción de la variación. Faltaría un estudio demográfico para determinar si la población de la isla era bastante extensa y numerosa, como aparentaba por apreciación visual. Por otra parte, históricamente la Isla San Esteban estuvo habitada por un grupo Seri (hoy extinto) que utilizaba este agave y pudo haber introducido variantes (F. Molina, com. pers.)

En este estudio lo más probable que esté sucediendo es que haya un alto flujo génico y no se descarta tampoco que haya flujo génico de diferentes poblaciones a la población de la isla.

Diferenciación y flujo génico

Los niveles bajos - no- significativamente diferentes de cero - obtenidos para la diferenciación genética entre las poblaciones (θ) tanto para *A. subsimplex* como para *A. cerulata* (0.08 ± 0.08 y 0.09 ± 0.04 respectivamente) sugieren un alto flujo génico, selección homogeneizadora por encontrarse en ambientes similares y/o que el tiempo de divergencia geográfica no ha sido suficiente para diferenciar las poblaciones. Los relativamente altos niveles de variación genética descartarían

a la deriva génica como fuerza estructuradora de las poblaciones (Hartl y Clark, 1989).

En la tabla 9 se pueden observar otros estudios realizados para obtener los patrones de diferenciación para otras plantas. Los valores obtenidos para θ de nuestras especies es similar a aquel obtenido para *Agave lechugilla*, un agave con una amplia distribución, como es el caso del nuestro y con alto flujo de polinizadores entre sus poblaciones (Silva A. dnp.).

Tabla 9. Valores de diferenciación genética obtenidos en plantas.

Espece	F _{ST} (ó θ)	Referencia
<i>Manfreda brachystachya</i>	0.03†	Eguiarte, dnp.
<i>Yucca filamentosa</i>	0.172†	Massey y Hamrick, 1998
<i>Agave lechugilla</i>	0.089†	Silva, A., dnp.
<i>Agave subsimplex</i>	0.31†	Salas-Benito, M., dnp.
<i>Agave victoria-reginae</i>	0.24†	Martínez-Palacios, et al. en prensa.
Promedio Agavaceae	0.1682†	
<i>Astrocaryum mexicanum</i>	0.042†	Eguiarte, L.E. 1994
<i>Abies religiosa</i>	0.24†	Aguirre et al. en prensa.
<i>Aechmea mexicana</i>	0.62†	Izquierdo, 1995.
<i>Erythroxylum havanense</i>	0.2782†	Domínguez et al., dnp.
<i>Quercus petraea</i>	0.027†	Le Corre, et al. 1997
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	0.26†	Aagard et al. 1995
<i>Pinus leucodermis</i>	0.0671†	Bucci et al. 1997
<i>Wyethia reticulata</i>	0.19†	Ayres y Ryan, 1997
Pinaceae	0.073†	Hamrick y Godt, 1996.
Solanaceae	0.43†	Hamrick y Godt, 1996.

Especie	F _{ST}	Referencia
Asteraceae	0.20†	Hamrick et al. 1979
<i>Agave subsimplex</i>	0.08* (θ)	Este estudio
<i>Agave cerulata</i>	0.09* (θ)	Este estudio
<i>Agave deserti</i>	0.083* (θ)	González, R., dnp.
<i>Euphorbia esula</i>	0.46*	Rowe et al. 1997
<i>Allium aaseae</i>	0.136*	Smith y Pham, 1996
<i>Chamaedorea alternans</i>	0.023*	Otero, M.A. 1998
<i>Medicago truncatula</i>	0.448* (θ)	Bonnin et al. 1996
<i>Quercus petraea</i>	0.024*	Le Corre, et al. 1997
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	0.73*,0.62**	Aagard et al. 1995
<i>Pinus leucodermis</i>	0.1792*	Bucci et al. 1997
<i>Wyethia reticulata</i>	0.25*	Ayres y Ryan, 1997

*RAPD's, † isoenzimas, ** RAPD's mitocondriales

Slatkin (1989) compara varios métodos para la obtención de flujo génico y llega a la conclusión de que cuando se tiene una distribución de alelos similar a la del modelo de islas F_{ST}, es un estimador adecuado de flujo génico bajo numerosas condiciones, por ejemplo bajo diferentes condiciones de selección y diferentes estructuras poblacionales.

El flujo génico entre las poblaciones de *A. subsimplex* y *A. cerulata*, se estimó como alto (Nm= 3.41), siendo mayor que 1, valor que Wright (1951) consideraba como suficiente para evitar la diferenciación, pero es menor a 4, que Kimura consideraba como límite para la diferenciación. Si sólo se analiza la especie *A. cerulata* en el análisis de Nm a partir de RAPD's se obtiene que el flujo génico es de 4.38 y para la especie *A. subsimplex* es de Nm de 6.38. En ambos

casos el flujo génico resultó lo suficientemente alto como para evitar la diferenciación.

El valor de Nm promedio obtenido resultó intermedio a aquellos valores reportados para especies relacionadas *Agave victoriae-reginae* en la que se reporta un Nm de 1.821 (Martínez- Palacios et al. 1999) y *Manfreda brachystachya* (Agavaceae) y un Nm de 7.73 (Eguiarte, 1994).

En el cálculo de Nm a partir del modelo de alelos raros de Slatkin (1985) se obtuvo una Nm muy similar para ambas especies, así como para todas las poblaciones. Probablemente se deba a que los alelos raros no resultaron ser muy abundantes en las especies estudiadas (6 y 4 de 42, para *A. subsimplex* y *A. cerulata* respectivamente).

Al comparar con la simulación de Slatkin (1981) que realiza a partir de las frecuencias promedio de alelos, se obtiene una gráfica muy similar a la del modelo de stepping- stone con $m=0.1$ por generación. En nuestro caso que tenemos $N= 37.4$ el número de migrantes por generación sería de 3.74, que se acerca mucho al número obtenido para Nm de todas las poblaciones. Este modelo propone que las poblaciones aledañas intercambian genes y por lo tanto las poblaciones más alejadas se diferencian más.

La mayoría de las poblaciones se encuentran lo suficientemente cercanas entre sí para apoyar la idea de que hay un flujo génico alto, aunque hay algunas que tienen supuestas barreras geográficas lo suficientemente fuertes, como en el caso de la isla, como para esperar una alta diferenciación genética. Sin embargo, se ha propuesto que si los polinizadores son realmente murciélagos, las distancias existentes entre tierra firme e isla - de apenas 68.7 Km. – suficientemente cortas para los polinizadores. Hay investigadores que han observado que las islas sirven de refugio nocturno de los murciélagos, como en el caso de la Isla Tiburón, aunque todavía no se tenga evidencia clara de la ubicación de los refugios (F. Molina, com. pers.). En un estudio con *Leptonycteris*, se ha visto que puede volar

hasta 25 Km. en una noche (Medellín, 1994). Por otra parte se ha observado que el área habitual de un murciélago (p.e. el murciélago pequeño café, *Myotis sp.*) puede ser de 56 km a la redonda (Fenton, 1983). Fleming (1990) en un estudio de la biología de *Pachycereus pringlei*, *Carnegia gigantea* y *Stenocereus thurberi* y sus polinizadores *Leptonycteris* de Bahía Kino, Sonora, llega a la conclusión que los murciélagos migrantes, sobre todo hembras preñadas, llegan al continente en marzo y abril, y después de esto la Isla Tiburón les sirve de refugio para tener sus crías y criarlas. Esto último habla de las frecuentes migraciones que realizan¹ los murciélagos entre isla y continente.

Aunque no se han hecho estudios de sistemas reproductivos en esta especie en particular, se dice que los agaves del desierto sonorense son preferentemente panmícticos (Gentry, 1972), lo cuál favorece la hipótesis del alto flujo génico. Se han realizado estudios en los cuales se ha calculado el coeficiente de endogamia (F_{IS}) a partir de isoenzimas para otros Agaves, como *Agave victoria-reginae* ($F_{IS}= 0.055$) y *Agave lechugilla* ($F_{IS}= 0.100$). Ambos valores son cercanos o iguales a cero, lo cuál indicaría que prácticamente no hay endogamia. En un estudio que se realizó con *Agave schottii*, del desierto de Arizona, se obtuvo que existe una evidente depresión por endogamia y posiblemente depresión por exogamia (Trame et al. 1995).

En nuestro estudio se encontró una mayor similitud genética entre las poblaciones más cercanas geográficamente, lo que sugiere que el flujo génico, aunque no sea muy alto ocurre preferencialmente en distancias cortas.

El análisis de aislamiento por distancia realizado por medio del método de las matrices de Mantel no mostró una relación significativa para todas las poblaciones estudiadas, lo cuál se debe a que la población de la Isla San Esteban porque aunque esté cercana geográficamente por línea aérea de las poblaciones de *Agave subsimplex*, se observa en la matriz de distancias genéticas, que éstas son bastante grandes. Esto probablemente se deba a que hay barreras geográficas

considerables entre esta isla y la costa de Sonora, como la Isla Tiburón, además de que se trata de otra especie.

Al analizar solamente a las poblaciones de *Agave subsimplex* (n=3), se obtuvo una correlación negativa y valores de Z negativos, sin embargo, el número de poblaciones muestreadas para esta especie es muy pequeño.

En el análisis de las poblaciones (n= 5) de *Agave cerulata* (incluyendo a la de la Isla San Esteban, sin incluir a *Agave deserti deserti*) se obtuvo una buena correlación entre distancias genéticas y geográficas, siendo ésta mayor a cuando se consideran todas las especies. La Z también fue alta después de 10 000 permutaciones (46.39) y la probabilidad fue mucho más baja. Existe, entonces un claro patrón de aislamiento por distancia para esta especie.

Interpretación de las distancias genéticas en el proceso de especiación

En el análisis fenético por medio de UPGMA se obtiene un clado claramente para cada especie -a excepción de la población de *Agave deserti* que agrupó con *A. cerulata dentiens*- con una distancia genética de por lo menos 0.032 entre uno y otro, que es la distancia mayor encontrada en todo el análisis.

La distancia genética de Nei (1978) entre dos subespecies que se obtiene en este análisis va de 0.0137 (entre *Agave cerulata cerulata* y *A.c. nelsonii*) hasta 0.024 (entre *A. c. cerulata* y *A. c. subcerulata*). Sin embargo entre las poblaciones de *A. subsimplex* se encuentra como máxima distancia genética 0.024 (entre las poblaciones de Bahía Kino y San Gabriel), lo cuál nos sugiere que a partir de nuestros datos de 42 loci de RAPD's pudieran ser consideradas subespecies distintas.

Las relaciones genéticas guardan una buena relación con su posición geográfica, a excepción del clado que forman *A. deserti* y *A. cerulata dentiens*, por

lo general las poblaciones más cercanas geográficamente se agrupan como más cercanas genéticamente.

Los indicadores de identidad y distancia genética de Nei (1972, 1978) pueden ser utilizados para medir la diferenciación genética en el proceso de especiación (Ayala, 1984). Cuando hay dos taxa morfológicamente muy distintos, aunque no tanto como para ser considerados especies distintas se habla de subespecies, que es lo que sucede en el caso de *Agave cerulata*. Para hacer una distinción entre variedades y subespecies algunos autores han propuesto que, basándose en datos de isoenzimas, se hable de subespecies cuando la distancia genética standard de Nei entre ellas sea igual o mayor de 0.05 (Nei, 1987). Debajo de ese valor se puede hablar de variedades. En nuestro estudio todas las subespecies tiene distancias genéticas menores a 0.05, y según este criterio deberían ser consideradas razas.

Sin embargo hay diferencias morfológicas y geográficas muy claras. Aunque haya diferencias morfológicas que dividen a estas especies en dos, genéticamente podrían ser una sola, y si todavía hay flujo génico entre ambas especies, estarían actuando biológicamente como una especie. Clasificarlas como especies separadas sólo tendría una utilidad práctica y se hablaría de que son especies taxonómicas.

Hay que tomar en cuenta también que los RAPD's han sido criticados como herramienta de análisis filogenético a niveles superiores al de poblaciones (Grosberg et al., 1996). Lo que nosotros percibimos como pequeñas diferencias, pudiera ser parcial, ya que los RAPD's tienden a subestimar la variación genética al no poder saber que hay detrás del alelo "0" o ausencia. Las diferencias podrían ser más grandes.

Para diferenciar genéticamente entre especies, se puede hablar de distancias genéticas de 0.2 o más dependiendo de la evolución del grupo en particular. Algunos autores por ejemplo, han separado especies de mamíferos con

este valor de D (Sage, 1981 en Nei, 1987). Aunque hay algunos grupos, como las aves (Johns y Avise, 1998, Avise y Aquadro, 1982), donde las distancias genéticas son muy pequeñas, aunque las morfológicas son muy grandes y por eso se han considerado diferentes especies. En estos grupos se puede hablar de una tasa acelerada de cambio morfológico, que pueden deberse a mayores presiones de selección. Las presiones de selección que producen diferencias morfológicas, pero no genéticas en este estudio pudieran ser a nivel local.

En cuanto a valores de distancias genéticas obtenidos en estudios realizados con plantas, los trabajos de Roberts (Crawford, 1985 ver tabla 10), a partir de isoenzimas, demuestran que dentro de una especie puede haber distancias interpoblacionales que van desde 0 hasta 0.31 (promedio= 0.13), la cuál se considera una distancia pequeña (Crawford, 1985). Otro ejemplo para distancias genéticas interpoblacionales bajas es la especie *Passiflora mollissima* (ver tabla 10). En nuestro estudio tenemos valores de distancias genéticas interpoblacionales bajas (0.005- 0.02 para la especie *A. subsimplex* y 0.003 entre las poblaciones de la subespecie *A. cerulata cerulata*).

Se han observado distancias genéticas muy altas entre subespecies de 0.29 hasta muy bajas 0.01 (Crawford, 1985). En nuestro estudio las distancias genéticas para las subespecies de *A. cerulata* resultaron ser muy bajas, 0.0142 - 0.0319. La distancia puede depender del origen de la subespecie, si este es reciente es probable que la distancia genética no sea mucha o que no se detecte con el marcador utilizado.

En cuanto a especies congénéricas, se ha visto que las distancias son por lo general, mayores, p.e. en datos de *Chenopodium* a partir de isoenzimas (Crawford, 1975). En otro estudio del género *Sullivantia* las distancias son pequeñas. En este caso las especies son morfológicamente distintas, pero alopátricas, el cuál es un caso muy similar al nuestro. En nuestro estudio la distancia genética entre especies es de 0.03, lo cuál concuerda con las distancias

menores obtenidas con datos de isoenzimas.

En este estudio se esperaba encontrar un modelo claro de especiación geográfica (alopátrica), que hubiera favorecido la diferenciación genética de tal modo que surgieran nuevas especies. La diferenciación genética en las especies y sus subespecies estudiadas no resultó ser muy alta. Sin embargo para poder decir que desde el punto de vista genético actúan como una sola especie hacen falta definir si existe interesterilidad. Ésta es un factor muy importante en la permanencia de las especies, estudios de hibridización podrían ayudar a definir si existe la posibilidad de hibridización.

Desde el punto de vista práctico de la especie no queda duda de que podrían manejarse como especies distintas, aunque esto no es cierto desde el punto de vista genético.

Tabla 10. Valores de distancia genética obtenidos dentro de especies y géneros de plantas.

Especie	D	Referencia
<i>Agave lechugilla</i>	0.03 - 0.12	Silva, A. (dnp.)
<i>Agave subsimplex</i>	0.14 - 0.41†	Salas-Benito, M.(dnp.)
<i>Agave victoria- reginae</i>	0.182†**	Martínez et al. en prensa
<i>Solanum heterodoxum</i>	0.19- 0.34 †**	Whalen, 1979 en Crawford, 1985
<i>Phlox drummondii</i>	0.01 †**	Levin, 1977 en Crawford, 1985
<i>Chenopodium incanum</i>	0.05- 0.08 †**	Crawford, 1985
<i>Capsicum anuum</i>	0.07†**	McLeod et al. en Crawford, 1975
<i>Capsicum baccatum</i>	0.02†**	McLeod et al. en Crawford, 1975
<i>Bidens discoidea</i>	0.31- 0†	Roberts en Crawford, 1975
<i>Solanum sp.</i>	0.13- 0†	Crawford, 1975
<i>Chenopodium sp.</i>	0.65- 0.03†	Crawford, 1975

Especie	D	Referencia
<i>Sullivantia sp.</i>	0.13- 0.1†	Soltis, 1981
<i>Agave subsimplex</i>	0.0148- 0.025*	Este estudio
<i>Agave cerulata</i>	0.0141- 0.0292*	Este estudio
<i>Agave deserti</i>	0.0062- 0.0292*	Este estudio y González, R. (dnp.)
<i>Passiflora ligularis</i>	0.112- 0.731*	Fajardo et al. 1998
<i>Passiflora adenopoda</i>	0.247- 0.789*	Fajardo et al. 1998
<i>Passiflora sp. india</i>	0.095-0.363*	Fajardo et al. 1998
<i>Passiflora mollissima</i>	0.098- 0.312*	Fajardo et al. 1998
<i>Passiflora edulis</i>	0.522- 0.683*	Fajardo et al. 1998
<i>Passiflora maliformis</i>	0.547- 0.570*	Fajardo et al. 1998

*RAPD's, † isoenzimas, ** promedio

Las distancias genéticas son pequeñas, aunque morfológicamente si se distinguen diferencias. Podría ser que la evolución morfológica sea reciente o que la evolución genética sea muy lenta.

En el análisis filogenético la población de la especie *A. deserti deserti* se agrupó dentro del clado de *A. cerulata* y no afuera del árbol como grupo enraizante, que es lo que se esperaría de nuestro análisis al ser *A. deserti* el supuesto grupo ancestral. La población de esta especie queda en una rama junto con *A. cerulata dentiens*, que por su posición geográfica de isla se cree debiera ser muy distante genéticamente del resto de las poblaciones de *A. cerulata*. La población que se está analizando de *A. deserti* es de las más sureñas de la especie, y si tomamos en cuenta que éstas son morfológicamente muy similares a *A. cerulata* como dice Gentry (1982) posiblemente exista flujo génico homogeneizador de esta población con el resto de las poblaciones de *A. cerulata*.

Gentry en su estudio de los Agaves de Sonora (1972), habla de que las mutaciones y el "rearrreglo de genes" en aislamiento han ocasionado la evolución

de nuevos genotipos que en el tiempo causan especiación. Estudios de DNA de algunas especies diploides y pentaploides del género *Agave* han demostrado que el cariotipo de estas plantas es muy estable y que la especiación pudiera estar ocurriendo por mutaciones puntuales y rearrreglos pequeños del DNA (Cavallini et al., 1996). Las distancias genéticas que nosotros observamos son lo suficientemente pequeñas como para apoyar esta hipótesis.

Tal vez sólo sean pequeños cambios en el DNA los que estén causando expresiones distintas de un genoma aún bastante homogéneo, cuya estabilidad se debe al intenso flujo génico.

Evolución de Agave cerulata Trel. y Agave subsimplex Trel. en Sonora y la Península de Baja California

Gentry (1982) al hablar del origen del grupo Deserticolae plantea que este grupo se originó en el sur de los Estados Unidos y que migró hacia el sur. De esta manera las poblaciones que quedaron en Sonora al separarse la porción de tierra de la península de Baja California se diferenciaron en dos especies distintas.

Álvarez (1989), analizando la distribución geográfica de cada uno de los géneros de la familia Agavaceae llega a la conclusión de que el origen de éstos fue en el centro de México, además señala la importancia de la tectónica de placas para explicar la distribución de las especies actualmente.

En este estudio podemos observar que los patrones de variación, contrario a lo predicho por Gentry (1982), aumentan de norte a sur. Las poblaciones más norteñas tienen menor variación que las sureñas, indicando el posible "efecto de fundador" o un cuello de botella más reciente que el de las poblaciones del sur.

Un cuello de botella reciente en las poblaciones norteñas pudiera ser producto de la última glaciación, llamada Wisconsiniana, hace 10 000 años. Se dice que la flora actual del desierto sonorense se estableció después de esta

glaciación (Briones, 1995). En una glaciación las especies migran hacia el sur por el cambio climático, donde establecen "refugios". Después de las glaciaciones recolonizan sus zonas originales, pero es un proceso que se ha visto reduce la variación genética en las especies afectadas, p.e. *Asclepias exaltata* (en un estudio con isoenzimas, Broyles, 1998) y en *Fagus sylvatica* (en un estudio con DNA ribosomal, Demesure et al. 1996).

El patrón de variación mayor hacia el sur que hacia el norte también sugiere que las poblaciones del sur pudieran haber originado a las poblaciones del norte. Entonces se supondría que una especie ancestral desconocida o extinta en el continente se separa junto con la península de Baja California y da origen a dos linajes distintos, *A. cerulata* y *A.subsimplex*. Estos linajes migran hacia el norte dando origen a *A. deserti*. Esta hipótesis se ve apoyada al haber encontrado una tendencia de la variación genética a aumentar hacia el sur.

Algo que ayuda a resolver este problema sería el análisis fenético del UPGMA, donde las poblaciones del sur quedan en la base de los cladogramas.

El análisis de más poblaciones también ayudaría a resolver el problema del origen del grupo Deserticolae.

Conservación de *Agave subsimplex* y *Agave cerulata*

A partir de los resultados obtenidos podemos decir que ambas especies tienen poblaciones aparentemente muy numerosas y genéticamente son muy variables por lo cuál no están en riesgo de extinción. Aunque *Agave subsimplex* es consumido por los Seris, sus poblaciones son grandes y tiene variación, esto último le permite evolucionar.

El alto flujo génico tiende a homogeneizar el genoma, por lo cuál se puede hablar que genéticamente actúan como una gran especie. Debido a la alta variación morfológica y genética la conservación *ex situ* resulta complicada. Con

una muestra aleatoria de semillas de ambas especies se tendría un buen muestreo del genoma, aunque probablemente incompleto.

Para la conservación *in situ* de ambas especies, basta con preservar zonas, aunque no muy grandes, si con abundancia de cada una de las subespecies.

Sería interesante conservar a la subespecie endémica de la Isla San Esteban, que resulta ser diferenciada morfológica y genéticamente, aunque parece tener poblaciones grandes que ayudan a su conservación.

Conclusiones

- Los RAPD's mostraron ser una buena herramienta para obtener la estructura genética de las poblaciones de *Agave subsimplex* Trel. y *Agave cerulata* Trel. Se obtuvieron un total de 42 loci, con los cuáles se tenían suficientes caracteres para el análisis.

- Los valores de diversidad genética son medianamente altos y coinciden con lo esperado para monocotiléneas perenes, longevas con un patrón de distribución restringido, pero con un sistema predominante de fertilización cruzada.

- La diferenciación entre las poblaciones fue muy pequeña, lo cuál podría estarnos hablando de selección homogeneizadora, al compartir habitats similares, de un alto flujo génico o de un origen reciente de las poblaciones.

- El flujo génico se estimó como alto, sobre todo dentro de cada especie, más que entre las especies, separadas por el Golfo de California. Es evidente esto al haber diferencias poco o no significativas al comparar las frecuencias alélicas para las poblaciones de cada especie.

- Generalmente las poblaciones más cercanas geográficamente tienen un mayor parecido genético. Esto queda más claro en la especie *Agave cerulata*.

- Las poblaciones sureñas presentaron mayor variación genética que las poblaciones del norte, lo cuál lleva a plantear la hipótesis que las poblaciones sureñas son ancestrales y que las dos especies estudiadas migraron hacia el norte dando origen a la especie *Agave deserti*. Esto sería apoyado porque las poblaciones sureñas tienen una posición basal en el árbol filogenético.

- La población estudiada de *Agave deserti deserti* no haya enraizó el árbol, como se esperaba, y quedó dentro del clado de la especie *Agave cerulata*, debido al alto flujo génico y su cercanía geográfica con esta especie.

- Las especies estudiadas formaron grupos distintivos de cada una en el análisis filogenético.

- Las distancias genéticas entre poblaciones, subespecies, especies fueron muy pequeñas en general, fueron aumentando conforme a la jerarquía que se comparaba. Las distancias entre las especies, aunque pequeñas se pueden equiparar a otras encontradas en otras especies vegetales.

- Las distancias genéticas no fueron muy grandes como para poder predecir un proceso de especiación de las subespecies, e incluso resultaron pequeñas entre las dos especies estudiadas. Genéticamente podrían ser una sola especie.

Literatura citada

Aagard, J.E. S.S. Vollmer, F.C. Sorensen y S.H. Strauss. 1995. Mitochondrial DNA products among RAPD profiles are frequent and strongly differentiated between races of Douglas-fir. *Molecular Ecology* **4**: 441- 447.

Aguirre P. E, G.R. Furnier y L.E. Eguiarte. 1999. The evolution of the southern Abies: low levels of genetic variation within and high levels of genetic differentiation among populations of species in southern Mexico and Guatemala. *American Journal of Botany* (en prensa).

Álvarez, Z.A. 1989. Distribución geográfica y posible origen de las *Agavaceae*. *Revista del Jardín Botánico Nacional de Cuba*, **10** (1): 25- 36.

Arizaga, S. y E. Ezcurra. 1995. Insurance against reproductive failure in a semelparous plant: bulbil formation in *Agave macroacantha* flowering stalks. *Oecologia* **101**: 329- 334.

Arita, H.T. 1991. Spatial segregation in long.- nosed bats, *Leptonycteris nivalis* and *Leptonycteris curasoae* in Mexico. *Journal of Mammalogy* **72**: 706-714.

Avise, J.C. y C.F. Aquadro.1982. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates: Patterns and correlations. *Evolutionary Biology* **15**: 151- 185.

Avise, J.C.1994. Molecular Markers, natural history and evolution. Chapman & Hall. New York.

- Ayala, F. J. y J.A. Kiger. 1984. Modern Genetics. Segunda Edición. The Benjamin Cummings, California.
- Ayres, D.R. y F.J. Ryan, 1997. The clonal and population structure of a rare endemic plant, *Wyethia reticulata* (Asteraceae): allozyme and RAPD analysis. *Molecular Ecology* **6**: 761- 772.
- Briggs, D. y S.M. Walters. 1984. Plant variation and evolution. Segunda edición. Cambridge University Press. 412 pp.
- Briones, O. L. 1994. Origen de los desiertos mexicanos. *Ciencia* **45**: 263- 279.
- Broyles, S.B. 1998. Postglacial migration and the loss of allozyme variation in northern populations of *Asclepias exaltata* (Asclepidaceae). *American Journal of Botany* **85**: 1091- 1097.
- Bonnin, I., T. Huguet, M. Gherardi, J-M. Prospero e I. Olivieri. 1996. High level of polymorphism and spatial structure in a selfing plant species, *Medicago truncatula* (Leguminosae), shown using RAPD markers. *American Journal of Botany* **83**: 843- 855.
- Bucci, G, Menozzi, P. 1993. Segregation analysis of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Picea abies* Karst. *Molecular Ecology* **2**: 227-232.
- Caetano- Anollés, G., B.J. Bassam, y P.M. Gresshoff. 1992. DNA amplification fingerprinting with very short primers. *Applications of RAPD Technology to Plant Breeding*. Manuscrito.

- Cavallini, A., L. Natali, G. Cionini e I. Castorena- Sánchez. 1996. Cytophotometric and biochemical analyses of DNA in pentaploid and diploid *Agave* species. *Genome* **39**: 266- 271.
- Crawford, D.J. 1983. Phylogenetic and Systematic Inferences from Electrophoretic Studies. en S.D. Tanksley y T.J. Orton. Isozymes in Plant Genetics and Breeding. Part A. Elsevier Science, Amsterdam: 257- 287.
- Darwin, C. 1859. On the Origins of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. John Murray, London.
- Dawson, I.K., K.J. Chaemers, R. Whaugh y W. Powell. 1993. Detection and analysis of genetic variation in *Hordeum spontaneum* populations from Israel using RAPD markers. *Molecular Ecology* **3** : 151- 159.
- Demesure, B. B. Comps y R.J. Petit. 1996. Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution* **50**: 2515- 2520.
- Dobzhansky, T. 1970. Genética del proceso evolutivo. Extemporáneos México. 463 pp.
- Doyle, J.J. y J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11- 15.
- Eguiarte, L.E. 1990. Genética de poblaciones de *Astrocaryum mexicanum* Liebm. en Los Tuxtlas, Ver. Tesis de Doctorado. Centro de Ecología/ UACPyP de CCH, UNAM, México.

- Eguiarte, L.E., N. Pérez- Nasser y D. Piñero. 1992. Genetic Structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm); implications for evolution and conservation. *Heredity* **68**: 217- 228.
- Eguiarte, L.E. A. Búrquez, J. Rodríguez, M. Martínez-Ramos, J. Sarukhán y D. Piñero. 1993. Direct and indirect estimates of neighborhood and effective population size in a tropical palm, *Astrocaryum mexicanum*. *Evolution* **47**: 75- 87.
- Ellstrand, N.C. y D.R. Elam. 1993. Population genetic consequences of small population size. Implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* **24**: 217- 242.
- Fajardo, D. F. Angel, M. Grum, J. Tohme, M. Lobo, W. M. Roca e I. Sánchez. 1998. Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. using RAPD markers. *Euphytica* **101**: 341- 347.
- Felger, R.S. y M.B. Moser. 1985. People of the desert and sea. Ethnobotany of the Seri Indians. Arizona University Press. 435 pp.
- Fenton, M. B., 1983. Just Bats. Toronto University Press, Toronto: 95- 101.
- Fleming, T.H., M.D. Tuttle y M.A. Horner. 1990. Pollination biology and the relative importance of nocturnal and diurnal pollinators in three species of sonoran desert columnar cacti. *The Southwestern Naturalist* **41**(3) : 257- 269.
- Frankham, R. 1997. Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity* **38**: 311- 327.

- Futuyma, D.J. 1998. Evolution. Tercera edición, Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.
- García- Mendoza A. y Galván R. 1995. Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Bol. Soc. Bot. México* **56**: 7- 24.
- Gentry, H.S. 1972. The Agave family in Sonora. Agriculture Handbook No. 399, Washington, D.C. 195 pp.
- Gentry, H.S. 1982. Agaves of Continental North America. The University of Arizona Press.
- Grosberg, R.K., Levitan, D.R. y B.B. Cameron. Characterization of Genetic Structure and Genealogies Using RAPD- PCR Markers: A Random Primer for the Novice and the Nervous en Ferraris, J.D. y S.R. Palumbi, eds. 1996. Molecular Zoology: Advances, Strategies and Protocols. Wiley - Liss, Inc.
- Haig, S.M. R. Bowman y T.D. Mullins. 1996. Population structure of red- cockaded woodpeckers in south Florida: RAPD's revisited. *Molecular Ecology* **5**: 725- 734.
- Haldane, J.B.S. 1990. The Causes of Evolution. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Hamrick, J.L., M.J. Godt y S. Herman- Broyles. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* **6**: 95- 124.
- Hamrick, J.L., M.J.W. Godt, D.A. Murawski y M.D. Loveless. 1991. Correlations between species traits and allozyme diversity: Implications for conservation

- biology, en Genetics and conservation of rare plants. eds. D.Falk y K. Holsinger. Oxford University Press. New York :75-86.
- Hamrick, J.L. y M.J.W. Godt. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Proc. Roy. Soc. London* **B 351**: 1291- 1298.
- Hartl, D.L. y A. G. Clark. 1989. Principles of Population Genetics. 2nd. Ed., Sinauer Ass. Inc., Sunderland, MA.
- Hedrick, P. 1992. Shooting the RAPD's. *Nature* (London) **355**: 679- 680.
- Hormaza, J.I. K. Pinney y V.S. Polito. 1998. Genetic Diversity of Pistachio (*Pistacia vera*, Anacardiceae) Germplasm Based on Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Economic Botany* **52** (1): 78- 87.
- Huff, D.R., R. Peakal y P.E. Smouse. 1993. RAPD variation within and among natural populations of buffalograss (*Buchloe dactyloides*). *Theoretical and Applied Genetics* **86**: 927- 934.
- Izquierdo, L.Y. 1995. Estructura y variación genética en 4 especies de *Achmea* (Bromeliaceae) en México. *A. mexicana*, *A. lueddemanniana*, *A. macvaughii*, *A. tuitensis*. Tesis doctoral. Centro de Ecología. UNAM, México.
- Karp, A., P.G. Isaacs, D.S. Ingram. 1998. Molecular Tools for Screening Biodiversity. Chapman & Hall. London. 498 p.
- Karron, J.D. 1991. Patterns of genetic variation and breeding systems in rare plant species. En: Genetics and conservation of Rare plants. eds. D.Falk y K. Holsinger. Oxford University Press. New York : 87- 98.

- Kimura, M. 1983. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press. Cambridge.
- Kump, B. y B. Javornik. 1996. Evaluation of genetic variability among common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) populations by RAPD markers. *Plant Science* **114**: 149- 158.
- Larson, R.L., H.W. Menard y S.M. Smith. 1968. Gulf of California: A result of Ocean Floor Spreading and Transform Faulting. *Science* **161**: 781- 783.
- Latta, R.G. y J.B. Mitton. 1997. A comparison of population differentiation across four classes of gene markers in limber pine (*Pinus flexilis* James). *Genetics* **146** (3): 1153- 1163.
- Ledig, F.T. 1986. Heterozygosity heterosis and fitness in outbreeding plants en M.E. Soulé, Conservation biology: the science of scarcity and diversity. Sinauer, Sunderland, Massachusetts :77 - 104.
- Le Corre, V. S. Dumolin-Lapegue y A. Kremer. 1997. Genetic variation at allozyme and RAPD loci in sessile oak *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.: the role of history and geography. *Molecular Ecology* **6**: 519- 529.
- Liu, Z. y G.R. Furnier. 1993. Comparison of allozyme, RFLP and RAPD markers for revealing genetic variation within and between aspen and bigtooth aspen. *Theoretical and Applied Genetics*. **87**: 97 - 105.
- Lynch, M. 1988. Estimation of relatedness by DNA fingerprinting. *Molecular Biology and Evolution* **5**: 584- 599.

- Lynch, M. y B.G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* **3**: 91- 99.
- Manly, B.F.J. 1991. Randomization and Monte Carlo Methods in Biology. Chapman & Hall, London. 281 pp.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Research* **27**: 209- 220.
- Martínez- Palacios A., L.E. Eguiarte y G.R. Furnier. 1999. Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoria reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. *American Journal of Botany* (en prensa).
- Mayr, E. 1963. Populations Species and Evolution The Bellknap Press of Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts. 453 pp.
- Mayr, E. 1982. Processes of speciation in animals. en C. Barigozzi (ed.) Mechanisms of Speciation Alan R. Liss. New York: 1- 19.
- Medellín, R. 1994. Plan de recuperación del murciélago magueyero *Leptonycteris nivalis*. Manuscrito. México, D.F.
- Miller, M.P. 1997. Tools for Population Genetic Analysis. Department of Biological Sciences. Northern Arizona University, Flagstaff, Arizona.
- Moran, R. 1967. *Agave subsimplex* Trelease. *Cact. Succ. Mex.* **12**: 59-61, en Gentry, H.S. 1982. Agaves of Continental North America. The University of Arizona Press.

- Moodie, M., R. P. Finch y G. Marshall. 1997. Analysis of genetic variation in wild mustard (*Sinapis arvensis*) using molecular markers. *Weed Science* **45**: 102-107.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* **106**: 283 - 292.
- Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press. 512 pp.
- Nobel, S.P. 1988. Environmental biology of agaves and cacti. Cambridge University Press. New York, NY, USA.
- Nobel, S.P. 1994. Remarkable Agaves and Cacti. Oxford University Press, N.Y.
- Otte, D. y J.A. Endler. 1989. Speciation and its consequences. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Mass.: 134-156.
- Palacios, C. y F. González-Candelas. 1997. Lack of genetic variability in the rare and endangered *Limonium cavanillesii* (Plumbaginaceae) using RAPD markers. *Molecular Ecology* **6** :671- 675.
- Raven, P.H. Systematics and plant population biology. *Systematic Botany* **1**: 284-316.
- Ridley, M. 1993. Evolution. Blackwell Scientific Publications. 670 pp.
- Rowe, M.L., D.J. Lee, S.J. Nissen, B.M. Bowditch. y R.A. Masters. 1997. Genetic variation in North American leafy spurge (*Euphorbia esula*) determined by DNA markers. *Weed Science* **45**: 446- 454.
- Sambrook, J., E.F.Fritsch, T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schaffer, W. y V. Schaffer. 1977. The reproductive biology of Agavaceae: I, pollen and nectar production for Arizona agaves. *The Southwestern Naturalist* **22** (2): 157- 168.

Schierenbeck, K.A., M. Skupski, D. Lieberman y M. Lieberman. 1997. Population structure and genetic diversity in four tropical tree species in Costa Rica. *Molecular Ecology* **6**: 137- 144.

Skroch, P. J. Tivang y J. Nienhuis. 1992. Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. *Applications of RAPD Technology to Plant Breeding*. Manuscrito.

Slatkin, M. 1987. Gene Flow and the geographic structure of natural populations. *Science* **263**: 787- 792.

Slatkin, M. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*. **43**: 1349- 1367.

Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non- equilibrium populations. *Evolution* **47**: 264- 279.

Slatkin, M. 1994. Gene Flow and Population Structure. *En: Real. L. (de.) Ecological Genetics*. Princeton University Press. pp. 3 -17.

Smith, J.F. y T.Vuong Pham. 1996. Genetic diversity of the narrow endemic *Allium aaseae* (Alliaceae). *American Journal of Botany* **83** (6): 717- 726.

Smith, J.L., J.S. Craig, J.R. Leadbetter, G.L. Bush, D.L. Roberts y D.W. Fulbright. 1994. Characterization of random amplified polymorphic DNA (RAPD) products

from *Xanthomonas campestris* and some comments on the use of RAPD products on phylogenetic analysis. *En: Ferraris, J.D. y S.R. Palumbi. 1996. Molecular Zoology: Advances, Strategies and Protocols. Wiley - Liss, Inc.*

Sokal, R.R. y F.J. Rohlf. 1995. Biometry. 3era edición, W.H. Freeman. New York.

Stewart, C.N. Jr. y D.M. Porter. 1995. RAPD profiling in biological conservation: An application to estimating clonal variation in rare and endangered *Illiamna* in Virginia. *Biological Conservation*. **74**: 135- 142.

Tingey, S.V., J.A. Rafalski y J.G.K. Williams. 1992. Genetic analysis with RAPD markers. *Applications of RAPD Technology to Plant Breeding*. Manuscrito.

Trame, A.M., A.J. Coddington y K.N. Paige. 1995. Field and genetic studies testing optimal outcrossing in *Agave schottii*, a long lived clonal plant. *Oecologia* **104**: 93 - 100.

Turner, R.M., J.E. Bowers y T.L. Burgess. 1995. Sonoran Desert Plants. The University of Arizona Press. 504 pp.

Weeden, N.F., G.M. Timmermann, M. Hemmat, B.E. Kneen y M.A. Lodhi. 1992. Inheritance and reliability of RAPD markers. *Applications of RAPD Technology to Plant Breeding*.

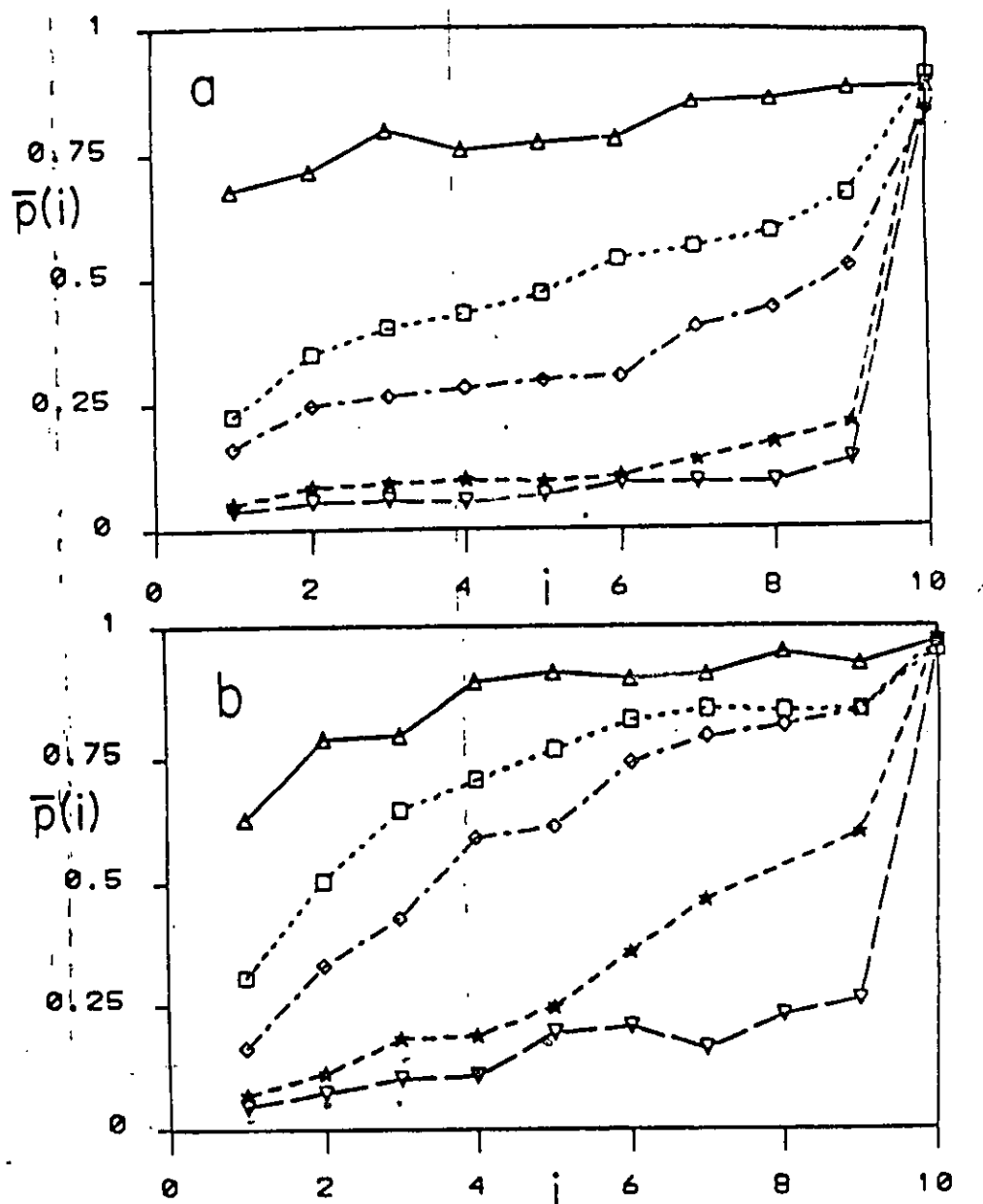
Weir, S. 1996. Genetic Data Analysis II. Sinauer Associates, Sunderland, Mass. 445 pp.

Welsh, J. y M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* **18**: 303-306.

Williams, J.G.K., A.R. Kubelil, K.J. Livak, J.A. Rafalski y S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker. *Nucleic Acid Research* **18**: 6531 -6535.

Williams, J.G.K., M.K. Hanafey, J.A. Rafalski y S.V. Tingey. Genetic Analysis using random polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology* **218**: 704- 740.

Apéndice 1



En la primer gráfica se observa la frecuencia promedio condicional para alelos neutro. En ambas gráficas $\mu=10^{-4}$, $d=10$ y $N=25$. Δ - Δ $m=0.001$, \square - \square $m=0.005$, \diamond - \diamond $m=0.01$, \star - \star $m=0.05$, ∇ - ∇ $m=0.1$.

A) Modelo de islas y B) Modelo de Stepping- Stone.

Resultados de la simulación del modelo de alelos promedio de Slatkin (1981) para alelos neutros. En la primer gráfica es el resultado del modelo de Islas y en la segunda gráfica es el resultado del modelo de Stepping- Stone.

El modelo de Stepping – stone describe el flujo génico que sucede sólo entre una población y sus poblaciones vecinas. De esta manera las poblaciones más alejadas se parecen menos y las aledañas más entre sí.