

82



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

ANALISIS DE VARIACION GENETICA DE *Agave deserti* EN EL
DESIERTO SONORENSE POR MEDIO DE MARCADORES
MOLECULARES (RAPDs)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

RODRIGO GONZALEZ CHAUVET



DIRECTOR DE TESIS:
DR. LUIS E. EGUIARTE FRUNS

MEXICO, D. F.



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION DE CIENCIAS



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

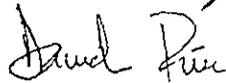
"Análisis de variación genética de Agave deserti
en el desierto Sonorense por medio de marcadores
moleculares (RAPDs)"

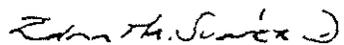
realizado por Rodrigo González Chauvet

Con número de cuenta 9350455-5 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de tesis Propietario	Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns	
Propietario	Dr. Daniel Piñero Dalmau	
Propietario	Dra. Maria del Carmen Mandujano Sánchez	
Suplente	Dr. Francisco Molina Freaner	Francisco E. Molina F.
Suplente	Biol. Arturo Silva Montellano	Arturo Silva



Consejo Departamental de BIOLOGIA
Dra. Edna Maria Suárez Díaz

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos más sinceros al Dr. Luis Eguiarte y a la Dra. Valeria Souza por su apoyo, a Luis le agradezco además la paciencia y asesoría que siempre me brindó y a Valeria por adoptarme como parte del laboratorio.

Agradezco especialmente a Aldo Valera y a Aura Navarro, ya que fueron quienes me ayudaron de manera permanente en todas las etapas de esta tesis, además de brindarme su amistad y apoyo incondicional.

Por supuesto agradezco todos los comentarios o muestras de apoyo, así como la ayuda que me ofrecieron en distintas formas, todos y cada uno de los integrantes del laboratorio de Evolución Molecular y Experimental.

Agradezco también todas las muestras de aprecio de aquellos a quienes considero mis amigos y que siempre estuvieron pendientes de mí desarrollo tanto académico como personal y que supieron alentarme a seguir con todos mis proyectos de vida a pesar de las dificultades que éstos conllevaran.

Agradezco también el apoyo y cariño de Ana Elena Escalante Hernández y la de su familia, quienes forman también parte importante de mi realidad.

Por último dedico esta tesis a mi familia en donde destacan mis padres Gustavo González Avalos y Cecilia Chauvet Flores del Valle quienes me han apoyado siempre pese a que les he dado algunos dolores de cabeza.

CONTENIDO	Pág.
Agradecimientos	4
Resumen	5
Abstract	6
Capítulo 1. Introducción General	7
1.1 Antecedentes	7
1.2 Características de la especie y subespecies	10
1.3 Técnica (RAPDs)	14
1.4 Genética de poblaciones	17
1.5 Variación genética	19
1.5 Variación fenotípica	20
1.6 Diferenciación genética	21
1.7 Flujo génico	22
1.8 Distancias e identidades genéticas	23
1.9 Distancias geográficas	24
1.10 Estructura geográfica de la variación genética	25
1.10 Objetivos	26
1.11 Hipótesis	26
1.12 Predicciones	27
Capítulo 2. Material y Métodos	28
2.1 Colecta de campo	28
2.2 Extracción de ADN	29
2.3 RAPDs	30
2.4 Análisis de datos	33
Capítulo 3. Resultados	35
3.1 Variación genética	35
3.2 Diferenciación y flujo genético	36
3.3 Distancia e identidad genética	41

3.4	Distancia geográfica	42
3.5	Estructura geográfica de la variación genética (prueba de Mantel)	43
3.6	Relaciones genealógicas	46
Capítulo 4. Discusión		47
4.1	RAPDs vs. otros marcadores moleculares	47
4.2	Variación genética	48
4.3	Diferenciación genética	51
4.4	Estimación del flujo genético	51
4.5	Estructura genética	53
4.6	Correlaciones entre los parámetros	54
4.6	Estructura geográfica de la variación genética	55
4.7	Relaciones genéticas	57
Capítulo 5. Conclusiones		59
Capítulo 6. Bibliografía		61

TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1: Riqueza y endemismo del género <i>Agave</i> en México.	10
Tabla 2: Especies y subespecies del grupo Deserticolae.	10
Tabla 3: Comparación de las características de las subespecies de <i>Agave deserti</i> .	12
Tabla 4: Características de las poblaciones colectadas.	30
Tabla 5: Frecuencias alélicas y prueba de Fisher para cada uno de los loci.	39
Tabla 6: Número de individuos, porcentaje de loci polimórficos por población y heterocigosis de las poblaciones y las subespecies.	37
Tabla 7: Diferenciación genética theta θ .	39

Tabla 8: Valores de θ (theta) y Nm para cada locus, de todas las poblaciones de <i>A. Deserti</i> .	40
Tabla 9: Valores de distancia e identidad genética entre las poblaciones	42
Tabla 10: Distancias geográficas en Km entre todas las poblaciones.	42
Tabla 11: Tabla comparativa de algunos valores ordenados en forma creciente de heterocigosis y porcentaje de loci polimórficos reportados para plantas con marcadores moleculares.	50
Tabla 12: Tabla comparativa de algunos valores ordenados en forma creciente de diferenciación genética reportados para plantas con marcadores moleculares.	52

FIGURAS

Figura 1: Distribución de <i>Agave deserti</i> , adicionalmente se encuentra la ubicación de las poblaciones presentes en el estudio.	13
Figura 2: Ejemplo de una electroforesis de gel de agarosa con el primer A-10 en la población de La Rumorosa <i>Agave deserti deserti</i> .	32
Figura 3: Ejemplo de una electroforesis de gel de agarosa con el primer B-20 en la población de Quitobac <i>Agave deserti simplex</i> .	33
Figura 4: Correlación entre el porcentaje de loci polimórficos y la heterocigosis de las poblaciones.	41
Figura 5: Resultado del análisis de aislamiento genético por distancia geográfica en km para todas las poblaciones de <i>Agave deserti</i> .	44
Figura 6: Análisis de las matrices de distancia genética contra distancia geográfica de las poblaciones de <i>Agave deserti</i> con excepción de los puntos formados por La Rumorosa.	45
Figura 7: Fenograma (UPGMA) de las poblaciones <i>Agave deserti</i> y sus subespecies, presentando las distancias genéticas de los nodos del lado izquierdo del mismo y la proporción de réplicas que apoyan los nodos después de aplicar un bootstrapping de 1000 permutaciones, en el centro de la horquilla a modo de porcentaje y en letras negritas.	46

RESUMEN

Agave deserti pertenece al grupo Deserticolae (Gentry, 1982), el cual se divide en 3 subespecies: *A. deserti deserti*, *A. deserti simplex* y *A. deserti pringlei* y se encuentra distribuido en el desierto Sonorense, el cual comprende parte de Sonora y parte de la Península de Baja California por lo que resulta un buen modelo para entender la dinámica evolutiva de un grupo de organismos separados por una barrera geográfica como es la que forma el mar de Cortés.

Se estimó la estructura genética de 6 poblaciones midiendo los niveles de variación genética, mediante estos niveles de variación se calcularon la heterocigosis, la *Fst* (en términos de θ theta), el flujo génico, las distancias genéticas (Nei, 1978). además de calcular las distancias geográficas y las relaciones filogenéticas entre las poblaciones. Para detectar esta variación se utilizaron marcadores moleculares del tipo RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA, Williams et al. 1990), los cuales se basan en la técnica de PCR y permiten obtener patrones de bandeo mediante electroforesis.

Agave deserti presenta niveles altos de heterocigosis ($Hs= 0.21$) y un alto porcentaje de loci polimórficos ($P= 68.2\%$), lo que indica un alto nivel de variación genética. Con respecto a la diferenciación genética entre las poblaciones se obtuvieron valores intermedios de $\theta= 0.14$ ($\theta= Fst$) y un flujo génico también intermedio de $Nm= 2.22$, lo que nos habla de que a pesar de las distancias geográficas existe flujo génico entre las poblaciones, lo que concuerda con la elevada variación genética que se mantiene por el intercambio de material genético mediante el flujo del mismo, contrarrestando la posible fijación de alelos por selección natural o deriva génica.

El análisis de las poblaciones nos permite observar como *A. deserti deserti* junto con *A. deserti pringlei* forman un grupo, mientras que *A. deserti simplex* forma otro, siendo esto lógico ya que los primeros se encuentran sobre la península y los segundos en el continente, con distancias genéticas pequeñas, siendo la población más alejada genéticamente la de La Rumorosa (0.063), que a su vez es la más alejada geográficamente al localizarse en la frontera con USA. Estas distancias indican la cercanía genética entre las poblaciones, lo que puede entenderse gracias tanto por el flujo génico, como porque el tiempo de divergencia y la distancia geográfica no han sido lo suficientemente contundentes para generar diferenciación genética a pesar de la variación morfológica que se observa. Esta última se puede explicar como la respuesta local a las características físicas y climáticas de cada localidad. Lo que sugiere que todas las subespecies forman una sola especie, sin subespecies y tal vez solo a través de mucho tiempo estos dos grupos se alejen genéticamente y geográficamente hasta generar especiación.

ABSTRACT

Agave deserti belongs to the Deserticolae group (Gentry, 1982), which is divided into three subspecies: *A. deserti deserti*, *A. deserti simplex* and *A. deserti pringlei*. It's distributed through the Sonorian desert spread in parts of Sonora and the Baja California peninsula. *Agave deserti* is a good model for understands the evolutionary dynamics of a group of organisms separated by a geographical barrier, the sea of Cortes.

The genetic structure of 6 populations of *A. deserti* was estimated by measuring of the genetic variation of RAPDs marker. Heterozygosity, F_{st} (in terms of theta), gene flow and genetic distances (Nei, 1978) were calculated. The geographic and genetic distances between populations were also calculated. RAPDs markers (Williams et. al. 1990) which are based in PCR technique and allow obtaining electrophoretic band patterns, were used to detect this variation.

Agave deserti has high levels of heterozygosity ($H_s=0.21$) and a high percentage of polymorphic loci ($P= 68.2\%$) which indicate a high level of genetic variation. In relation to the genetic differentiation between populations, intermediate values of theta=0.14 (theta= F_{st}) were obtained; suggesting that gene flow is occurring among populations. This is consistent with high genetic variation that is maintained by gene flow, opposing alleles fixation by genic derive or natural selection.

The population analysis allows us to observe that *A. deserti deserti* and *A. deserti pringlei* group together in the Peninsula, while *A. deserti simplex* from Sonora forms another group. The "La Rumorosa" population is the most distant both genetically and geographically, being located near the US border. These distances indicate the genetic closeness between populations. This fact allows understanding that gene flow; divergence time and the geographic distance have not been enough for genetic differentiation even though morphological variation is observed. This last fact can be explained as a local answer to the physical and climatic characteristics of each location. Which suggests that subspecies categories in *A. deserti* may not be valid and form only one species, without subspecies and only through a lot of time, these groups will genetic and geographic separated until generating speciation.

INTRODUCCION

En América, los miembros del género *Agave* se encuentran distribuidos entre los 40° de latitud norte y los 20° latitud sur (Alvarez de Zayas, 1989). Muestran una especial tolerancia a la temperatura y a la aridez, con lo que el gradiente de ambientes en que se encuentran pueden diferir en altitudes, desde la costa hasta alturas cercanas a los 3,000 msnm; prefieren suelos principalmente calcáreos, aunque también los suelos derivados de rocas metamórficas o ígneas (Alvarez de Zayas, 1989). Esto lo logran principalmente debido a sus adaptaciones para soportar prolongados periodos de sequía a través del control de la transpiración y las reservas de agua de sus tejidos foliares, caulinares y radiculares. Estas adaptaciones consisten entre otras, en abundantes fibras duras, cutícula gruesa y abundantes dientes marginales, además de un metabolismo del tipo CAM. Suelen habitar en vegetaciones xeromórficas, estableciéndose principalmente por los factores climáticos o por factores edáficos. En cualquiera de estas condiciones suelen tener a su favor poca competencia para su establecimiento y desarrollo (Alvarez de Zayas, 1989).

El género *Agave* ha sido dividido por Gentry (1982) en dos subgéneros: *Littaea*, caracterizado por sus inflorescencias de apariencia espigada o racemosa y *Agave* con inflorescencias paniculadas y flores en grandes agregados umbelados sobre pedúnculos laterales.

El género *Agave* presenta el 75% de sus especies en México y del total de éstas un 58% son endémicas de México (tabla 1). Por lo tanto, es un género de gran

importancia en México y su estudio y conservación debe considerarse como una responsabilidad dentro de la comunidad científica del país. Por otra parte dentro de la biología de la conservación, estudios de genética de poblaciones han ido adquiriendo importancia en la última década (Eguiarte, 1990, Eguiarte et al. 1992, Ellstrand y Ellam, 1993, Hamrick et al. 1991) y recientemente se han aplicado a miembros de la familia Agavaceae (Martínez-Palacios, et al. 1999).

Dentro de la República Mexicana el desierto Sonorense se considera la zona más importante en riqueza y endemismo del género *Agave*, abarcando gran parte de Sonora, así como prácticamente toda la península de Baja California, siendo éste un desierto que muestra un gradiente climático árido de subtropical a tropical (Axelrod, 1979). La península de Baja California presenta 12 especies endémicas, 5 de ellas en la región de los Cabos en el extremo sur de la península, mientras que la región formada por los límites de Sonora, Chihuahua y Sinaloa, especialmente entre Navojoa y los límites con Chihuahua alberga otras 7 especies endémicas (García-Mendoza, 1995).

La diferenciación de las especies de *Agaves* en la Baja California pudo haber comenzado por lo menos desde el Eoceno-Mioceno, es decir entre 57.5 m.a. y 5 m.a. periodos en los que existió una intensa actividad volcánica en la región y que culminó con la separación parcial de la península respecto al continente (Moctezuma y Serrato, 1988). Para el Plioceno, hace 12 millones de años, la península se hallaba casi totalmente emergida y separada (Moctezuma y Serrato, 1988); esto seguramente implicó que las plantas del subgénero *Agave* evolucionaran independientemente de las del continente (García-Mendoza, 1995).

Todo esto nos permite explorar el efecto de la historia geográfica y la tectónica del desierto Sonorense en la estructura y variación genética de las especies que se encuentran en el mismo, donde *Agave deserti* y sus subespecies parecen ser un modelo ideal para poner a prueba estos efectos gracias a que presentan una distribución que contempla poblaciones en Baja California y Sonora, así como hacia los Estados Unidos de América, donde Gentry (1982) propone que se originó la especie.

Determinar el nivel de diferenciación genética entre las poblaciones de *Agave deserti* permite evaluar los efectos de la separación de Baja California con respecto al continente. Esta separación presenta condiciones ambientales específicas para cada población y esto a su vez puede repercutir en diferencias genéticas y procesos de especiación.

Según estimaciones moleculares (Eguiarte L. et al. datos no publicados) y mediante la calibración de un reloj molecular, toda la familia Agavaceae se originó entre hace 30 a 14 millones de años, y las especies del género *Agave* se separaron hace muy poco tiempo, entre hace 1 a 2 millones de años, lo que nos sugiere que la península de Baja California ya se encontraba separada con respecto al continente al momento de que *Agave deserti* y sus descendientes colonizaran el desierto Sonorense.

Tabla 1. Riqueza y endemismos del género *Agave* en México (García-Mendoza, 1995).

Taxa	Numero total de especies	Numero y % de especies en México	Numero y % de especies endémicas
Género <i>Agave</i>	155	116 (75%)	90 (58%)
Subgénero <i>Littaea</i>	53	47 (88%)	41 (77%)
Subgénero <i>Agave</i>	102	69 (68%)	49 (48%)

CARACTERISTICAS DE LA ESPECIE Y SUBESPECIES

Agave deserti forma parte del grupo Deserticolae (tabla 2), así como del subgénero *Agave* dentro del género *Agave* (Gentry, 1982).

Tabla 2. Especies y subespecies del grupo Deserticolae (Gentry, 1982).

ESPECIE	SUBESPECIE
1. <i>Agave avellanidens</i>	
2. <i>Agave cerulata</i>	<i>A.cerulata cerulata</i> <i>A.cerulata nelsonii</i> <i>A.cerulata subcerulata</i> <i>A.cerulata dentiens</i>
3. <i>Agave deserti</i>	<i>A.deserti deserti</i> <i>A.deserti pringlei</i> <i>A.deserti simplex</i>
4. <i>Agave subsimplex</i>	
5. <i>Agave gigantensis</i>	
6. <i>Agave margaritae</i>	
7. <i>Agave mckelveyana</i>	
8. <i>Agave moranii</i>	
9. <i>Agave sobria</i>	<i>A.sobria sobria</i> <i>A.sobria frailensis</i> <i>A.sobria roseana</i>
10. <i>Agave vizcainoensis</i>	

El grupo *Deserticolae* se caracteriza por estar compuesto por plantas suculentas de diámetro pequeño a mediano, con un tono de gris a verdoso, también podemos encontrar especies no suculentas con diámetros de mediano a grandes, verdes, con las rosetas acaulescentes o poco acaulescentes. Sus hojas son pencas rígidas con fibras gruesas, que presentan una cutícula gruesa y formas lanceoladas con dientes débiles o también podemos encontrar hojas gruesas con dientes firmes. Sus panículas presentan pequeñas ramas laterales con brácteas pedunculadas y grupos de flores umbeladas. Las flores son relativamente pequeñas con un tubo abierto muy corto (4-8 mm) y tépalos largos que alcanzan entre 3 y 5 veces el largo del tubo. Florecen durante la primavera y producen cápsulas que son entre pequeñas y medianas. Se distribuyen en la región del desierto Sonorense comprendiendo el sureste de California, Arizona, Baja California y Sonora (Gentry, 1982).

Las principales características de la especie *Agave deserti* y sus subespecies se presentan en una tabla comparativa (tabla 3), para separar de manera más sencilla las diferencias entre ellas (Gentry, 1982).

Tabla 3. Características de las subespecies de *Agave deserti* (Gentry, 1982).

	<i>Agave deserti deserti</i>	<i>Agave deserti pringlei</i>	<i>Agave deserti simplex</i>
Tamaño roseta	Tamaño mediano, de 30 a 50 cm de alto y de 40 a 60 cm de diámetro.	Tamaño mediano, de 40 a 70 cm de alto y de 50 a 80 cm de diámetro.	De pequeñas a medianas.
Color	Gris claro opaco.	Verde a verde amarillento o gris opaco.	Verde claro a gris claro opaco.
Tamaño hojas	Variables, de 25 a 40 cm de largo y de 6 a 8 cm de ancho.	Variables, de 40 a 70 cm de largo y de 5 a 7 cm de ancho.	Variables, de 25 a 40 cm de largo y de 6.5 a 10 cm de ancho.
Forma de las hojas	Lanceoladas a linear-lanceoladas, un poco angostas de arriba y anchas en la base, hacia la zona central de las hojas se engrosan haciéndolas rígidas, cóncavas en el dorso y convexas en el envés.	Triangulares, angostas, lanceoladas, angostas en la punta y ensanchándose hacia la base, engrosadas en su parte media inferior y delgadas hacia la punta.	Lanceoladas, firmes, rígidas, cóncavas en el dorso hacia su parte media con márgenes ondulados.
Hojas dentadas	Con cúspides delgadas, dientes chicos que van de 2 a 3 mm de longitud y grandes que van de 6 a 8 mm de largo, grises, con una distancia entre ellos de 15 a 30 mm.	Espaciados regularmente con 1 o 2 cm y de 5 a 10 mm de longitud, esbeltos y ligeramente curvados.	En la parte media de la hoja son aproximadamente de 5 a 8 mm de largo, y una distancia entre ellos de 1 a 3 cm, son de café hacia grisáceo y presentando curvaturas variadas.
Espina	Es fuerte, generalmente de 2 a 4 cm de largo, de café claro a grisáceo.	Dato no proporcionado por el autor.	Sólida, de 3 a 4 cm de largo, ranurada en el dorso, de café obscuro a gris claro.
Panículas	Van de 2.5 a 4 m de alto y bracteas triangulares de 8 a 15 cm de largo y ramas laterales umbeladas.	Presentes de 3 a 6 m de alto con ramas laterales, (de 10 a 15), umbeladas.	Alcanzan entre 4 y 6 m de altura con ramas cortas (de 8 a 15), umbeladas.
Flores	Amarillas, miden entre 40 y 60 mm de largo y tienen un ovario de 22 a 40 mm de longitud, con un cuello angosto y un tubo poco profundo de 4 a 6 mm.	Amarillas, de 40 a 60 mm de longitud, con ovario de 20 a 35 mm de largo, fusiforme, con el cuello acanalado y un tubo amplio de 5 a 8 mm de profundidad.	Amarillas, pequeñas de 40 a 60 mm de longitud con ovario verdoso de 20 a 30 mm de largo, fusiforme, con cuello de 4 a 6 mm y un tubo corto de 5 a 8 mm de longitud.
Tépalos	Iguales, de 14 a 20 mm de largo.	Desiguales, de 15 a 20 de alto por de 5 a 7 mm de ancho.	Desiguales, de 15 a 20 de alto por de 4 a 5 mm de ancho.
Filamentos	De 25 a 35 mm de largo, insertados en la base de los tépalos.	Insertados en un anillo del nectáreo.	De 30 a 42 mm de largo, insertados por debajo de los tépalos.
Anteras	De 13 a 18 mm de largo, amarillas.	Dato no proporcionado por el autor.	De 15 a 21 mm de largo, amarillas y regulares.
Semillas	Negras, de 4 a 5 mm.	Negras, de 4 a 5 mm.	Negras, de 4 a 5 mm.

La distribución geográfica del género *Agave deserti* (Gentry, 1982), así como la ubicación de las poblaciones presentes en el estudio se encuentran en la figura 1.

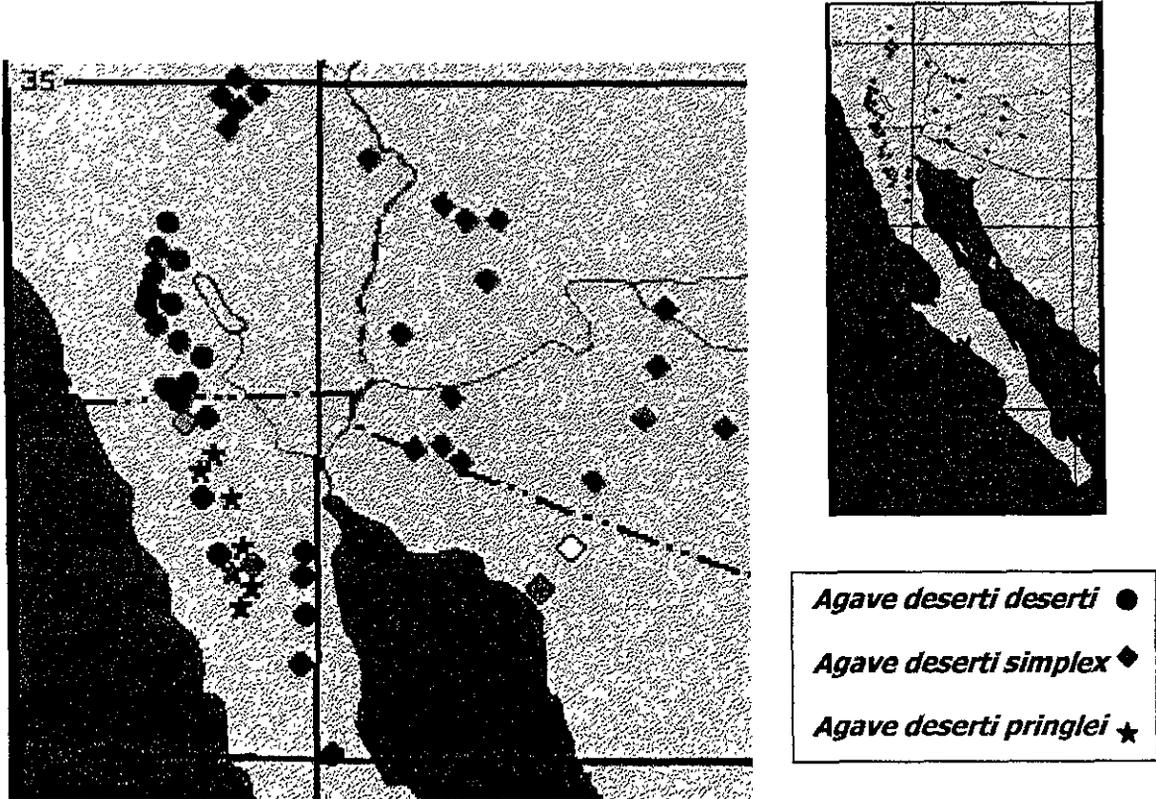


Figura 1. Distribución de *Agave deserti*, y la ubicación de las poblaciones analizadas en el estudio (Gentry, 1982).

- | | |
|--|---|
| 1. Laguna Amarga <i>A.d. deserti</i> [stippled square] | 4. Quitobac <i>A.d. simplex</i> [solid black square] |
| 2. Leyes de Reforma <i>A.d. deserti</i> [solid black square] | 5. Pinacate <i>A.d. simplex</i> [open square] |
| 3. La Rumorosa <i>A.d. deserti</i> [hatched square] | 6. San Matías <i>A.d. pringlei</i> [solid black square] |

TECNICA (RAPDs)

Los marcadores moleculares RAPDs: Random Amplified Polymorphic DNA (Williams et al. 1990), lo que traducido llamaríamos "ADN polimórfico amplificado aleatoriamente", se obtienen mediante amplificaciones de PCR (polymerase chain reaction), es decir "reacciones de la polimerasa en cadena". Los RAPDs son marcadores moleculares obtenidos por amplificaciones del ADN total mediante la técnica de PCR con segmentos de aproximadamente 10pb de ADN tomados aleatoriamente (es decir, sin tomar en cuenta la secuencia de pares de bases), conocidos como primers o cebadores. Estos primers tienen como características un contenido de G+C (Guanina+Citosina) de 50 a 80% y que las secuencias no sean palindrómicas (es decir, que no se lea igual la secuencia en un sentido que en el otro). Obteniendo fragmentos de ADN que forman patrones de bandeo al correr las muestras en un gel de agarosa mediante electroforesis (Fu et al. 1993).

El número de fragmentos de ADN resultantes dependen del primer y del ADN genómico utilizados. Una sola substitución en la secuencia del primer puede resultar en un cambio totalmente distinto en el patrón de bandeo de los RAPDs. Las condiciones de las reacciones de PCR limitan el tamaño de las bandas entre 100 y 3000 pb. Los marcadores moleculares RAPDs son marcadores dominantes, ya que se detecta la misma banda en el homócigo dominante y en el heterócigo y por lo tanto no se pueden detectar a los heterócigos.

Para que se produzcan fragmentos (bandas), es necesario que el primer se alinie en dos sitios en las hebras opuestas del ADN, con una separación máxima de unos 2 kb entre ellas (Edwards et. al. 1998). La técnica se aplica tomando en cuenta el hecho

de que en un PCR estándar se necesitan dos diferentes primers (uno para cada sentido) con la secuencia de bases determinada por la secuencia del fragmento que se desea amplificar, en cambio los RAPDs utilizan un solo primer escogido al azar. Durante la etapa de alineación, este primer actúa en ambos sentidos (Edwards et al. 1998). El polimorfismo en los RAPDs se puede observar con la sustitución de un solo par de bases, la inserción y/o deleción en los sitios de unión del primer. Adicionalmente, inserciones y deleciones pueden cambiar el tamaño de la banda (Fu et al. 1993). Como otros marcadores moleculares, los RAPDs se pueden utilizar para marcar cromosomas y genes, para obtener huellas genómicas (fingerprint genomes) y para producir mapeo de genomas.

Las ventajas en el uso de los RAPDs como marcadores son:

- Existe un universo potencialmente infinito de primers, que pueden ser utilizados con cualquier especie (Fu et al. 1993).
- No se requiere de librerías génicas, radioactividad, transferencias del tipo southern o de la secuencia del primer (Fu et al. 1993).
- Es una técnica simple, rápida y barata (Williams, 1990).
- Suelen ser marcadores neutros, que toman en cuenta todo el genoma (genes, pseudogenes, regiones espaciadoras, regiones reguladoras, etc.) detectando un alto polimorfismo (ver tabla 12).
- Se observa generalmente mayor polimorfismo que con isoenzimas (Liu y Furnier, 1993). Aunque existen excepciones como en el *Agave subsimplex* donde se reporta una *Hs* de 0.28 con isoenzimas y de 0.14 con RAPDs (Salas-Benito, M. datos no publicados y Navarro, A. 1999) (ver tabla 12).

La limitación o desventajas en el uso de los RAPDs como marcadores son:

- Son marcadores dominantes, lo cual puede dejar de ser un inconveniente al usar más de un marcador (Fu et al. 1993).
- La concentración del primer y magnesio pueden alterar el perfil de la amplificación, favoreciendo un mayor número de alienaciones falsas (Williams, et al. 1993). Esto puede repercutir en la baja reproducibilidad de la técnica.
- Se requiere ADN de alta calidad, es decir limpio y poco degradado (Grosberg et al. 1996).

GENETICA DE POBLACIONES

La genética de poblaciones es una herramienta principalmente utilizada para la descripción y entendimiento de los procesos evolutivos dentro de poblaciones naturales, se utiliza para predicciones en poblaciones teóricas, para reconstrucciones filogenéticas y para describir la estructura genética actual de especies naturales. De modo que la genética de poblaciones se divide en teoría (cuerpo teórico) y observaciones (base de datos empíricos). La teoría es el marco que nos permite conocer que sucedería bajo el mundo de los supuestos y nos permite contrastarlo con el mundo de las observaciones.

Las bases teóricas de la genética de poblaciones fueron asentadas por las leyes de la herencia Mendelianas y por las observaciones y teorías Darwinianas, así como las aportaciones de Fisher, Haldene y Wright (por mencionar algunos de los destacados) que de modo general forman la visión actual de la teoría evolutiva conocida como teoría neodarwiniana. Sobre estas bases conceptuales se construyó la genética de poblaciones y fue reforzada por el uso de estimadores matemáticos y estadísticos para establecer un buen grado de certidumbre en sus estudios.

La evolución dentro de las poblaciones naturales se genera principalmente por las fuerzas evolutivas que son: la mutación, la migración, la deriva génica, la estrategia de apareamiento y la selección natural. Estas fuerzas son las responsables de la modificación de la estructura genética dentro de las poblaciones, en donde la mutación y la migración generan variación genética y la deriva génica y la selección natural tienden a disminuirla. Esto se refleja directamente en la proporción de las frecuencias alélicas. Estas proporciones son precisamente las que son cuantificadas

por la genética de poblaciones, lo que nos permite establecer como se han ido moldeando en el tiempo para reconstruir su historia y predecir su futuro.

La principal herramienta matemática en la genética de poblaciones la establecieron G.H. Hardy y W. Weinberg con lo que se conoce como: la ley del equilibrio de Hardy-Weinberg en donde establecen en términos algebraicos el comportamiento a través del tiempo de las frecuencias alélicas, en un caso hipotético de la ausencia de las fuerzas evolutivas (mutación, migración, deriva génica, estrategia reproductiva y selección natural) y se comportan así:

$$D = p^2$$

$$H = 2pq$$

$$R = q^2$$

donde D es la frecuencia genotípica de los homocigos AA, H es la frecuencia genotípica de los heterocigos Aa, R la frecuencia de los homocigos recesivos aa, p es la frecuencia del alelo dominante A y q la del alelo recesivo a, para los que existen las siguientes relaciones:

$$D + H + R = 1$$

$$\text{por lo tanto } p + q = 1$$

En otras palabras, la ley del equilibrio de Hardy-Weinberg evalúa lo que sucedería si no existiera evolución, lo que resulta útil para entender la dinámica de las proporciones de las frecuencias alélicas y así, introducir una a una las variables y fuerzas evolutivas en la fórmula para observar cómo y cuánto afectan las

proporciones de las frecuencias alélicas presentes. Este caso hipotético está sustentado en una serie de supuestos, como son: Que los organismos dentro de la especie se aparean todos contra todos y de manera aleatoria (panmixia), que el tamaño de la población es infinito, que las generaciones no se sobrelapen y que el material genético de los organismos no sufre alteraciones (no hay mutaciones). Claro está que estos supuestos permiten que las frecuencias alélicas sean constantes, lo que se traduce en la ausencia de evolución y esto no se observa dentro de las poblaciones naturales.

VARIACION GENETICA

Una manera de estimar el nivel de variación genética dentro de una población es determinando la heterocigosis, es decir la proporción de individuos heterocigos ($2pq$), denotada como H , valor que puede encontrarse entre 0 y 1. Cuando $H=1$, se tiene la máxima heterocigosis posible, lo que supone una población con tamaño efectivo infinito, y un número de alelos infinito. Bajo los supuestos del equilibrio de Hardy-Weinberg y la presencia de 2 alelos, la proporción máxima en la frecuencia de heterocigos esperados es de 0.5 y por lo tanto la de homocigos también sería de 0.5.

Otro estimador de la variación genética es la proporción de loci polimórficos (la cual se denota como P), medida que nos habla directamente de la variación en los loci. Este estimador es menos robusto debido a que se ve directamente afectado por el número y tipo de loci analizados. Esta situación se puede mejorar al muestrear de manera aleatoria el genoma, como es el caso de los RAPDs (Nevo, 1978).

Dado que la variación genética se mide mediante la estimación de la heterocigosis, así como estimando el porcentaje de loci polimórficos se recurrió al programa Tools For Population Genetic Analysis o TFPGA (Marck P. Miller, 1997) y tomando en cuenta que los RAPDs son marcadores moleculares dominantes, la heterocigosis esperada se obtiene a partir de las frecuencias alélicas p y q , pero por la misma razón (dominancia) no se puede obtener la heterocigosis observada.

La heterocigosis promedio se calcula a partir de la fórmula $H_s = 1 - J_s$ donde $J_s = \sum x_i^2$ y para la que x_i es la frecuencia alélica promedio de p para cada uno de los loci.

VARIACION FENOTIPICA

La variación morfológica o fenotípica entre las especies fue descrita de manera empírica desde los primeros naturalistas, e inclusive se clasificaron especies desde los tiempos de Aristóteles, así como lo hiciera Darwin de manera formal en 1859. Sin embargo la mayor variación es aquella que no se ve y está expresada en el genotipo, pero en la contraparte podemos encontrar individuos de una misma especie con genotipos iguales y con variación morfológica, explicando esta situación por la plasticidad fenotípica que está determinada por la base genética y moldeada por las condiciones ambientales.

La estructura genética dentro de una especie, entre sus poblaciones o dentro de una de sus poblaciones, está definida a partir de la variación genética que existe dentro y entre los niveles de estudio (especie, ínter o intrapoblacional). Esta estructura genética está determinada en parte, por las condiciones ambientales, el tamaño

efectivo de las poblaciones, su adecuación y su ciclo de vida. Por lo que la estructura genética de las poblaciones nos refleja su evolución.

DIFERENCIACION GENETICA

Comúnmente la estructura genética se mide utilizando estimadores de la heterocigosis, a través de la que podemos calcular estadísticos, como los clásicos estadísticos F propuestos por Wright (1951, 1965). Que en particular calculan la diferenciación genética entre las poblaciones. Siendo este siempre un valor positivo, lo que nos indica que tan distintas genéticamente son las subpoblaciones entre sí y se calcula con la fórmula:

$$F_{st} = H_t - H_s / H_t$$

Donde H_s es el promedio de la heterocigosis esperada de cada una de las poblaciones, para todos los loci y H_t es la heterocigosis esperada del total de las poblaciones para todos los loci (Hedrick, 1983). Una F_{st} de 0 indica que todas las poblaciones analizadas tienen las mismas frecuencias alélicas para todos los loci. Entre mayor sea la F_{st} indicará mayor diferenciación entre las poblaciones, hasta llegar a 1, donde las poblaciones están fijadas para diferentes alelos en todos los loci.

Pero para el caso específico de este estudio, se utilizó un estimador de la estructura genética conocido como θ (theta) que es equivalente al estadístico F_{st} de Wright, pero con algunas correcciones estadísticas para diferentes tamaños de muestra y especialmente con tamaños de muestra pequeños presentada por Weir y Cockerham (1984). De este modo el programa TPGA calcula la θ (theta) para cada locus y le realiza réplicas de jackknife, lo que significa que recalcula θ (theta) quitando

sistemáticamente loci del análisis, lo que permite obtener las estimaciones de varianza de θ (tetha). Determina también el intervalo de confianza asimétrico de los loci con una prueba de bootstrap, que forma nuevos muestreos con reemplazos a partir de los loci, manteniendo siempre una n de loci igual y repitiendo esto de modo aleatorio en repetidas ocasiones que van de 1,000 hasta 10,000 para de este modo establecer el intervalo de confianza (Weir, 1996).

Los valores de θ van de 0 a 1, donde 0 indica que los genes muestreados de individuos tomados al azar son iguales y 1 que son totalmente diferentes, por lo que este estimador nos permite conocer la diferenciación genética de los loci dentro del muestreo. (Este estimador puede dar valores negativos, que se interpretan como 0).

FLUJO GENICO

Para estimar el flujo génico existen diversos métodos directos e indirectos. Los métodos directos son estimaciones a partir de medidas ecológicas, como serían la dispersión de semillas o polen. Los métodos indirectos se calcula a partir de los valores obtenidos para la estructura genética (o diferenciación interpoblacional), como son los estadísticos F , G o en nuestro caso θ (Slatkin, 1994). Para los que la relación está dada por la fórmula del modelo de islas de Wright (1951) y modificada por Crow y Aoki (1984):

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

Donde al despejar Nm tenemos que:

$$Nm = \frac{1}{4} \alpha (1/\theta - 1)$$

Para la que tenemos que Nm es igual al flujo génico y $\alpha=(n/n-1)^2$, donde n es el número de poblaciones.

Originalmente en el modelo de islas de Wright (1951) menciona que si Nm es mayor a 1 se debe esperar poca diferenciación, porque el flujo genético no permite que se presente deriva génica. Pero Kimura (1983) argumenta que en algunos casos con valores de Nm mayores a 5 se puede seguir detectando cierta diferenciación genética.

El flujo génico permite mantener una variación genética homogénea entre las poblaciones, contrarresta la diferenciación que pudiera darse por adaptaciones a condiciones locales y por lo tanto la especiación, pero a la vez promueve la dispersión de genes y/o la recombinación genética a lo largo de toda el área de distribución de la especie (Slatkin, 1987).

DISTANCIAS E IDENTIDADES GENÉTICAS

A partir de la distribución geográfica, se espera que los apareamientos entre individuos de diferentes poblaciones, es decir el flujo génico, suceda en mayor intensidad entre poblaciones cercanas y por lo tanto genéticamente se espera que también sean cercanas, fenómeno llamado por Wright (1958) como "aislamiento por distancia". Para este análisis se calculan las distancias genéticas corregidas de Nei (1978).

Las distancias genéticas entre las poblaciones se calcularon mediante el programa TFPGA, aplicando las distancias corregidas de Nei (1978).

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

Donde I es la identidad genética de Nei (1978):

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

Para la que x es una de las poblaciones del análisis, y la otra población con la que se compara y por último, n es el número de individuos en cada población.

El programa utiliza los valores de distancia e identidad genética para realizar un fenograma sobre la base del algoritmo UPGMA de Swofford y Olsen (1990), mismo que aplica n número de bootstraps (en nuestro caso aplicamos 1,000) para definir la proporción de pseudoreplicas que soportan cada nodo. Esto nos permite tener una representación gráfica de las distancias genéticas con las que podemos inferir las relaciones filogenéticas entre las poblaciones.

DISTANCIAS GEOGRAFICAS

Se construyó una matriz de distancias geográficas en Km para tomar en cuenta el posible aislamiento genético por distancia, para lo que se establecieron las distancias entre las poblaciones con ayuda de sus coordenadas (obtenidas con un GPS y cartas del INEGI) que permitieron triangular las distancias en Km, así como su ubicación geográfica.

ESTRUCTURA GEOGRAFICA DE LA VARIACION GENETICA

Para determinar si existe alguna correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica se realiza una prueba de Mantel (Mantel 1967, Sokal 1979). Esta prueba se aplica a partir del supuesto de que las dos matrices no están correlacionadas y se intenta analizar si cualquier aparente relación es efecto del azar. Esto se logra calculando el estadístico Z :

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

Donde m corresponde a los elementos de la matriz 1 (distancia genética) y e a los elementos de la matriz 2 (distancia geográfica).

Mismo que realiza n numero de permutaciones azarosas de las posiciones de los elementos de una de las matrices (cualquiera de ellas), generando una distribución normalizada (en este caso se aplicaron 1,000 permutaciones). Si la Z observada es mayor que la Z promedio obtenida de las permutaciones aleatorias indica una correlación positiva. De este modo el programa TFPGA calcula la Z observada y la distribución de la Z obteniendo un promedio a partir de las permutaciones, así como la proporción de permutaciones que coinciden con la Z original.

OBJETIVOS

- Estimar los niveles de variación genética de la especie *Agave deserti* mediante marcadores moleculares (RAPDs).
- Estimar la estructura genética de algunas de las poblaciones y subespecies de *Agave deserti*, así como las distancias genéticas y sus relaciones filogenéticas.
- Relacionar la estructura genética y las relaciones filogenéticas con la historia geográfica y tectónica del desierto Sonorense.
- Determinar el nivel de flujo génico entre las poblaciones y subespecies de *Agave deserti* en el desierto Sonorense.

HIPÓTESIS

Basándose en lo que sugiere Gentry (1982), se considera que la especie ancestral de *Agave deserti* es nativa de Arizona y a partir de ahí comenzó a migrar hacia el sur hasta alcanzar latitudes de hasta 20° sur, con lo que al encontrar dos rutas, una por la península y otra por el continente las poblaciones perdieron contacto por la barrera geográfica, con la consecuente reducción de la poza génica para cada subpoblación, mismas que al paso del tiempo se convirtieron en poblaciones independientes con condiciones ambientales particulares, lo que todo sumado puede explicar los procesos de subespeciación.

PREDICCIONES

Por lo tanto se espera encontrar que:

- La variación genética de las poblaciones hacia la frontera norte sea mayor que las poblaciones más sureñas que sufrieron reducciones en su poza génica tanto de la península de Baja California como del continente en Sonora.
- Se espera que el flujo génico entre las poblaciones sea reducido, lo que fomentaría los procesos de subespeciación junto con la mencionada reducción de la poza génica.
- Al analizar las relaciones filogenéticas debemos encontrar que existen distancias genéticas importantes entre las subespecies y a su vez distancias genéticas menores entre poblaciones de una misma subespecie, apoyando la hipótesis taxonómica de Gentry (1982).

MATERIAL Y METODO

Colecta del material biológico

Se realizó un viaje de colecta de campo en el desierto Sonorense, en la cual se visitaron seis poblaciones de *Agave deserti* incluyendo sus variedades *Agave deserti deserti*, *Agave deserti simplex* y *Agave deserti pringlei* (tabla 4). Se colectaron 50 individuos por población, aunque en algunos casos se redujo el número de individuos trabajados por población por llegar en mal estado algunos individuos (tabla 4).

Para evitar coleccionar genets (individuos clonales con información genética idéntica), se procuró coleccionar plantas alejadas por lo menos dos metros entre individuos dentro de una misma población y entre 50 y 100 Km entre poblaciones.

Las coordenadas se estimaron vía satélite con la ayuda de un aparato GPS (Ensign GPS de Tremble Navigation) y con cartas geográficas del INEGI (escala 1:250,000).

Una vez colectadas las muestras (cortes de aproximadamente 25 cm² de las hojas jóvenes de las plantas) se colocaron en bolsas de plástico grueso, etiquetadas con los datos de colecta y para su transportación sumergidas en un tanque con nitrógeno líquido. A su llegada al laboratorio se trasladaron para su mejor conservación a un ultracongelador vertical a -80°C (REVCO Scientific, Inc.).

EXTRACCION DE ADN

Las muestras de ADN se obtuvieron mediante el protocolo de extracción de ADN, Miniprep (Vázquez Lobo, 1996), en donde se muelen las muestras con nitrógeno líquido y la ayuda de un mortero. Se obtiene mediante este procedimiento un polvo fino, al que se le agrega el buffer de extracción CTAB2x (CTAB 2%, PVP40 2%, Tris pH 8.0 100 mM, EDTA pH 8.0 20 mM, NaCl 1.4 M y β -Mercapto- etanol 0.2 %), mismo que requiere la adición del β -Mercapto-etanol en el momento de usar el buffer. Se centrifugan las muestras (10,000 rpm durante 10 min. a 4°C), para incubarlas por un periodo de 10 min. a 60°C. En este momento se agrega cloroformo: alcohol isoamílico que permite la separación del ADN y las proteínas con ayuda de otro ciclo de centrifugación (7,000 rpm durante 15 min. a 4°C), precipitando el ADN con isopropanol frío (aprox. -20°C). Con la intención de mejorar el rendimiento de la precipitación se mantienen aproximadamente 12 hrs. en el congelador a -20°C. Se obtiene un botón (pellet) previa centrifugada (9,000 rpm durante 5 min. a 4°C), mismo que se seca agregando etanol al 70% frío (aprox. -20°C), obteniendo al término del procedimiento el ADN que se resuspende en 200 μ l del buffer TE (Tris-HCl 10mM pH 8.0, EDTA 1mM). El ADN resuspendido presenta una concentración que va de 15 ng/ μ l a 45 ng/ μ l aproximadamente. La concentración se determinó con un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda Bio UV/Vis programado para cuantificar ADN de doble cadena.

Tabla 4. Características de las poblaciones colectadas.

Población/Sitio	Fecha Colecta	Coordenadas geográficas	Especie	No. Ind. colectados
1. Laguna Amarga, Km 176 de San Felipe a Ensenada.	8-Nov-97	N31° 19.406 W115° 12.781	<i>Agave deserti</i> <i>deserti</i>	50
2. Leyes de la Reforma.	8-Nov-97	N31° 31.010 W115° 47.869	<i>Agave deserti</i> <i>deserti</i> *	50
3. R. Rumorosa, entre Mexicali y Tecate.	18-Feb-98	N32° 34.86 W115° 58.24	<i>Agave deserti</i> <i>deserti</i>	47
4. Quitobac, Km 223 entre Caborca y Sonoita.	7-Nov-97	N31° 36.599 W112° 47.343	<i>Agave deserti</i> <i>simplex</i>	46
5. Pinacate, Km 107 entre Sonoita y SLR Colorado.	7-Nov-97	N32° 07.834 W113° 53.910	<i>Agave deserti</i> <i>simplex</i>	50
6. Paso de San Matías después de la desviación Km 137	8-Nov-97	N31° 20.104 W115° 33.025	<i>Agave deserti</i> <i>pringlei</i>	50

*Población intermedia entre *Agave deserti* y *Agave deserti pringlei*.

RAPDs

La técnica de los RAPDs se trabajó según el protocolo de Williams et al. (1990, ver también Karp, 1998) donde se prepara para cada individuo una reacción mezclando 18.8µl de agua bidestilada y esterilizada, 1.5µl de buffer para PCR con magnesio (Boehringer Mannheim 15mM de MgCl₂), 1.0µl de buffer para PCR sin magnesio (Boehringer Mannheim), 0.5µl de nucleótidos premezclados para PCR (PCR nucleotide mix de Boehringer Mannheim 10 mM para cada nucleótido dNTP), 1 unidad de Taq polimerasa (Boehringer Mannheim Taq DNA polymerase, obtenida de *Thermus aquaticus* BM, recombinante con *E.coli*), 1.5µl de la muestra de ADN

(resuspendido previamente en TE, ver extracción de ADN) y 1.0µl de primer de 10 pb (Operon Technologies, Inc.), sumando un volumen final de 24.5µl en cada reacción de PCR.

Las reacciones de PCR se realizaron con un termociclador (ERICOM, modelo Deltacycler II™ System), mismo que corrió un programa de 44 ciclos. Cada ciclo inicialmente eleva la temperatura hasta 94°C durante un minuto (desnaturalización del ADN), baja a 36°C por un minuto (alineamiento del primer) y eleva nuevamente la temperatura hasta 72°C por un periodo de dos minutos (polimerización de la cadena complementaria). Se finaliza con un periodo de polimerización de 15 minutos a 72 °C, que aumenta el rendimiento de ADN en las reacciones.

Para obtener los resultados de los productos de PCR, se corren en una electroforesis (horizontal) de gel de agarosa al 1.4%, mezclado con buffer TBE al 1% (Trisma base 17.8 mM, Acido Bórico 17.8 mM y EDTA Na 2H₂O 0.4mM), al que se le adiciona para su tinción 6% del volumen final de Bromuro de Etidio al 0.5%.

Las muestras se corrieron mediante la técnica de electroforesis a 130 volts por espacio de 2 horas, junto con un marcador de pesos moleculares (DNA molecular Weight marker XIV Boehringer Mannheim), mismo que permite calcular el peso molecular de las bandas resultantes de los RAPDs.

Se probaron 40 primers de 10 pb (serie A 20 primers y serie B 20 primers de Operon Technologies, Inc.), de los cuales se seleccionaron 2 primers, que fueron los que presentaron mayor numero de loci polimorficos, el OPA-10 (5'-GTGATCGCAG-3') y el

OPB-20 (5'-GGACCCTTAC-3') (a los que en lo subsecuente me referiré como A10 y B20 respectivamente), mismos que presentaron 28 y 25 loci (bandas polimórficas) respectivamente. El resto de los primers se descartaron por no presentar loci polimórficos o inclusive no presentar patrones de bandeo.

Una vez realizada la electroforesis se fotografiaron los geles (figura 2 y 3) con una cámara digital (Digital Cámara 40, Kodak) y se procesaron las imágenes mediante el programa Bio Max 1D versión 1.5 (Kodak Scientific Imaging Systems) en sistema operativo Macintosh.

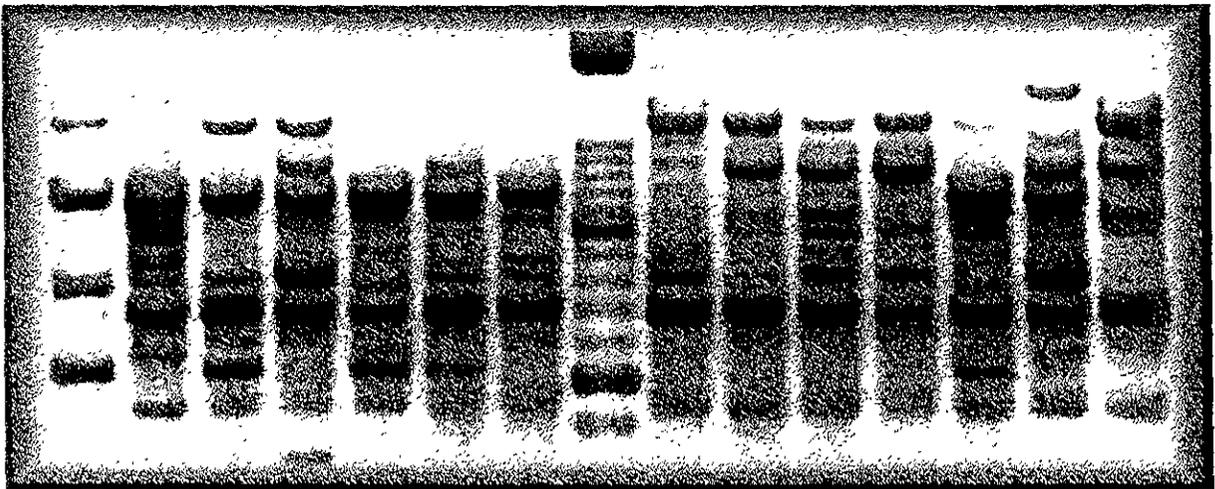


Figura 2. Electroforesis de gel de agarosa al 1.4% con el primer A10 con individuos de la población de La Rumorosa, *Agave deserti deserti*.

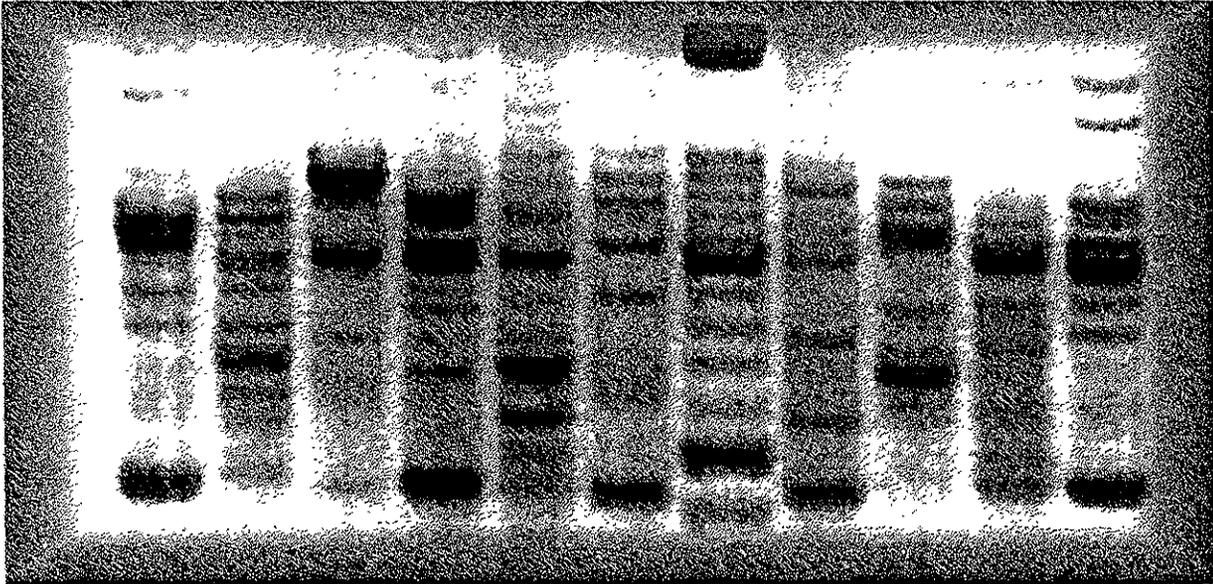


Figura 3. Electroforesis de gel de agarosa al 1.4% con el primer B20 con individuos de la población de Quitobac, *Agave deserti simplex*.

ANÁLISIS DE DATOS

Mediante la observación de los geles y con ayuda del programa Bio Max 1D (Kodak Scientific Imaging Systems) se realiza el análisis de las imágenes digitales de los geles. Este programa puede detectar las bandas, adicionándoles una marca sobrepuesta con un número, permitiendo detectar rápidamente la presencia y posición de la banda en el gradiente de pesos moleculares. Asimismo, el programa permite asociar los valores de peso molecular en términos de pb (pares de bases) al marcador de pesos moleculares que viajó a través del gel junto con las muestras y en las mismas condiciones de corrida electroforética. Esto permite que el programa pueda calcular extrapolando los valores del peso molecular en pb para cada banda que presente cada uno de los individuos, obteniendo así un patrón de bandeo, que permite crear una matriz de presencia/ausencia de bandas para cada locus.

RESULTADOS

El análisis de variación genética se realizó usando 2 primers el A10 y el B20, estos primers produjeron 53 bandas polimórficas, claramente detectables y reproducibles en las 6 poblaciones de *Agave deserti*. En promedio se analizaron 45.5 individuos por población (tabla 5).

Se obtuvieron los valores de frecuencias alélicas para cada uno de los loci obtenidos a partir de los primers A10 y B20, suponiendo equilibrio de H-W. Para analizar si existía diferencia significativa en la frecuencia alélica entre poblaciones se aplicó la prueba exacta de Fisher, 1954 (tabla 6). Se encontraron diferencias significativas en todos los loci estudiados, con $P < 0.05$ y aún con $P < 0.0001$, existen diferencias significativas en 40 loci del total de 53, lo que representa el 75.47% del total.

VARIACION GENETICA

Se estimaron los niveles de variación genética mediante los valores de la heterocigosis (H_s) de las diferentes poblaciones y subespecies, así como el promedio de las mismas (tabla 6). Además se obtuvo como segundo estimador de la variación genética el porcentaje de loci polimórficos (tabla 6).

La población que presentó el valor más alto de heterocigosis fue la de La Rumorosa, correspondiente a *Agave deserti deserti* $H_s = 0.26$, la que geográficamente se encuentra más norteña, haciendo frontera con USA, mientras que la población con el valor más bajo fue la de Leyes de Reforma $H_s = 0.13$, siendo esta última también una población de *Agave deserti deserti*, localizada aproximadamente al centro de Baja California Norte (figura 1).

El mayor porcentaje de loci polimórficos lo encontramos en la población de *Agave deserti deserti* de Laguna Amarga (77.36%) y el porcentaje menor corresponde a la población de *Agave deserti simplex* en el Pinacate (47.17%). Localizada en el centro de Baja California Norte la primera y al noroeste de Sonora la segunda (figura 1). Aunque debe de tomarse en cuenta que la característica de los RAPDs como marcadores dominantes tiende a sobrevalorar los valores del porcentaje de loci polimórficos, por lo que estos datos se deben interpretar con cuidado.

Se analizó la relación entre ambos parámetros de variación genética, es decir entre el porcentaje de loci polimórficos y la heterocigosis, para establecer si existía una correlación. Es natural esperar que entre mayor sea la heterocigosis de igual modo aumente el porcentaje de loci polimórfico (figura 4). Pero aparentemente y basados en la gráfica podemos decir que este supuesto no se cumple por lo menos para *Agave deserti* y sus subespecies. Lo que pueda explicarse por efectos de fijación de alelos, lo que rompería con la relación proporcional entre ambos estimadores de variación genética.

DIFERENCIACION GENETICA Y FLUJO GENICO

Se obtuvo la diferenciación genética, mediante los valores de θ (theta) para cada uno de los loci y sobre la base de estos valores se estimó la Nm (tablas 7 y 8) de los mismos a partir de la fórmula:

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

Se estimaron los valores de F_{st} en términos de θ (theta) y mediante 10,000 réplicas del tipo bootstrapping se calculó el promedio para cada subespecie.

Tabla 6. Frecuencias alélicas y prueba de Fisher para cada uno de los loci.

	<i>A. d. deserti</i>	<i>A. d. deserti</i>	<i>A. d. deserti</i>	<i>A. d. Simplex</i>	<i>A. d. pringlei</i>	<i>A. d. pringlei</i>		
Pobl./locus	1 Lag. Amarga	2 Ley. Reforma	3 Rumorosa	4 Quitobac	5 Pinacate	6 S. Matías		
Primer A10							<i>P</i> de Fisher	S. E.
450	0.273	0.06	0.286	0.316	0.132	0.191	0.0	0.0
480	0.136	0.24	0.031	0.143	0.235	0.128	0.0	0.0
500	0.0	0.0	0.02	0.01	0.0	0.117	0.0	0.0
520	0.011	0.03	0.02	0.061	0.0	0.0	0.046	0.004
550	0.659	0.34	0.316	0.153	0.015	0.457	0.0	0.0
580	0.0	0.29	0.051	0.031	0.147	0.213	0.0	0.0
620	0.023	0.01	0.275	0.378	0.0	0.128	0.0	0.0
650	0.057	0.09	0.02	0.061	0.102	0.149	0.031	0.008
690	0.148	0.55	0.133	0.112	0.176	0.287	0.0	0.0
720	0.011	0.03	0.143	0.204	0.0	0.021	0.0	0.0
750	0.068	0.16	0.194	0.235	0.221	0.479	0.0	0.0
775	0.25	0.04	0.02	0.112	0.0	0.032	0.0	0.0
800	0.204	0.16	0.255	0.357	0.294	0.011	0.0	0.0
850	0.17	0.25	0.051	0.122	0.088	0.16	0.003	0.003
900	0.079	0.06	0.143	0.204	0.088	0.298	0.0	0.0
950	0.114	0.04	0.01	0.01	0.088	0.138	0.0	0.0
1000	0.011	0.06	0.153	0.153	0.485	0.149	0.0	0.0
1050	0.216	0.14	0.082	0.286	0.0	0.043	0.0	0.0
1100	0.023	0.23	0.163	0.194	0.147	0.213	0.001	0.001
1150	0.023	0.16	0.071	0.071	0.0	0.117	0.001	0.001
1200	0.079	0.11	0.133	0.214	0.132	0.383	0.0	0.0
1300	0.034	0.03	0.194	0.255	0.059	0.043	0.0	0.0
1350	0.011	0.0	0.0	0.061	0.0	0.032	0.006	0.001
1400	0.034	0.07	0.143	0.092	0.0	0.351	0.0	0.0
1450	0.25	0.21	0.02	0.02	0.0	0.0	0.0	0.0
1500	0.079	0.14	0.02	0.01	0.0	0.053	0.0	0.0
1650	0.057	0.16	0.122	0.163	0.0	0.032	0.0	0.0
1800	0.034	0.08	0.296	0.378	0.0	0.362	0.0	0.0
Primer B20								
450	0.398	0.31	0.316	0.571	0.0	0.787	0.0	0.0
500	0.216	0.06	0.275	0.071	0.0	0.319	0.0	0.0

550	0.079	0.03	0.01	0.235	0.015	0.021	0.0	0.0
580	0.17	0.09	0.214	0.133	0.0	0.064	0.0	0.0
620	0.068	0.11	0.00	0.02	0.0	0.011	0.0	0.0
680	0.273	0.18	0.347	0.0	0.0	0.787	0.0	0.0
700	0.17	0.18	0.673	0.826	0.338	0.457	0.0	0.0
750	0.17	0.18	0.01	0.296	0.044	0.128	0.0	0.0
800	0.17	0.03	0.184	0.041	0.059	0.362	0.0	0.0
850	0.091	0.03	0.092	0.02	0.0	0.149	0.0	0.0
880	0.079	0.0	0.01	0.0	0.029	0.117	0.0	0.0
900	0.204	0.04	0.275	0.143	0.176	0.255	0.0	0.0
980	0.159	0.28	0.347	0.449	0.073	0.213	0.0	0.0
1020	0.159	0.13	0.133	0.03	0.162	0.202	0.015	0.006
1050	0.125	0.14	0.184	0.112	0.102	0.298	0.019	0.006
1100	0.295	0.09	0.153	0.184	0.294	0.479	0.0	0.0
1200	0.42	0.23	0.255	0.378	0.073	0.521	0.0	0.0
1250	0.148	0.28	0.0	0.122	0.0	0.021	0.0	0.0
1300	0.273	0.0	0.061	0.0	0.088	0.298	0.0	0.0
1400	0.159	0.29	0.153	0.194	0.03	0.011	0.0	0.0
1500	0.057	0.0	0.51	0.245	0.073	0.032	0.0	0.0
1700	0.091	0.01	0.0	0.071	0.0	0.67	0.0	0.0
2000	0.125	0.0	0.633	0.531	0.618	0.117	0.0	0.0
2200	0.398	0.060	0.03	0.0	0.0	0.085	0.0	0.0
2500	0.273	0.14	0.071	0.031	0.044	0.128	0.0	0.0

Tabla 5. Número de individuos analizados (N), porcentaje de loci polimórficos (P) y heterocigosis (Hs) de las poblaciones, así como los promedios de cada subespecie estudiada.

Población		N	P (% loci polimórficos)	Hs
<i>Agave deserti deserti</i>				
1	Laguna Amarga	44	77.36	0.22
2	Leyes de Reforma	50	67.92	0.13
3	La Rumorosa	49	69.81	0.26
Promedio		47.6	71.36	0.20
<i>Agave deserti simplex</i>				
4	Quitobac	49	73.58	0.22
5	Pinacate	34	47.17	0.20
Promedio		41.5	60.37	0.21
<i>Agave deserti pringlei</i>				
6	San Matías	47	73.58	0.23
PROMEDIO TOTAL				
		45.5	68.23	0.22

Tabla 7. Diferenciación genética entre las poblaciones estudiadas.

Subespecie	θ (theta)	Desv. Std. (Jackknife)	I.C. 95% (Bootstrap)	Nm
<i>Agave deserti deserti</i>	0.13	0.021	0.09 - 0.17	2.3
<i>Agave deserti simplex</i>	0.11	0.025	0.07 - 0.16	2.8
<i>Agave deserti pringlei</i>	*	*	*	*
Total	0.14	0.018	0.10 - 0.17	2.2

* En el caso de *A. deserti pringlei*, al ser una sola población, no se pudo calcular θ y por lo tanto, los demás datos.

Tabla 8. Valores de θ (theta) y Nm para cada locus, de todas las poblaciones analizadas de *Agave. deserti*

Locus	θ (Theta)	Nm	Locus	θ (Theta)	Nm
Primer A10			Primer B20		
450	0.050	6.712	450	0.245	1.107
480	0.037	9.291	500	0.108	2.961
500	0.075	4.440	550	0.113	2.814
520	0.014	24.992	580	0.041	8.293
550	0.193	1.501	620	0.047	7.218
580	0.118	2.690	680	0.391	0.558
620	0.190	1.533	700	0.284	0.904
650	0.017	20.816	750	0.076	4.321
690	0.150	2.035	800	0.122	2.581
720	0.095	3.425	850	0.039	8.870
750	0.103	3.114	880	0.054	6.221
775	0.105	3.042	900	0.044	7.803
800	0.078	4.226	980	0.075	4.383
850	0.034	10.044	1020	0.019	18.196
900	0.056	6.068	1050	0.028	12.360
950	0.040	8.550	1100	0.102	3.159
1000	0.157	1.924	1200	0.096	3.366
1050	0.085	3.830	1250	0.126	2.483
1100	0.029	11.884	1300	0.162	1.860
1150	0.034	9.984	1400	0.076	4.370
1200	0.080	4.101	1500	0.286	0.897
1300	0.092	3.527	1700	0.515	0.339
1350	0.024	14.156	2000	0.353	0.659
1400	0.132	2.352	2200	0.235	1.171
1450	0.152	1.997	2500	0.064	5.247
1500	0.045	7.534			
1650	0.041	8.231	Promedio	0.139	2.22
1800	0.162	1.850	Desv. Std.	0.018	
			I. C. 95%	0.10 - 0.17	

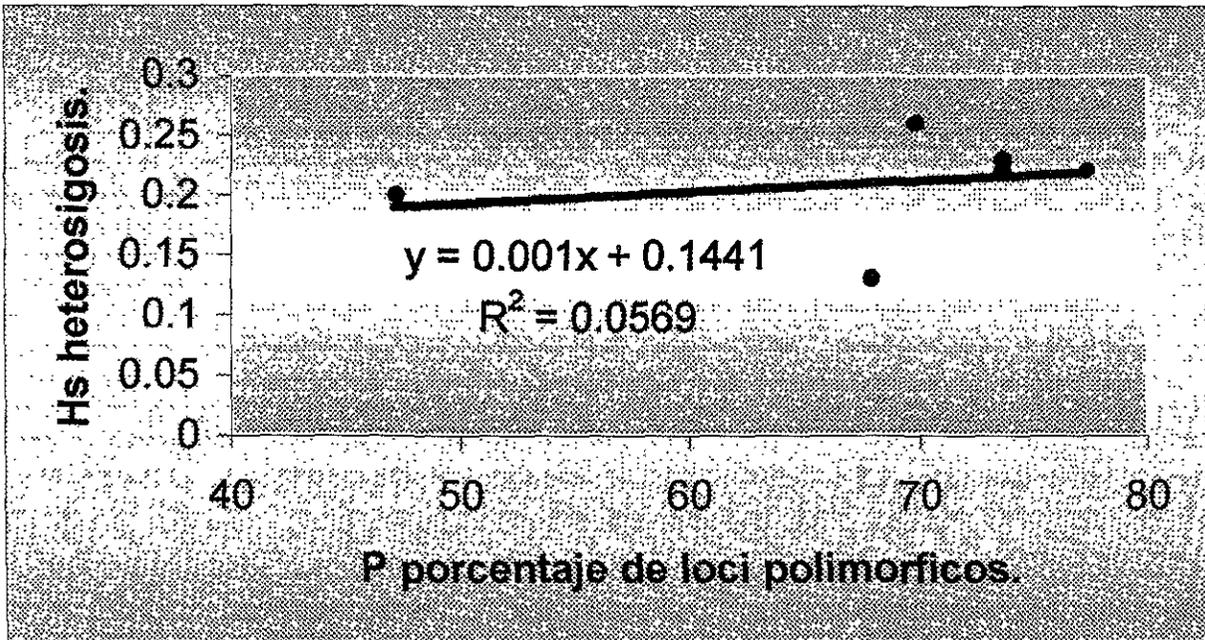


Figura 4. Correlación entre el porcentaje de loci polimórficos y la heterocigosis de las poblaciones.

DISTANCIAS E IDENTIDADES GENÉTICAS

Las distancias genéticas de Nei (1978), así como los valores de identidad genética de Nei (1978); (tabla 9) entre las poblaciones, se obtuvieron a través del programa de computo TFPGA, mediante el cual se pudieron realizar las matrices de distancia genética según Nei (1978).

Tanto las distancias genéticas, así como las identidades coinciden y sugieren una gran cercanía genética entre las poblaciones con un rango de distancias genéticas pequeñas, que van de 0.015 entre la población de San Matías y Laguna amarga, hasta una distancia genética de 0.079 que presentan La Rumorosa y Leyes de Reforma.

DISTANCIAS GEOGRAFICAS

Se calcularon las distancias geográficas utilizando las coordenadas para triangular la distancia entre las poblaciones (tabla 11). Obteniendo distancias en línea recta, donde las poblaciones más cercanas son las de Leyes de Reforma y San Matías con una distancia entre ellas de 32.6 Km, mientras que las más alejadas son Quitobac con respecto a La Rumorosa que se separan por 365.4 Km de distancia.

Tabla 9. Valores de distancia e identidad genética entre las poblaciones analizadas de *Agave deserti* en el desierto Sonorense.

	Quitobac	Pinacate	Lag. Amarga	S. Matías	L.de Reforma	Rumorosa
Quitobac	0					
Pinacate	0.02/0.98	0				
Lag. Amarga	0.04/0.96	0.04/0.96	0			
S. Matías	0.05/0.65	0.04/0.96	0.02/0.98	0		
L.de Reforma	0.04/0.96	0.03/0.97	0.03/0.97	0.04/0.96	0	
Rumorosa	0.05/0.95	0.06/0.94	0.06/0.94	0.07/0.93	0.08/0.92	0

Distancia genética en texto normal e identidad genética en negritas.

Tabla 10. Distancias geográficas en Km entre todas las poblaciones analizadas de *Agave deserti* en el desierto Sonorense.

	Quitobac	Pinacate	Lag. Amarga	S. Matías	L. de Reforma	Rumorosa
Quitobac	0					
El pinacate	133.02	0				
Lag. Amarga	270.48	77.96	0			
S. Matías	307.66	198.81	37.47	0		
L.de Reforma	334.09	219.00	67.54	32.59	0	
Rumorosa	365.40	234.08	147.75	129.08	104.57	0

Se trataron de encontrar otro tipo de correlaciones, como la posible relación de los estimadores de variación genética con la latitud, para lo que se graficó el gradiente latitudinal contra la heterocigosis y contra el porcentaje de loci polimórficos. Para lo que en ambos casos no existe una relación proporcional, ni mucho menos significativa.

ESTRUCTURA GEOGRAFICA DE LA VARIACION GENETICA

(Prueba de Mantel)

Para determinar si la distancia geográfica tenía una correlación con la distancia genética se graficaron ambas matrices de distancia y se aplicó la prueba de Mantel (figura 5), en donde obtenemos una Z original mayor (121.86) que la Z promedio a la que se le aplican 999 permutaciones (117.15), $P=0.21$ a pesar de ser limítrofe y con una probabilidad mayor a 0.05 entre ambas matrices, nos indica que no existe correlación. Aunque gráficamente se puede apreciar una cierta tendencia a formar una recta, sobre todo si se elimina la población de La Rumorosa que presenta la mayor distancia genética (marcada en la figura 5).

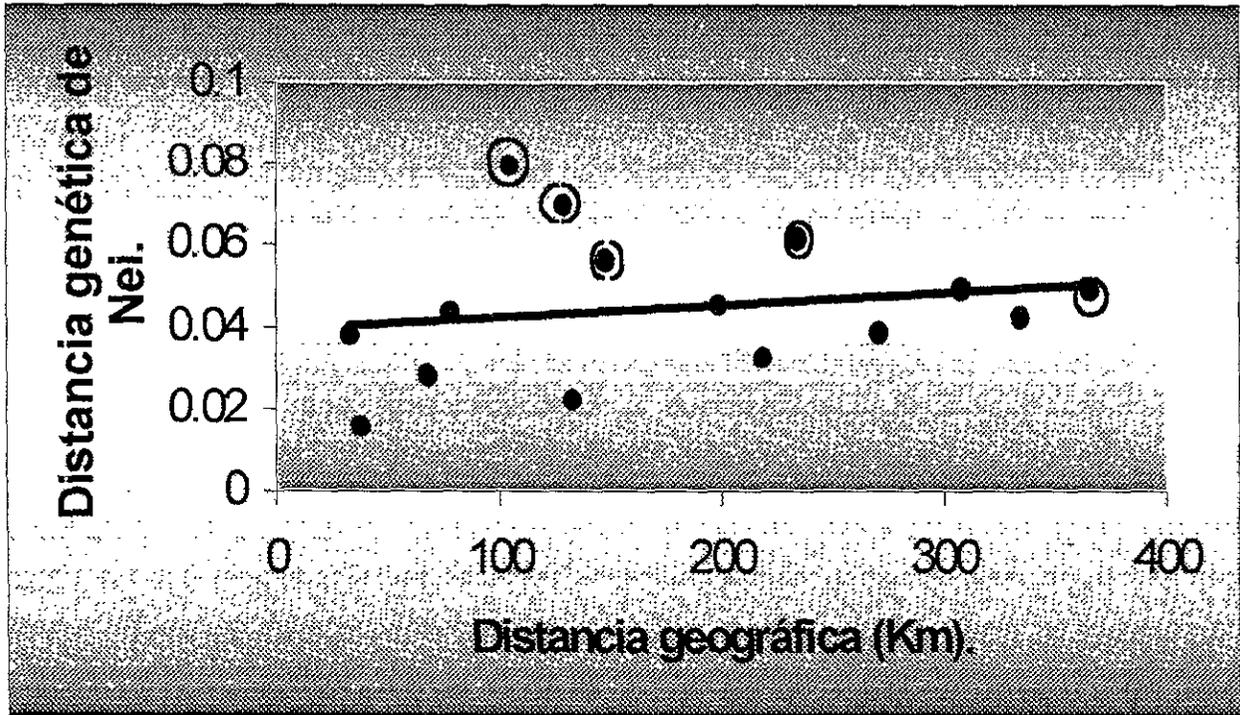


Figura 5. Resultado del análisis de aislamiento genético por distancia geográfica en Km para todas las poblaciones de *Agave deserti*, con los puntos de la población de La Rumorosa marcados para distinguir su comportamiento atípico.

(Z original = 121.8562, Z promedio después de 999 permutaciones = 117.1481, Correlación entre las dos matrices $r = 0.1800$ y $P = 0.2210$).

Partiendo de la observación de la gráfica de la figura 5, el comportamiento particular de una sola de las poblaciones y de su resultado no significativo, pero limítrofe para ser considerado estadísticamente significativo, sugirió que se analizara nuevamente omitiendo los puntos correspondientes a la Rumorosa (figura 6), que se comportaban de manera particular, encontrando un patrón que a simple vista da la impresión de tener una cierta tendencia y que al someter a una prueba de Mantel (Mantel, 1967;

(Mantel, 1967; Sokal, 1979), obtenemos una Z original mayor (65.6) a la Z promedio (59.4), obtenida después de aplicar 999 permutaciones y con una probabilidad de $P=0.05$ por lo que puede asegurarse como significativa la correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética.

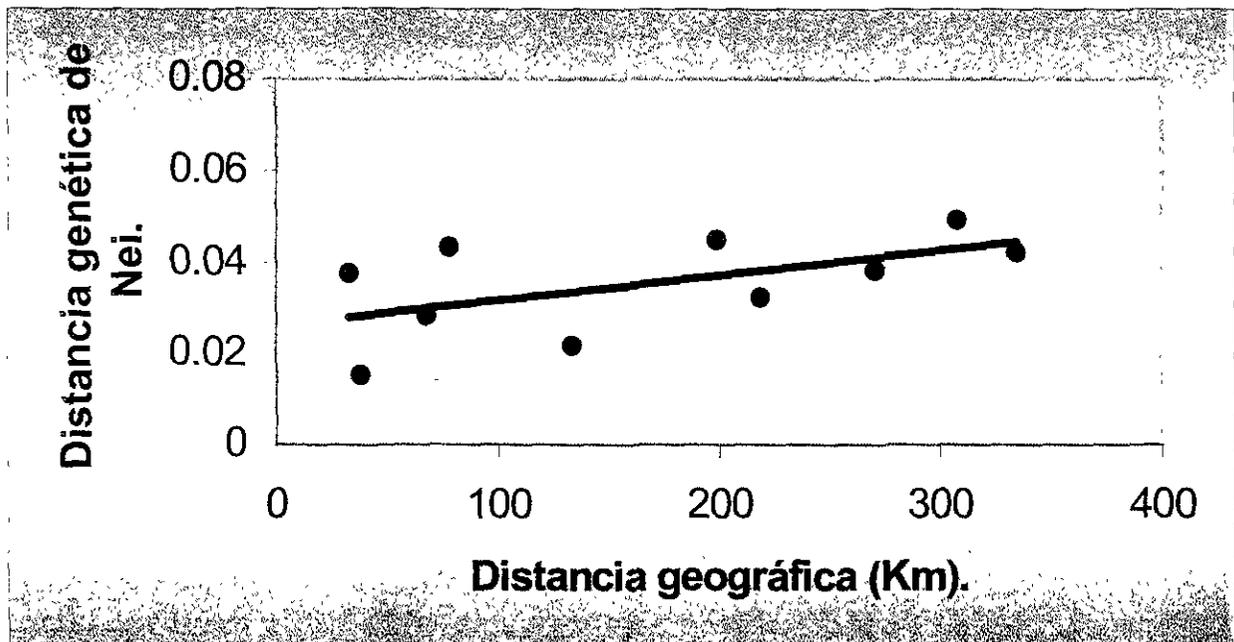


Figura 6. Análisis de las matrices de distancia genética contra distancia geográfica de las poblaciones de *Agave deserti*, con excepción de la población de La Rumorosa.

(Prueba de mantel: Z (original) = 106.16, Z (promedio) después de 999 permutaciones = 83.89, correlación entre las matrices $r=0.6837$ y $P=0.0020$).

RELACIONES GENÉTICAS

Se construyó un fenograma mediante el algoritmo UPGMA y las distancias genéticas. Se hizo un análisis estadístico de bootstrapping con 1.000 permutaciones, con lo que se determina el número de réplicas que sustentan cada nodo, obteniendo valores consistentes y robustos que se observan en la figura 7. Debe tenerse particular atención en las distancias genéticas, que en ningún caso son muy grandes, lo que indica una gran cercanía genética entre las poblaciones.

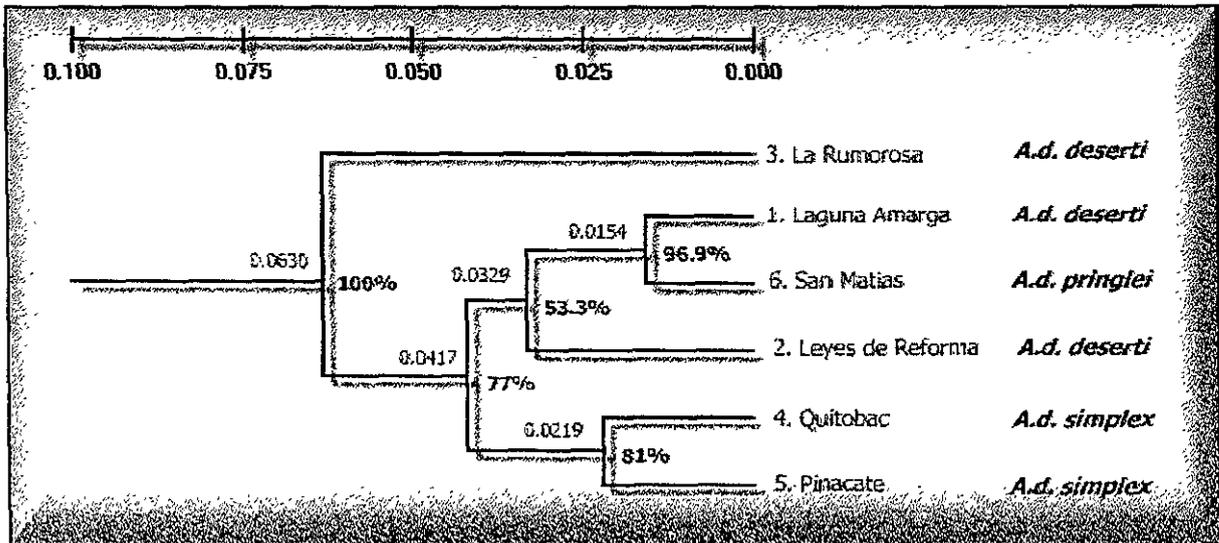


Figura 7. Fenograma (UPGMA) de las poblaciones *Agave deserti* y sus subespecies, presentando las distancias genéticas de los nodos del lado izquierdo del mismo y la proporción de réplicas que apoyan los nodos después de aplicar un bootstrapping de 1000 permutaciones, en el centro de la horquilla a modo de porcentaje y en letras negritas.

DISCUSIÓN

RAPDs VS. OTROS MARCADORES MOLECULARES

El uso de RAPDs como marcadores moleculares está justificado a partir de sus características, donde el elevado número de loci detectables y el muestreo aleatorio a lo largo de todo el genoma, son razones suficientes para contrarrestar la desventaja que implica su carácter dominante. Por estas mismas razones y por su relativo bajo costo en tiempo y dinero, los han convertido en una herramienta de uso común para detectar la variación genética entre poblaciones naturales (Bucci y Menozzi, 1993, Ayres y Ryan, 1997, Moodie y Marshall, 1997, Smith y Vuong, 1996, Rowe et al. 1997, Schierenbeck et al. 1997, Fofana et al. 1997, Otero et al. 1997, Palacios y González-Candelas, 1997, Fajardo et al. 1998, Corre et al. 1997) y de igual modo para determinar la estructura genética de las poblaciones (Bonnin et al. 1996, Ayres y Ryan, 1997, Dyer y Rice, 1997, Wolff et al. 1997).

Probablemente los marcadores moleculares más comparados con los RAPDs, son las isoenzimas debido a que es una técnica bien desarrollada y utilizada por muchos años, mientras que los RAPDs es una técnica relativamente nueva y en ambos casos sus costos operacionales son reducidos y su capacidad de resolución es parcial, si se le compara con una secuenciación, por lo que él compararlos resulta obligado. En este aspecto resultan teóricamente mejores los RAPDs partiendo de que analizan la variación genética a partir del total de la secuencia de ADN, de manera neutral y aleatoriamente, mientras que en las isoenzimas se trabaja a partir de las proteínas, las que esconden mucha de la variación genética de la secuencia de ADN que les dio origen.

Regularmente esto es cierto en términos de la capacidad de detección de variación genética de ambos marcadores moleculares, ya que suelen obtenerse valores mas altos de heterocigosis con los RAPDs, que con las isoenzimas para un mismo grupo de organismos, existiendo numerosos ejemplos de esto: Le Corre et al. (1997) con *Quercus petraea*, Dominguez et al. (dnp) con *Erythoxylum havanense*. Aunque encontramos excepciones donde se detecta mayor variación genética con isoenzimas que con RAPDs como en el caso de Salas-Benito, (dnp) y Navarro, 1999 con *Agave subsimplex* (ver tabla 12).

VARIACION GENETICA

En el caso particular de este estudio el número de loci detectados por cada primer fue alto, puesto que se detectaron un total de 53 bandas polimórficas, 28 con el primer OPA-10 y 25 con el OPB-20. Otros autores han reportado números elevados de bandeo en sus trabajos como es el caso de Moodie et al. (1997), que obtuvo 22 bandas en promedio por primer para la mostaza silvestre (*Sinapis arvensis*). Palacios y González-Candelas (1997) obtuvieron 21 bandas con el primer OPA-4 y Stewart y Porter (1995) que reportan 35 bandas con dos primers en una especie del género *Lliamna*.

Para minimizar la posibilidad de incurrir en un error estadístico en donde se obtuviera una identidad genética sesgada (<0.05), Nei (1987) sugiere utilizar un mínimo de 29 loci, esto es particularmente importante en los casos donde las distancias genéticas son pequeñas. Este es el caso del presente estudio, por lo que de especial

importancia es el destacar que se utilizaron 53 loci obtenidos a partir de dos primers, logrando obtener un buen respaldo estadístico.

Los valores de variabilidad genética de las poblaciones de *Agave deserti* resultaron valores intermedios dentro de los valores reportados para plantas con isoenzimas y RAPDs (tabla 12), coincidiendo con los valores obtenidos en especies de plantas monocotiledóneas perennes, longevas, con patrones de distribución restringidos (en este caso endemismo) y con sistema de fertilización predominantemente cruzado, quedando entonces los valores obtenidos para *Agave deserti* y sus subespecies entre los valores de otros agaves y plantas desérticas.

Tomando en cuenta otros reportes de heterocigosis en plantas Selander (1976) menciona que el promedio de variación genética con isoenzimas para plantas es de $H_s = 0.17$ y el porcentaje de loci polimórficos $P = 46.4\%$, mientras que Hamrick et al. (1992) plantea que la $H_s = 0.15$ y el $P = 50\%$, también con isoenzimas. Mientras que en el presente estudio obtuvimos valores con RAPDs de heterocigosis promedio para todas las poblaciones de *Agave deserti* de: $H_s = 0.2152$ y el porcentaje de loci polimórficos $P = 68.2\%$, valores relativamente más altos que los promedio de todas las plantas medidos con isoenzimas, pero se debe tomar en cuenta que los RAPDs tienden generalmente a detectar mayor variación genética que las isoenzimas, aunque esto no es una regla siempre (ver tabla 12).

Deben tomarse en cuenta otros factores que pueden afectar los valores de variación genética, como el endemismo, ya que según Hamrick y Godt (1996) las especies endémicas tienden a tener menor variación en términos de heterocigosis.

Tabla 11. Tabla Comparativa ordenada en forma creciente de heterocigosis y porcentaje de loci polimórficos reportados para plantas con marcadores moleculares (isoenzimas y RAPDs).

Especie	Hs	% P	Marcador	Referencia
<i>Washingtonia filifera</i>	0.017	9.8	Isoenzimas	McClenaghan, L.R. et al. 1986
<i>Cucurbita pepo</i>	0.079	-	Isoenzimas	Deena, S. et al. 1987
<i>Alkanna orientalis</i>	0.103	-	RAPDs	Wolff, K. et al. 1997
<i>Abies religiosa</i>	0.108	-	Isoenzimas	Aguirre, et al. En prensa
Douglas-fir (pseudotsuga)	0.13	-	RAPDs	Aagaard, J.E. et al. 1995
<i>Astrocaryum mexicanum</i>	0.135	31.8	Isoenzimas	Eguiarte, 1994
Hierbas	0.14	35.0	Isoenzimas	Hamrick, et al. 1979
<i>Agave subsimplex</i>	0.142	78.6	RAPDs	Navarro, A. 1999
<i>Medicago truncatula</i>	0.145	62.5	RAPDs	Bonnin, et al. 1996
<i>Aechmea tuitensis</i>	0.155	-	Isoenzimas	Izquierdo y Piñero (dnp)
<i>Lophocereus schottii</i>	0.159	34.4	Isoenzimas	Parker, K.C. et al. 1992
Douglas-fir (pseudotsuga)	0.16	-	Isoenzimas	Aagaard, J.E. et al. 1995
Coníferas	0.17	52.0	Isoenzimas	Ledig, 1996
<i>Agave cerulata</i>	0.181	77.6	RAPDs	Navarro, A. 1999
<i>Yucca filamentosa</i>	0.2	67.6	Isoenzimas	Massey y Hamrick, 1998
<i>Allium aaseae</i>	0.203	-	RAPDs	Smith, J.F. et al. 1996
<i>Agave deserti deserti</i>	0.204	71.7	RAPDs	Presente estudio
<i>Agave deserti simplex</i>	0.209	60.3	RAPDs	Presente estudio
<i>Agave deserti pringlei</i>	0.232	73.5	RAPDs	Presente estudio
<i>Agave deserti</i>	0.215	68.2	RAPDs	Presente estudio
<i>Quercus petraea</i>	0.233	-	RAPDs	Le Corre, et al. 1997
<i>Wyethia reticulata</i>	0.28	100	RAPDs	Ayres y Ryan, 1997
<i>Agave subsimplex</i>	0.28	87.5	Isoenzimas	Salas-Benito, M. (dnp)
<i>Erythoxylum havanense</i>	0.316	70.6	Isoenzimas	Domínguez, et al. (dnp)
<i>Agave victoria-reginae</i>	0.335	83.0	Isoenzimas	Martínez-Palacios, et al.
<i>Allium aaseae</i>	0.343	56.9	RAPDs	Smith y Pham, 1996
<i>Chamaedorea alternans</i>	0.35	45.5	RAPDs	Otero, 1997
<i>Agave lechugilla</i>	0.39	-	Isoenzimas	Silva, A. (dnp)
<i>Euphorbia esula</i>	0.417	-	RAPDs	Rowe, et al. 1997
<i>Bdallophyton bambusarum</i>	0.455	98.6	Isoenzimas	García-Franco, J.G. et al. 1998
<i>Manfreda brachystachya</i>	0.48	100	Isoenzimas	Eguiarte, et al. (dnp)

DIFERENCIACION GENETICA

La diferenciación genética entre las poblaciones de *Agave deserti* estimada mediante θ (theta), resultó intermedia ($\theta = 0.1395$, ver tabla 13), lo que sugiere que el flujo génico entre las poblaciones y/o que el tiempo de separación de las poblaciones es decir, la divergencia geográfica no han sido suficientes para generar una divergencia genética importante entre las poblaciones. También podemos pensar que las distancias geográficas resultan pequeñas en términos de la capacidad de dispersión de los polinizadores, entre los que se reportan murciélagos, con algunas especies capaces de cubrir áreas con radios de 56 Km lo que nos permite pensar que pudieran alcanzar poblaciones con distancias de 112 km. sin mayor problema (*Myotis sp.* reportado por Fenton, 1983).

ESTIMACIONES DEL FLUJO GENICO

Cuando se calcula el flujo génico (Nm) entre poblaciones se debe tomar en cuenta que según Wright (1951), la Nm debe ser mayor a 1 para que se detecte la diferenciación, pero según Kimura (1993) no debe de pasar de 4, ya que este sería el límite para la diferenciación. En este estudio, al calcular el flujo génico a partir de los valores de θ (theta), se obtuvo una Nm promedio = 2.22, valor intermedio que sugiere de igual modo un flujo génico intermedio entre las poblaciones de *Agave deserti*.

Al mantenerse el flujo genético entre las poblaciones se mantiene un efecto homogeneizador que no permite la fijación de alelos en las poblaciones por lo que se impide la diferenciación y especiación incipientes gracias a los agentes de dispersión, especialmente los murciélagos por su amplia área de acción.

Tabla 12. Tabla Comparativa de valores ordenados en forma creciente de diferenciación genética reportados para plantas con marcadores moleculares (isoenzimas y RAPDs).

Especie	Valores	Fst ó θ	Marcador	Referencia
<i>Protium glabrum</i>	0.012	θ	RAPDs	Schierenbeck, K.A. et al. 1997
<i>Chamaedorea alternans</i>	0.0136	Fst	RAPDs	Otero. M.A. 1998
<i>Dedrpanax arboreus</i>	0.023	θ	RAPDs	Schierenbeck, K.A. et al. 1997
<i>Quercus petraea</i>	0.024	Fst	RAPDs	Le Corre. et al. 1995
<i>Inga thibaudiana</i>	0.025	θ	RAPDs	Schierenbeck, K.A. et al. 1997
<i>Quercus petraea</i>	0.027	Fst	Isoenzimas	Le Corre et al. 1997
<i>Manfreda brachystachya</i>	0.03	Fst	Isoenzimas	Eguiarte. (dnp)
<i>Washingtonia filifera</i>	0.038	Fst	Isoenzimas	McClenaghan, L.R. et al. 1986
<i>Astrocaryum mexicanum</i>	0.042	Fst	Isoenzimas	Eguiarte. L.E. 1994
<i>Pinus leucodermis</i>	0.067	Fst	Isoenzimas	Bucci. et al. 1997
Pinaceae	0.073	Fst	Isoenzimas	Hamrick y Godt. 1996
<i>Agave subsimplex</i>	0.08	θ	RAPDs	Navarro. A. (dnp), 1999
<i>Agave lechugilla</i>	0.089	Fst	Isoenzimas	Silva. A. (dnp)
<i>Agave cerulata</i>	0.09	θ	RAPDs	Navarro. A. (dnp), 1999
<i>Erythroxylum havanense</i>	0.105	Fst	RAPDs	Dominguez, C.A. et al. (dnp)
<i>A. deserti simplex</i>	0.11	θ	RAPDs	Presente Estudio
<i>A. deserti deserti</i>	0.13	θ	RAPDs	Presente Estudio
<i>A. deserti pringlei</i>	-	θ	RAPDs	Presente Estudio
<i>Allium aaseae</i>	0.136	Fst	RAPDs	Smith y Pham. 1996
<i>Agave deserti</i>	0.139	θ	RAPDs	Presente Estudio
<i>Yucca filamentosa</i>	0.172	Fst	Isoenzimas	Massey y Hamrick. 1998
<i>Pinus leucodermis</i>	0.179	Fst	RAPDs	Bucci. et al. 1997
<i>Laphocereus schottii</i>	0.187	Fst	Isoenzimas	Parker, K.C. et al. 1992
<i>Wyethia reticulata</i>	0.19	Fst	Isoenzimas	Ayres y Ryan. 1997
Asteraceae	0.20	Fst	Isoenzimas	Hamrick et al. 1979
<i>Agave victoria-reginae</i>	0.24	Fst	Isoenzimas	Martínez-Palacios et al. (dnp)
<i>Abies religiosa</i>	0.24	Fst	Isoenzimas	Aguirre et al. (prensa)
<i>Wyethia reticulata</i>	0.25	Fst	RAPDs	Ayres y Ryan. 1997
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	0.26	Fst	Isoenzimas	Aagard et al. 1995
<i>Erythroxylum havanense</i>	0.28	Fst	Isoenzimas	Domínguez, C.A. et al. (dnp)
<i>Agave subsimplex</i>	0.31	Fst	Isoenzimas	Salas-Benito. M. (dnp)
Solanaceae	0.43	Fst	Isoenzimas	Hamrick y Godt. 1996
<i>Medicago truncatula</i>	0.448	θ	RAPDs	Bonnin. et al. 1996
<i>Euphorbia esula</i>	0.46	Fst	RAPDs	Rowe et al. 1997
<i>Aechmea mexicana</i>	0.62	Fst	Isoenzimas	Izquierdo y Piñero. (dnp)
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	0.73	Fst	RAPDs	Aagard et al. 1995

ESTRUCTURA GENETICA

Las poblaciones de *Agave deserti* tienen una estructura genética que indica que son de origen reciente, lo que concuerda con las estimaciones con reloj molecular, en donde se sugiere que el género *Agave* se originó no hace más de 1 a 2 millones de años, esto coincide con los datos de variación genética en donde se mantiene una gran variación genética y una baja diferenciación entre las poblaciones gracias en parte a que el flujo génico no se ha visto muy detenido por la barrera geográfica que representa la separación de la península con respecto al continente y por supuesto el mar de Cortés que las divide se mantiene un flujo génico entre las poblaciones sostenido por las capacidades de dispersión de sus polinizadores (especialmente murciélagos) que permite mantener un efecto homogeneizador de la variación genética, así como unas distancias genéticas muy pequeñas.

Por lo que al colonizar la península de Baja California y parte del continente en lo que comprende el desierto Sonorense, *Agave deserti* no sufrió una reducción de su poza génica de manera sensible y lo que reconocemos en la actualidad como variación morfológica es más bien una expresión fenotípica local en función de las características físicas y climáticas específicas de cada localidad en que encontramos una población.

Adicionalmente debemos tomar en cuenta que hace 1 a 2 millones de años en que probablemente ocurrió el origen del género *Agave* no son muchos si observamos las características del metabolismo y desarrollo de las plantas del desierto, en este caso de los agaves, en donde encontramos que son plantas con metabolismo tipo CAM

con tiempos de desarrollo muy largos y tendencia a la propagación vegetativa (o bien reproducción asexual), lo que tiene como resultado plantas con crecimiento muy lento y que solo manifiestan un evento reproductivo en su vida después de por lo menos 25 años de desarrollo y en algunos casos más dependiendo de lo favorable de las condiciones climatológicas y de la propagación vegetativa que genera una elevada clonalidad en estas especies.

Por lo que sí consideramos estos tiempos en términos generacionales 1 a 2 millones de años, que corresponden de 40,000 a 80,000 generaciones, mismas que resultan pocas generaciones para generar variaciones genéticas importantes entre las poblaciones.

CORRELACION ENTRE LOS PARAMETROS

En primer lugar, se buscó la posible relación entre el porcentaje de loci polimórficos y la heterocigosis de las poblaciones, siendo ambos parámetros indicadores de la variación genética, uno pensaría encontrar una relación directamente proporcional entre ambos parámetros dado que entre mayor variación genética se esperaría que ambos parámetros lo reflejaran de igual modo indicando valores altos, pero a pesar de esto y de que se detectó flujo génico entre las poblaciones, no existe ninguna relación directa entre ambos indicadores. Esto puede deberse a que a pesar de que ambos indicadores nos permiten estimar la variación genética, cada uno de ellos detecta características diferentes, por un lado la heterocigosis nos indica la proporción en las frecuencias alélicas, mientras que el porcentaje de loci polimórficos nos indica la variedad de loci que presenta la especie, esto resulta independientemente de la proporción en la frecuencia alélica de cada loci.

En busca de otras relaciones se graficó tanto la heterocigosis como el porcentaje de loci polimórficos contra la latitud en grados, para tratar de encontrar la posible correlación entre la posición geográfica y la variación genética, esto basado en la hipótesis de Gentry (1982), que nos indica que el origen de *Agave deserti* es norteamericano (Arizona, U.S.A.) y a partir de ahí migró hacia el sur, para luego sufrir la fragmentación de las poblaciones por la separación de la península con respecto al continente y la consecuente reducción de la poza génica, por lo que esperaríamos que entre más al norte se encuentre la población tendría mayor variación genética, pero nuevamente en ninguna de las gráficas encontramos ninguna relación, lo que nos permite cuestionar la hipótesis de Gentry o bien pensar que el flujo génico mantiene un nivel homogéneo de variación genética independientemente de la posición geográfica, gracias a que las distancias no parecen ser problema para los vectores de dispersión, especialmente en el caso de los murciélagos.

ESTRUCTURA GEOGRAFICA DE LA VARIACION GENETICA

Por último se aplicó una prueba de Mantel (Mantel, 1967; Sokal, 1979) para determinar la correlación entre las matrices de distancia genética y distancia geográfica en km de las poblaciones, donde obtenemos el estadístico Z y su probabilidad (P), así como un índice de correlación (r), indicadores suficientes para establecer si existe una correlación estadísticamente significativa. Originalmente se obtuvo una gráfica (figura 4) con todas las poblaciones en la que el estadístico Z resultó no significativa y una probabilidad estadística poco confiable por lo que en conjunto se rechaza la correlación.

Al observar que a simple vista aparentaba cierta tendencia a formar una recta en la gráfica de la figura 5, con excepción de los puntos que marcadamente se salían de la tendencia, dio pie a que se analizaran estos puntos para buscar una explicación a su comportamiento. Resultando ser los puntos formados por las distancias genéticas y geográficas de todas poblaciones con respecto a la población de La Rumorosa, en donde La Rumorosa es la población de *Agave deserti deserti* más norteña.

Por lo anterior se realizó una nueva prueba de Mantel eliminando los puntos atípicos (figura 6) asociando el estadístico Z y P correspondientes, donde el resultado confirmó una correlación positiva, por lo que podemos afirmar que entre mayor distancia geográfica mayor es la distancia genética lo que hace sentido con un nivel de flujo génico intermedio como el que obtuvimos y con las capacidades de dispersión de los murciélagos y los demás vectores de dispersión, con excepción de la población de la Rumorosa.

La posible explicación para la población de La Rumorosa, podría estar dada entendiendo que la población de La Rumorosa presenta mayor distancia genética de la esperada en términos de su distancia geográfica, debido a que se localiza geográficamente en el punto de bifurcación de la migración que realiza *Agave deserti* desde los Estados Unidos de América (Gentry 1982), formándose a partir de ahí las dos rutas de migración que presenta *Agave deserti* dentro del desierto Sonorense, por un lado la ruta que migra sobre el continente hacia Sonora y da origen a *Agave deserti simplex* y por el otro lado la ruta de migración de la Península de Baja California donde encontramos *Agave deserti deserti* y *Agave deserti pringlei*.

La presencia del mar de Cortés, origino las dos rutas migratorias y por lo tanto la reducción de la poza genética correspondiente a cada una de las mismas, por lo que podemos entender entonces que la población de La Rumorosa tenga mayor distancia genética con respecto a las demás poblaciones por ser la única población que no sufrió una reducción en su poza génica, además de ser la que mantiene mayor contacto con las poblaciones de los Estados Unidos de América, que fuesen las poblaciones que dan origen al grupo según Gentry, 1982.

RELACIONES GENETICAS

En la figura 7, observamos un fenograma de las relaciones genéticas de las poblaciones de *Agave deserti* presentes en el estudio, donde se observan dos grupos y una rama independiente constituida por una sola población (La Rumorosa) que resulta ser la población de *Agave deserti deserti* más norteña ubicada en la frontera con U.S.A. por lo que tomando en cuenta la correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica, resulta lógico que sea la mas alejada en ambos sentidos.

Luego podemos observar un clado formado por las dos poblaciones del continente (en Sonora) y que están formadas por individuos de *Agave deserti simplex*, mientras que el segundo clado está formado por poblaciones de la península de Baja California, las que corresponden a poblaciones de *Agave deserti deserti* e insertado en el centro del clado la población de *Agave deserti pringlei*, lo que curiosamente coincide con la situación geográfica de sus poblaciones, que se encuentran en el centro de la distribución de *Agave deserti deserti* en la península (ver figura 1 correspondiente al mapa de la distribución).

Adicionalmente es importante hacer notar lo corto de las distancias genéticas, ya que en el caso de mayor distancia tan solo es de 0.063, por lo que podemos decir que la diferenciación genética es despreciable, a pesar de delimitar adecuadamente las poblaciones en grupos que reflejan la distribución geográfica de las poblaciones analizadas.

CONCLUSIONES

- A pesar del carácter dominante de los RAPDs, éstos tuvieron la capacidad resolutive para cumplir satisfactoriamente con los objetivos planteados en este estudio, demostrando ser un excelente método para estimar la variación y estructura genética de poblaciones naturales, gracias al gran número de loci que se puede obtener por primer, lo que aumenta considerablemente su poder de resolución.

- Podemos decir que las poblaciones de *Agave deserti* se encuentran establecidas como de origen reciente en términos evolutivos, porque a pesar de la separación de la península de Baja California con respecto al continente y la correspondiente barrera geográfica que forma el mar de Cortés, no ha generado un efecto importante en la variación genética entre las poblaciones, gracias al flujo génico entre las mismas, al número relativamente bajo de generaciones durante ese período de tiempo y a distancias geográficas también relativamente cortas en términos de las capacidades de sus polinizadores.

- Tomando en cuenta la relativamente elevada variación genética, la diferenciación genética moderada entre las poblaciones, el flujo génico y lo corto de las distancias genéticas podemos decir que las subespecies consideradas por Gentry, no son otra cosa que la especie *Agave deserti*, que presenta variación fenotípica por efectos medioambientales pero no subespecies y que probablemente solo a lo largo de otros millones de años pudieran tener un efecto de subespeciación y finalmente de especiación.

- Sobre la base de la correlación positiva entre la distancia geográfica y la distancia genética entre las poblaciones, así como las relaciones filogenéticas podemos concluir que la estructura genética de *Agave deserti* está íntimamente ligada con su distribución, manteniendo un flujo génico importante que mantiene una pequeña diferenciación genética entre las poblaciones, además de una variación genética homogénea entre las poblaciones que limitan la posibilidad de fijación de alelos y por lo tanto la especiación.

BIBLIOGRAFIA

- Alvarez de Zayas, A. 1989. Distribución geográfica y posible origen de las Agavaceae. *Revista del Jardín Botánico Nacional. Universidad de la Habana. Vol.10. No.1:25-36.*
- 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.
- 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**: 716-772.
- Axelrod, D.I. 1979. Age and Origin of Sonoran Desert Vegetation. Occasional Papers of the California Academy of Sciences.
- Bonnin, I., T. Huguet, M. Gherardi, J-M. Prospero y 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(7)**: 843- 855.
- Bucci, G. y P. Menozzi. 1993. Segregation analysis of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Picea abies* Karst. *Molecular Ecology*. **2**: 227-232.
- Bucci, G., G.G. Vendramin, L. Lelli y F. Vicario. 1997. Assessing the genetic divergence of *Pinus leucodermis* Ant. Endangered populations: use of molecular markers for conservation purposes. *Theor. Appl. Genet.* **95**: 1138-1146.

- Caetano-Anolles, G., B.J. Bassam y P.M. Gresshoff. DNA amplification fingerprinting whit very short primers. *Applications of RAPD Technology to Plant Breeding*. 18-25.
- Cavallini, A., L. Natali, G. Cionini y I. Castorena-Sanchez. 1996. Cytophotometric and biochemical analyses of DNA in pentaploid and diploid *Agave* species. *Genome* **39**: 266-271.
- Coello, G., A. Escalante y G. Soberon. 1993. Lack of genetic variation in *Lacandonia schismatica* (Lacandoniaceae: triuridales) in its only known locality. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **80**: 898-901.
- Darwin, C. 1959. On the Origins of Species by Means of Natural Selection. or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life. John Murray. London.
- Decker, D.S. y H.D. Wilson. 1987. Allozyme variation in the *Cucurbita pepo* complex: *C. pepo* var. *Ovifera* vs. *C. texana*. *Systematic Botany* **12 (2)**: 263-273.
- Domínguez, C.A., C. Abarca, J.L. Ibarra, F. Molina y L.E. Eguiarte. Genetic divergence among populations of a distylous shrub whit morph-biased male sterility: an assessment whit isozymes and RAPD markers.
- Dyer, A.R. y K.J. Rice. 1997. Evidence of spatial genetic structure in a California bunchgrass population. *Oecologia* **112**: 333-339.
- Edwards, K.J. 1998. Randomly Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs). Molecular Tools for Screening Biodiversity.
- 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.
- Eguiarte, L.E., A. Silva y A. García-Mendoza. 1999. Biología evolutiva de la familia Agavaceae. (En prensa).
- Ellstrand, N.C. y D.R. Elam. 1993. Population genetic cosequences of small population size. Implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* **24**: 217-242.
- Fajardo, D., F. Angel, M. Grumm, J. Tohme, M. Lobo, W.M. Roca y I. Sanchez. 1998. Genetic variation analysis of the genus *Passiflora* L. Using RAPD markers. *Euphytica* **101**: 341-347.
- Fenton, M.B. 1983. Just Bats. Toronto University Press. Toronto. pp. 95-101.
- Fofana, B., X. Vekemans, P. du Jardin y J.P. Baudoin. 1997. Genetic diversity in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by RAPD markers. *Euphytica* **95**: 157-165.
- Fu, Y.K., A.V. Deynze y K.P. Pauls. 1993. Chapter 18: Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD) Analysis. Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology. 360.
- Furman, B.J., D. Grattapaglia, W.S. Dvorak y D.M. O'malley. Analysis of genetic relationships of Central American and Mexican pines using RAPD markers that distinguish species. *Molecular Ecology* **6**: 321-331.

- García-Franco, J.G., V. Souza, L.E. Eguiarte y V. Rico-Gray. 1998. Genetic variation, genetic structure and effective population size in the tropical holoparasitic endophyte *Bdallophyton bambusarum* (Rafflesiaceae). *Pl. Syst. Evol.* **210**: 271-288.
- García-Mendoza, A. 1995. Riqueza y Endemismos de la Familia Agavaceae en México. Instituto de Biología. U.N.A.M.
- 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. 1996. Molecular Zoology: Advances. Strategies and Protocols. Wiley – Liss. Inc.
- Haig, S.M., R. Bowman y D. Mullins. 1996. Population structure of red-cockaded woodpeckers in south Florida: RAPDs revisited. *Molecular Ecology* **5**: 725-734.
- Hamrick, J.L., Y.B. Linhart y J.B. Mitton. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **10**: 173-200.
- Hamrick, J.L. y M.J.W. Godt. 1989. Allozyme diversity in plant species. En Brown, A.H.D., M.T. Clegg, A.L. Kahler y B.S. Weir. eds. *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources*. Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland Massachussets. Pp. 43-63.
- 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.
- Harrier, L.A., P.W. Whitty, J.M., Sutherland y J.I. Sprent. 1997. Phenetic investigation of non-nodulating African species of *Acacia* (*Leguminosae*) using morphological and molecular markers. *Pl. Syst. Evol.* **205**: 27-51.
- Hedrick, P. 1992. Shooting the RAPDs. *Nature* **355**: 679-680.
- Hogbin, P.M., D.J. Ayre y R.J. Whelan. 1998. Genetic variation and reproductive success of road verge populations of the rare shrub *Grevillea barklyana* (*Proteaceae*). *Heredity* **80**: 180-186.
- Hormaza, J.I., K. Pinney y V.S. Polito. 1998. Genetic diversity of pistachio (*Pistacia vera*, *Anacardiaceae*) germplasm based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Economic Botany* **52(1)**: 78-87.
- Karp, A., P.G. Isaacs, D.S. Ingram. 1998. Molecular Tools for Screening Biodiversity. Chapman & Hall. London. 498 p.
- 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.
- Latta, R.G. y J.B. Mitton. 1997. A comparison of population differentiation across four classes of gene marker in limber pine (*Pinus flexilis* James). *Genetics* **146**: 1153-1163.
- 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.

- Ledig, F.T. 1996. Heterozygosity heterosis and fitness in outbreeding plants en M.E. Soulé. Conservation biology: the science of scarcity and diversity. Sinauer. Sunderland. Massacusetts: 77-104.
- Linch, M. y B.G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* **3**: 91-99.
- Liu, Z. Y G.R. Furnier. 1993. Comparison of allozyme. RFLP and RAPD markers for revealing genetic variatin within and between aspen and bigtooth aspen. *Theoretical and Applied Genetics*. **87**: 97-105.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Research* **27**: 209-220.
- Martínez-Palacios, A. y L.E. Eguiarte. 1999. *American Journal of Botany*. (En prensa).
- Massey, L. K. y J.L. Hamrick. 1998. Genetic diversity and population structure of *Yucca filamentosa* (agavaceae) *Am. J. Bot.* **85**: 340-345.
- McClenaghan, L.R. Jr. y A. Beauchamp. 1986. Low genic differentiation among isolated populations of the California fan palm (*Washingtonia filifera*). *Evolution* **40 (2)**: 315-322.
- Miller, M.P. 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.
- Moctezuma, B.J. y T.M. Serrato. 1988. Islas del Golfo de California. Secretaria de Gobernación – Universidad Nacional Autónoma de México, México. 292
- 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.

- Navarro, A. 1999. Estructura genética y procesos de especiación de *Agave cerulata* (Trel.) y *Agave subsimplex* (Trel.) en el desierto Sonorense a partir de RAPD`s. Tesis de licenciatura. Facultad de ciencias. U.N.A.M.. México D.F.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* **106**: 283-292.
- Nevo, E. 1978. Genetic variation in natural populations: Patterns and theory. *Theoretical population biology* **13**: 121-177.
- Otero, A., M. de la Cruz y K. Oyama. 1997. El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. *Bol. Soc. Bot.* **60**: 85-117.
- 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.
- Parker, K.C. y J.L. Hamrick. 1992. Genetic diversity and clonal structure in a columnar cactus, *Lophocereus schottii*. *American Journal of Botany* **79** (1): 86-96.
- Rajaseger, G., H.T.W. Tan, I.M. Turner y P.P. Kumar. 1997. Analysis of genetic diversity among *Ixora* cultivars (Rubiaceae) using Random Amplified Polymorphic DNA. *Annals of Botany* **80**: 355-361.
- Rieseberg, L. H. 1996. Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Molecular Ecology* **5**: 99-105.
- Rocha, O.J. y J.A. Lobo. 1996. Genetic variation and differentiation among five populations of the guanacaste tree (*Enterolobium Cyclocarpum* Jacq.) in Costa Rica. *Int. J. Plant Sci.* **157**(2): 234-239.

- Rowe, M.L., D.J. Lee, 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.
- Schierebeck, 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.
- Slatkin, M. 1987. Gene Flow and the geographic structure of natural populations. *Science* **263**: 787-792.
- Slatkin, M. 1994. Gene Flow and Population Structure. En: Real, L. Ecological Genetics. Princeton University Press. pp. 3-17.
- Smith, J.F. y T.V. Pham. 1996. Genetic diversity of the narrow endemic *Allium aaseae* (Alliaceae). *American Journal of Botany* **83(6)**: 717-726.
- Sokal, R.R. 1979. Testing stational significance of geographic variation patterns. *Syst. Zool.* **28**: 227-231.
- Sokal, R.R. y F.J. Rohlf. 1995. RAPD profiling in biological conservation: An application to estimating clonal variation in rare and endangered *Liamna* in Virginia. *Biological Conservation* **74**: 135-142.
- Sokal, R.R. y F.J. Rohlf. 1995. Biometry. Ed. W.R. Freeman and Company. New York. pp. 885.
- Skroch, P., J. Tivang y J. Nienhuis. Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. *Applications of RAPD Technology to Plant Breeding*. 26-30.
- Thormann, C.E. y T.C. Osborn. Use of RAPD and RFLP markers for germplasm evaluation. *Applications of RAPD Technology to Plant Breeding*. 9-11.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

- Trame, A-M., A.J. Coddington y Ken N. Paige. Field and genetic studies testing optimal outcrossing in *Agave schottii*. a long-lived clonal plant. *Oecologia* **104**: 93-100.
- Vázquez-Lobo, A. 1996. Evolución de hongos endofitos del género *Pinus* L: Implementacion de tecnicas moleculares y resultados preliminares. Tesis. Biología. Ciencias. U.N.A.M.
- Weeden, N.F., G.M. Timmerman. M. Hemmat. B.E. Kneen y M.A. Lodhi. Inheritance and reliability of RAPD markers. *Applications of RAPD Technology to Plant Breeding*. 12-17.
- Weir, B.S. y C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**: 1358-1370.
- Weir, B.S. 1996. Genetic data analysis II. Sinauer Associates. Sunderland Massachusetts. p. 445.
- Welsh, J., C. Petersen y M. McClelland. 1991. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucleic Acids Research* **19(2)**: 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 Acis Research* **18**: 6531-6535.
- Williams, J.G.K., M.K. Hanafey, J.A. Rafalski y S.V. Tingey . Genetic Analisis using random polymorphic DNA markers. *Methods in Enzimology* **218**: 704-740.
- Wolff, K., S. El-Akkad y R.J. Abbott. Population substructure in *Alkanna orientalis* (Boraginaceae) in the Sinai Desert. in relation to its pollinator behaviour. *Molecular Ecology* **6**: 365-372.
- Wright, S.1951. The genetic structure of populations. *Ann. Eugen.* **15**: 322-354.