



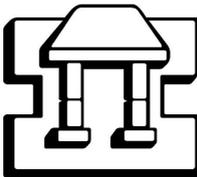
UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA POBLACIÓN DE  
AGAVE KARWINSKII ZUCC. EN EL VALLE DE  
ZAPOTITLÁN SALINAS, PUEBLA.**

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A  
ROBERTO EDUARDO LÓPEZ URRUTIA



DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE E. CAMPOS CONTRERAS

LABORATORIO DE BIOQUÍMICA MOLECULAR, UBIPRO

JULIO 2004



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.

.....

## Agradecimientos

A la Dra. Martha Martínez García, por haber dirigido este trabajo mientras las circunstancias lo permitieron, por las innumerables horas de enseñanza y por proporcionarme un acercamiento a la biología molecular y a la investigación científica.

Al Dr. Jorge Campos Contreras, por su enriquecedora participación a través del desarrollo de este trabajo y por haber asumido la dirección de la tesis.

A mis revisores; el Dr. Saúl Flores, la Bióloga Edith López, el Biólogo Alberto Rodríguez y el Dr. Gerardo Zúñiga, por sus aportaciones y consejos.

A mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica Molecular por su ayuda, su apoyo y compañía durante interminables horas de electroforesis.

A los nobles agaves *karwinskii* de Zapotitlán Salinas, que soportaron estóicamente el martirio de la colecta.

.....

## Contenido

Resumen .....	1
Introducción .....	2
Área de estudio .....	14
Antecedentes .....	17
Objetivos .....	20
Hipótesis .....	20
Materiales y métodos .....	21
Resultados .....	29
Discusión .....	37
Conclusiones .....	43
Apéndice 1 .....	44
Referencias .....	46

## Resumen

El valle de Zapotitlán se ubica dentro de la Reserva de la Biosfera Tehuacán-Cuicatlán, un área con una gran riqueza florística y un alto grado de endemismo. El valle cuenta con lugares con diferentes grados de deterioro, que influye en el desarrollo de las plantas y en su estructura poblacional. Los marcadores moleculares –métodos basados en la detección de polimorfismos en el DNA– permiten estimar la variabilidad genética de una especie y analizar la estructura de su población. *Agave karwinskii* es una especie endémica de Puebla, Oaxaca y Veracruz. En el Valle de Zapotitlán, se establece la forma Tehuacán de esta especie, en lugares con diferentes grados de perturbación.

En este trabajo se determinaron los parámetros de la diversidad genética de la población de *A. karwinskii* forma Tehuacán en el valle de Zapotitlán.

Se realizaron muestreos en zonas del Valle de Zapotitlán, previamente elegidas en función del grado de perturbación. Se aisló el DNA genómico, y se realizó el análisis de marcadores moleculares tipo RAPD con 10 primers. A partir de estos datos se construyó una matriz de presencia-ausencia, que se analizó mediante el índice de Jaccard y UPGMA. La forma en que se distribuye la diversidad se analizó por medio de un AMOVA.

Se obtuvieron 122 marcadores con un 49% de polimorfismo promedio. La  $F_{st}$  obtenida fue de 0.340, un valor comparable al de otras especies del género con distribución mas amplia.<sup>4</sup> El 26.80% de la variación se encuentra entre las poblaciones y el 73.20% dentro de las poblaciones. En contraste con otros estudios donde el flujo génico es mayor que 1, el valor del flujo génico en esta especie fue de 0.47.

La distribución de la variación y el flujo génico indican que la población se encuentra en un proceso de estructuración. Se observaron agrupaciones de las poblaciones mas cercanas geográficamente, asimismo, se observa mayor variabilidad en las poblaciones establecidas en zonas mas conservadas.

# Introducción

## Biodiversidad y diversidad genética

La ubicación latitudinal de la República Mexicana, su localización entre dos provincias biogeográficas (Neártica y Neotropical), su compleja topografía y climatología, así como su origen geológico son factores que dan origen a una variada riqueza biológica, por lo que México es considerado el séptimo entre los doce países megadiversos del planeta. En términos generales, México alberga un 10% de la biodiversidad del Planeta (Toledo, 1994).

La biodiversidad se refiere a la riqueza o variedad de formas vivientes: plantas, animales y microorganismos (diversidad de especies) que existen en un territorio, organizados en diferentes ecosistemas (diversidad de ecosistemas) y sostenidos como entes vivientes por una cantidad de información genética aún mayor (diversidad genética) (Dirzo, 1990; Toledo, 1994).

De acuerdo con Ledig (1988) la biodiversidad está constituida por: i) la diversidad de "formas" del(los) mismo(s) gen(es) dentro de una especie, ii) el cúmulo de diferencias genéticas que caracterizan a las diferentes poblaciones (o razas clásicas) y iii) las enormes bibliotecas de información genética que caracterizan a cada una de las especies.

De esta forma, los genomas de las especies vivientes son archivos de información genética en los que existen porciones, que aunque no se expresan, han demostrado que son la base del concepto de





- Identificar genes relacionados a características favorables o desfavorables en estudios genealógicos.
- Establecer el origen de razas domesticadas.
- Evaluar la historia y patrones de migración de una población dada.

El DNA permite también monitorear la diversidad genética presente en especies indicadoras o en poblaciones expuestas a estrés.

Gran parte de los estudios de diversidad genética de especies vegetales, se realizan en plantas cultivadas, o de importancia comercial (Russell *et al.*, 1997; Pejic *et al.*, 1998; García-Mas *et al.*, 2000; Gil-Vega *et al.*, 2001; Erschadi *et al.*, 2000; Li y Nelson, 2002; La Rosa *et al.*, 2003; Infante *et al.*, 2003)

Sin embargo, en los últimos 10 años, el estudio de los niveles de variación genética que se presentan en las poblaciones naturales ha cobrado importancia, hasta convertirse en uno de los puntos centrales de la genética de poblaciones (Eguiarte, 1990; Hedrick, 2001).

Particularmente importante resulta el estudio de poblaciones silvestres de plantas endémicas o de distribución limitada (Gabrielsen y Brochmann, 1998; Schmidt y Jensen, 2000; Maldonado San Martín *et al.*, 2003) y poblaciones sujetas a procesos de fragmentación o de degradación del ambiente (Zeng *et al.*, 2003) ante la creciente tasa de destrucción de los ambientes de la tierra (Eguiarte y Piñero, 1990), sin embargo, a pesar de la cantidad de información generada

.....

a este respecto se incrementa constantemente, aún no se cuenta con los datos suficientes para analizar las consecuencias de los procesos genéticos en relación a la viabilidad de las poblaciones (Oostermeijer *et al.*, 2003)

## Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son una serie de métodos de análisis que se basan en la detección de polimorfismos en proteínas y DNA. Especialmente, los marcadores basados en DNA presentan la ventaja de revelar un gran número de caracteres, muy por encima de los que se obtienen con las isoenzimas, a partir de la información genética disponible en un organismo. Por esta razón se han utilizado para resolver problemas en ecología y genética de poblaciones específicamente, en la evaluación de la diversidad botánica (Otero *et al.*, 1997; Karp *et al.*, 1996).

Entre los marcadores basados en DNA más utilizados se encuentran los Polimorfismos de Longitud en Fragmentos de Restricción (RFLP; Restriction Fragment Length Polymorphism), las Repeticiones de Secuencias Simples (SSR; Simple-Sequence Repeats), conocidas también como microsatélites, el DNA Polimórfico Amplificado Aleatoriamente (RAPD; Randomly Amplified Polymorphic DNA), y los Polimorfismos de Longitud en Fragmentos Amplificados (AFLP; Amplified Fragment Length Polymorphism) (Otero *et al.*, 1997).

Para obtener RFLPs es necesario digerir el DNA con enzimas de restricción (generalmente EcoRI, EcoRV, HindII, MvaI y BamHI),

.....

separar los fragmentos mediante electroforesis y transferirlos a una membrana para después hacer una hibridación con una sonda determinada (Botstein *et al.*, 1980; García-Mas *et al.*, 2000). Los patrones que se obtienen son reproducibles y las diferencias que se aprecian son el resultado de mutaciones que alteran los sitios de restricción (Karp *et al.*, 1996).

El desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Polymerase Chain Reaction) permitió superar algunas de las limitaciones técnicas de los RFLPs, como la alta cantidad de DNA requerida para cada ensayo y el tiempo necesario para llevar a cabo los pasos de hibridación y transferencia (Karp *et al.*, 1996).

Los microsatélites aprovechan la PCR para obtener marcadores que consisten en secuencias cortas (menos de 10 pb) repetidas en tandem en diversas regiones del genoma. El polimorfismo encontrado se basa en el número de repeticiones de dichas secuencias. (Pejic *et al.*, 1998)

Los marcadores utilizados en este estudio, los RAPDs son generados por la amplificación de segmentos aleatorios de DNA. Se utilizan primers de 8 a 15 bases, con más de 50% de G+C, que generan productos de PCR gracias a la existencia de varios sitios de acoplamiento a lo largo del genoma analizado. Los polimorfismos observados se deben a pérdida de sitios de acoplamiento, inserciones que provocan que los sitios de acoplamiento estén demasiado distantes para que se de la amplificación o que simplemente modifican la longitud de la cadena amplificada (Williams *et al.*, 1990).

Finalmente, los AFLPs se obtienen a través de una metodología combinada entre los RFLPs y la PCR. Ésta consiste en una digestión del DNA con dos enzimas de restricción, una de corte frecuente y una de corte raro, seguidos de amplificación selectiva de los fragmentos de restricción; los productos se marcan radiactivamente y se separan por electroforesis. Los polimorfismos se originan tanto por la presencia o posición de los sitios de restricción como por la selectividad de las amplificaciones subsiguientes (Simpson, 1997)

A pesar de que todos los marcadores antes mencionados resultan adecuados para estudios de diversidad genética (Russell *et al.*, 1997; García-Mas *et al.*, 1997) existen diferencias sensibles entre ellos, algunas se citan a continuación.

La complejidad metodológica de los RFLPs es alta, al igual que su costo (Pejic, 1998), además de demandar mayor cantidad de DNA por reacción y de arrojar un menor número de marcadores y porcentaje de polimorfismo inferior al del resto de las técnicas. (Karp *et al.*, 1996; Pejic, 1998; García-Mas, 2000). Los agrupamientos obtenidos a partir de RFLPs, RAPDs y AFLPs son consistentes entre sí, a diferencia de aquéllos obtenidos a partir de SSRs (Russell, *et al.* 1997). Los SSRs, RAPDs y AFLPs son basados en PCR, sin embargo, la naturaleza altamente mutable de los primeros hace difícil discernir las diferencias entre los marcadores si los productos no se separan en geles de poliacrilamida (Karp *et al.*, 1996).

.....

es favorable debido a que para su aplicación, a diferencia de los RFLPs y SSRs, no se requiere conocimiento previo del genoma y a que permiten analizar un mayor número de locus (Russell, et al , 1997; Sunnucks, 2000). La simplicidad metodológica de los RAPDs es una de sus principales ventajas, ya que se pueden obtener densidades de marcadores comparables a las de AFLPs a un menor costo (Russell *et al.*, 1997; Otero *et al.*, 1997).

Los RAPDs han demostrado ser especialmente útiles en el área de genética de poblaciones al tratarse de analizar la estructura genética de especies raras o de distribución muy restringida (Otero *et al.*, 1997; Navarro, 1999; Gil-Vega *et al.*, 2001; Maldonado San Martín *et al.*, 2003, Infante *et al.*, 2003).

### *Agave karwinskii*

La familia Agavaceae está constituida por plantas o árboles rosetiformes, con troncos gruesos de tejido secundario. Las hojas son carnosas y gruesas, con mayor cantidad de estomas en el haz; con espinas y haces vasculares acompañados de gruesas fibras. Poseen una inflorescencia compleja y de gran tamaño, compuesta por una buena cantidad de flores triloculares y tricarpelares. El fruto es en general una cápsula y el cariotipo es relativamente constante,  $n = 30$  (Dahlgren *et al.*, 1985).

El género *Agave* cuenta con alrededor de 140 especies y se encuentra dividido en dos subgéneros: *Littaea* y *Agave*, a su vez cada subgénero se divide en grupos (Cuadro 1).

Las especies de este género son plantas rosetiformes consideradas perennes en virtud del largo tiempo que toman en crecer y florear (de 8 a 20 años), sin embargo la mayoría de las especies son semélparas, como si se tratara de plantas anuales (Gentry, 1982).

Los agaves poseen tallo suculento y corto, que en su parte central cuenta con una gran región meristemática de la que se originan las hojas nuevas; en conjunto, forma una masa de tejido blanco y fibroso en la que se insertan las hojas en espiral, lo que da a la mayoría de los agaves el aspecto de rosetas acaules. Este tallo, separado de las hojas y la raíz constituye lo que comúnmente se llama "cabeza" o "piña" y es empleado en la producción de bebidas como el mezcal y el tequila (Gentry, 1982).

Cuadro 1. Resumen del género *Agave* tomado de Gentry (1982)

	Sección	Especies
Subgénero <i>Littaea</i>	<i>Amolae</i>	8
	<i>Choritepalae</i>	3
	<i>Filiferae</i>	8
	<i>Marginatae</i>	21
	<i>Parviflorae</i>	4
	<i>Polycephalae</i>	5
	<i>Striatae</i>	3
	<i>Urceolatae</i>	2
	TOTAL	54
Subgénero <i>Agave</i>	<i>Americanae</i>	6
	<i>Canpamiflorae</i>	3
	<i>Deserticolae</i>	10
	<i>Crenatae</i>	6
	<i>Dipetalae</i>	10
	<i>Hemiflorae</i>	12
	<i>Marmoratae</i>	4
	<i>Parrynae</i>	6
	<i>Rigidae</i>	12
	<i>Salmianae</i>	5
	<i>Sisalanae</i>	6
	<i>Umbelliflorae</i>	2
TOTAL	82	
TOTAL Género <i>Agave</i>		136

Las hojas son generalmente gruesas y suculentas, nacen en la única yema (en la parte apical del tallo) y permanecen ahí un tiempo formando un cono de hojas sobrepuestas; posteriormente maduran y se abren para formar la roseta, permitiendo el desarrollo de hojas nuevas en su lugar. Su tamaño se incrementa gradualmente a medida que maduran, para después decaer abruptamente y formar brácteas en la base del tallo. El arreglo radial de las hojas forma la cobertura y permite

colectar agua de lluvia y dirigirla hacia el suelo que rodea la base del tallo, en el que la evaporación es menor debido a la sombra producida por la roseta (Gentry, 1982).

La armadura de las hojas consiste en una fuerte espina terminal y un borde cuticular continuo o discontinuo provisto de espinas laterales de menor tamaño. La presencia y la forma de estas espinas son caracteres diacríticos importantes para las especies del género. Todas las hojas son glabras y poseen una cubierta serosa que en algunos casos puede ser glauca (Gentry, 1982).

La inflorescencia es un espectacular clímax para años de desarrollo de la roseta; puede ser espiculada para el subgénero *Littaea* o paniculada para el subgénero *Agave*. Su dimensión es variable, de un metro y medio a diez y su desarrollo se completa de dos a cuatro meses. Las hojas de la parte apical de la roseta se modifican para formar brácteas pedunculares cada vez más pequeñas a medida que ascienden a lo largo del escapo. La morfología floral es también variable entre las especies, en general presentan un ovario ínfero y trilocular y seis tépalos en una o dos series. Los principales polinizadores son los murciélagos, aunque algunas aves como los colibríes visitan las flores de algunas especies (Gentry, 1982).

La especie estudiada, *Agave karwinskii* Zucc, descrita en 1833, es un agave arborescente que posee un tallo de 1 hasta 3 m de alto y que aparentemente forma colonias clonales por medio de rizomas. Las hojas son de color verde, rígidas, lanceoladas, de 40 a 65 cm de largo, de 3 a 7 cm de ancho, dispuestas en roseta en

.....

posición vertical o casi horizontal, acuminadas, cóncavas en el haz y convexas en el envés, de margen recto; la base es engrosada y presentan una espina terminal cónica y oscura que varía de 1 a 4 cm de largo así como numerosas espinas laterales de 3 a 5 mm. Las flores son pequeñas (de 45 a 57 mm) amarillas o verduscas, con ovario cilíndrico, anteras céntricas y cápsula ovoide; se organizan en una panícula de 3 a 3.5 m de largo, con 10 a 15 ramificaciones en el último tercio del escapo. Fig. 1, (Gentry, 1982).

La sistemática de *Agave karwinskii* es la siguiente:

Reino: Plantae  
División: Angiospremeae  
Clase: Monocotiledoneae  
Orden: Asparagales  
Familia: Agavaceae  
Género: *Agave*  
Subgénero: *Agave*  
Grupo: *Rigidae*  
Especie: *Agave karwinskii*  
(Dalghren et al., 1985; Gentry, 1982).

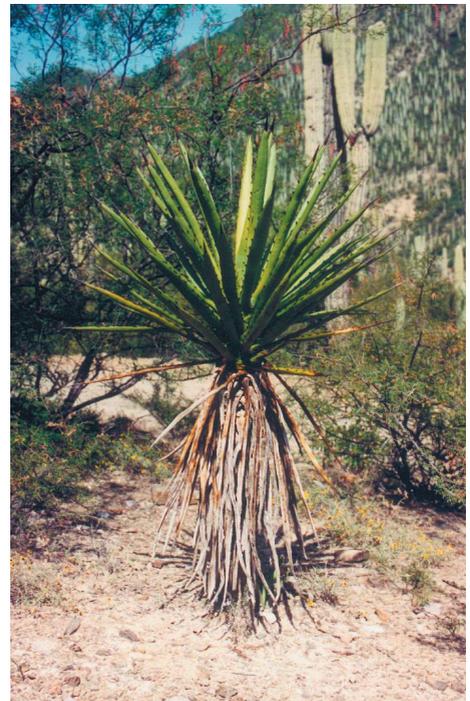


Figura 1. Individuo de *Agave karwinskii* en el valle de Zapotitlán Salinas.

Esta especie se distribuye en los estados de Puebla y Oaxaca, en zonas con altitud entre 1550 y 1850 m. (Fig. 2; Gentry, 1982) aunque existen registros recientes de su presencia en Veracruz (García-Mendoza y Galván, 1995). *A. karwinskii* es una de las cinco especies de este género que

son endémicas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, siendo 15 en total las que se distribuyen en esa región (García-Mendoza y Galván, 1995). Cohabita con *Prosopis laevigata*, *Cercidium praecox*, *Neobuxbamia tetezo*, *Mimosa luisiana*, *Agave macroacantha* y *Agave marmorata*, entre otros (Oliveros-Galindo, 2000.)

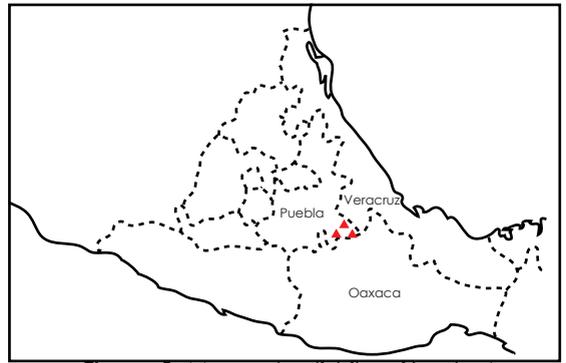


Figura 2. Mapa de distribución de *Agave karwinskii* Zucc. modificado de Gentry, 1982

En sus zonas de distribución se nombra popularmente a *Agave karwinskii* Zucc. como "maguey cirial", "kuish", "cahmisa" o "tobasiche". Se le utiliza como cerca viva en cultivos o en casas habitación y sus hojas como leña en labores domésticas. En algunas poblaciones se utiliza como la principal fuente de obtención de mezcal, mientras que en otras se utiliza únicamente como complemento en caso de que la obtención de *A. tequilana* se dificulte (Urrutia, 1986).

## Área de estudio

Este trabajo se realizó en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla, situado dentro de la provincia fitogeográfica del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, la región árida y semiárida mas meridional de México (Rzedowski, 1978). Ésta se encuentra localizada entre los 17°48' y 18°58' LN y los 97°03' y 97°43' LW.

Sigue una dirección sureste-noroeste por la Sierra de Juárez, Zongolica y Tecamachalco, en la parte sureste del estado de Puebla y el noroeste de Oaxaca. Fisiograficamente, el Valle de Tehuacán es parte de la provincia Mixteca - Oaxaqueña , en la cual existen pequeños calles de origen tectónico, entre los que destacan los de Cuicatlán, Huajuapán, Tehuacán, Tepelmeme y Zapotitlán. Fig. 3. (Valiente-Banuet *et al.*, 2000).

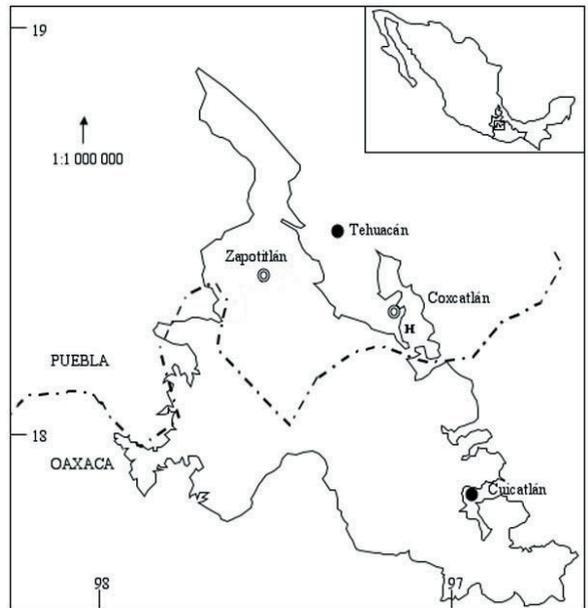


Figura 3. Ubicación del área de estudio

Específicamente el área de estudio se ubica a lo largo del Río "El Salado", sobre las terrazas aluviales del mismo, entre los 18°16'59'' y 18°20'11'' de latitud norte y entre los 97°26'51'' Y 97°30'13'' de longitud oeste; con una extensión aproximada de 28.657 Km<sup>2</sup> (Oliveros-Galindo, 2000). El valle de Tehuacán comprende diferentes tipos climáticos, de cálidos a templados; en el valle de Zapotitlán, el clima es semiárido con una precipitación media anual de 400 a 500 mm y una temperatura media anual de 21°C (García, 1973).

La flora de la región está constituida por 180 familias, 891 géneros y 2621 especies (Dávila *et al.*, 1993), es decir, el 11.4 % de las 22800 especies de plantas vasculares que se estima existen en nuestro país. Además de la gran riqueza de especies, el Valle cuenta con niveles altos de endemismo: de las 180 familias, 76 (42.2 %) poseen al menos una especie endémica del valle, mientras que existen 205 géneros (23% del total de géneros presentes) con al menos una especie endémica en el área, entre ellos el género *Agave* que presenta 5 especies endémicas (Dávila, *et al.* 2002).

En el Valle de Tehuacán existen 29 asociaciones vegetales diferentes (Valiente-Banuet *et al.*, 2000), de las cuales es posible reconocer cinco en el área de estudio: Tetecheras dominadas por *Neobuxbamia tetezo*, Selva baja perennifolia con espinas laterales (Mezquital) dominada por *Prosopis laevigata*, Cardonal dominado por *Cephalocereus columna-trajani*, Matorral espinoso con espinas laterales y Candelillar, dominado por *Euphorbia antisiphilitica* (Oliveros-Galindo, 2000).

La especie *Agave karwinskii* forma parte de tres de estas asociaciones vegetales:

i) Tetecheras de *Neobuxbamia tetezo*: donde también se encuentran presentes *Mimosa luisiana*, *Agave marmorata*, *Bursera aloexylon*, *Ceiba parvifolia*, *Acacia coulteri*, *Cordia curassavica*, *Fouquieria formosa*, *Calliandra eriopylla*, *Ipomoea arborescens*, *Caesalpinia melanadenia*, *Castela tortuosa*, *Ruellia hirsuto-glandulosa* y *Siphonoglossa ramosa* en el estrato arbustivo, así como *Myrtillocactus*

.....  
geometrizers y *Pachocereus hollianus* en el estrato arbóreo (Valiente-Banuet et al., 2000; Oliveros-Galindo, 2000).

ii) Selva baja perennifolia con espinas laterales (Mezquital): En la asociación de *Prosopis laevigata* - *Celtis pallida*-*Cercidium praecox* - *Opuntia pilifera* -*Myrtillocactus geometrizers* y *Pachocereus hollianus* donde comparte el estrato arbustivo con *Celtis pallida*, *Castela tortuosa*, *Zanthoxylum liebmannianum* y *Agave marmorata*. También se encuentran *Cercidium praecox*, *Opuntia pilifera*, *Myrtillocactus geometrizers*, *Pachocereus hollianus*, *P. marginatus*, *Stenocereus stellatus*, *Acacia bilimekii* y *Bursera arida*, en el estrato arboreo, además de algunos elementos caducifolios, como *Mimosa luisana*, *Caesalpinia melanadenia*, *Bursera schlechtendalii* e *Ipomoea arborescens* (Oliveros-Galindo, 2000).

iii) Matorral espinoso con espinas laterales: se distingue de la vegetación circundante por la ausencia de cactáceas columnares, aunque se encuentren las mismas especies de arbustos presentes en las tetecheras, a saber: *Mimosa luisiana*, *Cordia curassavica*, *Caesalpinia melanadenia*, *Bursera schlechtendalii*, *B. Aloexylon*, *Fouquieria formosa*, *Jatropha neopauciflora*, *Ipomoea arborescens*, *Ferocactus latispinus* y *Solanum trydinamum* (Valiente-Banuet et al., 2000).

## Antecedentes

La diversidad genética de algunas especies del género *Agave* dentro del territorio nacional ha sido estudiada por los siguientes autores, entre otros:

Martínez-Palacios et al., (1999) examinaron los patrones de variación de 10 loci de isoenzimas en 10 poblaciones que representan la distribución de *Agave victoriae-reginae*. Encontró tres agrupaciones que podrían representar especies separadas o subespecies, aparentemente aisladas por la distancia y el corto alcance de sus polinizadores principales, las abejas.

Navarro (1999) estimó la estructura genética de *Agave cerulata* y *Agave subsimplex* (ambas especies distribuidas en el desierto sonorense) por medio de marcadores RAPDs. Halló niveles bajos de diferenciación genética entre las poblaciones de ambas especies gracias a el efecto de un flujo génico alto y de la selección homogeneizadora, presente gracias a que las poblaciones se encuentran en ambientes muy similares.

González (2000), en un estudio de la variación genética de *Agave deserti* mediante marcadores RAPDs, encontró cercanía genética entre las poblaciones a pesar de la separación geográfica, aún entre las poblaciones de *A. deserti deserti*, *A. deserti pringlei* y *A. deserti simplex*, las tres subespecies descritas. Los resultados de su trabajo sugieren que todas las subespecies forman una sola especie, sin subespecies.

.....

Infante *et al.* (2003) evaluaron la diversidad genética del henequén (*Agave fourcroydes*) utilizando marcadores moleculares AFLP. A pesar de que esta especie sólo se reproduce asexualmente, en este trabajo se encontraron diferentes niveles de variación entre los individuos de distintas poblaciones. Un segundo ensayo demostró que las diferencias genéticas aparecen durante la reproducción asexual. Posteriormente, González *et al.* (2003) continuaron este trabajo y observaron que individuos producto de propagación vegetativa conservan características y patrones de marcadores de los individuos de los que se originan, sin ser completamente iguales. Por tanto, concluyen que es posible seleccionar individuos de una población y propagarlos sin que disminuya la diversidad genética de la población.

En cuanto a *Agave karwinskii*, después de una revisión bibliográfica exhaustiva no se han encontrado reportes de trabajos que analicen su variabilidad genética, o estructura poblacional; sin embargo, se reporta lo siguiente:

Rivera (1983) realizó un estudio citogenético de *Agave karwinskii*, para lo cual muestreó en el valle de Tehuacán y en los valles centrales de Oaxaca. Describió tres fenotipos distintos: *A. karwinskii* forma Tehuacán, Miahuatlán y Amatengo, y estableció la distribución de cada una de ellos. El número cromosómico que halló para cada una de ellas es:  $2n=30$  para la forma Tehuacán,  $2n=40$  para la forma Miahuatlán y  $2n=40$  par la forma Amatengo.

Posteriormente Urrutia (1986) realizó un estudio etnobotánico de los

.....

agaves en los valles centrales de Oaxaca. Entre ellos registra a *A. karwinskii*, del cual describió las variedades y usos que recibe en las poblaciones de la región.

El presente estudio se ubica en el contexto del Proyecto General de la UBIPRO, en el cual se establece un gradiente de deterioro dividido en 4 zonas: A,B,C,D siendo la primera la mejor conservada y la última la más deteriorada, éstas se tomaron en cuenta para los muestreos realizados en este estudio (UBIPRO, 2000).

Dentro del mismo proyecto, Moreno (2003) realizó un estudio citogeográfico de *Agave karwinskii* y *Agave macroacantha* en el que encontró un número cromosómico de  $2n= 60$  para ambas especies en toda el área de distribución considerada. Asimismo, determinó que la forma del área de distribución es disyunta debido a la pérdida de suelo a causa de la erosión.

Debido a su carácter de especie endémica, es importante realizar estudios de genética de poblaciones de *A. karwinskii* para contribuir a su conocimiento.

.....

## Objetivos

### General

Estimar la diversidad genética de la población de *Agave karwinskii* en el valle de Zapotitlán Salinas, Puebla.

### Particulares

- Reconocer la presencia de *A. karwinskii* en las zonas de estudio del valle de Zapotitlán Salinas.
- Colectar *A. karwinskii* de cada una de las zonas para su estudio y coleccionar el material necesario para la elaboración de ejemplares de herbario
- Estandarizar la técnica de extracción de DNA genómico para *A. karwinskii*
- Estandarizar la técnica de RAPDs para los individuos de *A. karwinskii*.
- Estimar la variación genética inter e intra poblacional de *A. karwinskii*.
- Determinar el flujo génico y estructura en la población de *A. karwinskii* considerando dos sitios de muestreo fuera del valle de Zapotitlán como referencia externa.

## Hipótesis

Si los diversos grados de deterioro de los diferentes sitios de colecta tienen un efecto en los individuos de *Agave karwinskii*, entonces se espera encontrar una población estructurada con diferentes grados de variabilidad en cada sitio.

# Materiales y métodos

## Trabajo de campo

Se colectaron al menos cinco individuos de cada zona de muestreo (Fig. 4), procurando que éstos no formaran parte de la misma colonia, para evitar colectar el mismo individuo genético. Se colectó una hoja joven de cada individuo, que fue transportada al laboratorio en una bolsa de papel.

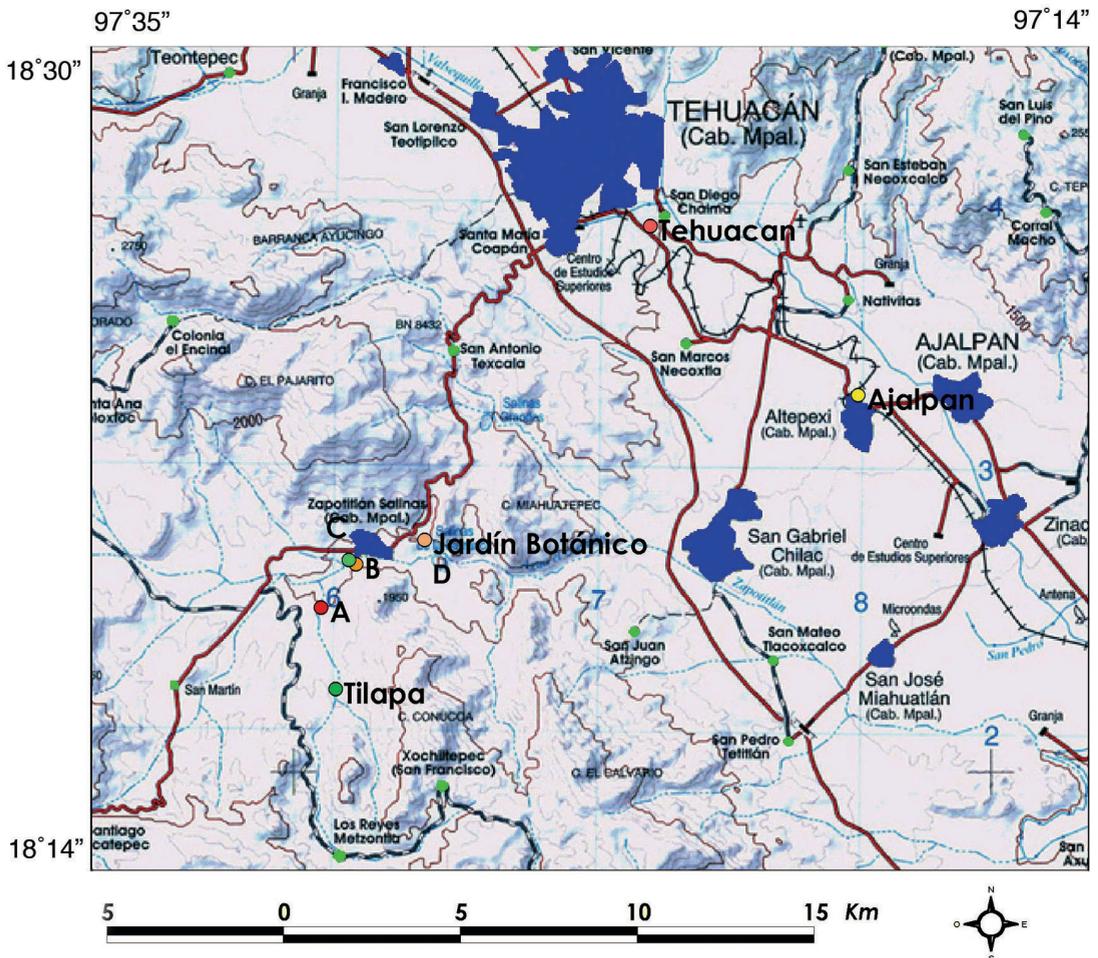


Figura 4. Ubicación de las zonas de muestreo.

.....

También se colectaron los materiales que respaldan la especie trabajada, mismos que fueron prensados y secados. Posteriormente montados y depositados como ejemplares de herbario en el Herbario IZTA de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (No. de ejemplar 41604)

El material colectado se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  al llegar a laboratorio, hasta el momento de ser procesado.

## Trabajo de laboratorio

### Extracción de DNA genómico

Aproximadamente 100 mg de clorénquima fueron congelados con nitrógeno líquido y molidos hasta obtener un polvo fino retirando manualmente las fibras mas gruesas durante el proceso. A partir del polvo obtenido se realizó la extracción de DNA genómico siguiendo el protocolo correspondiente al DNeasy Plant Mini kit, de la marca Qiagen, que consiste en columnas de purificación. (Apéndice 1)

La presencia de DNA en las extracciones se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 120 mV durante 40 min, revelado con bromuro de etidio y visualizando con luz UV.

### RAPDs

La reacción de amplificación se realizó de acuerdo al protocolo reportado por Williams *et al.* (1990) con las siguientes modificaciones: 0.1  $\mu\text{M}$  de primer, 200  $\mu\text{M}$  de dNTPs y 1 unidad de Taq polimerasa.

La amplificación se realizó en un Termociclador GeneAMP PCR System 9700 programado con un ciclo previo de desnaturalización a 94 °C seguido de 40 ciclos de 1 min a 94°C para la desnaturalización reversible del DNA, 1 min a 37°C para la alineación de primers y 1 min. a 72° C para la polimerización y un ciclo final de 15 min a 72 °C para polimerización complementaria.

Se probaron diferentes primers de la serie Operon hasta encontrar aquellos que produjeran un número considerable de bandas polimórficas; los primers que se utilizaron fueron: A-02, A-10, A-11, A13, B-05, B-17, B-20, C-07, G-06, J-13 y J-20 (Cuadro 2)

Se realizó una electroforesis de los productos de amplificación en un gel de agarosa al 1.5%, revelándolos con bromuro de etidio. Los polimorfismos se visualizaron con luz UV. La imagen de cada gel se documentó utilizando el software Alpha Ease versión 3.3 de Alpha Innotech Corp.

### Análisis estadístico de los datos

A partir de los patrones de bandas producidas por los primers se construyó una matriz de presencia-ausencia y se calculó el porcentaje de polimorfismo por primer y por población.

Cuadro 2. Secuencias de los primers utilizados

Primer	Secuencia 5'-3'
A-02	CAGGCCCTTC
A-10	GTGATCGCAG
A-11	CAATCGCCCGT
A-13	CAGCACCCAC
B-05	TGCGCCCTTC
B-17	AGGGAACGAG
B-20	CGACCCTTAC
C-07	GTCCCGACGA
G-06	GTGCCTAACC
J-13	CCACACTACC
J-20	AAGCGGCCTC



Con los datos del AMOVA, se calculó el flujo génico entre las poblaciones usando las siguientes fórmulas, corregidas para n pequeños (Crow y Aoki, 1984):

$$N_e m = \left( \frac{1}{4a} \right) \left( \frac{1}{\phi_{st}} - 1 \right)$$

donde:

$N_e m$  = Número de migrantes por generación

$$a = \left( \frac{n}{n-1} \right)^2$$

n = número de individuos

$\Phi_{st}$  = índice de diversidad genética

A partir de los valores de la  $\Phi_{st}$  entre pares de poblaciones se generó un segundo dendrograma mediante UPGMA para representar las distancias entre poblaciones.

Porcentaje de *loci* polimórficos

Se calculó el índice de polimorfismo de cada marcador y se obtuvo el polimorfismo promedio para todos los individuos (especie), así como valores de polimorfismo promedio por primer y por población.

En todos los casos se utilizó la siguiente fórmula:

$$P = \frac{x}{n}$$

donde:

P = porcentaje de polimorfismo

x = frecuencia del marcador

n = número de individuos

.....

## Diversidad genética y heterocigosis esperada

Se calculó el índice de Shannon (Bussell, 1999) para cada locus de acuerdo con la siguiente fórmula

$$H'_j = -\sum p_i \log_2 p_i$$

donde:

$H'_j$  = índice de diversidad de Shannon

$p_i$  = frecuencia del alelo presente del  $i$ ésimo locus en la población

A partir de éste se obtuvo la diversidad promedio poblacional:

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

donde:

$H'_{pop}$  = diversidad promedio por población

$n$  = número de poblaciones

Finalmente, se obtuvo la diversidad por especie:

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

donde:

$H'_{sp}$  = diversidad promedio por especie

$p_s$  = frecuencia del alelo presente del  $s$ ésimo locus en la muestra total

El grado de diferenciación poblacional se estimó a partir de la diversidad promedio ( $H'_{pop}$ ) y la diversidad total de la especie ( $H'_{sp}$ ) obtenida mediante el índice de Shannon utilizando las siguientes fórmulas, para el componente de diversidad dentro de las poblaciones (Bussell, 1999):

$$\frac{H'_{pop}}{H'_{sp}}$$

y para la diversidad entre poblaciones:

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

La  $G'_{st}$  total se calculó con base en los valores promedio por primer de  $H'$ ,  $H'_{pop}$  y  $H'_{sp}$  (Bussell, 1999).

La heterocigosis promedio esperada se calculó para cada población ( $He_{pop}$ ) y para la muestra total ( $He_{sp}$ ) mediante tres métodos: el de la raíz cuadrada, el de Lynch y Milligan (1994) y el bayesiano (Zhivotovski, 1999)

El método de la raíz cuadrada parte del parámetro convencional de diversidad:  $H = 2pq$  (donde  $p = 1-q$ ), por tanto la fórmula para calcular la heterocigocidad por locus es:

$$He = 2 \left[ (1 - \sqrt{x}) \sqrt{x} \right]$$

donde:

$x$  = frecuencia del alelo presente del  $i$ ésimo locus

Lynch y Milligan (1994) sostienen que  $q = x^{1/2}$  donde  $x$  es la frecuencia



# Resultados

## Colecta

Se colectaron 26 individuos de *Agave karwinskii* en las 4 zonas de estudio dentro del valle y 5 individuos más en la zona de Tilapa, así como 8 individuos de zonas ubicadas fuera del valle de Zapotitlán (Cuadro 3). De acuerdo con Nybom y Bartish (2000) este número de individuos por población permite una correcta estimación de la diversidad genética.

Cuadro 3. Datos geográficos de los individuos colectados

Zona	Ubicación	No. Individuos
Zona A	18°18'22" LN	7
Granjas	97°29'30" LW	
Zona B	18°19'15" LN	9
	97°28'45" LW	
Zona C	18°19'20" LN	5
Panteón	97°28'54" LW	
Zona D	18°19'44" LN	5
Jardín botánico	97°27'16" LW	
Tilapa	18°16'42" LN	5
	97°29'12" LW	2 herbario
Ajalpan	18°22'36" LN	2
	97°17'56" LW	
Tehuacan	18°26'05" LN	6
	97°22'22" LW	

## Extracción de DNA genómico

Se extrajo el DNA de 39 individuos de *Agave karwinskii* y 1 de *A. angustifolia* var. *marginata* como individuo externo

## RAPDs

Inicialmente se probaron 2 individuos con 17 primers de las series A, B, C, D y J de Operon Technologies. Los 11 primers que se utilizaron fueron seleccionados por el número de marcadores que produjeron

.....

y su reproducibilidad. Los primers seccionados se probaron con los 31 individuos de *A. karwinskii* y en el individuo de *A. angustifolia*.

Con ellos, 34 individuos de *A. karwinskii* produjeron amplificación, así como el individuo de *A. angustifolia*; los otros 5, produjeron amplificación sólo con 10 de los 11 primers analizados. En total se obtuvieron 122 marcadores. La diversidad promedio por población fluctúa del 22 al 65% (Cuadro 4).

### Análisis estadístico de los datos

#### Polimorfismo

Los 12 primers utilizados arrojaron porcentajes de polimorfismo promedio del 27 al 63 %, mientras que el polimorfismo promedio para todos los marcadores fue de 49% (Figura 5, cuadro 4)

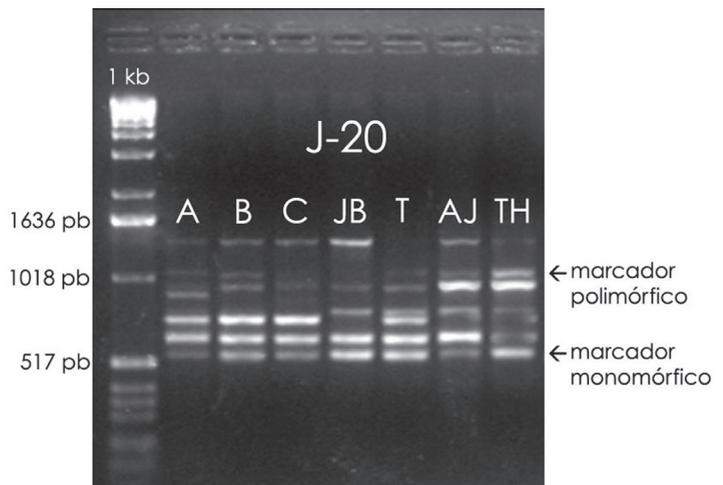


Fig 5. Polimorfismos evidenciados por el primer OPJ-20 en un individuo de cada zona

Cuadro 4. Número de marcadores y porcentaje de polimorfismo promedio por primer y por población. El porcentaje de polimorfismo corresponde al promedio de los porcentajes de polimorfismo de cada población.

Primer	No. Marcadores	Poblaciones							% polimorfismo promedio
		A	B	C	D	T	AJ	TH	
OPA-02	10	70	90	50	60	60	20	60	59
OPA-10	12	67	75	42	42	58	00	58	49
OPA-11	10	90	40	70	90	70	20	60	63
OPA-13	10	80	80	70	50	60	50	20	59
OPB-05	9	33	56	22	56	89	11	56	46
OPB-17	11	45	64	27	64	82	27	45	51
OPB-20	14	93	79	21	29	64	50	64	57
OPC-07	12	75	67	25	58	58	42	08	48
OPG-06	12	83	83	33	17	67	08	58	50
OPJ-13	11	45	55	18	27	55	00	27	32
OPJ-20	11	36	45	18	36	09	09	36	27
	% polimorfismo promedio	65	67	36	48	61	22	45	49

### Análisis de agrupamiento

El dendrograma (Fig. 6) muestra a los individuos de las zonas A (A1-A7), B (B1-B9) y C (C1-C5), así como del jardín botánico (D1-D5), Tilapa (T1-T5), Ajalpan (AJ1-AJ2) y Tehuacán (TH1-TH6). En él se observa una separación entre los individuos de las poblaciones que se encuentran dentro del valle de Zapotitlán (Zonas A, B y C, jardín botánico y tilapa) y los que se encuentran fuera del, en Ajalpan y Tehuacán. Dentro de las poblaciones del valle de Zapotitlán, el agrupamiento que se obtuvo concuerda con el esperado: por sitio de colecta, y a la vez, por grado de deterioro del ambiente. El individuo de *A. agustifolia* (*A. ang*) se encuentra fuera de las agrupaciones, al pertenecer a otra especie.

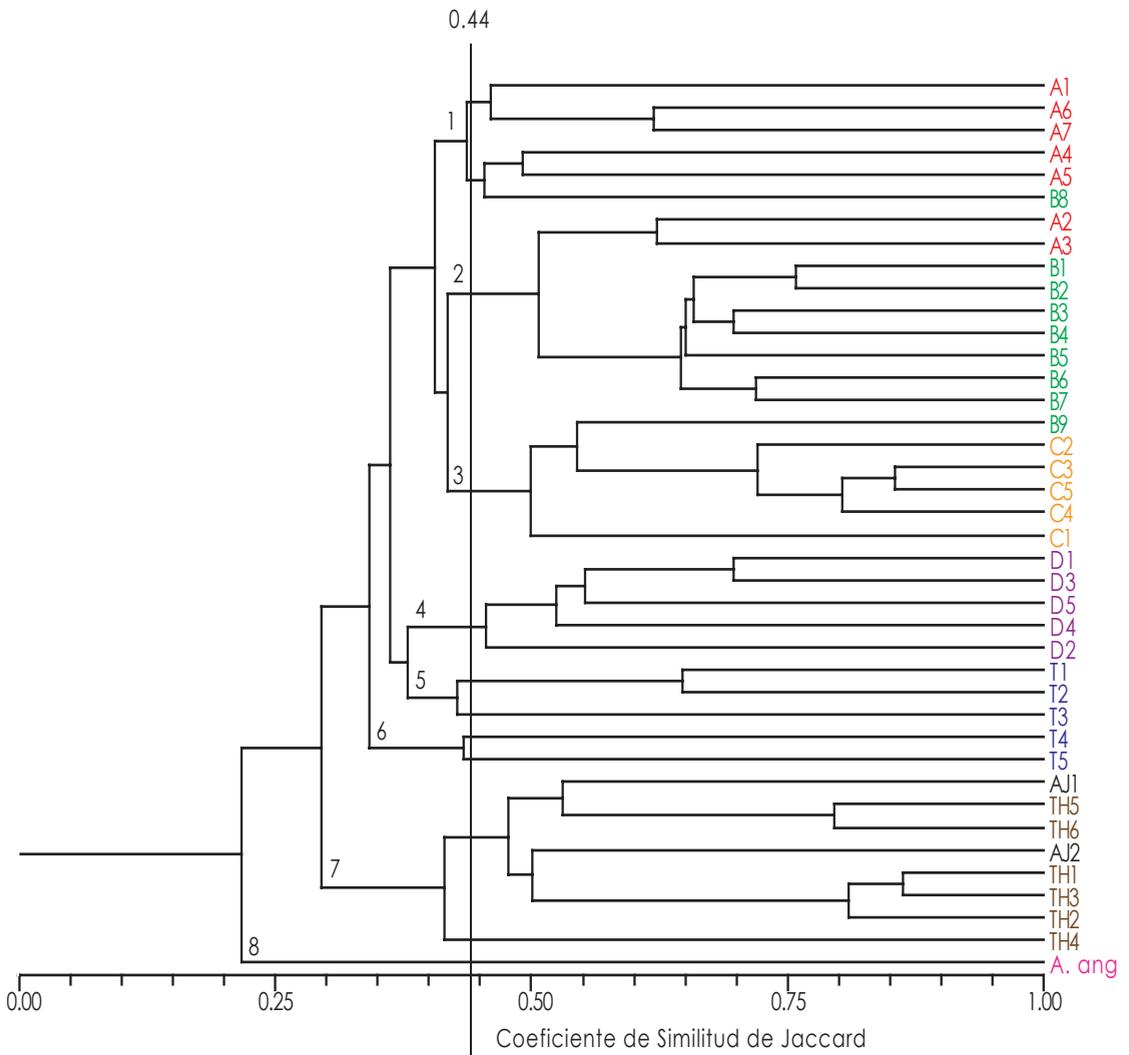


Figura 6. Dendrograma obtenido del análisis de agrupamiento de los individuos. La línea vertical indica el punto de corte; las agrupaciones a la izquierda de ésta son estadísticamente significativas

El resultado de la prueba no paramétrica de Mantel fue de  $r=0.903$ , lo que indica que estas agrupaciones son una buena representación de los datos obtenidos.

El resultado de la prueba del mejor corte, representado en la figura 6 con una línea vertical, fue de 0.44. Esto indica que existen al

menos 6 agrupaciones significativas; donde el agrupamiento de los individuos con respecto a su zona de colecta es muy evidente (Nodos 1, 2, 3, 4, 5 y 6, Figura 6).

En el análisis de coordenadas principales o PCO (Fig. 7) se observó una tendencia similar a la que exhibe el dendrograma, es decir, separación de los individuos de las poblaciones localizadas dentro y fuera del valle. De igual forma, se aprecia la agrupación de los individuos por sitio de colecta. A través de esta representación, es posible apreciar la cercanía de las zonas A y B de una mejor forma.

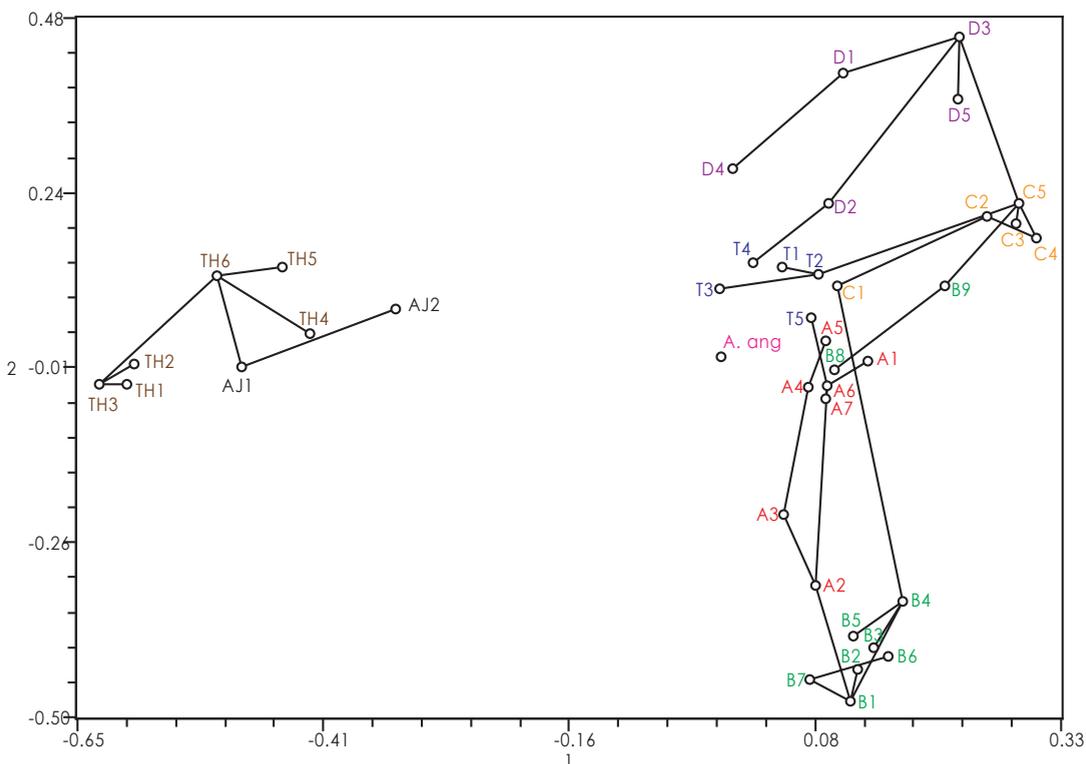


Figura 7. Análisis de coordenadas principales en dos dimensiones con red de tendido mínimo (MST). Las líneas indican las relaciones genéticas más cercanas

La  $\Phi_{st}$  obtenida del AMOVA realizado con los individuos de las poblaciones de *A. karwinskii* fue de 0.340; el análisis indica que 26.80% de la variación total se encuentra entre las poblaciones, mientras que 73.20% se encuentra dentro de las poblaciones (o entre los individuos) (Cuadro 5). Este resultado es coherente con los anteriores y sugiere que la población se encuentra en proceso de estructuración.

Cuadro 5. Resultados del AMOVA de *A. karwinskii* g.l. grados de libertad, V.C. varianza total de los componentes, % total de V porcentaje de la varianza,  $\Phi_{st}$  equivalente al índice de diversidad, P probabilidad de que sean productos al azar después

de 999 permutaciones					
Origen de variación	g.l.	V.C.	% total V	$\Phi_{st}$	P
Entre poblaciones	6	7.86	26.8	0.340	<0.009
Dentro de las poblaciones	32	15.28	73.2		
Nem = 0.47					

El valor del flujo génico fue de 0.47, por lo tanto puede decirse que el flujo génico entre las poblaciones de dentro del Valle de Zapotitlán y fuera de éste, ha sido bajo.

El dendrograma obtenido con base en las  $\Phi_{st}$  entre poblaciones (Fig. 7) muestra las relaciones que existen entre ellas. Se observa que algunas de las poblaciones se agrupan con aquellas más cercanas geográficamente

Cuadro 6. Diversidad genética observada con los 11 primers. El valor de la  $G_{st}$  es de 0.49

	H pop	H sp	Hpop/Hsp	1-Hpop/Hsp
A02	2.67	4.99	0.53	0.46
A10	2.39	5.15	0.46	0.53
A11	2.58	4.50	0.57	0.42
A13	2.45	4.04	0.60	0.39
B05	1.82	3.72	0.48	0.51
B17	2.48	4.62	0.53	0.46
B20	3.42	6.08	0.56	0.43
G06	2.61	4.80	0.54	0.45
C07	2.53	4.99	0.50	0.49
J13	1.40	3.51	0.39	0.60
J20	1.23	3.34	0.36	0.63
Total	25.6	49.80	0.36	0.49

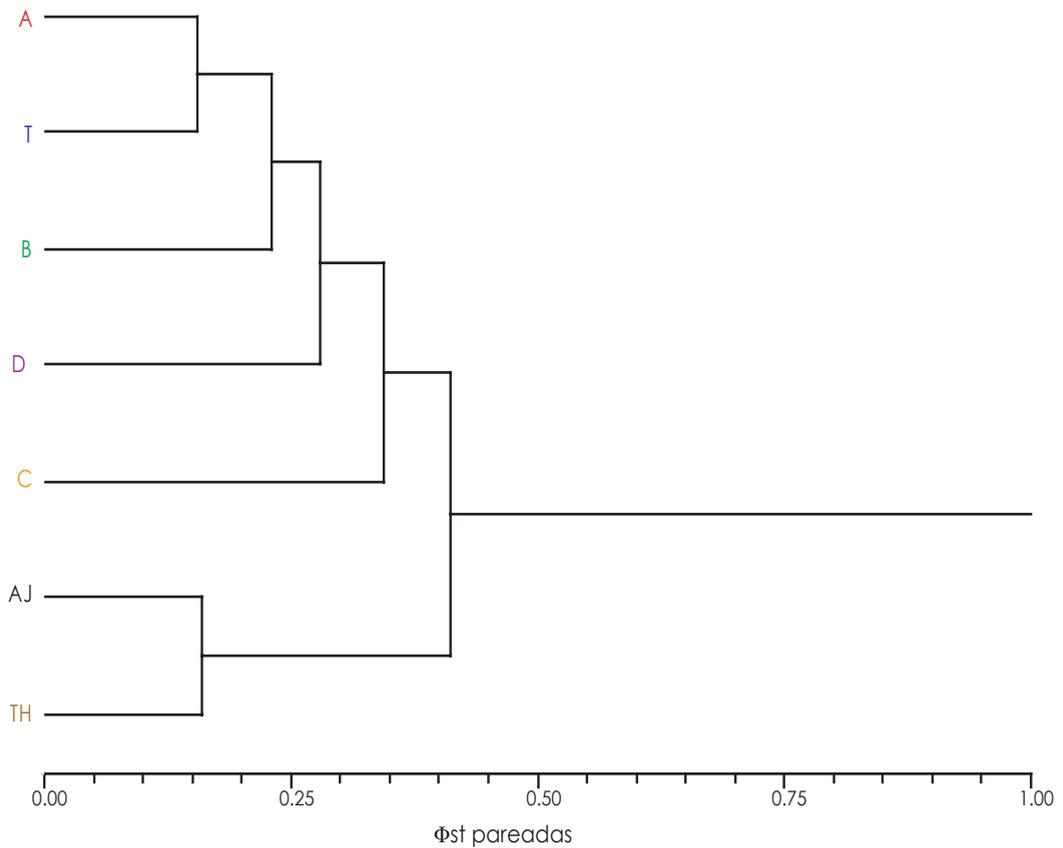


Figura 8. Dendrograma obtenido de las distancias entre poblaciones

(Zona A y Tilapa; Zona C y jardín botánico), mientras que la población B se separa, quizá por tratarse de una zona de transición. Finalmente, los sitios de colecta externos al valle (Ajalpan y Tehuacán) se separan del grupo.

El cuadro 6 muestra los valores obtenidos a partir del índice de Shannon. Los valores de diversidad dentro y entre las poblaciones son muy similares, sin embargo, el primero es mayor, tal como sucede en el AMOVA. El valor de la  $G_{st}$  es de 0.49, ligeramente inferior al promedio de los valores encontrados por otros autores para especies endogámicas (Bussell, 1999).

Cuadro 7. Valores de heterocigocidad obtenidos por los métodos de la raíz cuadrada, de Lynch y Milligan y Zhivotovski.

\* Datos no calculables

Método	Especie	A	B	C	D	T	AJ	TH
Raiz	0.31	0.43	0.44	0.41	0.41	0.41	0.33	0.43
Lynch-Milligan	0.30	0.20	0.19	0.05	0.27	0.23	*	0.20
Zhivotovski	0.32	0.32	0.31	0.29	0.30	0.32	0.36	0.29

Finalmente, en el cuadro 7 pueden observarse los valores de heterocigocidad que se obtuvieron

a través de los 3 métodos aplicados. La baja heterocigocidad mostrada en estos valores es congruente con el bajo flujo génico que se presenta entre los sitios de muestreo.

.....

## Discusión

La biología de la conservación ha ganado importancia a través de los últimos años debido al aumento en las tasas de extinción. Para lograr una conservación eficiente, es preciso entender la historia natural de las especies a conservar, de modo que este conocimiento sirva de base a otras acciones encaminadas a la conservación, que permitan a las especies continuar sus procesos de especiación y adaptación. (Eguiarte y Piñero, 1990)

La evaluación de las respuestas, particularmente del comportamiento de la diversidad genética, de especies vegetales en sitios en diferente estado de conservación aporta datos tanto al conocimiento de la especie en si misma, como al de la dinámica del ecosistema que habita. Esta idea es parte medular del proyecto UBIPRO, el cual pretende entender los procesos involucrados en la degradación de la región del valle de Zapotitlán Salinas y, de esa manera, contribuir al conocimiento de la dinámica de las zonas áridas del país en general (UBIPRO, 2000).

*Agave karwinskii* es una especie que se distribuye en el valle de Zapotitlán Salinas y, dentro de él, en sitios con estado de conservación contrastante; se trata de una especie endémica, oriunda de esta región y sólo localizada fuera de ella en los valles centrales de Oaxaca.

La importancia de esta población aumenta si se toma en cuenta que constituye la población silvestre mas grande de la

que se tiene registro, ya que las poblaciones localizadas mas al sur, han sido intensamente manipuladas durante generaciones por los productores de bebidas alcohólicas (García-Mendoza, comunicación personal).

Esta población está constituida por colonias producto de la reproducción vegetativa, lo que dificulta la colecta de individuos que no estén aparentemente relacionados, aún en el sitio B, donde se registró la mayor cantidad de individuos. El caso extremo de esta situación se presentó en los sitios de Ajalpan y Tehuacán, donde el número de individuos presentes impidió coleccionar individuos físicamente separados como se pretendía.

Sin embargo, de acuerdo con Nybom y Bartish (2000), número de individuos por población y de loci analizados se encuentran dentro de un rango que permite obtener resultados fidedignos a partir de análisis genéticos.

El polimorfismo es, en esencia, el conjunto de diferencias genéticas de la especie y da una idea general de la variabilidad genética presente. En este estudio se encontró un polimorfismo promedio de 49% (Cuadro 5) que nos habla de una población menos variable que las de otras especies de género evaluadas con una metodología similar como *Agave deserti* que presenta un polimorfismo del 68%, (González, 2000), *Agave subsimplex*, del 79%, o *Agave cerluata* con un 78% de polimorfismo (Navarro, 1999).



.....

menos con 2 de los 3 métodos utilizados (cuadro 9), corresponden a aquellos ubicados en regiones más conservadas o con un estado menor de deterioro.

El AMOVA, permite conocer la  $\Phi_{st}$ , un indicador de la diversidad genética y muestra también la distribución de la variabilidad entre las poblaciones o sitios de colecta que se analizan; en este caso, arroja un valor de  $\Phi_{st} = 0.34$ , comparable con la  $F_{st}$  de otras especies de *Agave* con distribución más amplia (Navarro, 1999; González, 2000) e indica que la mayor cantidad de variabilidad (73.20%) se encuentra distribuida dentro de las poblaciones, o entre individuos.

Con base en estos datos, obtiene el valor del flujo génico, que es de 0.47, un valor bajo que se acentúa si se le compara con los valores obtenidos para otras especies: 6.1 para *Agave subsimplex*, 4.3 para *Agave cerulata* y 2.2 para *Agave deserti* (Navarro, 1999; González, 2000).

Los valores de distribución de la población (mayor variación entre individuos que entre poblaciones) podrían sugerir la presencia de una sola población no estructurada, sin embargo, para que tal condición se cumpliera, el flujo génico debería tener un valor mayor que 1. Dado que se encontró un flujo génico menor a 1, lo que sugiere que éste ha sido bajo, se puede hablar de la existencia de un proceso de estructuración incipiente.

.....  
Dos observaciones apoyan esta idea:

Primero. La mencionada agrupación correspondiente a los sitios de colecta y, por ende, a las condiciones edáficas. Dado el valor del flujo génico, la probabilidad de que los alelos presentes en los individuos de cada sitio de colecta permanezcan entre ellos es alta, lo que después de un determinado período de tiempo, teminaría por aumentar la diferenciación existente entre sitios de colecta (o poblaciones?)

Segundo. El género *Agave* presenta tanto reproducción sexual como asexual y que aquella que mas contribuye al flujo génico es la de tipo sexual. De acuerdo con lo observado, puede sugerirse que la reproducción asexual es utilizada con mas frecuencia: durante las salidas al campo que se realizaron en diferentes estaciones del año, se encontró un número muy reducido (menos de 5) individuos con un escapo desarrollado, de los cuales sólo uno de ellos presentó estructuras florales; éstas tampoco se encontraron en la mayoría de los ejemplares existentes en el Herbario Nacional, lo que hace evidente su escasez.

*Agave karwinskii* puede ser polinizado por *Leptonycteris curasoae*, un polinizador eficiente (Howell, 1981, Gentry, 1982); sin embargo, esta eficiencia se ve seriamente afectada por la ausencia de flores, lo que explica el hecho de que el flujo génico sea tan bajo.

Cabe destacar que a pesar de haber colectado individuos que formaban parte de la misma colonia en los stios de Ajalpan y

.....

Tehuacán, se encontraron diferencias entre ellos, entonces, los valores de diversidad genética obtenidos pueden ser producto sólo de la reproducción asexual; un fenómeno que se presenta también en *Agave fourcroydes*, una especie que al parecer ha abandonado por completo la reproducción sexual, en el que existe diversidad genética entre una planta "madre" y sus hijuelos (Infante, et al 2003). Un análisis de diversidad clonal en esta población aportaría mas datos a este respecto.

.....

## Conclusiones

- Los individuos colectados dentro del valle de Zapotitlán se agrupan entre sí, separándose de aquéllos procedentes de Tehuacán y Ajalpan
- Dentro del valle de Zapotitlán, los individuos de *A. karwinskii* se agrupan genéticamente de acuerdo al sitio de colecta
- Los individuos localizados en los sitios de la zona conservada (sitios de colecta A, B, y T) presentan una mayor variabilidad que las que se ubican en la zona con mayor deterioro (sitios C y D)
- La población de *Agave karwinskii* localizada en el valle de Zapotitlán, y sus alrededores tiene una variación genética menor a la de otras especies del género de mayor distribución

.....

## Apéndice 1

### Protocolo de Extracción DNeasy Plant Kit

1. Moler el tejido vegetal (alrededor de 100 mg de clorénqima) con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino. Transferir el macerado y el nitrógeno líquido a un tubo eppendorf y permitir que éste último se evapore. Evitar que el tejido se descongele
2. Añadir 400  $\mu\text{L}$  de buffer AP1 y 2  $\mu\text{L}$  de RNAsa (100mg/mL), agitar vigorosamente.
3. Incubar la mezcla durante 10 min a 65 °C. Mezclar 2 o 3 veces durante la incubación, invirtiendo el tubo.
4. Añadir 130  $\mu\text{L}$  del buffer AP2, mezclar e incubar por 5 min en hielo. Centrifugar durante 15 min a 14000 rpm.
5. Vaciar el lisado a la columna DNeasy shredder (columna lila) y centrifugar durante 2 min a 14000 rpm.
6. Transferir el filtrado a un tubo eppendorf, sin remover la pastilla.
7. Añadir 1.5% volúmenes de buffer AP3/E y mezclar con la pipeta.
8. Colocar 650  $\mu\text{L}$  de la mezcla, incluyendo cualquier precipitado, a la columna DNeasy spin (columna blanca). Centrifugar 1 min a 8000 rpm y desechar el filtrado.

.....

9. Repetir el paso anterior con la muestra restante.

10. Colocar la columna en un tubo colector nuevo, añadir 500  $\mu\text{L}$  de buffer AW a la columna y centrifugar 1 min a 8000 rpm. Desechar el filtrado.

11. Añadir nuevamente 500  $\mu\text{L}$  de buffer AW a la columna y centrifugar 2 min a 14000 rpm para secar la membrana.

12. Transferir la columna a un tubo eppendorf nuevo y añadir 100  $\mu\text{L}$  de buffer AE precalentado a 65 °C. Incubar 5 min a temperatura ambiente y después centrifugar 1 min a 8000 rpm para eluir el DNA.

13. Repetir el paso anterior

14. Almacenar a -20 °C

## Referencias

- Botstein, D. R.L. White, M. Skolnick y R.W. Davis. 1980. Construcción of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331
- Bussell, J.D. 1999. The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst population of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). *Mol. Ecol.* 8: 775 - 789
- Crow, J. F. y K. Aoki. 1984. Group selection for phylogenetic behavioral trait. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 81:6073.6077
- Dahlgren, R.M.T., H.T. Clifford y P.F. Yeo 1985. The families of the monocotyledons. Structure, evolution and taxonomy. Springer-Verlag. Berlin
- Dávila A. P., J. L. Villaseñor, R. Medina, R. Ramírez, A. Salinas, J. Sánchez-Ken y P. Tenorio. 1993. Listados florísticos de México X. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología. UNAM. México.
- Dávila, P., M. C. Arizmendi, A. Valiente-Banuet, J. L. Villaseñor A, Casas y R. Lira. 2002. Biological diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. *Biod. and Cons.* 11: 421–442,
- Dirzo R. 1990. La biodiversidad como crisis ecológica actual ¿Qué sabemos ? en: La evolución biológica (Núñez-Farfán J. y L. E. Eguiarte, compiladores) Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad. 399-412 pp.
- Eguiarte, L.E. 1999. Una guía para principiantes a la genética de poblaciones. En: La evolución biológica. Comp: J. Nuñez-Farfán y L.E. Eguiarte. UNAM – CONABIO. México D.F.

- Eguiarte, L.E. y D. Piñero. 1990. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. Ciencias. No. Especial 4:34-46
- Erschadi, S, G. Haberer, M. Schöniger, R.A. Torres-Ruiz. 2000. Estimating genetic diversity of *Arabidopsis thaliana* ecotypes with amplified fragment length polymorphisms (AFLP). Theor. Appl. Genet. 100:633–640
- Excoffier L, P.E. Smouse y J.M. Quattro. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. Genetics 131: 479-491
- Felsenstein J. 1986-1999. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.5c University of Washington.
- Gabrielsen, T.M. y Brochmann, B. 1998. Sex after all: high levels of genetic diversity in the arctic clonal plant *Saxifraga cernua* using RAPD markers. Mol. Ecol. 7:1701 - 1708
- García,E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köpen. Instituto de Geografía. UNAM. México
- García-Mas, J, M. Oliver, H, Gómez-Paniagua y M.C. de Vicente. 2000. Comparing AFLP, RAPD and RFLP markers for measuring genetic diversity in melon. Theor. Appl. Genet. 101:860-864
- García-Mendoza, A. y B. Galván. 1995. Riqueza de la familia Agavaceae y Nolinaceae en México. Bol. Soc. Bot. México. 56: 45-57
- Gentry, H.S. 1982. Agaves of Continental North América. Tuscon, EUA. University of Arizona Press. 670 p.
- Gil-Vega, K., M. González Chavira, O Martínez de la Vega, J, Simpson y G. Vandemark. 2001. Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. Euphytica 119:335-





UNAM FES Iztacala.

- Oostermeijer, J.G.B., S.H. Lujiten, y J.C.M. den Nijs. 2003. Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation. *Biol. Conserv.* 113 : 389 – 398.
- Otero A. A., M. de la Cruz y K. Oyama. 1997. El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. *Bol. Soc. Bot. México* 60:85-117
- Pejic, I, P. Ajimone-Marsan, M. Morgante, V. Kozumplick, P. Castiglioni, G. Taramino y M. Motto. 1998. Comparative análisis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs. *Theor. Appl. Genet.* 97:1248-1255
- Redowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Limusa. México DF. 431 p.
- Rivera, J. 1983. Estudio citogenético y fitogeográfico de *Agave aff tequilana* y *Agave karwinskii* Zucc. en los valles de Tehuacán, Puebla y Centrales de Oaxaca. Tesis de Licenciatura. UNAM ENEP Iztacala.
- Russell, J.R., J.D. Fuller, M. Macualay, B.G. Hatz, A. Janhoor, W. Powell y R. Wanugh. 1997, Direct comparison of levels of genetic variation among barely accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.* 95:714-722.
- Schmidt K. y K. Jensen. 2000. Genetic structure and AFLP variation of remnant populations in the rare plant *Pedicularis palustris* (Scrophulariaceae) and its relation to population size and reproductive components1 *american journal of botany* 87(5): 678–689.
- Simpson, J. 1997. Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs). *Bol. Soc. Bot. México.* 60:119-122

