



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA
POBLACIONAL DE *Agave xylonacantha* (AGAVACEAE) UTILIZANDO
"INTER SIMPLE SEQUENCE REPEAT" (ISSR) COMO MARCADOR
MOLECULAR.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

RICARDO COLIN NUÑEZ.



DIRECTORA DE TESIS: M en C. MARTHA GRACIELA ROCHA MUNIVE.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A MIS PADRES :

Sra. JULIETA NÚÑEZ DE COLIN (†)

Sr. JOSE FRANCISCO COLIN DE AVILA.

A LA MEMORIA DE MI QUERIDA MADRE QUE EN VIDA ANHELO PRESENCIAR LA TERMINACIÓN DE MIS ESTUDIOS PROFESIONALES. A MI PADRE QUE CON GUSTO Y SATISFACCIÓN ME A BRINDADO SIEMPRE SU APOYO.

A MIS HERMANOS :

JOSE FRANCISCO COLIN NUÑEZ

CARLOS COLIN NUÑEZ

QUIENES SIEMPRE ME HAN APOYADO EN TODO MOMENTO.

El presente trabajo se realizo en el laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, perteneciente al departamento de Ecología Evolutiva, en el Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México, dentro del proyecto de la SEMARNAT-CONACYT 2002-C01-0246 ECOLOGÍA, GENÉTICA Y BIOLOGÍA DE LA CONSERVACIÓN DE LAS POBLACIONES DEL GÉNERO *Agave* EN LA RESERVA DE LA BIOSFERA DE LA BARRANCA DE METZTITLAN, HIDALGO, bajo la dirección de la M en C. Martha Graciela Rocha Munive y en asesoría con el Dr. Luis E. Eguiarte Fruns, quien es el responsable del laboratorio y del proyecto antes mencionado.

AGRADECIMIENTOS

A los Drs. Luis E. Eguiarte y Valeria Souza, por su apoyo, motivación, y por todas las facilidades otorgadas durante y después de la realización de este trabajo. A los integrantes del laboratorio de Evolución Molecular y Experimental: Laura Espinosa, Rene cerritos, Jaime Gasca, Xitlali Aguirre, Andrea González y Antonio Cruz, quienes siempre mostraron disposición y amabilidad para ayudarme y solucionar mis dudas por simples que estas fueran. A Roberto E. Trejo y Manuel Rosas por su ayuda en las colectas, extracciones de DNA y electroforesis.

A los revisores de este trabajo: Dra. Erika Aguirre, Dr. Abisaí García Mendoza, por sus comentarios y aportaciones; al Dr. Luis Eguiarte por las revisiones, comentarios, criticas y sugerencias hechas para enriquecer este trabajo; a mi directora de tesis M en C. Martha Rocha y al Biol. Aldo Valera por su amabilidad, disposición a enseñarme, y por toda la ayuda recibida para poder realizar y concluir este proyecto.

También quiero dar las gracias a todos los integrantes de la Reserva de la Biosfera de la Barranca de Metztitlan , muy especialmente a Don Erasto Badillo y a su esposa Andrea, por sus enseñanzas, amistad y hospitalidad. A todas aquellas personas que realizaron las colectas de las poblaciones: Martha Rocha, Aldo Valera, Luis Egiarte, Andrea González, Roberto Trejo y Manuel Rosas. A la Biol. Gabriela Guerrero del Centro de Investigaciones en Ecosistemas (CIECO) de la UNAM, por la elaboración del mapa de las poblaciones utilizadas en el análisis de este estudio.

Especialmente quiero expresar mi gratitud a Martha y Aldo, por sus aportaciones, paciencia y estímulo durante la preparación y corrección de este trabajo, por su honestidad y confianza; quiero agradecer a Jaime, Manuel, Roberto y Quena, por sus comentarios y ayuda permanente, a Lau, Rene y Toño por su apoyo moral, así como también a los demás integrantes del laboratorio de Evolución Molecular y Experimental: Nuria, German, Esmeralda, Sandra, Enrique y Miguel, que aunque no tengo mucho tiempo de conocerlos me han brindado su hospitalidad y apoyo moral.

A todos mis grandes amigos de la Facultad de Ciencias: Edgar, José Luis, Jerónimo, María Luisa, Liliana, Mónica, Carla, quienes me apoyaron en los momentos difíciles de mi vida, me dieron consejos, me brindaron su amistad y por todas las vivencias y experiencias compartidas a lo largo de la carrera, a Flavio y Cristian, por su amistad y apoyo.

A Diana, por todos los momentos compartidos, por escucharme, entenderme y sobre todo por brindarme su amistad y cariño.

En el ámbito familiar, quiero agradecerles a mis padres, quienes sin escatimar esfuerzo alguno sacrificaron gran parte de su vida para formarme y educarme; a mis dos hermanos, quienes me han enseñado que con esfuerzo y dedicación se pueden alcanzar las metas que uno se fije.

Me resulta difícil de incluir y de recordar a todos, seguramente he olvidado mencionar a varios grandes amigos, pero tengan por seguro que no a sido a propósito y espero me disculpen.

Finalmente quiero expresar mi más sincero agradecimiento y gratitud a TODAS aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron en la realización de esta tesis, aportando sugerencias, ideas y correcciones al manuscrito.

A todas ellas, **“MUCHAS GRACIAS.”**

Atentamente.

RICARDO COLIN NUÑEZ.

INDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 La Genética de Poblaciones: una herramienta para entender los procesos volutivos.....	3
1.2 Variación genética: Métodos y medidas.....	6
1.3 Estructura Genética de las Poblaciones Naturales.....	7
1.4 Distancia Genética.....	9
1.5 Inter simple sequence repeats (ISSR's).....	10
1.6 La familia <i>Agavaceae</i> y la importancia del género <i>Agave</i>	12
1.7 <i>Agave xylonacantha</i>	14
2. OBJETIVOS.....	18
Objetivo general.	18
Objetivos particulares.....	18
3. MATERIAL Y METODO	19
3.1 Poblaciones utilizadas.	19
3.2 Extracción de DNA.....	21
3.3 Amplificación del DNA por medio de ISSR's.....	21
3.4 Variación y estructura genética.	22
3.5 Flujo génico.....	24
3.6 Distancia genética y aislamiento por distancia.....	24
3.7 Estructura genética poblacional a partir del análisis de la varianza (AMOVA).....	26
4. RESULTADOS	28
4.1 Variación genética.....	29
4.2 Estructura genética.	31
4.3 Distancia genética y aislamiento por distancia.....	32
4.4 Estructura genética poblacional a partir del análisis de la varianza (AMOVA).....	34
5. DISCUSIÓN.....	36
5.1 Inter simple sequence repeats (ISSR's).....	36
5.2 Diversidad genética y estructura poblacional.....	37
5.3 Ecología y genética de poblaciones.....	42
5.4 Flujo génico y distancias genéticas.	44
5.5 Consideraciones finales.....	47
6. CONCLUSIONES.....	49
APÉNDICE 1	51
Protocolo de extracción de DNA para <i>Agave xylonacantha</i>	51
Reactivos:	52
APÉNDICE 2	53
Reacciones para PCR de <i>A. xylonacantha</i>	53
APÉNDICE 3	54
Frecuencias alélicas por loci para cada una de las poblaciones.....	54
LITERATURA CITADA.....	56

RESUMEN

Agave xylonacantha pertenece al subgénero *Littaea* y al grupo Marginatae de la familia Agavaceae. En el presente trabajo se utilizaron los ISSR's (Inter Simple Sequence Repeats) como marcadores moleculares, y se realizó un análisis de la diversidad y estructura genética. Se estudiaron cuatro poblaciones localizadas en los estados de Querétaro, Hidalgo y San Luis Potosí, abarcando la mayor parte del área de distribución de esta especie. Se obtuvieron un total de 65 loci; la población que presentó el mayor número de loci fue Metztlán (Hgo.) con 58, a ésta le siguió la población de Tolantongo (Hgo.) con 57 y las que presentaron el menor número de loci fueron Ciudad Valles (San Luis Potosí) y el Lindero (Qro.) con 50. Los datos obtenidos en este trabajo mostraron que *A. xylonacantha* presenta una variación genética moderada, se obtuvo un valor de diversidad genética de $H = 0.19$ y un porcentaje de loci polimórficos de $P = 67.7 \%$. La estructura poblacional se obtuvo en base al coeficiente de coancestría (θ), encontrando que esta especie presenta una estructuración genética de $\theta = 0.063$ (con un intervalo de confianza de 95 % entre $\theta = 0.040$ y 0.089). El flujo génico se calculó a partir del valor de θ , y nos dio un resultado de $Nm = 6.61$, lo cual indica que el flujo génico es alto. Se obtuvo un valor bajo de distancia genética entre los pares de poblaciones ($D = 0.0149$). Entre la población de Tolantongo y la de El Lindero se registró la menor distancia ($D = 0.0094$), mientras que la distancia más alta se registró entre las poblaciones de Metztlán y El Lindero ($D = 0.0187$). Con respecto a la correlación de la latitud contra la heterocigosis, observamos que la menor diversidad se encuentra en las poblaciones del norte y la mayor diversidad en las poblaciones del sur. La mayor diversidad genética se encuentra en la población de Metztlán, en la región donde las poblaciones de esta especie son más abundantes, sugiriéndonos que esta zona representa un centro importante de diversidad para la especie. Con la prueba de heterogeneidad realizada se encontraron diferencias significativas para 31 de los 65 loci. En el análisis de aislamiento por distancia realizado mediante la prueba de Mantel, se observó que esta especie no sigue un modelo de aislamiento por distancia ($r = 0.3062$ y $p = 0.3310$). Los resultados obtenidos con el análisis de varianza molecular (AMOVA), nos indican que el menor porcentaje de la variación se encuentra repartida entre los grupos con el 1.49 %, entre las poblaciones dentro de los grupos se obtuvo el 7.23 % y el mayor porcentaje de la variación se encuentra dentro de las poblaciones con el 91.29 % de la variación. Concluimos que *A. xylonacantha* presenta una variación genética moderada y una baja estructura poblacional, posiblemente asociada a la movilidad de sus polinizadores y a la historia reciente de la especie, sin embargo son necesarios estudios de la ecología de la polinización, así como el uso de otros marcadores moleculares que puedan avalar estas hipótesis.

ABSTRACT

Agave xylonacantha belongs to the subgenus *Littaea* and to the group Marginatae in the Agavaceae family. In this work we used ISSR's (Inter Simple Sequence Repeats) as a molecular marker to study the genetic diversity and structure of this species. Four populations were studied from the states of Querétaro, Hidalgo and San Luis Potosí, encompassing the majority of the species' distribution range. We obtained a total of 65 loci; Metztlán (Hgo) was the population with more loci (58), followed by the Tolantongo (Hgo.) population with 57 loci, and finally Ciudad Valles (San Luis Potosí) and El Lindero (Qro.) had 50 loci each. We showed that *A. xylonacantha* had a moderate genetic variation of $H = 0.19$ and a percentage of polymorphic loci of $P = 67.7\%$. Population structure was obtained using the coancestry coefficient (θ), and we found that this species has a genetic structure of $\theta = 0.063$ (with a confidence interval of 95 %, from $\theta = 0.040$ to 0.089). Gene flow was estimated from θ and we obtained a value of $Nm = 6.61$, which suggest a high level of gene flow. Values of genetic distance were low between population pairs, with an average of $D = 0.0149$. The shortest distance was found between Tolantongo and El Lindero ($D = 0.0094$), while the largest was found between Metztlán and El Lindero populations ($D = 0.0187$). We found a positive correlation between latitude and genetic diversity since the northern populations possessed less genetic variation than the southern populations. The biggest amount of genetic diversity was found in the Metztlán populations, which also is the region where populations are more abundant, suggesting that this zone is an important center of diversity for the species. Using a heterogeneity test, significant differences were found for 31 out of 65 loci. Isolation by distance analysis was performed with a Mantel test and indicated that this species does not follow an isolation by distance model ($r = 0.3062$ y $p = 0.3310$). The analysis of molecular variance (AMOVA) indicated that 1.49 % of the variation was found among groups, 7.23 % among populations within groups and 91.29 % within groups. We concluded that *A. xylonacantha* has a moderate genetic variation and a low population structure. This is probably due either to the high mobility of the pollinators or to the recent history of the species. Nevertheless, we still need to perform pollination ecology studies and to implement the use of new molecular markers to support any of these hypotheses.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La Genética de Poblaciones: una herramienta para entender los procesos evolutivos.

La evolución orgánica es consecuencia de dos procesos fundamentales: por un lado tenemos a la **especiación**, por medio de la cual se originan nuevas entidades evolutivas, nuevas especies y gracias a ella existe la gran diversidad que observamos en el mundo viviente; y por el otro encontramos a la **adaptación**, que es el mecanismo que habilita a las poblaciones para resolver problemas que les presenta el ambiente, ya que hace que una población adquiera características favorables en términos de sobrevivencia y fertilidad con respecto a un medio dado (Eguiarte, 1999).

A principios del siglo XIX el naturalista J. B. Lamarck propuso que la adaptación se debía a que los organismos tenían una tendencia innata a la perfección, de esta manera, si el ambiente presentaba variaciones, los organismos cambiaban con él; pero esta teoría no fue aceptada por ser muy idealista y no presentar pruebas para apoyarla (Eguiarte, 1999).

No fue hasta que Alfred R. Wallace y Charles Darwin propusieron la teoría de la evolución orgánica por medio de la selección natural, y se publicara el libro *El origen de las especies* de Darwin cuando la evolución fue vista como adaptación y diversificación de las especies por medio del mecanismo de selección natural, explicada en términos temporales y geográficos dentro de un proceso gradual (Niklas, 1997). Estas ideas eran muy sencillas y surgían de las observaciones cotidianas: Darwin y Wallace proponían que hay competencia interespecífica en las poblaciones naturales, en esta competencia algunos individuos tienen cualidades que aumentan su sobrevivencia y/o reproducción, en consecuencia, éstos dejan más hijos, quienes adquirirán y perpetuarán por medio de la herencia esas cualidades exitosas (Eguiarte, 1999).

Sin embargo, no basta con entender la selección natural para explicar la adaptación (Eguiarte, 1999). La comprensión de la evolución orgánica requería de una teoría genética que pudiera cuantificar y explicar cómo las características son transmitidas de padres a hijos, ya que la aparición de diferencias entre los miembros, así como su herencia, son indispensables para el proceso evolutivo y para la concepción de la teoría. Esta teoría genética fue aportada por Gregor Mendel, gracias a sus trabajos realizados sobre la herencia de los caracteres en los chícharos a mediados del siglo XIX; pero fue hasta los años de 1920 y 1930 que Ronald Fisher, John B. S. Haldane y Sewall Wright interpretaron la teoría propuesta por Darwin en términos de la genética mendeliana, dando origen a la disciplina que hoy conocemos como genética de poblaciones (Provine, 1971; Eguiarte, 1999; Hughes, 1999).

La genética de poblaciones nos ayuda a entender a la evolución en términos de adaptación y especiación, a partir del comportamiento que tienen los genes en las poblaciones, y considera a éstos como las unidades sobre las que actúan las diferentes fuerzas evolutivas, como la selección natural, la endogamia, la migración, la mutación y la deriva génica (Hartl y Clark, 1997). Para comprender esta evolución a nivel genético es necesario determinar los niveles de variación genética en las poblaciones, así como el origen de esta variación, su mantenimiento, distribución y cuál es su importancia evolutiva (Hartl y Clark, 1989).

La base de la genética de poblaciones es la ley del equilibrio de Hardy-Weinberg, a partir de la cual se estudian los efectos de las fuerzas evolutivas en la variación genética inicial, la cual no es más que un modelo que describe en base a las leyes de Mendel, la relación que hay entre las frecuencias alélicas y genotípicas en un estado de equilibrio de un solo locus, en una población diploide, que se entrecruza aleatoriamente (Gillespie, 1998). Para que se de este equilibrio deben cumplirse las siguientes condiciones: 1.- Que el tamaño de las poblaciones sea muy grande, 2.- Que los apareamientos sean al azar, 3.- Que todos los alelos sean igualmente competentes para dejar hijos y 4.- Que no lleguen alelos de fuentes externas (Eguiarte, 1999; Hedrick, 2000). En otras palabras, si los supuestos

anteriores se llegan a cumplir nada cambiaría y las frecuencias de los genes permanecen iguales en todas las generaciones, es decir, “**no hay evolución**” (Eguiarte, 1999).

En términos generales es difícil que todas las condiciones del equilibrio de Hardy-Weinberg puedan cumplirse siempre en todas las poblaciones, ya que la mayoría de las poblaciones son dinámicas espacial y temporalmente, es decir, van cambiando de densidad, localidad y tamaño conforme pasa el tiempo, además, las poblaciones pueden llegar a fragmentarse y formar así varias poblaciones o incluso unirse con otras poblaciones. Basta con que alguna de las condiciones no se cumpla para que las frecuencias alélicas cambien y por consecuencia también las frecuencias fenotípicas (Hartl y Clark, 1989; Eguiarte, 1999; Hedrick, 2000).

Una violación a la primera condición de la ley de Hardy-Weinberg es la *deriva génica* y se produce por que las poblaciones naturales son limitadas y presentan pocos individuos, originando errores de muestreo de una generación a otra, esto es, algunos individuos producen mayor número de hijos que otros sin que intervenga la selección natural. Estos errores se incrementan entre más chica sea la población, cambiando con mayor rapidez las frecuencias alélicas. De esta manera se generan dos efectos: por un lado se producen cambios en las frecuencias alélicas al azar, y por el otro, se fijan o se pierden alelos. Para determinar la importancia que puede llegar a tener la deriva génica en las poblaciones, **no** se debe tomar en cuenta a todos los individuos que la conforman, sino el número de los individuos que se están reproduciendo, a esto se le llama *tamaño efectivo de la población*, representado por N_e (Eguiarte, 1999; Hedrick, 2000).

La vulneración al segundo supuesto de esta ley, es decir, a los apareamientos al azar, se le conoce como *endogamia*, y se da porque los organismos que integran las poblaciones muchas veces tienen capacidad de dispersión o colonización muy limitadas, originando cambios en los genotipos, aumentando las frecuencias de los homocigos y reduciendo la de los heterocigos (Eguiarte, 1999).

Si se infringe el tercer supuesto (que todos los alelos sean igualmente competentes para dejar descendencia), se tiene la *selección natural* (Eguiarte, 1999), que se presenta cuando los distintos genotipos no poseen la misma eficiencia para dejar hijos y/o sobrevivir. Esta eficiencia se interpreta en términos de sobrevivencia y fecundidad diferencial, que se cuantifica por medio de la adecuación, denominada w , la cual es una medida que indica la eficiencia de un genotipo dado y señala cuantos hijos en promedio deja un portador de ese genotipo (Eguiarte, 1999; Hedrick, 2000).

Por último, dentro del cuarto supuesto (que no lleguen alelos de fuentes externas), se puede quebrantar de dos maneras: una es por la entrada de nuevos individuos de otras poblaciones, a lo que se le llama *migración* o *flujo génico*, la cual depende tanto de la tasa de migración, denotada como m y definida como la proporción de migrantes, es decir, individuos nuevos que llegan a la población, y de las frecuencias alélicas de los individuos migrantes; si el flujo génico entre las poblaciones es muy alto se provocará un efecto de homogeneización entre las poblaciones y si continua por mucho tiempo eventualmente las poblaciones quedaran idénticas (Eguiarte, 1999). La otra manera en la que se puede ver afectado este supuesto es por la formación de nuevos alelos, es decir la *mutación*, la cual es una fuerza evolutiva muy importante para entender el proceso adaptativo, es el origen de toda novedad y variación genética, ya que es la fuente primaria del material de la evolución (Eguiarte, 1999).

1.2 Variación genética: Métodos y medidas.

En las poblaciones naturales la variación genética se ve afectada por las fuerzas evolutivas como la selección, deriva génica, endogamia, flujo génico y mutación, esta última es considerada como la fuente principal de aumentar la variación, en cambio la endogamia y la deriva génica la disminuyen. Tanto la selección como el flujo génico pueden aumentar o reducir los niveles de variación genética, dependiendo de cada situación en particular (Hedrick, 2000).

A mediados del siglo XX se empezaron a utilizar las primeras herramientas para documentar la variación genética dentro y entre las poblaciones naturales (Hedrick, 2000); la primera herramienta desarrollada para obtener buenas estimaciones de la variación genética en los años 1960 fueron las isoenzimas, en los años de 1970 hacen su aparición las primeras secuencias de aminoácidos y hacia 1980 las secuencias de DNA (Harris, 1966; Lewontin y Hubby, 1966; Lewontin, 1974). Estas herramientas y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés: “Polymerase Chain Reaction”) han revolucionado los métodos de análisis en las últimas décadas. Actualmente se han desarrollado marcadores inespecíficos que generan información sin previo conocimiento de las secuencias de genes de las especies que se quieran estudiar. Entre las técnicas más utilizadas encontramos a los RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA, William et al., 1990); los AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms, Vos et al., 1995) y los ISSR (Inter- simple sequence repeats, Zietkiewicz et al., 1994) que utilizan marcadores inespecíficos para amplificar regiones al azar en el genoma, obteniendo un patrón variable de bandas que representan las regiones amplificadas (Wolfe y Liston, 1998).

Las medidas que más se utilizan para cuantificar los niveles de variación genética de una población son la Heterocigosis esperada (H_E), (a la cual Nei (1987) llamó diversidad genética), es equivalente a la proporción de loci heterocígonos en un individuo escogido al azar; y el porcentaje de loci polimórficos (P), se refiere a la proporción de loci en los cuales el alelo más común se encuentra en una frecuencia igual o menor a 0.95.

1.3 Estructura Genética de las Poblaciones Naturales.

La estructura de las poblaciones consiste en dos partes distintas pero interrelacionadas, por un lado tenemos la estructura demográfica y por el otro la estructura genética. La estructura genética está determinada por los procesos genéticos como la selección, la recombinación y la mutación. Para determinar la estructura genética, es necesario comprender el patrón de variación genética de la especie, es decir, evaluar los genotipos de los diferentes individuos (Slatkin, 1994). Esta estructura se ve afectada por varios factores, entre los cuales podemos mencionar los ecológicos, geográficos y conductuales (en

animales), provocando que haya diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas de una región a otra, esto se debe a que las especies o las poblaciones no forman un continuo, ni suelen formar unidades panmícticas donde los individuos se aparean al azar (Excoffier, 2001). Los factores ecológicos y demográficos que afectan la estructuración de las poblaciones son el tamaño, el número y la edad de los individuos que contiene cada población, el sistema reproductivo de la especie así como su capacidad de dispersión (Hartl y Clark, 1997).

Cuando una población esta subdividida geográficamente, por lo común presenta diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas en las diferentes subpoblaciones que la conforman. Dichas diferencias dependen principalmente de los niveles de flujo génico que exista entre las subpoblaciones, es decir si los niveles de flujo génico son altos la variación genética de las subpoblaciones tenderá a homogenizarse. Por el contrario, si los niveles de flujo génico son bajos, la selección natural, la deriva génica y la mutación pueden originar una diferenciación genética mayor entre las subpoblaciones (Nei, 1987).

Para evaluar el efecto que tiene la subdivisión en las poblaciones se han desarrollado varios métodos y el más utilizado es el de los estadísticos F propuestos por Wright (1951), quien define tres coeficientes F distintos, basados en un modelo de un locus con dos alelos, relacionados directamente con los tres niveles que presenta una población subdividida, es decir, distribuyendo la variación genética a nivel poblacional (T), de subpoblaciones (S) y a nivel individual (I) (Hartl y Clark, 1989; Hedrick, 2000).

La F_{ST} , conocida como índice de fijación subpoblacional, mide la diferenciación genética entre las poblaciones. Los valores de F_{ST} van de cero cuando no hay diferenciación entre las subpoblaciones, es decir se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, hasta uno, cuando se han fijado los diferentes alelos en las subpoblaciones (Wright, 1969; Hartl y Clark, 1997).

La F_{IS} , también llamada coeficiente de endogamia, mide la reducción en la heterocigosis de un individuo debido al apareamiento no azaroso dentro de su subpoblación. La F_{IT} es

denominada como coeficiente de endogamia total de un individuo y mide la reducción en la heterocigosis de ese individuo con respecto a la población total (Hartl y Clark, 1989); si los valores son positivos indican una deficiencia de heterócigos y si son negativos un exceso de heterócigos (Hedrick, 2000).

La G_{ST} propuesta por Nei (1973), se define como la proporción de diversidad genética que se encuentra entre poblaciones y se considera análogo a la F_{ST} en el contexto de loci multialélicos.

Otro parámetro que se ha utilizado para medir la diferenciación genética entre poblaciones es el llamado coeficiente de coancestría (θ), propuesto por Cockerham (1969), el cual representa la probabilidad de que dos genes tomados al azar provenientes de diferentes individuos sean idénticos por descendencia y es equivalente a la F_{ST} ; la coancestría se incrementa con el tiempo, de tal manera que indica que tan diferenciadas están las poblaciones (Weir, 1996).

1.4 Distancia Genética.

Las medidas de distancia genética permiten evaluar la cantidad de variación compartida entre grupos, ya que las similitudes o diferencias en el tipo, cantidad y patrón de variación genética entre poblaciones puede ser el resultado de muchos factores. El que dos poblaciones sean similares puede deberse a una separación reciente, al flujo génico entre ellas, a su gran tamaño (hay poca deriva génica) o a presiones de selección semejantes que hayan afectado a loci similares en ambas poblaciones. Por otra parte, si dos poblaciones son diferentes se puede deber a que esas poblaciones se separaron hace mucho tiempo y ya no presentan flujo génico entre ellas, también se puede deber a que la deriva génica ha generado grandes diferencias o posiblemente a que haya diferentes presiones selectivas entre las dos poblaciones (Hedrick, 2000). La medida más utilizada es la identidad de Nei, denominada I , que evalúa la diferencia entre las frecuencias alélicas entre poblaciones (Nei, 1972).

Cuando una especie presenta una distribución geográfica se espera que las poblaciones más cercanas geográficamente también sean las más cercanas genéticamente. A este principio se le conoce como aislamiento por distancia, y nos dice que los individuos tienden a aparearse con aquellos más cercanos geográficamente de lo que se esperaría al azar (Wright, 1943).

1.5 Inter simple sequence repeats (ISSR's).

Los primeros marcadores desarrollados a finales de los 70 se basaron en la identificación de proteínas e isoenzimas por medio de electroforesis en geles de almidón o poliacrilamida. Con ellos se abrió el conocimiento de la estructura y heterogeneidad genética entre diferentes especies, variedades y poblaciones de distinto origen geográfico. Pero esta técnica tenía una limitación muy importante: no era capaz de detectar suficiente polimorfismo entre variedades o especies próximas, debido a que las proteínas son el resultado de la expresión génica, que puede ser distinta de unos tejidos a otros, de una etapa de desarrollo a otra, de un medioambiente a otro y de una época del año a otra. Los avances de la tecnología del DNA recombinante han permitido el desarrollo de los marcadores moleculares basados en el DNA, que han cobrado auge desde el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Entre las técnicas más utilizadas en los análisis de genética de poblaciones encontramos a los RAPD's (Williams et al., 1990), AFLP's (Vos et al., 1995) y a los microsatélites o SSR's (simple sequence repeats) (Tautz, 1989; Staub et al., 1996; Gupta y Varshney, 2000). Cada una de estas técnicas posee ventajas y desventajas, por ejemplo los RAPD's son fáciles y rápidos de desarrollar por el tipo de secuencias arbitrarias de los *primers*, generan información sin previo conocimiento de las secuencias de genes de las especies que se quieran estudiar, son muy polimórficos, pero poseen baja reproducibilidad y poca especificidad, debido a las bajas temperaturas de alineación de los *primers* (Karp et al., 1997; Hansen et al., 1998; Jones., et al., 1997; Virk et al., 2000). Los AFLP's son altamente reproducibles, presentan gran número de loci polimórficos y al igual que los RAPD's no se necesita del conocimiento previo de la secuencia de DNA, pero esta técnica resulta ser muy laboriosa y presenta un alto costo operacional y de implementación (Karp et al., 1997). Los microsatélites son secuencias simples repetidas ubicadas entre

secuencias no repetitivas del genoma nuclear de organismos eucariontes y pueden ser di-, tri-, tetra- y pentanucleótidos (Zietkiewicz et al., 1994; Wolfe, 2000; Pradeep et al., 2002), son específicos y muy polimórficos, pero se requiere del conocimiento de la secuencia genómica para diseñar *primers* específicos y tienen un alto costo para su desarrollo (Karp et al., 1997; Jones., et al., 1997).

Para superar esas limitaciones y desventajas de las técnicas antes mencionadas se desarrolló una nueva técnica a mediados de los años 90's llamada ISSR (Inter- simple sequence repeats), (Zietkiewicz et al., 1994), la cual es empleada en estudios de diversidad genética, análisis filogenéticos, mapeo genómico y en estudios de biología evolutiva.

Los ISSR son marcadores semiarbitrarios amplificados por medio de PCR que nos permiten evaluar los niveles de variación genética en regiones internas de los microsatélites. La amplificación ocurre a partir de un oligonucleótido o *primer* complementario a un microsatélite, que está diseñado para ensamblarse a las secuencias repetidas que pueden ser dinucleótidos o trinucleótidos. Los *primers* de los ISSRs incluyen además de las secuencias repetidas, un par de bases arbitrario en el extremo 3'. Estos nucleótidos extras juegan un papel muy importante, ya que sirven como anclas, asegurando que la amplificación se lleve a cabo siempre desde el extremo 5' del microsatélite, en donde el *primer* (oligonucleótido) sitúa dos regiones separadas por una secuencia genómica amplificable del DNA blanco, dando como resultado una molécula con un tamaño particular, esto es, su peso molecular en pares de bases, y es considerada como un locus que representa el fragmento de DNA entre los microsatélites (Bornet y Branchard, 2001).

El resultado final del PCR es un patrón variable de bandas que representan las regiones amplificadas, el cual es considerado como la huella genética de cada individuo. Los polimorfismos que se obtienen son originados gracias a los cambios en los nucleótidos que sirven como anclas y a la variación en tamaño de los productos amplificados.

Este tipo de marcador presenta la desventaja de que sólo se obtiene la presencia o ausencia de las bandas, dificultando la posibilidad de distinguir entre los individuos

heterócigos e individuos homócigos dominantes. Para cada locus, el alelo positivo es la presencia de la banda y domina sobre el alelo nulo o ausencia de la banda. Estos últimos son los individuos homócigos recesivos. Por lo anterior, a este tipo de marcadores se les considera como marcadores dominantes (Zietkiewicz et al., 1994).

1. 6 La familia *Agavaceae* y la importancia del género *Agave*.

La familia *Agavaceae* es un grupo de plantas suculentas con hojas agrupadas en forma de roseta con tonalidades verdes, con matices ligeramente azulados (glaucas) y pueden presentar márgenes lisos o con dientes de diferentes tamaños. Sus flores son grandes, bisexuales y nacen de un escapo floral, sus frutos son triloculares con semillas planas de color negro (García-Mendoza y Galván, 1995). Esta familia fue propuesta por Endlicher en 1841, y esta conformada por los géneros *Agave*, *Yucca*, *Hesperaloe*, *Furcraea*, *Beschorneria*, *Manfreda*, *Polianthes* y *Prochnyanthes*, los cuales presentan estrategias de ciclo de vida contrastantes, ya que algunas especies son iteróparas, es decir que se pueden reproducir cada año, mientras que otras sólo se pueden reproducir una sola vez en su vida para después morir, a estas especies se les conoce como semélparas.

Los géneros que conforman a esta familia presenta una notable diversidad de morfologías florales y de polinizadores, entre los cuales se pueden encontrar murciélagos, abejas, colibríes y polillas (Eguiarte, et al., 2000). Las especies de esta familia son endémicas del continente americano y los ocho géneros se encuentran en México, siendo nuestro país el que presenta el mayor número de especies, las cuales se encuentran asociadas principalmente a zonas áridas y semiáridas del centro de México, el cual es considerado como el centro de origen de la familia (García-Mendoza y Galván, 1995; Eguiarte, et al., 2000).

De los ocho géneros que conforman a esta familia, el que presenta un mayor número de especies reportadas es el género *Agave*, con alrededor de 200 especies y 47 categorías infraespecíficas, para un total de 247 taxa, de los cuales 150 especies se encuentran presentes en nuestro país (García-Mendoza, 2002). La complejidad taxonómica que

presenta este género lo ha hecho objeto de varios estudios, entre los cuales podemos mencionar los realizados por Berger en 1915, donde se reconocen 256 especies; los de Trelease en 1920, que reconoce 170 especies y el de Gentry en 1982, donde se reconocen 136 especies.

Gentry (1982) divide a este género en dos subgéneros: 1) *Agave* con 102 especies distribuidas en 12 grupos, se distribuye desde California a Texas y sur de Florida, hasta Perú, Colombia y Venezuela, incluyendo las Antillas y Centroamérica, presenta una inflorescencia en panícula y las flores se encuentran en grandes agregados umbelados sobre pedúnculos laterales, y 2) *Littaea* representado por 8 grupos y 53 especies, presenta una inflorescencia de apariencia espigada y flores en pares, tiene una distribución más restringida: se distribuye desde Utah, Nevada y Arizona en los Estados Unidos hasta Guatemala, sin incluir los estados de Baja California y Yucatán (Gentry, 1982).

En México las especies de *Agave* se encuentran desde el nivel del mar hasta los 3400 msnm, siendo entre los 1000 y 2000 msnm donde se encuentra el mayor número de especies. Los agaves son comunes en cañadas y márgenes de ríos escarpadas expuestas a la luz del sol. Las zonas con mayor diversidad de especies son las cuencas en donde crecen de manera abundante en sus laderas. Los principales ambientes son el desierto o chaparral, el bosque de pino-encino y el bosque tropical deciduo. Los tipos de suelo donde crecen los agaves van desde los formados por rocas ígneas ácidas, hasta los básicamente calcáreos de origen marino (García-Mendoza, 2002).

La riqueza en especies endémicas de este género en nuestro país puede deberse a la gran heterogeneidad de los hábitats, los cuales difieren en clima, geología, altitud, topografía, suelos, etcétera, así como a las propiedades intrínsecas de cada taxón, como puede ser la tolerancia ecológica, la plasticidad genética, capacidad de dispersión, la germinación de sus semillas y a la variedad de interacciones que presenta con otros organismos, principalmente con sus polinizadores, siendo el valle de Tehuacán-Cuicatlán la región que presenta el mayor número de endemismos; de las 15 especies que presenta, 8 son endémicas (García-Mendoza, 2002).

El uso que se le da a los agaves es muy amplio y data desde la época prehispánica. Desde entonces se obtenían afiladas puntas, papel, cuerdas e hilos con los que se hacían prendas de vestir y calzado. En la actualidad algunas especies se utilizan para elaborar bebidas alcohólicas entre las cuales podemos mencionar el pulque, el mezcal y el tequila; en la elaboración de cercas naturales, otras por sus propiedades curativas son utilizadas como medicamento y los botones de las inflorescencias son empleados en la elaboración de alimentos.

1.7 *Agave xylonacantha*.

Pertenece al subgénero *Littaea*, y dentro de éste al grupo Marginatae que incluye 21 especies distribuidas desde Nuevo México hasta Guatemala, de las cuales podemos mencionar a *A. garciae-mendozae*, *A. difformis*, *A. victoriae-reginae* y *A. lechuguilla* entre otros (Gentry, 1982; Galván y Hernández, 2002). Este grupo se caracteriza por presentar hojas rígidas con márgenes córneos y dientes grandes o pequeños, con inflorescencia en espiga, las flores son pequeñas y se encuentran en grupos de dos o tres, el tubo es corto, los tépalos son más largos que el tubo, los filamentos se insertan en el segmento basal y las cápsulas son oblongas (Gentry, 1982).

Agave xylonacantha Salm. Presenta rosetas abiertas, simples que miden hasta 1.3 m de diámetro. Tiene hojas extendidas de 45 a 90 cm de largo por 5 a 10 cm de ancho, en forma de espada delgada y estrecha hacia los extremos (ensiforme-lanceolada), más anchas al centro, largas y se adelgazan paulatinamente hasta terminar en una punta delgada (acuminadas), rígidas, de planas a cóncavas en el haz, redondas en el envés, son de color verde grisáceo a amarillento, a veces de color verde claro con matiz ligeramente azulado (glaucas), pueden presentar una banda pálida al centro, con un margen córneo continuo. Los dientes son muy irregulares y confluentes, aplanados, frecuentemente tri – y penta – cuspidados, de 2 a 5 cm de separación entre dientes, de 8 a 15 mm de largo, gris claro, la

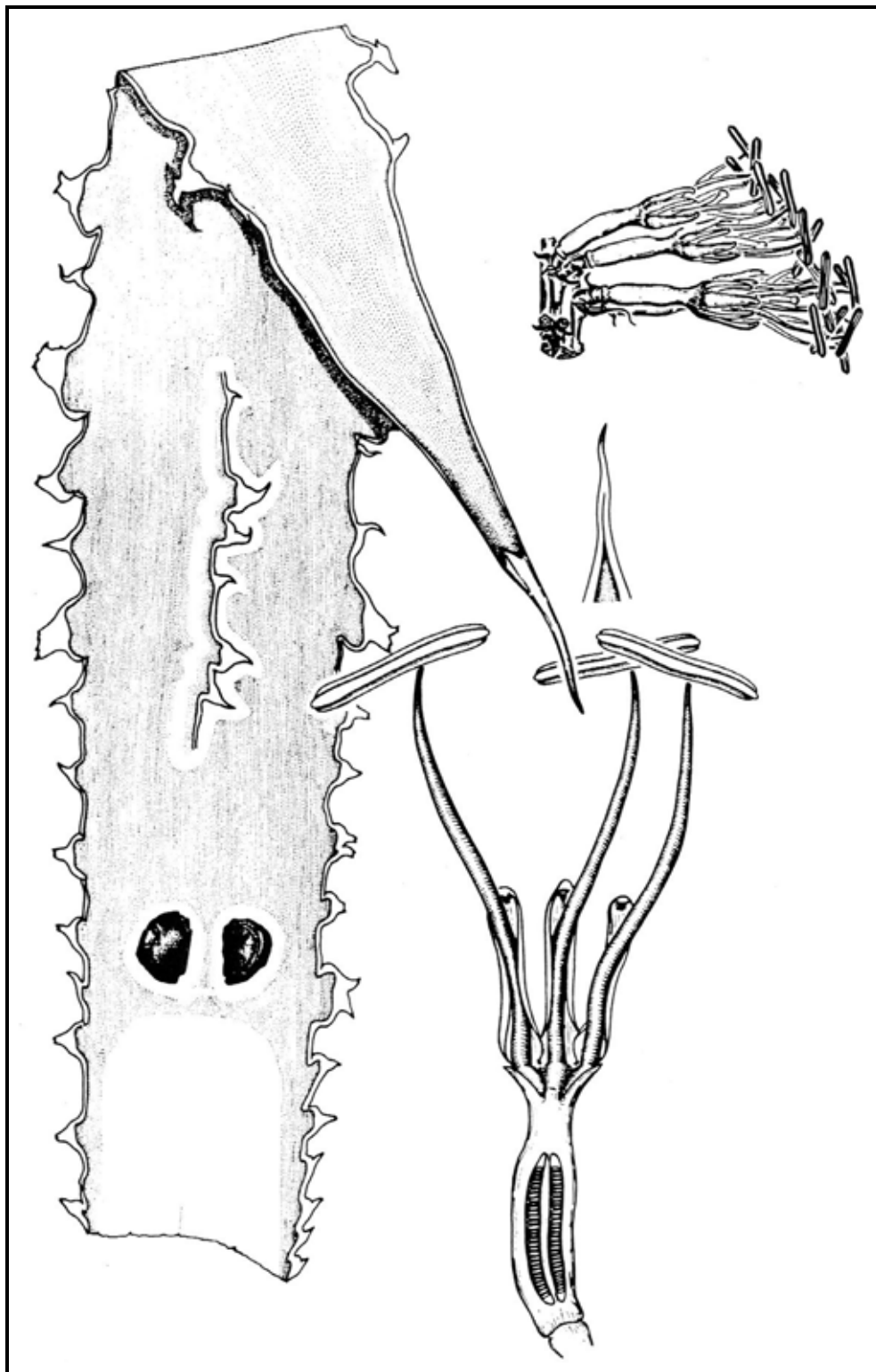


Figura 1.1. Forma de la hoja, tipo de margen, ápice de la hoja y el tipo de flor de *A. xylonacantha*. Tomado de Gentry, 1982.

espina mide 2.5 a 5 cm de largo. La inflorescencia es espigada y mide de 3 a 6 m de largo, erecta, con brácteas del pedúnculo muy angostas, flores en pares o triadas, de 40 a 50 mm de largo, verde a amarillo pálido, filamentos a veces rojos o púrpuras, ovario 20-27 mm de largo, fusiforme, anteras de 17 a 22 mm de largo, (Gentry, 1982), ver detalles en figuras 1.1 y 1.2.



Figura 1.2. Morfología de *A. xylonacantha* (fotografía: Dr. Luis E. Eguiarte).

Tabla 1.1. Localidades reportadas para las poblaciones de *A. xylonacantha*, el estado al que pertenecen así como la altitud a la que se encuentra cada población (Gentry, 1982).

Estado	Localidad	Altitud (msnm)
Hidalgo	3 Km. sur de Metztitlán, Barranca de Metztitlán.	1,280
	3 Km. NE de río Metztitlan	1,432
	Paredes de la barranca de Metztitlán cerca de Venados	1,300
	Cerca del puente Venados, 25 Km. al S de Metztitlán	1,400
San Luis Potosí	10 Km. E de Cd. Valles, en la carretera a Tampico	*
Tamaulipas	8-10 millas S de Ciudad Mante.	*
	13 millas W de Gonzáles, camino a Mante	91

* Dato no reportado por Gentry (1982)

Las poblaciones de *A. xylonacantha* han sido descritas previamente, y se conocen los sitios donde se distribuye esta especie, siendo muy abundante en el tercio inferior de la barranca de Metztitlán, Hidalgo (Sánchez-Mejorada, 1978); abarcando además los estados de San Luis Potosí, Tamaulipas e Hidalgo. Las poblaciones reportadas para cada uno de los estados se muestran en la tabla 1.1 y la distribución geográfica se muestra en el mapa de la figura 1.3 (Gentry, 1982).

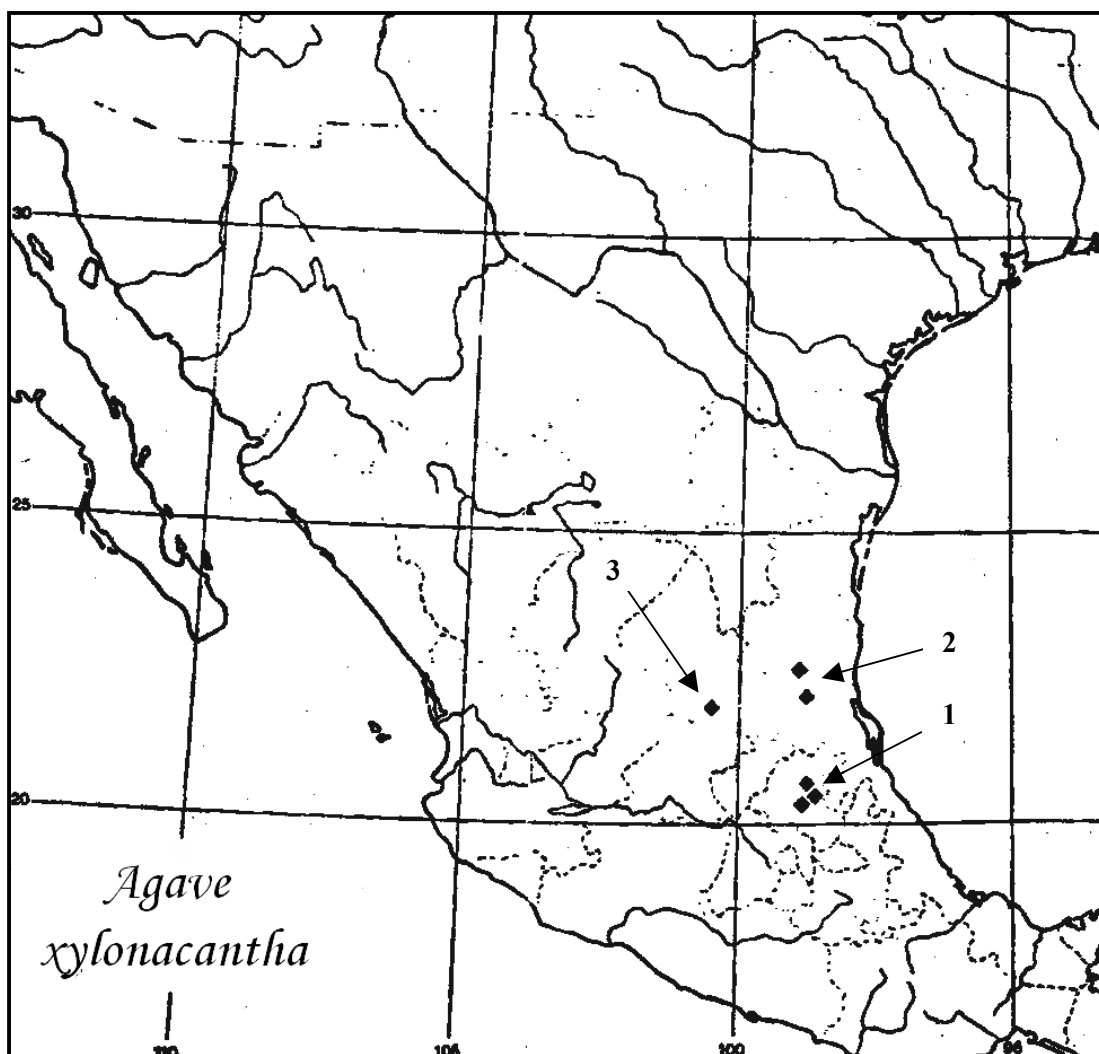


Figura 1.3. Mapa de la distribución geográfica de las poblaciones reportadas para *A. xylonacantha*. Los rombos indican la ubicación de las poblaciones, y los números el estado al que pertenecen: 1= Hidalgo, 2= Tamaulipas y 3= San Luis Potosí (Gentry, 1982).

2. OBJETIVOS

Objetivo general.

Utilizando las herramientas de la Genética de Poblaciones, estimar los índices de la variación, diferenciación y distancia genética, en poblaciones naturales de *Agave xylonacantha*.

Objetivos particulares.

Utilizando a los ISSR's como marcador molecular, obtener la heterocigosis esperada y el porcentaje de loci polimórficos para estimar la variación genética dentro de las poblaciones de *A. xylonacantha*.

Determinar la estructuración de la variación genética de las poblaciones en base a estadísticos análogos a F_{ST} .

Obtener la distancia genética que presentan las poblaciones en base a la identidad genética propuesta por Nei, y establecer una relación entre este parámetro y la distancia geográfica, es decir, determinar si las poblaciones siguen un patrón de aislamiento por distancia.

Utilizando el método UPGMA construir un dendrograma para establecer las relaciones genéticas entre las poblaciones naturales de *A. xylonacantha*.

3. MATERIAL Y MÉTODO

3.1 Poblaciones utilizadas.

Las poblaciones que se utilizaron para realizar este estudio se localizan en los estados de Querétaro, Hidalgo y San Luis Potosí (Tabla 3.1), cubriendo de esta manera la mayor parte del área de distribución de esta especie. De cada población se colectó tejido de 40 individuos (excepto la población del estado de Querétaro, que solo cuenta con 28 individuos); tomando de cada roseta la hoja más joven, de la cual se cortó un fragmento de la parte central de aproximadamente 6 centímetros de ancho por 4 centímetros de largo, las muestras fueron etiquetadas y se almacenaron en un ultracongelador REVCO a -80° C para que se conservaran en buen estado hasta su uso.

Tabla 3.1. Localización geográfica y número de individuos muestreados en las poblaciones de *A. xylonacantha* utilizadas en este estudio.

POBLACIÓN	ESTADO	COORDENADAS		INDIVIDUOS POR POBLACIÓN	ALTITUD (msnm)
METZTITLAN	HIDALGO	N (20°34.33')	W (98°45.24')	40	1300
TOLANTONGO	HIDALGO	N (20° 49')	W (98° 58')	40	1045
EL LINDERO	QUERETARO	N (21° 21.3')	W (99° 33.30')	28	600
CIUDAD VALLES	SAN LUIS POTOSI	N (21°57.72')	W (98° 53.40')	44	1280

La distribución geográfica de las poblaciones analizadas de *A. xylonacantha* se muestran en el mapa de la figura 3.1.

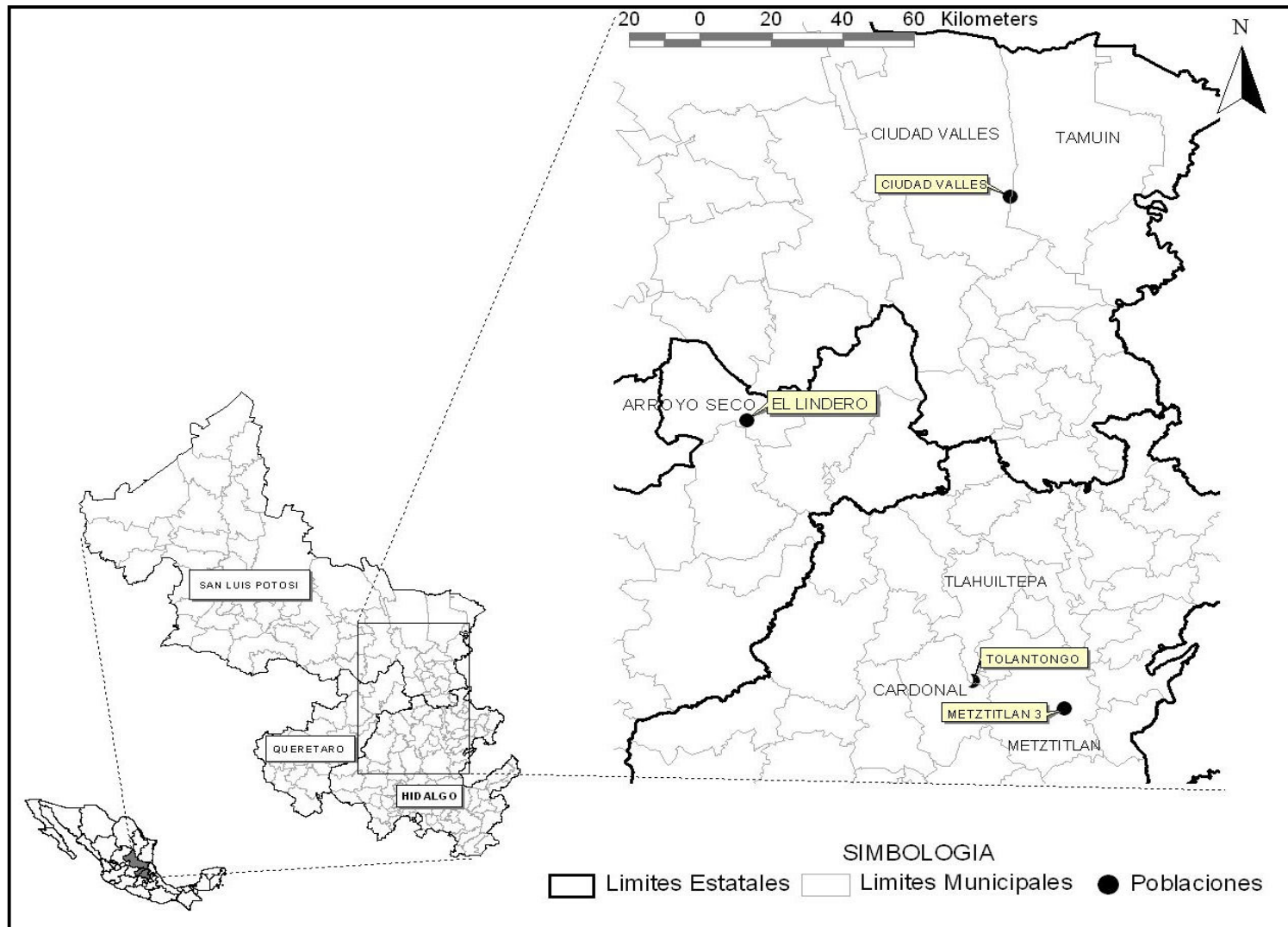


Figura 3.1. Mapa de la distribución geográfica de las poblaciones analizadas de *A. xylonacantha*.

3.2 Extracción de DNA.

La extracción de DNA se basó en una modificación al método de Doyle y Doyle (1987). Este método consiste de manera general en el rompimiento de las paredes celulares por medio de la pulverización con nitrógeno líquido en un mortero y la adición de buffers de extracción CTAB, CTAB 2X y STE, que sirven como detergentes para solubilizar la membrana y eliminar azúcares, también se añade la RNAsa y proteinasa K para digerir al RNA y a las proteínas. Con la adición de cloroformo-octanol se eliminan restos celulares, compuestos fenólicos y otras moléculas que permanezcan en solución; posteriormente el DNA es precipitado con la adición de isopropanol frío, seguido de una limpieza con etanol al 70% y finalmente es re-hidratado en agua ultra pura. (Para ver detalladamente el protocolo de extracción consultar el Apéndice 1).

3.3 Amplificación del DNA por medio de ISSR's.

Para realizar esta técnica se probaron 20 *primers* procedentes de la serie No. 9 de la Unidad de Servicios de Proteínas y Ácidos Nucleicos de la Universidad de Columbia Británica, Vancouver, B. C., Canadá. Los que mejor resultados dieron fueron los *primers* 853, 846 y 811, mostrando un claro y nítido patrón de bandas; cuyas secuencias repetidas son:




846: CAC ACA CAC ACA CAC ART

853: TCT CTC TCT CTC TCT CRT

811: GAG AGA GAG AGA GAG AC

R = A ó G

Las cantidades de los distintos reactivos empleados en las mezclas de reacción utilizadas en los protocolos definitivos de los diferentes *primers* se encuentran en el apéndice 2. Los programas de amplificación utilizados para cada *primers* se muestran a continuación:

Primer 853		Primer 846		Primer 811	
95°C	5 min.	95°C	4 min.	95°C	5 min.
94°C	40 seg.	94°C	40 seg.	94°C	30 seg.
56.3°C	40 seg.	56°C	40 seg.	52°C	40 seg.
72°C	60 seg.	72°C	60 seg.	72°C	75 seg.
					
	37 ciclos		37 ciclos		36 ciclos
72°C	5 min.	72°C	5 min.	72°C	5 min.
4°C	12 hrs.	4°C	12 hrs.	4°C	12 hrs.

Los productos que se obtuvieron del PCR con los diferentes *primers* fueron separados por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2%, utilizando TAE 1X como buffer de corrida, los geles se tiñeron con bromuro de etidio para poder ser visualizados en la lámpara de luz ultravioleta. En cada corrida de los geles se colocó además de los individuos un marcador de peso molecular (ladder) de 100 pares de bases marca Invitrogen de 250 μg (1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) con el objetivo de poder calcular el tamaño (en pares de bases) de los diferentes loci amplificados.

Cada gel fue fotografiado con una cámara digital Kodak EDAS 240 y las imágenes fueron digitalizadas usando el programa Kodak ID versión 3.6. Después se procedió a realizar la lectura de manera manual; esto es, identificando los patrones de los diferentes loci amplificados y ordenándolos de acuerdo al tamaño en pares de bases que estos presentaron y así poder armar una matriz de presencia y ausencia de bandas para cada individuo y para cada *primer*.

3.4 Variación y estructura genética.

Utilizando las matrices de presencia y ausencia se calcularon las frecuencias alélicas de los loci amplificados en base a los alelos recesivos (q), esto es a partir de los individuos sin banda (debido a que los heterocigotos no pueden ser distinguidos), calculando la raíz cuadrada de la frecuencia de las ausencias (x), es decir $q = x^{1/2}$ y la frecuencia del alelo dominante como $p = 1 - q$ (Aguirre, 2004; González, 2004). En base a lo anterior, se calculó la variación genética a partir de la heterocigosis esperada y el porcentaje de loci

polimórficos utilizando el programa TFGA (Tools for Population Genetic Analyses) versión 1.3 (Miller, 1997), el cual asume que las poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Para calcular la heterocigosis esperada promedio (H_E) se utiliza la formula $H_E = 1 - \sum p^2$, siendo p_i la frecuencia promedio del alelo p para todos los loci (Eguiarte,1990; Nybom y Bartish, 2000), y toma valores que van de cero, cuando no se registra variación en ninguno de los genes analizados, a uno, cuando todos los loci son polimórficos. Para disminuir el sesgo se utilizó la corrección propuesta por Lynch y Milligan (1994) para marcadores dominantes, en la cual el algoritmo propone realizar el análisis utilizando sólo las bandas con frecuencias $< 1-(3/N)$ para evitar seleccionar loci con altas frecuencias de alelos nulos (Lynch y Milligan, 1994). Utilizando la corrección para los marcadores dominantes propuesta por Lynch y Milligan (1994), la heterocigosis esperada para cada locus se obtiene a partir de la formula: $H_E = 2q(1-q) + 2Var(q)$ siendo $Var(q) = (1-x)/4N$ y la frecuencia del alelo q se calcula a partir de la formula: $q = x^{1/2} [1-Var(x)/8x^2]^{-1}$ (Nybom y Bartish, 2000).

El porcentaje de loci polimórficos se obtuvo utilizando el criterio del 95%, es decir que solo se considera un loci polimórfico si el alelo más común tiene una frecuencia alélica máxima del 95%.

En el caso de la estructuración genética, se calculó como análogo a la F_{ST} el coeficiente de coancestría (θ), el cual estima la varianza entre la población total y las subpoblaciones. La F_{ST} se obtiene a partir de H_T y H_S , donde H_S es la proporción de heterocigos esperada promedio a nivel subpoblación y H_T es la proporción de heterocigos esperada a nivel global (Eguiarte,1990; Nybom y Bartish, 2000), y se puede obtener a partir de la siguiente formula: $F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$. Si es igual a cero nos indica que las poblaciones están bajo equilibrio de Hardy-Weinberg y si es igual a uno todas las poblaciones serían diferentes entre si, es decir no comparten ningún alelo, lo cual se explicaría si en cada una de las poblaciones se hubiera fijado un alelo (Eguiarte, 1990).

También se realizó un análisis de heterogeneidad de frecuencias alélicas, mediante la probabilidad combinada de Fisher (Raymond y Rousset, 1995); la cual utiliza tablas de contingencia para determinar si existen diferencias significativas de las frecuencias alélicas entre las poblaciones, empleando simulaciones Monte Carlo con cadenas de Markov provee una excelente aproximación a la probabilidad exacta de las diferencias observadas en las frecuencias alélicas (Raymond y Rousset, 1995), y considera que los loci con valores de p menores a 0.05 presentan diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias alélicas entre las poblaciones.

3.5 Flujo génico.

Existen dos formas para calcular el flujo génico en poblaciones naturales: métodos directos y métodos indirectos. En nuestro caso utilizamos el método indirecto, el cual utiliza observaciones de las frecuencias alélicas para deducir que cantidad de flujo génico ocurrió para producir los patrones espaciales observados. Este tipo de método depende de modelos matemáticos que predicen que patrones se observarían en las diferentes tasas de flujo génico (Slatkin y Barton, 1989). Wright (1951) introdujo un método basándose en su modelo de islas, definiendo F_{ST} como la cantidad de consanguinidad causada por las diferencias en las frecuencias génicas entre las poblaciones, calculando el flujo génico a partir del valor de F_{ST} . De esta manera, el número de migrantes (Nm) se puede calcular a partir de la siguiente fórmula, utilizando la corrección de Crow y Aoki (1984):

$Nm = 1/4((1/F_{ST}) - 1) \alpha$ donde N es una estimación del tamaño efectivo de la población, m es la tasa de migración entre subpoblaciones y $\alpha = (n / n-1)^2$ como corrección para el tamaño de la muestra, donde n es el número de poblaciones analizadas.

3.6 Distancia genética y aislamiento por distancia.

La medida que más se utiliza para calcular la distancia genética es la distancia genética estándar propuesta por Nei (1972), la cual evalúa las diferencias entre las frecuencias alélicas de las poblaciones, y se obtiene a partir de la fórmula $D = -\ln(I)$, siendo I la

identidad genética que se obtiene a partir de la fórmula $I = J_{x,y} / (J_x J_y)^{1/2}$. Donde $J_x = \sum x_i^2$ es la identidad genética de la población X, y x_i es la frecuencia promedio del alelo p para todos los loci de esa subpoblación. $J_y = \sum y_i^2$ corresponde la identidad genética de la subpoblación Y, y_i es la frecuencia promedio del alelo p para todos los loci de esa subpoblación. $J_{x,y}$ es la identidad genética promedio de las subpoblaciones calculada como $J_{x,y} = \sum x_i y_i$, y $x_i y_i$ es el producto de las frecuencias promedio del alelo p para todos los loci en las poblaciones X y Y (Nei, 1972; Eguiarte, 1990).

Estas identidades y distancias se obtienen para pares de poblaciones, la identidad (I), toma valores que van de cero, cuando no se comparten alelos entre las poblaciones, a uno si las dos poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas. La distancia (D) tiene un valor de cero si las poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas y de infinito si no comparten ningún alelo (Hedrick, 1983).

A partir de las distancias genéticas se construyó un dendrograma de tipo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), que fue propuesto originalmente por Sokal y Sneath (1963), el cual utiliza un número de unidad taxonómica operacional (OTUs), indicados por 1, 2, 3,..., los cuales pueden ser poblaciones, especies u otro grupo biológico. Asume que las distancias genéticas entre los grupos están calculadas usando frecuencias alélicas, sustituciones nucleotídicas, u otro dato que sea utilizable en una matriz de pares de distancias genéticas (Hedrick, 2000). Este método comienza por agrupar a los dos grupos que presentan la menor distancia genética, combinándolos dentro de un nuevo OTU, después calcula nuevos estimados de las distancias genéticas entre esta nueva unidad y las otras unidades restantes mediante un promedio aritmético de esas distancias. Es decir, si asumimos que se tienen cuatro diferentes OTUs, y que la población 1 y 2 son las poblaciones que tienen la menor distancia genética, estas dos poblaciones son agrupadas dentro de una nueva unidad (12); la distancia genética entre esta unidad y las unidades 3 y 4 sería:

$$D_{(12)3} = \frac{1}{2} (D_{13} + D_{23}) \quad \text{y} \quad D_{(12)4} = \frac{1}{2} (D_{14} + D_{24})$$

Teniendo ahora una nueva matriz de distancias utilizando los tres OTUs restantes, (12), 3 y 4. Asumiendo que D_{34} es la distancia genética más pequeña se forma un segundo grupo con los OTUs 3 y 4, por último se calcula la distancia promedio entre las dos agrupaciones: $D_{(12)(34)} = \frac{1}{4} (D_{13} + D_{14} + D_{23} + D_{24})$ quedando $D_{(12)(34)} = \frac{1}{2} (D_{(12)3} + D_{(12)4})$ (Hedrick, 2000).

Por otro lado, para estimar el aislamiento por distancia se utilizó la prueba de Mantel (1967), la cual nos permite evaluar la correlación que hay entre dos matrices, es decir podemos establecer si existe una relación entre la distancia genética y la distancia geográfica, lo que nos permite determinar si las poblaciones analizadas siguen un patrón de aislamiento por distancia. Cuando la correlación es positiva y posee una $p < 0.05$, se considera que es estadísticamente significativa, y que existe aislamiento por distancia entre las poblaciones.

3.7 Estructura genética poblacional a partir del análisis de la varianza (AMOVA).

El análisis molecular de la varianza o Analysis of Molecular Variance (AMOVA) calcula la distancia entre los diferentes haplotipos (en el caso de los ISSRs un haplotipo consiste en el patrón de 1 y 0 que representa las bandas observadas (1) y las ausencias de banda (0) para cada individuo) y produce estimados de los componentes de la varianza que son similares a los estadísticos F . Los llamados estadísticos Φ , reflejan la correlación de la diversidad haplotípica en diferentes niveles de subdivisión jerárquica, es decir los individuos que integran a las poblaciones, los grupos de poblaciones y el total de las poblaciones (Excoffier, 2001).

Este análisis se realizó utilizando el programa Arlequín versión 2.0 (Schneider et al., 2000), el cual no considera a las frecuencias alélicas y no asume que las poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, por lo que los valores de F_{ST} obtenidos en base a Φ pueden variar en relación con los calculados por el TFGA (Miller, 1997).

Cuando la población estudiada posee altos niveles de endogamia, los valores de F_{ST} obtenidos a partir de las frecuencias alélicas (suponiendo que existe equilibrio de Hardy-Weinberg) resultan sesgados, siendo menores que los generados por el AMOVA y si el valor de F_{ST} generado por el AMOVA es similar al obtenido con el TFGA, podemos suponer que la premisa del equilibrio de Hardy-Weinberg no es muy errónea y los datos de la estructuración poblacional son confiables (Aguirre, 2004).

4. RESULTADOS

Al realizar las lecturas de los tres *primers* y las cuatro poblaciones, se obtuvieron un total de 65 loci polimórficos como resultado de la amplificación de los ISSR's, de los cuales 19 corresponden al *primer* 853, 21 al *primer* 846 y 25 al *primer* 811, (Figuras 4.1; 4.2 y 4.3). De los 65 loci amplificados con los tres *primers*, la población que presentó el mayor número de loci es Metztlán con 58, a esta le sigue la población de Tolantongo con 57 y las que presentan el menor número de loci fueron Ciudad Valles y el Lindero con 50.

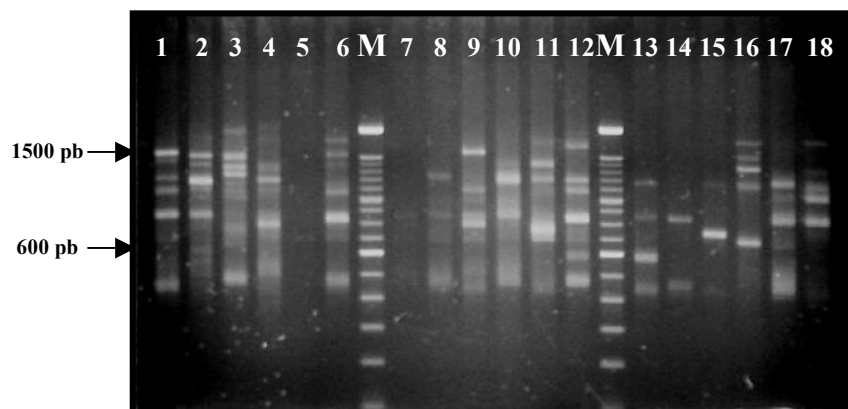


Figura 4.1. Loci amplificados por medio de ISSR con el *primer* 853, los tamaños de estos loci van de 450 a 1900 pares de bases. El marcador de peso molecular es de 100 pares de bases (M). Los números indican los diferentes individuos analizados.

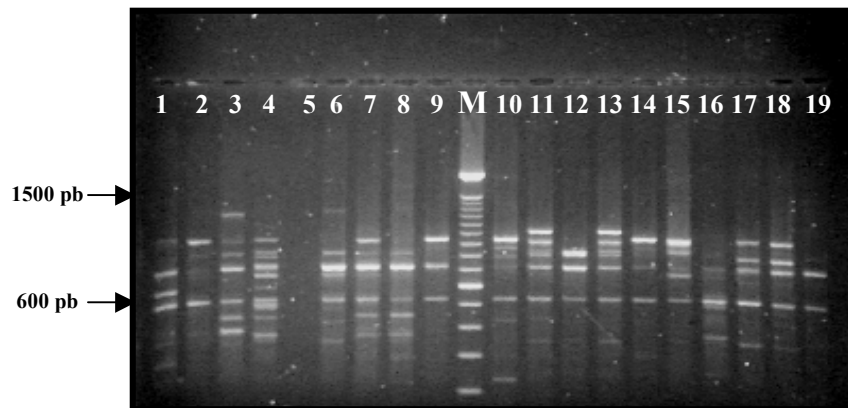


Figura 4.2 Loci amplificados por medio de ISSR con el *primer* 846, los tamaños de estos loci van de 450 a 1900 pares de bases. El marcador de peso molecular es de 100 pares de bases (M). Los números indican los diferentes individuos analizados.

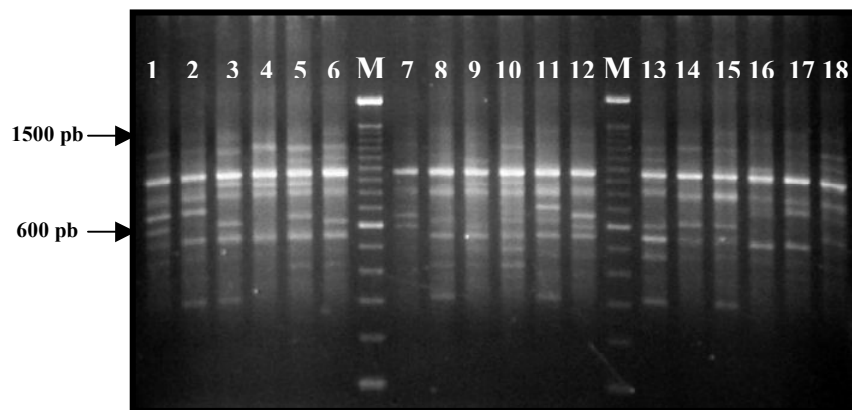


Figura 4.3. Loci amplificados por medio de ISSR con el *primer* 811, los tamaños de estos loci van de 450 a 1900 pares de bases. El marcador de peso molecular es de 100 pares de bases (M). Los números indican los diferentes individuos analizados.

4.1 Variación genética.

Para obtener los datos del análisis de la variación genética de los 65 loci amplificados por medio de los ISSR's se utilizó el programa TFPGA (Tools for Population Genetic Analyses) versión 1.3 (Miller, 1997) con la corrección de Lynch y Milligan (1994), obteniendo una heterocigosis total esperada a nivel de especie de 0.19 y 67.7 % de loci polimórficos, con un criterio del 95 % de confianza. Los valores de heterocigosis esperada y % de loci polimórficos para cada población se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Variación genética obtenida para cada una y el total de las poblaciones, a partir de la heterocigosis esperada (H_E) y porcentaje de loci polimórficos (% P), con el criterio del 95% de confianza, así como el número de individuos que se utilizaron en cada población (N).

POBLACIÓN	(N)	H_E	% P
1 METZTITLAN	38	0.194	61.5
2 TOLANTONGO	30	0.186	63.0
3 CIUDAD VALLES	36	0.173	56.9
4 EL LINDERO	28	0.181	60.0
$\bar{H}_S = 0.183$			
		H_t	$\%P_t$
TOTAL DE LA ESPECIE	132	0.192	67.69

También se obtuvieron los valores de variación genética por *primer*, para todas las poblaciones, presentándose una mayor heterocigosis y polimorfismo en el *primer* 853, y donde se obtuvo la menor variación genética para el total de las poblaciones fue con el *primer* 811(Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Heterocigosis total (H) y % de polimorfismo para cada uno de los *primers* utilizados en el total de las poblaciones.

PRIMER	H	%P
853	0.213	84.2
846	0.187	61.9
811	0.179	60.0

Se elaboró una gráfica de correlación entre la latitud y la variación genética, observando que la heterocigosis disminuye conforme aumenta la latitud, es decir que conforme las poblaciones se van ubicando mas hacia el norte, los valores de la heterocigosis disminuyen (Figura 4.4).

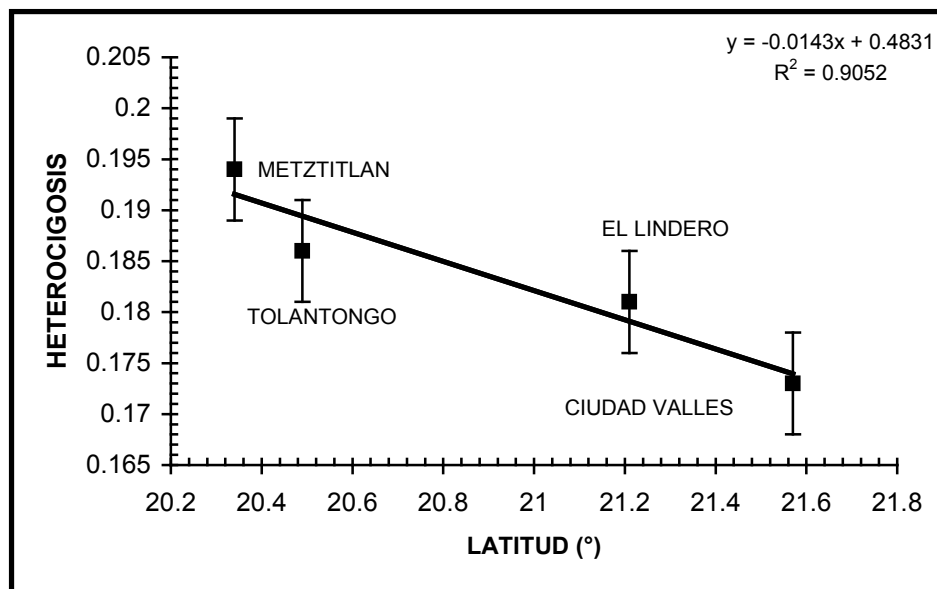


Figura 4.4 Resultados de la correlación latitud vs heterocigosis.

4.2 Estructura genética.

La estructura poblacional se obtuvo en base al coeficiente de coancestría (θ) propuesto por Cockerham (1969), el cual es equivalente a la F_{ST} , asumiendo que las poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, se obtuvo un valor mínimo de $\theta = 0.040$ y un máximo de $\theta = 0.089$ con un nivel de confianza del 95% (utilizando 5000 replicas). El valor promedio de θ para todos los loci es de 0.063.

El flujo génico se calculó a partir del valor de θ , y nos dio un resultado de $Nm = 6.61$, lo cual indica que el flujo génico es alto y esto está asociado con la baja estructura poblacional que presentan las poblaciones de *A. xylonacantha*.

Con respecto a la prueba de heterogeneidad realizada mediante el análisis de la diferenciación exacta de Raymond y Rousset (1995), se encontraron diferencias significativas en las poblaciones de *A. xylonacantha* para 31 de los 65 loci examinados (Tabla 4.3). De los cuales 8 loci resultaron ser estadísticamente significativos para el primer 853, en el primer 846 se obtuvieron 11 y para el primer 811 salieron 12 loci con valores de $p < 0.05$ (Tabla 4.3). La correspondencia de loci por primer es: del loci 1 al 19 pertenecen al primer 853, del 20 al 40 corresponden al primer 846 y del 41 al 65 al primer 811 (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Frecuencias alélicas (p y q) por loci para el total de las poblaciones y la prueba de diferenciación de Raymond y Rousset (R & R). Los valores en negritas son los loci que tuvieron diferencias estadísticamente significativas en sus frecuencias alélicas entre las poblaciones ($p < 0.05$).

LOCI	p	q	R & R	LOCI	p	q	R & R
1	0.1207	0.8793	0.8616	34	0.0544	0.9456	0.0041
2	0.0544	0.9456	0.0110	35	0.4764	0.5236	0.0000
3	0.1558	0.8442	0.0000	36	0.0584	0.9416	0.0088
4	0.0346	0.9654	0.0577	37	0.2114	0.7886	0.0034
5	0.1121	0.8879	0.0217	38	0.2259	0.7741	0.0000
6	0.0268	0.9732	0.0424	39	0.0787	0.9213	0.0025
7	0.4483	0.5517	0.6327	40	0.0464	0.9536	0.0000
8	0.1079	0.8921	0.0062	41	0.0229	0.9771	0.0677
9	0.0705	0.9295	0.6750	42	0.0307	0.9693	0.0089
10	0.0828	0.9172	0.4513	43	0.2407	0.7593	0.0000
11	0.0584	0.9416	0.0480	44	0.0584	0.9416	0.3616
12	0.5807	0.4193	0.0122	45	0.1425	0.8575	0.3370
13	0.0705	0.9295	0.2671	46	0.0464	0.9536	0.0053
14	0.1971	0.8029	0.0272	47	1.0000	0.0000	1.0000
15	0.1513	0.8487	0.1211	48	0.1207	0.8793	0.0000
16	0.0268	0.9732	0.3688	49	0.0191	0.9809	0.0153
17	0.1293	0.8707	0.2243	50	0.7083	0.2917	0.0057
18	0.0544	0.9456	0.1346	51	0.0191	0.9809	0.1539
19	0.4151	0.5849	0.3023	52	0.2609	0.7391	0.4207
20	0.0152	0.9848	0.2756	53	0.0114	0.9886	0.0585
21	0.0076	0.9924	0.0932	54	0.3195	0.6805	0.0021
22	0.0468	0.9536	0.0000	55	0.0504	0.9496	0.0000
23	0.0038	0.9962	0.4508	56	0.1337	0.8663	0.0002
24	0.0038	0.9962	1.0000	57	0.0038	0.9962	0.4345
25	0.0544	0.9456	0.0350	58	0.7215	0.2785	0.2024
26	0.3960	0.6040	0.0075	59	0.0114	0.9886	0.6045
27	0.0705	0.9295	0.0091	60	0.3655	0.6345	0.0669
28	0.2794	0.7236	0.0000	61	0.0076	0.9924	0.7010
29	0.0464	0.9536	0.1181	62	0.2162	0.7838	0.2175
30	0.6604	0.3396	0.0753	63	0.0995	0.9005	0.0013
31	0.0425	0.9575	0.0850	64	0.0624	0.9376	0.0000
32	0.1558	0.8442	0.9934	65	0.0665	0.9335	0.4162
33	0.0828	0.9172	0.1173				

4.3 Distancia genética y aislamiento por distancia.

Las distancias genéticas de las poblaciones fueron calculadas en base a la distancia no sesgada de Nei (1978), con el programa TFPGA versión 1.3 (Miller, 1997), obteniendo una distancia mínima de 0.0094 y una máxima 0.0187, siendo la población de TOLANTONGO y la de EL LINDERO las más cercanas, es decir son las que más se parecen genéticamente, y las dos más lejanas fueron la población de CIUDAD VALLES y la de METZTITLAN, en la tabla 4.4, debajo de la diagonal se pueden observar las distancias genéticas entre cada par de poblaciones.

Tabla 4.4. Distancias genéticas (Nei, 1978) y geográficas en kilómetros (itálicas), entre cada par de poblaciones de *A. xylonacantha*.

POBLACIÓN	METZTITLAN 1	TOLANTONGO 2	CIUDAD VALLES 3	EL LINDERO 4
METZTITLAN 1	*****	<i>25.59</i>	<i>153.82</i>	<i>119.68</i>
TOLANTONGO 2	0.0146	*****	<i>145.14</i>	<i>97.61</i>
CIUDAD VALLES 3	0.0184	0.0137	*****	<i>95.73</i>
EL LINDERO 4	0.0187	0.0094	0.0150	*****

También se construyó un dendrograma por medio del método UPGMA utilizando un “bootstrap” de 1000 permutaciones, en donde se pueden observar de manera gráfica las relaciones genéticas entre las cuatro poblaciones utilizadas (Figura 4.5).

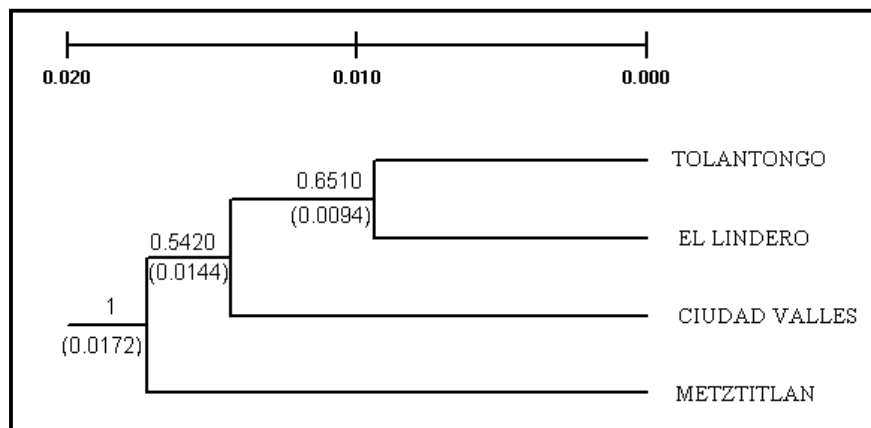


Figura 4.5. Dendrograma construido por medio de UPGMA, utilizando las distancias genéticas de Nei (1978). En la parte superior de cada nodo se muestra el valor de “bootstrap” que lo soporta y por debajo, entre paréntesis las distancias genéticas.

En el análisis de aislamiento por distancia realizado mediante la prueba de Mantel con el programa TFPGA versión 1.3 (Miller, 1997), nos dio valores de $r = 0.3062$ y $p = 0.3310$ lo que nos indica que no hay una correlación significativa entre las distancias genéticas y las distancias geográficas presentes en cada par de poblaciones, es decir que esta especie no sigue un modelo de aislamiento por distancia (Figura 4.6). Las distancias geográficas entre cada par de poblaciones se pueden consultar en la tabla 4.4.

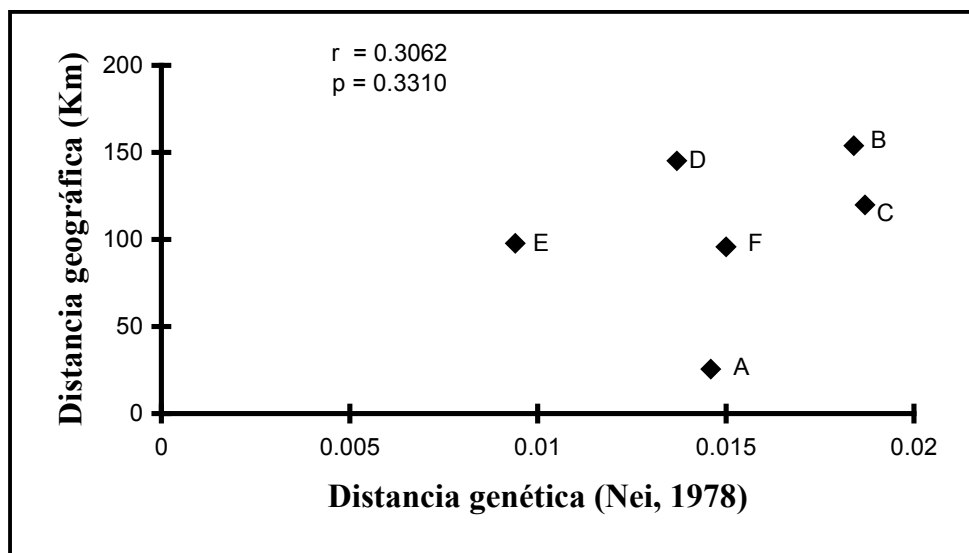


Figura 4.6. Prueba de mantel para evaluar el aislamiento por distancia entre cada par de poblaciones, obtenida a partir de las distancias genéticas de Nei (1978) y las distancias geográficas (en Kilómetros). Las letras indican cada par de poblaciones: A = Metztlán y Tolantongo; B = Metztlán y Cd. Valles; C = Metztlán y el Lindero; D = Tolantongo y Cd. Valles; E = Tolantongo y el Lindero; F = Cd. Valles y el Lindero.

4.4 Estructura genética poblacional a partir del análisis de la varianza (AMOVA).

Para analizar la distribución de la variación genética jerárquicamente, se realizó el análisis de varianza molecular (AMOVA), utilizando el programa Arlequín versión 2.0 (Schneider et al., 2000), formando tres grupos con las poblaciones; el grupo uno se nombró el Lindero y pertenece a esa misma población, el grupo dos se llamó Ciudad Valles que incluye a la población del mismo nombre y el grupo tres se nombró Hidalgo barranca y agrupa a las poblaciones pertenecientes al estado de Hidalgo las cuales son Tolantongo y Metztlán, siendo estas dos poblaciones las más cercanas geográficamente.

Los resultados obtenidos con estos grupos nos indican que el menor porcentaje de la variación se encuentra repartida entre los tres grupos con el 1.49 %, entre las poblaciones dentro de los grupos se tiene el 7.23 % y el mayor porcentaje de la variación se encuentra dentro de las poblaciones con el 91.29 % de la variación (Tabla 4.5). El valor análogo a F_{ST} es de $\Phi_{ST} = 0.087$.

Tabla 4.5. Resultados del análisis molecular de la varianza (AMOVA) para *A. xylonacantha*. Los grupos formados son tres, el grupo uno se llamó El Lindero, el grupo dos se llamó Ciudad Valles y el tercer grupo Hidalgo barranca.

ORIGEN DE LA VARIACIÓN	<i>g. l.</i>	SUMA DE CUADRADOS	COMPONENTES DE LA VARIANZA	PORCENTAJE DE LA VARIACIÓN
Entre grupos	2	64.207	0.12376 Va	1.49
Entre poblaciones dentro de los grupos	1	27.710	0.60025 Vb	7.23
Dentro de las poblaciones	128	970.712	7.58369 Vc	91.29

5 DISCUSIÓN

5.1 Inter simple sequence repeats (ISSR's).

Los marcadores de DNA comúnmente utilizados en los análisis de genética de poblaciones basados en el método de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR, son los RAPD's, AFLP's y los SSR o microsatélites, pero las mayores limitaciones de esas técnicas son la baja reproducibilidad de los RAPD's, el alto costo de los AFLP's y la necesidad de conocer la secuencia flanqueadora para diseñar los *primers* específicos de los microsatélites. La técnica de los ISSR's supera esas limitaciones y se emplea principalmente en el estudio de especies cultivadas, en el ámbito de su diversidad genética, análisis filogenéticos, mapeo genético y biología evolutiva (Meyer et al., 1993; Gupta et al., 1994; Wu et al., 1994; Zietkiewicz et al., 1994). Este tipo de marcador genético está basado en el método de PCR y combina los beneficios de los AFLPs y microsatélites, además de la universalidad de los RAPD's. Su alta reproducibilidad se debe principalmente a la naturaleza y longitud de los *primers* (16 a 15 pb), lo cual permite el uso de altas temperaturas de alineación (45-60 °C), asegurando que solamente se amplifiquen aquellos segmentos de DNA complementarios al *primer* (Pradeep et al., 2002).

Los ISSR's se utilizan confiablemente en los estudios de genética de poblaciones, ya que se heredan de manera mendeliana y experimentalmente son poco sensibles a variaciones en la concentración del *primer* y del DNA, son de fácil manejo y detectan una alta variación (Zietkiewicz et al., 1994; Wolfe, 2000; Bernet y Branchard, 2001; Pradeep et al., 2002). Esta variación se puede ver afectada por la naturaleza de los *primers* utilizados, es decir *primers* anclados en la terminación 3', *primers* anclados en la terminación 5' o *primers* no anclados, así como de las repeticiones de sus secuencias (Pradeep et al., 2002). Cuando se utilizan *primers* no anclados, es decir, que sólo se utilizan las secuencias de los microsatélites en el *primer*, éstos tienden a deslizarse dentro de las unidades de repetición durante la amplificación, originando manchas en vez de un claro patrón de bandas, las repeticiones de di-nucleótidos en los *primers* anclados en la terminación 3' originan

patrones de bandeo mucho más claros en comparación con los producidos por los anclados en la terminación 5' (Pradeep et al., 2002). Las secuencias repetidas de los *primers* que generan mayor polimorfismo en plantas son (AG), (GA), (CT), (TC), (AC) y (CA), en comparación con otras repeticiones ya sean di-, tri-, o tetra nucleótidos (Pradeep et al., 2002). Otro factor que influye en la detección de los polimorfismos obtenidos es el tipo de gel utilizado; los geles de poliacrilamida (PAGE) en combinación con radioactividad son el método más sensible, seguidos por geles de poliacrilamida teñidos con plata y finalmente los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Sin embargo se ha demostrado en varios estudios que se pueden detectar altos niveles de polimorfismo en geles de agarosa sin el uso de radioactividad (Tsumura et al., 1996; Kojima et al., 1998; Wolf y Morgan-Richard, 1998; Arcade et al., 2000; Sankar y Moore, 2001; Aguirre, 2004; González, 2004).

Los ISSR's resultaron ser una técnica simple, rápida y eficiente en el estudio de la genética de poblaciones de *Agave xylonacantha*, por ser reproducibles y por el alto polimorfismo visualizado fácilmente en geles de agarosa con di-nucleótidos (CA), (TC) y (GA), obteniendo un total de 65 loci para los tres *primers*, los cuales van de 320 a 1900 pares de bases, lo que nos asegura obtener valores confiables en el análisis y nos da una idea muy amplia acerca del comportamiento genético que tienen las poblaciones naturales de esta especie.

5.2 Diversidad genética y estructura poblacional.

Los datos generados con esta técnica mostraron que en *A. xylonacantha* se presenta una variación genética moderada, teniendo una $H = 0.19$ y un $P = 67.7 \%$. Con respecto a la correlación de latitud contra la heterocigosis, podemos observar claramente que conforme se va avanzando hacia el norte, en las poblaciones se va presentando una disminución de la heterocigosis, lo cual nos hace pensar que las poblaciones que se encuentran más al norte son las más recientes, sugiriéndonos que el centro de origen para esta especie posiblemente sea en Metztlán, ya que esta es la población que presenta la mayor heterocigosis y es también la población que presenta la mayor distancia genética. Algo parecido sucede en *A.*

lechuguilla (Silva-Montellano, 2001; Silva-Montellano y Eguiarte, 2003), pero esta correlación se pierde en las poblaciones más norteñas.

La estructura poblacional se obtuvo en base al coeficiente de coancestría (θ) propuesto por Cockerham (1969), el cual es equivalente a la F_{ST} , utilizando el programa TFPGA, el cual a su vez emplea el algoritmo de Weir y Cockerham (1984), en donde se hacen análisis de varianza de las frecuencias alélicas esperadas y su posterior correlación dentro de las poblaciones con respecto al total de la especie. Encontramos que en *A. xylonacantha* se presenta una estructuración genética de $\theta = 0.063$ (con un intervalo de confianza al 95 % entre $\theta = 0.040$ y 0.089). Con respecto a la prueba de heterogeneidad realizada mediante el análisis de la diferenciación exacta de Raymond y Rousset (1995), se encontraron diferencias significativas para 31 de los 65 loci examinados. Y aunque entre las cuatro poblaciones analizadas se presentan frecuencias alélicas similares, los tamaños de muestra permiten detectar diferencias significativas en las frecuencias alélicas, indicándonos que esta especie presenta una baja diferenciación genética entre poblaciones.

Al comparar nuestros datos de la variación genética con los reportados para otras especies del género *Agave*, donde utilizan la misma técnica que en nuestro estudio (ISSR), notamos que tanto en *A. cupreata* que pertenece al subgénero *Agave* y al grupo *Crenatae*, como en *A. potatorum* subgénero *Agave* grupo *Hiemiflorae* (Aguirre, 2004), así como en *A. garciae-mendozae* (subgénero *Littaea* grupo *Marginatae*) (González, 2004), se encuentran niveles de variación genética más altos, siendo estos valores muy semejantes entre las tres especies, los cuales presentan una marcada diferencia con respecto a los niveles de variación genética obtenidos en este estudio (Tabla 5.1). Al cotejar los valores de F_{ST} reportados en esas especies encontramos que en el análisis realizado por Aguirre (2004), para *A. potatorum* se presenta una moderada estructuración, por el contrario para *A. cupreata* se presenta una estructura poblacional relativamente alta, así como también en *A. garciae-mendozae* (González, 2004), siendo semejantes estos dos valores (Tabla 5.1).

Recientemente Rocha (2006), realizó un análisis comparativo de cinco especies de agaves del subgénero *Littaea* ubicadas en la Barranca de Metztlán, encontrando niveles de

variación genética relativamente altos. Para *A. striata* que pertenece al grupo Striatae se reporta una $H = 0.23$ y $P = 76\%$, en *A. celsii albicans* (grupo Polycephalae) se tiene una $H = 0.24$ y un $P = 89\%$, siendo esta especie la que presenta los valores más diferentes a los reportados en nuestro estudio, los más parecidos son los de *A. difformis* que pertenece al grupo Marginatae, donde se reporta una $H = 0.20$ y un $P = 62\%$, pero estas tres especies presentan una estructuración relativamente alta (Tabla 5.1). En *A. hidalguensis* (grupo Marginatae) se reporta una F_{ST} igual a la obtenida en este estudio, pero esto puede deberse a que solo se utilizaron dos poblaciones en el análisis. Dentro de este estudio Rocha (2006), incluye poblaciones de *A. xylonacantha* ubicadas en el estado de Hidalgo (tres en la barranca de Metztlán y una en Zimapán), encontrando valores de variación genética ligeramente mayores a los obtenidos en este estudio ($H = 0.21$ y $P = 75\%$), así como también una baja estructura poblacional, reportando una $F_{ST} = 0.059$ (Tabla 5.1).

Durante los últimos años se han realizado varios estudios dentro de la familia Agavaceae y en particular del género *Agave*, utilizando diferentes técnicas, como son las Isoenzimas y los RAPDs. Se ha encontrado que en algunos de los estudios se presenta el mismo patrón que los obtenidos en *A. xylonacantha* para la diversidad genética y estructura poblacional. En *A. subsimplex* que pertenece al subgénero *Agave* y al grupo Deserticolae (Navarro et al., 2003), encuentran niveles altos de variación genética utilizando RAPDs en tres poblaciones cercanas a la costa de Sonora, pero una diferenciación moderada ($F_{ST} = 0.084$). Para *A. cerulata* y *A. deserti* (Navarro et al., 2003) que son especies cercanas a la anterior, reportan valores similares, encontrando una alta variación y diferenciación genética entre poblaciones. Esta diferenciación poblacional se ajusta al patrón que se presenta en los trabajos realizados por González (2004) en *A. garciae-mendozae* y por Aguirre (2004) para *A. cupreata* utilizando ISSR's, es decir que estas especies presentan una estructura poblacional ligeramente alta aunque una diferenciación relativamente baja entre especies (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Índices de diversidad y estructuración genética reportados para diferentes especies del género *Agave* y algunos miembros de la familia Agavaceae, así como para diferentes tipos de plantas; utilizando isoenzimas y RAPDs como técnicas moleculares.

	H	%P	F_{ST}	TÉCNICA	REFERENCIA
<i>A. xylonacantha</i>	0.19	67.7	0.063	ISSR	ESTE ESTUDIO
<i>A. xylonacantha</i>	0.21	75	0.059	ISSR	Rocha, (2006)
<i>A. difformis</i>	0.20	62	0.113	ISSR	Rocha, (2006)
<i>A. striata</i>	0.23	76	0.103	ISSR	Rocha, (2006)
<i>A. hidalguensis</i>	0.23	71	0.063	ISSR	Rocha, (2006)
<i>A. celsii albicans</i>	0.24	89	0.130	ISSR	Rocha, (2006)
<i>A. garciae-mendozae</i>	0.27	85	0.10	ISSR	González, (2004)
<i>A. cupreata</i>	0.29	89	0.145	ISSR	Aguirre (2004), Eguiarte et. al.,(2003)
<i>A. potatorum</i>	0.27	83	0.084	ISSR	Aguirre (2004), Eguiarte et. al.,(2003)
<i>A. subsimplex</i>	0.143	78	0.084	RAPDs	Navarro et al. (2003)
<i>A. cerulata</i>	0.24	90	0.10	RAPDs	Navarro et al. (2003)
<i>A. deserti</i>	0.19	78	0.14	RAPDs	Navarro et al. (2003)
<i>A. lechuguilla</i>	0.39	96	0.083	Isoenzimas	Silva y Eguiarte (2003)
<i>A. victoriae-reginae</i>	0.33	83	0.24	Isoenzimas	Martínez Palacios et al (1999)
<i>Yucca filamentosa</i>	0.20	68	0.17	Isoenzimas	Massey y Hamrick (1998)
<i>Manfreda brachystachya</i>	0.48	100	0.03	Isoenzimas	Eguiarte et al. (2000.)
Monocotiledóneas con polinización cruzada	0.158	52.5	0.157	Isoenzimas	Hamrick y Godt (1996)
Perennes longevas con polinización cruzada	0.180	65.5	0.094	Isoenzimas	Hamrick y Godt (1996)
Distribución regional con polinización cruzada	0.171	59.9	0.120	Isoenzimas	Hamrick y Godt (1996)
Perennes longevas con distribución regional	0.190	67	0.086	Isoenzimas	Hamrick y Godt (1996)
Monocotiledóneas	0.190		0.38	RAPDs	Nybom y Bartish (2000)
Perennes longevas	0.242		0.25	RAPDs	Nybom y Bartish (2000)
Distribución regional	0.222		0.43	RAPDs	Nybom y Bartish (2000)
Heterocruza	0.260		0.28	RAPDs	Nybom y Bartish (2000)
Autocruza	0.091		0.70	RAPDs	Nybom y Bartish (2000)
Promedios de rasgos de historias de vida	0.220		0.35	ISSR	Nybom (2004)

Martinez-Palacios et al. (1999), realizaron el estudio de la genética de poblaciones para *A. victoriae-reginae* (perteneciente al subgénero *Littaea* y al Grupo Marginatae), analizando 10 loci por medio de isoenzimas, encontrando también niveles altos de diversidad genética dentro de las poblaciones, obteniendo una $H = 0.33$ y un $P = 83\%$, así como una estructura poblacional alta ($F_{ST} = 0.24$). En *A. lechuguilla* (Silva-Montellano, 2001; Silva-Montellano y Eguiarte, 2003), que pertenece al mismo grupo y subgénero que la especie anterior (y a la de nuestro estudio), analizaron la variación genética utilizando 13 loci isoenzimáticos, encontrando que esta especie tiene un alto valor promedio de H_s (0.394) a lo largo de su gradiente latitudinal de distribución, con un rango de 0.3 a 0.5, pero reportan una moderada estructuración. En *Manfreda brachystachya* (Eguiarte et al., 2000), se nota una marcada diferencia, tanto para la heterocigosis como para los polimorfismos, presentando esta especie una alta diversidad genética dentro de las poblaciones, pero una estructuración muy baja ($F_{ST} = 0.03$), quedando este valor por debajo del obtenido en nuestro estudio (Tabla 5.1).

Tras realizar la comparación con las diferentes especies de agave en donde se han realizado los análisis de genética de poblaciones, podemos ver que *A. xylonacantha* presenta una variación genética moderada y una baja estructura poblacional. Esto lo podemos constatar con el estudio de Rocha (2006), donde también se hizo el análisis genético de esta misma especie y obtiene valores muy semejantes a los nuestros, reafirmando la veracidad de nuestros resultados, además, en ambos estudios se utilizaron los mismos *primers* así como también la población de Metztitlán.

Para saber como se esta repartiendo la variación genética entre las poblaciones, se realizó el análisis molecular de la varianza (AMOVA), utilizando el programa Arlequín versión 2.0 (Schneider et al., 2000), en donde la F_{ST} es calculada en base a Φ_{ST} como la correlación de haplotipos aleatorios dentro de las poblaciones con respecto a un par de haplotipos aleatorios tomados del total de la especie (Excoffier et al., 1992), obteniendo un listado de 133 haplotipos diferentes, que corresponden a los 133 individuos analizados, es decir, que todos los individuos son genéticamente diferentes, indicándonos que el mayor porcentaje de la variación se encuentra dentro de las poblaciones, es decir, que si

conservamos cualquiera de las poblaciones estamos asegurando el 91.29 % de la variación genética total de la especie, pero para fines prácticos de la genética de la conservación nos indica que las poblaciones que son más importantes de conservar son las de Tolantongo y Metztitlán, ya que conservando estas poblaciones se tendría casi el total de la variación genética (98.52 %), lo cual coincide con los valores obtenidos para la diversidad genética, siendo estas poblaciones las que presentan una mayor heterocigosis esperada, teniendo una $H_E = 0.194$ en Metztitlán y una $H_E = 0.186$ para Tolantongo.

El valor de $\Phi_{ST} = 0.0871$, aunque difiere del valor obtenido mediante los coeficientes de Wright (1951; 1969) (el cual nos dio un valor de $\theta = 0.0633$), cae dentro del intervalo de confianza obtenido, el cual va de un mínimo de $\theta = 0.0401$ a un máximo de $\theta = 0.0891$. Podemos suponer que la premisa del equilibrio de Hardy-Weinberg no es errónea, y los datos de la estructuración poblacional son razonablemente confiables. A pesar de que ambos estadísticos se calculan de diferente forma, nos sigue indicando que esta especie presenta una baja estructuración y un alto flujo génico.

5.3 Ecología y genética de poblaciones.

Se ha demostrado que factores ecológicos y rasgos de historias de vida como el sistema reproductivo, los mecanismos de dispersión de las semillas, la forma de vida y el área de distribución geográfica, están estrechamente asociados con el monto total de la variación genética y su distribución dentro y entre las poblaciones (Hamrick y Godt, 1989, 1996; Loveles y Hamrick, 1984 ; Nybon y Bartish, 2000). Hamrick y Godt (1996), realizan un estudio comparativo de los efectos en los rasgos de historias de vida en la diversidad genética, encontrando que en las comparaciones entre el sistema reproductivo y el estatus taxonómico de las especies; sistema reproductivo y área geográfica; forma de vida y sistema reproductivo, así como en la combinación de forma de vida y área geográfica, se explica relativamente poca variación interespecífica para polimorfismos y heterocigosis, pero se explica una alta proporción de la variación entre especies para la estructura poblacional. En la tabla 5.1 se muestran los valores obtenidos en ese estudio, que se ajustan a los factores ecológicos que se presentan en las agaváceas, encontrando que nuestros

valores son semejantes a los patrones encontrados por Hamrick y Godt (1996). Nybom y Bartish (2000), realizan un estudio similar utilizando RAPDs, dentro de dicho estudio reportan que la forma de vida no tiene un impacto significativo para la diversidad dentro de las poblaciones, lo cual puede deberse a que las especies de vida larga generalmente tienen un alto potencial para largos movimientos de genes, pero puede ser un buen predictor de la diversidad entre poblaciones. El rango geográfico no mostró asociación de ninguna forma con la diversidad genética dentro de las poblaciones, pero el sistema reproductivo tiene un alto impacto, encontrando que las especies autopolinizables tienen la menor diversidad y las especies de polinización cruzada tienen la más diversa (Nybom y Bartish, 2000). Hamrick y Godt (1996) establecen que el sistema reproductivo puede ser uno de los más importantes predictores de la diversidad genética dentro de las poblaciones.

Más recientemente Nybom (2004) realiza una comparación de marcadores moleculares basados en el DNA nuclear (RAPD, AFLP, ISSR) para estimar la diversidad genética en plantas. Menciona que casi todos los rasgos de vida analizados mostraron una asociación con la diversidad genética dentro de las poblaciones y que los valores de H_S obtenidos por medio de RAPD son muy similares a los citados por Hamrick y Godt (1989). Con respecto a la diversidad genética entre poblaciones encuentra que los valores promedio para Φ_{ST} y G_{ST} son muy similares para los ISSR (Nybom, 2004). También hace una comparación entre los diferentes marcadores y encuentra que los ISSR sobre enfatizan diferencias entre poblaciones estrechamente relacionadas pero atribuyen menos variación sobre largas distancias geográficas. Los RAPD y AFLP producen estimados similares, mientras que los ISSR tienden a producir estimados un poco altos en la variación genética dentro de las poblaciones. Posiblemente los ISSR detecten más variación a bajos niveles, es decir, dentro de las poblaciones y menos variación a más altos niveles, por ejemplo entre poblaciones o entre regiones (Nybom, 2004). En la tabla 5.1 se muestran los valores de los promedios generales para ISSR reportados por Nybom (2004).

Las historias de vida de las agaváceas presentan ciclos de vida muy largos, lo que permite la coexistencia de individuos de generaciones diferentes en la misma población, pero refleja también la importancia de las interacciones con sus polinizadores, siendo estos

el factor más importante en la evolución de la biología reproductiva e historia de vida de los agaves (Schaffer y Schaffer, 1977). Los polinizadores juegan un papel muy importante en procesos evolutivos como la especiación, ya que las diferencias en la composición específica y abundancia de la fauna polinizadora podrían afectar el flujo génico dentro y entre las poblaciones de plantas, afectando así su estructura genética.

La baja diversidad genética y estructura poblacional en *A. xylonacantha* esta posiblemente asociada a dos factores: uno sería que esta especie tiene un origen muy reciente y el otro sería la alta eficiencia de sus polinizadores, asociada esta principalmente a murciélagos. Hasta hace algunos años no se tenía evidencia de que los murciélagos jugaran un papel importante en la polinización de las especies del subgénero *Littaea*, y se consideraba a los esfíngidos y las abejas como los principales polinizadores. Recientemente se ha demostrado que los murciélagos (*Leptonycteris curasoae* y *Choeronycteris mexicana*) son los principales polinizadores en *A. garciae-mendozae* y las abejas los polinizadores secundarios (González, 2004). Rocha et al. (2005) estudiaron la ecología reproductiva de 5 especies del subgénero *Littaea* ubicadas en la Barranca de Metztitlán (dentro de las cuales incluye a *A. xylonacantha*), y encuentra que son altamente visitadas por las mismas especies de murciélagos que en *A. garciae-mendozae* además de *Glossophaga sp.*, incluyendo también otro tipo de visitas como esfíngidos, abejas, abejorros y colibríes (Rocha et al., 2005). Como las especies de murciélagos antes mencionadas son consideradas especies migratorias, el desplazamiento del polen por medio de los murciélagos permite un alto flujo génico entre las poblaciones, evitando de esta manera que exista una fuerte diferenciación entre las poblaciones, lo cual nos ayuda a entender por que la mayor parte de la variación genética de esta especie se encuentra dentro de las poblaciones.

5.4 Flujo génico y distancias genéticas.

La estructura genética y la biología de la polinización de las poblaciones naturales se encuentran fuertemente relacionadas. La estructura genética determina la evolución de los rasgos reproductivos, lo cual depende a su vez de la disponibilidad de variación genética

útil y de los tamaños poblacionales efectivos. Por otro lado, los polinizadores determinan los niveles de polinización cruzada y autopolinización, afectando los niveles de endogamia al interior de las poblaciones naturales. Además, también determinan la distancia a la que se mueve el polen, afectando los niveles de flujo génico entre las poblaciones (Hamrick y Godt, 1989; Silva-Montellano, 2001). Lo anterior lo podemos ver reflejado en el alto nivel de flujo génico obtenido en este análisis, utilizando la fórmula propuesta por Wright (1951), con la corrección de Crow y Aoki (1984), obtuvimos una $Nm = 6.61$. Esta fórmula establece dos propiedades muy relevantes de la F_{ST} : que es casi independiente de la tasa de mutación y del número de poblaciones usadas. Slatkin y Barton (1989) demuestran que es también poco afectada por los distintos tipos de selección y consideran a este como uno de los mejores métodos indirectos para estimar el flujo génico (Eguiarte, 1990; Slatkin, 1994). Si se hubiera obtenido un valor de Nm menor a 1, la deriva génica actuaría de manera independiente en cada una de las poblaciones, dado que el valor obtenido es mayor a 4, entonces las poblaciones se comportan como una gran población más o menos panmíctica, superando los efectos de la deriva génica y previniendo la diferenciación local. Esto provoca que las poblaciones se mantengan interconectadas genéticamente, dando como resultado que los valores de las distancias genéticas entre las poblaciones analizadas de esta especie se vean reducidas, van de un mínimo de 0.0094 a un máximo de 0.0187. Para establecer este parentesco genético entre las poblaciones, se utilizó la distancia genética de Nei (1978), obteniendo un bajo promedio para todos los pares de poblaciones ($D = 0.0149$). Entre la población de Tolantongo, perteneciente al estado de Hidalgo y la de El Lindero que se encuentra en el estado de Querétaro, es donde se registra la menor distancia ($D = 0.0094$), siendo estas dos las más parecidas genéticamente, la distancia más alta se registro entre las poblaciones de Metztitlán y El Lindero ($D = 0.0187$). El obtener distancias genéticas pequeñas nos reflejan una mayor similitud en las frecuencias alélicas de las poblaciones, indicándonos también una estructuración poco marcada en la especie.

En el análisis de aislamiento por distancia realizado mediante la prueba de Mantel, nos dio valores no significativos ($r = 0.3062$ y $p = 0.3310$), lo que nos indica que no hay una correlación significativa entre las distancias genéticas y las distancias geográficas presentes

en cada par de poblaciones, es decir, que esta especie no sigue un modelo de aislamiento por distancia.

Si comparamos los niveles máximos y mínimos de las distancias genéticas obtenidas en este estudio con los reportados en las diferentes especies de *Agave* (Tabla 5.2), podemos ver claramente que nuestros resultados se encuentran por debajo en todos los estudios realizados. Aún en *A. hidalguensis* (Rocha, 2006), donde sólo se reportan dos poblaciones, la distancia obtenida es mayor que la distancia mínima de este estudio. En cambio, en el análisis realizado por Rocha (2006) para *A. xylonacantha* se presentan valores similares a los encontrados en nuestro estudio (Tabla 5.2), indicándonos que las poblaciones han divergido hace poco tiempo y son muy jóvenes, así como el alto nivel de flujo génico que existe entre ellas.

Tabla 5.2. Distancias genéticas reportadas para diferentes especies del género *Agave*, los valores presentados en esta tabla son las distancias mínimas y máximas.

	DISTANCIAS GENÉTICAS	TÉCNICA	REFERENCIA
<i>A. xylonacantha</i>	D = 0.0094 – 0.0187	ISSR	ESTE ESTUDIO
<i>A. xylonacantha</i>	D = 0.0060 – 0.0268	ISSR	Rocha (2006)
<i>A. difformis</i>	D = 0.0125 – 0.0615	ISSR	Rocha (2006)
<i>A. striata</i>	D = 0.0122 – 0.0512	ISSR	Rocha (2006)
<i>A. hidalguensis</i>	D= 0.0208	ISSR	Rocha (2006)
<i>A. celsii albicans</i>	D = 0.0280 – 0.0891	ISSR	Rocha (2006)
<i>A. garciae-mendozae</i>	D = 0.0219 – 0.0457	ISSR	González, (2004)
<i>A. cupreata</i>	D = 0.0348 – 0.0930	ISSR	Aguirre (2004), Eguiarte et. al.,(2003)
<i>A. potatorum</i>	D = 0.0228 - 0.0550	ISSR	Aguirre (2004), Eguiarte et. al.,(2003)
<i>A. subsimplex</i>	D = 0.0148 – 0.025	RAPDs	Navarro et al. (2003)
<i>A. cerulata</i>	D = 0.0141 – 0.092	RAPDs	Navarro et al. (2003)
<i>A. deserti</i>	D = 0.0062 – 0.0292	RAPDs	Navarro et al. (2003)
<i>A. lechuguilla</i>	D = 0.03 – 0.12	Isoenzimas	Silva-Montellano y Eguiarte (2003)
<i>A. victoriae-reginae</i>	D = 0.182 (promedio)	Isoenzimas	Martínez-Palacios et al. (1999)

5.5 Consideraciones finales.

Si recapitulamos lo dicho a lo largo de la discusión, podemos ver que de las comparaciones hechas en los trabajos de genética de poblaciones en las diferentes especies del género *Agave*, los niveles de variación genética son altos y la diferenciación genética entre poblaciones nos indica que en algunos grupos una parte de esta variación se encuentra repartida entre las poblaciones, al disminuir el flujo génico origina una diferenciación genética entre las distintas poblaciones, sugiriéndonos que estas poblaciones han divergido hace tiempo. Lo anterior no sucede en *A. xylonacantha*, ya que esta especie presenta una variación genética moderada y una baja estructura poblacional, así como un alto flujo génico, originando que los valores de las distancias genéticas entre las poblaciones se vean reducidas, indicándonos que las poblaciones han divergido hace poco tiempo, es decir, que posiblemente sean de un origen muy reciente.

Otro factor que se debe de considerar es la variación genética dentro de las poblaciones analizadas de *A. xylonacantha*. Como se mencionó al principio de esta discusión, en la gráfica de correlación entre la latitud y la heterocigosis, vemos que conforme aumenta la latitud la heterocigosis disminuye. Si a esto le añadimos que la población de Metztlán es la que presenta la mayor distancia genética, podemos proponer que las poblaciones que se ubican más al norte son las más recientes y que posiblemente el centro de origen para esta especie sea en Metztlán. Esto lo podemos ver de manera más clara si analizamos detalladamente el dendrograma de la figura 4.5, observando que las poblaciones de El Lindero y Ciudad Valles resultan ser más cercanas a la población de Tolantongo, y que la población de Metztlán se encuentra en la base del dendrograma, es decir, que es genéticamente la más diferente.

Una propuesta interesante sería el realizar un estudio en donde se relacionen tanto la genética de poblaciones como la ecología reproductiva de todas poblaciones conocidas, realizando un detallado muestreo dentro del área de distribución geográfica que presenta esta especie, determinar la proporción de flujo génico entre las poblaciones por medio de marcadores fluorescentes, así como utilizar marcadores más finos para los análisis de

diversidad genética y estructura poblacional, dado que se pueden encontrar diferencias entre las poblaciones en cuanto a la coloración, forma y tamaño de las flores, en el tipo de visitas de los polinizadores, en el éxito reproductivo y en la producción del néctar. Un ejemplo de esto es lo que sucede en *Agave lechuguilla* (Silva-Montellano, 2001; Silva-Montellano y Eguiarte, 2003), en donde se realizó un estudio de la ecología reproductiva a lo largo de su gradiente de distribución latitudinal, encontrando que las flores tienden a ser más pequeñas, menos abiertas y menos coloridas hacia la parte norte. Con respecto a las visitas florales, reportan que los principales polinizadores parecen ser esfingidos y abejas grandes diurnas. En todas las poblaciones analizadas las abejas resultaron ser los polinizadores potenciales más abundantes. Sin embargo, la abundancia de los polinizadores varía a lo largo del gradiente, disminuyendo la frecuencia de visitas por flor hacia las poblaciones más norteñas, así como la producción de frutos. Este tipo de datos nos proporcionaría una visión más amplia, detallada y precisa de lo que está sucediendo dentro de la especie, así como poder conocer y proteger a sus polinizadores, ya que estos juegan un papel fundamental en la manutención de la diversidad y estructura genética.

Por otro lado, las metodologías moleculares han revolucionado el análisis genético. Los polimorfismos basados en DNA se están usando para la construcción de mapas de ligamiento, estrategias de selección asistida por marcadores, pruebas de parentesco, identificación de especies y estudios de genética de poblaciones. Estos últimos son una herramienta para poder entender un poco más acerca de la evolución del género *Agave*, así como de aportar elementos necesarios para el manejo de estas especies y poder diseñar programas de conservación para mantener de esta forma, la diversidad y estructura genética de las poblaciones naturales.

6 CONCLUSIONES

- ◆ Los ISSR's resultaron ser una técnica simple, rápida y eficiente para los análisis de genética de poblaciones, por ser específicos, reproducibles y por el alto polimorfismo visualizado fácilmente en geles de agarosa, obteniendo un total de 65 loci para los tres *primers*, los cuales van de 320 a 1900 pares de bases. Esto nos permite analizar un genotipo relativamente amplio, lo que nos asegura obtener valores confiables, dándonos una idea muy amplia acerca del comportamiento que tienen las poblaciones naturales de *Agave xylonacantha*.
- ◆ La diversidad genética resulto ser relativamente baja en comparación a otras especies de agaves, presentando una $H_t = 0.192$ y un $P = 67.69\%$. Las poblaciones que presentan una mayor diversidad genética son Metztlán $H_E = 0.194$ y Tolantongo $H_E = 0.186$.
- ◆ Esta especie presenta una estructura poblacional baja, con un valor de $F_{ST} = 0.0633$, lo cual se encuentra relacionado con el alto nivel de flujo génico, obteniendo un valor de $Nm = 6.61$.
- ◆ El alto nivel de flujo génico encontrado provoca que las poblaciones se mantengan interconectadas genéticamente, originando que los valores de las distancias genéticas entre las poblaciones analizadas se vean reducidas, van de un mínimo de 0.0094 a un máximo de 0.0187, ($\bar{D} = 0.0149$).
- ◆ Los resultados del análisis de aislamiento por distancia nos indican que no hay una correlación significativa entre las distancias genéticas y las distancias geográficas presentes entre cada par de poblaciones, es decir que esta especie no sigue un modelo de aislamiento por distancia.

◆ El mayor porcentaje de la variación se encuentra dentro de las poblaciones con el 91.29 % de la variación genética. Las poblaciones que se deben de conservar son las de Tolantongo y Metztitlán, ya que con estas poblaciones se tendría casi el total de la variación genética (98.52 %), lo cual coincide con los valores obtenidos para diversidad genética, siendo estas poblaciones las que presentan una mayor heterocigosis esperada.

◆ Para tener una mejor visión de lo que esta pasando dentro de la especie seria necesario realizar un estudio de genética de poblaciones y ecología reproductiva con el total de las poblaciones que se tienen registradas, diseñando un muestreo detallado dentro del área de distribución geográfica de la especie, así como utilizar marcadores más finos para los análisis de diversidad genética y estructura poblacional.

APÉNDICE 1

Protocolo de extracción de DNA para *Agave xylonacantha*

1. En un mortero cortar tiras pequeñas de tejido (alrededor de 1g) y moler con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, eliminar el máximo de fibras. De ser posible, tratar de moler en un solo evento y no moler la muestra excesivamente (esto provoca que el ADN se fraccione).
2. Agregar 250 µl de buffer de extracción CTAB y 750 µl de buffer STE, seguir moliendo y recuperar en un microtubo de 1.5ml. (Es importante conservar las proporciones de los buffers, sin embargo las cantidades pueden variar según la textura y consistencia de la muestra, al tratar de obtener un jarabe). Centrifugar a 10 000 rpm durante 8 minutos y eliminar el sobrenadante.
3. Resuspender con 400 µl de CTAB 2X y 600 µl de STE. Centrifugar a 10 000 rpm durante 8 min. Eliminar el sobrenadante y resuspender con 600 µl de CTAB 2X.
4. Agregar 4 µl de RNAsa (7000 U/ml), e Incubar a 37°C por 20 minutos. (Durante la incubación es conveniente invertir los tubos 2 ó 3 veces). Conservar en hielo 10-15 minutos.
5. Agregar 40 µl de proteinasa K (20 mg/ml) e incubar a 65°C por 20 minutos. (Durante la incubación es conveniente invertir los tubos 2 ó 3 veces). Poner en hielo 10-15 minutos.
6. Agregar a cada tubo 600 µl de cloroformo:octanol 24:1, agitar en vortex hasta homogeneizar, (no exceder la agitación). Centrifugar a 9 000 rpm durante 12 min. (o hasta que el sobrenadante quede transparente, o bien repetir el paso de cloroformo: octanol con el sobrenadante resultante del centrifugado).
7. Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo. Este paso es fundamental para obtener un ADN limpio. Se debe evitar recuperar material de la difase que se forma, recuperar con una pipeta de 200 µl solo el 70% del sobrenadante. Se obtendrá menos ADN pero más limpio.
8. Precipitar el ADN con isopropanol frío a -20°C. El volumen es 2/3 del volumen obtenido del sobrenadante en el paso anterior (600 µl aprox.). Dejar reposar 2 horas a -20°C. No es recomendable dejar precipitando muchas horas, pues el producto resulta más sucio.

9. Centrifugar a 9 000 rpm durante 5 min. Eliminar el sobrenadante. Se observará un pequeño botón al fondo del tubo, este debe ser de color blanco translucido. Si es muy blanco y grande es posible que este sucio. Muestras de este tipo es conveniente eliminarlas.

10. Limpiar el ADN agregando 1ml de etanol al 70% frío a -20°C , mezclar en vortex hasta observar que el botón se desprende dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 8 000 rpm durante 5 min. Eliminar el sobrenadante sin perder de vista el botón. Si lo considera necesario se puede repetir el lavado con alcohol al 80%.

11. Rehidratar el ADN con agua ultra pura, el volumen de agua depende del tamaño del botón y puede ir de $15\mu\text{l}$ a $150\mu\text{l}$ aproximadamente.

Reactivos:

- **Buffer de extracción CTAB 2X**

Tris-HCl 100 mM pH8

NaCl 1.4 M

EDTA 20 mM pH8

CTAB 2%

b-mercaptoetanol 0.3% (no agregar este reactivo hasta el momento de usar el buffer)

- **Buffer de extracción CTAB**

Tris-HCl 100 mM pH8

NaCl 1.5 M

EDTA 20 mM pH8

CTAB 4%

PVP40 4%

Ac. Ascórbico 0.1%

DIECA 0.1%

b-mercaptoetanol 0.3% (no agregar este reactivo hasta el momento de usar el buffer)

- **Buffer de extracción STE**

Tris-HCl 100 mM pH8

EDTA 50 mM pH8

NaCl 100 mM

b-mercaptoetanol 0.3% (no agregar este reactivo hasta el momento de usar el buffer)

APÉNDICE 2

Reacciones para PCR de *A. xylonacantha*

Primer 853

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL	REACCION DE 30µl
Buffer	10X	1X	3 µl
MgCl ₂	50 mM	4.6 mM	2.76 µl
dNTPmix	2.5 Mm c/u	0.2 mM	2.4 µl
Primer	10 µM	0.4 µM	1.2 µl
DNA	50 ng/µl	70 ng	1.5 µl
Taq	5 U/µl	0.7 U/µl	0.14 µl
Agua			19 µl
		TOTAL	30 µl

Primer 846

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL	REACCION DE 30µl
Buffer	10X	1X	3 µl
MgCl ₂	50 mM	2.0 mM	0.3µl
dNTPmix	2.5 Mm c/u	0.2 mM	2.4 µl
Primer	10 µM	0.4 µM	1.2 µl
DNA	50 ng/µl	70 ng	1.8 µl
Taq	5 U/µl	0.7 U/µl	0.14 µl
Agua			21.16 µl
		TOTAL	30 µl

Primer 811

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	CONCENTRACIÓN FINAL	REACCION DE 30µl
Buffer	10X	1X	3 µl
MgCl ₂	50 mM	2.53 Mm	0.618 µl
dNTPmix	2.5 Mm c/u	0.2 mM	2.4 µl
Primer	10 µM	0.4 µM	1.2 µl
DNA	50 ng/µl	70 ng	1.8 µl
Taq	5 U/µl	0.7 U/µl	0.14 µl
Agua			20.842 µl
		TOTAL	30 µl

APÉNDICE 3

Frecuencias alélicas por loci para cada una de las poblaciones.

LOCUS	METZTITLAN		TOLANTONGO		CIUDADVALLES		EL LINDERO	
	p	q	p	q	p	q	p	q
1	0.0961	0.9039	0.1424	0.8576	0.1172	0.8828	0.1327	0.8673
2	0.0400	0.9600	0.0167	0.9833	0.0280	0.9720	0.1533	0.8467
3	0.1255	0.8745	0.1618	0.8382	0.3101	0.6899	0.0179	0.9821
4	0.0400	0.9600	0.0864	0.9136	0.0139	0.9861	0.0000	1.0000
5	0.1716	0.8284	0.1618	0.8382	0.0280	0.9720	0.0928	0.9072
6	0.0537	0.9463	0.0509	0.9491	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
7	0.4576	0.5424	0.4776	0.5224	0.3730	0.6270	0.4932	0.5068
8	0.0400	0.9600	0.2232	0.7768	0.0715	0.9285	0.1327	0.8673
9	0.0537	0.9463	0.0509	0.9491	0.1017	0.1017	0.0735	0.9265
10	0.0537	0.9463	0.1046	0.8954	0.1172	0.8828	0.0546	0.9454
11	0.0400	0.9600	0.0336	0.9664	0.1330	0.8670	0.0179	0.9821
12	0.5081	0.4919	0.4469	0.5531	0.8103	0.1897	0.6116	0.3884
13	0.0537	0.9463	0.0685	0.9315	0.0423	0.9577	0.1327	0.8673
14	0.2203	0.7797	0.1046	0.8954	0.3101	0.6899	0.1327	0.8673
15	0.1255	0.8745	0.2023	0.7977	0.0865	0.9135	0.2185	0.7815
16	0.0265	0.9735	0.0000	1.0000	0.0280	0.9720	0.0546	0.9454
17	0.1107	0.8893	0.0864	0.9136	0.1172	0.8828	0.2185	0.7815
18	0.0676	0.9324	0.1046	0.8954	0.0139	0.9861	0.0360	0.9640
19	0.4340	0.5660	0.4776	0.5224	0.3101	0.6899	0.4594	0.5406
20	0.0400	0.9600	0.0000	1.0000	0.0139	0.9861	0.0000	1.0000
21	0.0000	1.0000	0.0336	0.9664	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
22	0.1716	0.8284	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
23	0.0000	1.0000	0.0167	0.9833	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
24	0.0132	0.9868	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
25	0.0818	0.9182	0.0509	0.9491	0.0000	1.0000	0.0928	0.9072
26	0.4340	0.5660	0.2448	0.7552	0.5526	0.4474	0.3414	0.6586
27	0.0400	0.9600	0.0509	0.9491	0.1654	0.8346	0.0179	0.9821
28	0.6662	0.3338	0.1818	0.8182	0.1490	0.8510	0.1745	0.8255
29	0.0400	0.9600	0.0167	0.9833	0.0280	0.9720	0.1125	0.8875
30	0.7078	0.2922	0.5831	0.4169	0.8103	0.1897	0.5294	0.4706
31	0.0132	0.9868	0.1046	0.8954	0.0280	0.9720	0.0360	0.9640
32	0.1559	0.8441	0.1424	0.8576	0.1654	0.8346	0.1533	0.8467
33	0.0400	0.9600	0.0864	0.9136	0.1490	0.8510	0.0546	0.9454
34	0.1255	0.8745	0.0685	0.9315	0.0000	1.0000	0.0179	0.9821
35	0.2038	0.7962	0.7258	0.2742	0.6571	0.3429	0.5294	0.4706

LOCUS	METZTITLAN		TOLANTONGO		CIUDADVALLES		EL LINDERO	
	p	q	p	q	p	q	p	q
36	0.1107	0.8893	0.0336	0.9664	0.0000	1.0000	0.0925	0.9072
37	0.3685	0.6315	0.2448	0.7552	0.1330	0.8670	0.0928	0.9072
38	0.4340	0.5660	0.1818	0.8182	0.2165	0.7835	0.0546	0.9454
39	0.0676	0.9324	0.1424	0.8576	0.0000	1.0000	0.1327	0.8673
40	0.1406	0.8594	0.0167	0.9833	0.0000	1.0000	0.0179	0.9821
41	0.0400	0.9600	0.0509	0.9491	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
42	0.0818	0.9182	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0360	0.9640
43	0.1875	0.8125	0.3136	0.6864	0.1017	0.8983	0.4594	0.5406
44	0.0537	0.9463	0.0336	0.9664	0.1017	0.8983	0.0360	0.9640
45	0.2038	0.7962	0.0864	0.9136	0.1330	0.8670	0.1327	0.8673
46	0.0000	1.0000	0.0167	0.9833	0.0865	0.9135	0.0928	0.9072
47	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000
48	0.1107	0.8893	0.0336	0.9664	0.0715	0.9285	0.3151	0.6849
49	0.0000	1.0000	0.0685	0.9315	0.0139	0.9861	0.0000	1.0000
50	0.7078	0.2922	0.5102	0.4898	0.8103	0.1897	1.0000	0.0000
51	0.0400	0.9600	0.0336	0.9664	0.0000	1.0000	0.000	1.000
52	0.2038	0.7962	0.2670	0.7330	0.2526	0.7474	0.3414	0.6586
53	0.0400	0.9600	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
54	0.3482	0.6518	0.2448	0.7552	0.4947	0.5053	0.1745	0.8255
55	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000	0.0865	0.9135	0.1327	0.8673
56	0.0676	0.9324	0.2023	0.7977	0.0568	0.9432	0.2652	0.7348
57	0.0000	1.000	0.0167	0.9833	0.0000	1.0000	0.0000	1.0000
58	0.5955	0.4045	0.7258	0.2742	0.8103	0.1897	0.7851	0.2149
59	0.0265	0.9735	0.0000	1.0000	0.0139	0.9861	0.0000	1.0000
60	0.3685	0.6315	0.2232	0.7768	0.4428	0.5572	0.4277	0.5723
61	0.0000	1.0000	0.0167	0.9833	0.0139	0.9861	0.0000	1.0000
62	0.2373	0.7627	0.2448	0.7552	0.2526	0.7474	0.1125	0.8875
63	0.0132	0.9868	0.0685	0.9315	0.2165	0.7835	0.1125	0.8875
64	0.0132	0.9868	0.0167	0.9833	0.2165	0.7835	0.0000	1.0000
65	0.0676	0.9324	0.0336	0.9664	0.0568	0.9432	0.1125	0.8875

LITERATURA CITADA

- AGUIRRE, D. X. 2004. Genética de poblaciones de *Agave cupreata* y *Agave potatorum*: aportaciones para el manejo y conservación de dos especies mezcaleras. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D. F. 73p.
- ARCADE, A., F. ANSELIN, P. F. RAMPANT, M. C. LESAGE, L. E. PAQUES, Y D. PRAT. 2000. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetics mapping of European and Japanese larch. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 299-307.
- BORNET, B. Y M. BRANCHARD 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 209-215.
- COCKERHAM, C. C. 1969. Variance of gene frequencies. *Evolution* 23: 72-83.
- CROW, J. F. Y K. AOKI (1984). Group selection for a polygenic behavioral trait: Estimating the degree of populatiion subdivision. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA* 81: 6073-6077.
- DOYLE, J. J. Y J. L. DOYLE. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11-15.
- EGUIARTE, L. E. 1990. Genética de poblaciones de *Astrocaryum mexicanum* Liebm. en Los Tuxtlas, Ver. Tesis de doctorado. Centro de Ecología. UNAM. México, D.F.
- EGUIARTE, L. E. 1999. Una Guía para Principiantes a la Genética de Poblaciones. En: La Evolución Biológica. J. Núñez Farfán y L. E. Eguiarte [eds.]. México, D.F., UNAM: 35-50.
- EGUIARTE, L. E., V. SOUZA, Y A. SILVA-MONTELLANO. 2000. Evolución de la familia Agavaceae: Filogenia, Biología reproductiva y genética de poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 66: 131-150.
- EGUIARTE, L. E., X. AGUIRRE., M. ROCHA., C. TORRES., A. SILVA-MONTELLANO, Y A. VALERA. 2003. Diversidad genética de dos especies mezcaleras Proyecto Conabio V038, Informe final.
- ESSELMAN, E. J., L. JIANQIANG, D. J. CRAWFORD, J. L. WINDUS, Y A. D. WOLFE. 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology* 8: 443-451.

- EXCOFFIER, L. Y P. E. SMOUSE. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- EXCOFFIER, L. 2001. Analysis of population subdivision. En: D. J. Balding, M. Bishop, y C. Cannings [eds.], *Handbook of Statistical Genetics*. John Wiley and Sons.
- GALVÁN, R. Y L. HERNÁNDEZ-SANDOVAL. 2002. *Agave garciae-mendozae*, a new species from central Mexico. *Cactus and Succulent Journal* 74: 188-191.
- GARCÍA-MENDOZA, A. Y R. GALVÁN. 1995. Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 56: 7-24.
- GARCÍA-MENDOZA, A. 2002. Distribution of *Agave* (Agavaceae) in Mexico. *Cactus and Succulent Journal* 74: 177-186.
- GENTRY, H. S. 1982. *Agaves of continental North America*. The University of Arizona Press, Arizona.
- GILLESPIE, J. H. 1998 *Population Genetics, A Concise Guide*. USA, The Johns Hopkins University Press.
- GONZÁLEZ, A. 2004. *Biología reproductiva y genética de poblaciones del Agave garciae-mendozae*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D. F. 88 p.
- GUPTA, M., Y-S. CHYL., J. ROMERO-SEVERSON, Y J. L. OWEN. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 998-1006.
- GUPTA, P. K. Y R. K. VARSHNEY. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetics analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113: 163-185.
- HAMRICK, J. L. Y J. W. GODT. 1989. Allozyme diversity in plant species. *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*. H. D. Brown, M. T. Clegg, A. L. Kah.er and B. S. Weir. Sunderland, M.A., *Sinauer*: 43-63.
- HAMRICK, J. L. Y M. J. W. GODT. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. En: J. Silvertown, M. Franco, y J. L. Harper [eds.], *Plant life histories, ecology, phylogeny and evolution*. The Royal Society and Cambridge University Press, Cambridge.
- HANSEN, M., C. HALLDEN, Y T. SÄLL. 1998. Error rates and polymorphism frequencies for three RAPD protocols. *Plant Molecular Biology Reporter* 16: 139-146.

- HARRIS, H. 1966. Enzyme polymorphisms in man. *Proceeding of the Royal Society of the London Series B* 164: 298-310.
- HARTL, D. L. Y A. G. CLARK. 1989. Principles of population genetics. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- HARTL, D. L. Y A. G. CLARK. 1997. Principles of population genetics. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- HEDRICK, P. W. 1983. Genetics of populations Science Books International. Boston.
- HEDRICK, P. W. 2000. Genetics of populations. Jones and Bartlett Pub, Mass.
- HUGHES, A. L. 1999. Adaptive evolution of genes and genomes. Oxford University Press. New York.
- JONES, C. J., K. J. EDWARDS., S. CASTAGLIONE., M. O. WINFIELD., F. SALE, C. VAN DE WIEL., G. BREDEMEIJER., M. BUIATTI., E. MAESTRI., A. MALCHEVSHI., N. MARMIROLI., R. AERT., G. VOLCKAERT., J. RUEDA., R. LINACERO., A. VAZQUEZ, Y A. KARP. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plant by a network of European laboratories. *Molecular Breed* 3: 381-390.
- KARP, A., S. KRESOVICH., K. V. BHAT., W. G. AYADA, Y T. HODGKIN. 1997. Molecular tools in plant genetics resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI technical bulletin no 2. *International Plant Genetic Resources Institute*, Rome, Italy.
- KOJIMA, T., T. NAGAOKA., K. NODA, Y Y. OGIHARA. 1998. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 37-45.
- LEWONTIN, R. C. Y J. L. HUBBY 1966. A molecular approach to the study of the genetic heterozygosity in natural populations II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54: 595-609.
- LEWONTIN, R. C. 1974. "The analysis of variance and the analysis of causes." *American Journal Human Genetics* 26: 400-411.
- LOVELES, M.D. Y J. L. HAMRICK. 1984. Ecological determinants of genetics structure in plant populations. *Annual Review Ecology and Systematics* 15: 65-95.
- LYNCH, M. Y B. G. MILLIGAN. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.

- MANTEL, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27 : 209-220.
- MARTÍNEZ-PALACIOS, A., L. E. EGUIARTE, Y G. FURNIER. 1999. Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoria-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. *American Journal of Botany* 86: 1093-1098.
- MASSEY, L. K. Y J. L. HAMRICK. 1998. Genetic diversity and population structure of *Yucca filamentosa* (Agavaceae). *American Journal of Botany* 85: 340-345.
- MILLER, M. P. 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA). Ver.1.3. Northern Arizona University, Flagstaff, AZ.
- MEYER, W., T. G. MITCHELL., E. Z. FREEDMAN, Y R. VILGAYS. 1993. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strain of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 31: 2274-2280.
- NAVARRO-QUEZADA, A., R. GONZÁLEZ-CHAUVET., F. MOLINA-FREANER, Y L. E. EGUIARTE. 2003. Genetic differentiation in the *Agave deserti* (Agavaceae) complex of the Sonoran desert. *Heredity* 90: 220-227.
- NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*. 106(84,284): 238-292.
- NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3321-3323.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- NEI, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. New York, Columbia University Press.
- NIKLAS, K. J. 1997. The evolutionary biology of plants. Cambridge University Press.
- NYBOM, H. Y I. BARTISH. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD marker in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 3: 93-114.
- NYBOM, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plant. *Molecular Ecology* 13: 1143-1155.
- PRADEEP, R. M., SARLA, N, Y SIDDIQ E. A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128 : 9-17.
- PROVINE, W. B. 1971. The Origins of Theoretical Population Genetics. Chicago, University of Chicago Press.

- RAYMOND, M. L. Y F. ROUSSET. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.
- ROCHA, M. G., A. VALERA, Y L. E. EGUIARTE. 2005. Reproductive ecology of five sympatric *Agave Littaea* (Agavaceae) species in central Mexico. *American Journal of Botany* 92(8): 1330-1341.
- ROCHA, M. G. 2006. Genética evolutiva comparada en cinco especies de *Agave*. Tesis de doctorado. Instituto de Ecología. UNAM. México, D. F.
- SÁNCHEZ-MEJORADA, H. 1978. Manual de campo de las cactáceas y suculentas de la Barranca de Metztitlán. Sociedad Mexicana de Cactología, México.
- SANKAR, A. A. Y G. A. MOORE. 2001. Evaluation of Inter-simple sequence repeat analysis for mapping in *Citrus* and extension of genetic linkage map. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 206-214.
- SCHAFFER, W.M. Y M.V. SCHAFFER. 1977. The reproductive biology of Agavaceae : I. Pollen and nectar production in four Arizona agaves. *Southwestern Naturalist* 22 :157-168.
- SCHNEIDER, S., D. ROESSLI. Y E. EXCOFFIER. 2000. Arlequin Version 2.0 A Software for Population Genetic Data Analysis. University of Geneva, Geneva.
- SILVA-MONTELLANO, A. 2001. Ecología reproductiva y genética de poblaciones de *Agave lechuguilla* (Torr.) en un gradiente latitudinal. Tesis de doctorado. Instituto de Ecología. México, UNAM. México, D. F.
- SILVA-MONTELLANO, A. Y L. E. EGUIARTE. 2003. Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert. II. Genetic variation, differentiation, and inbreeding estimates. *American Journal of Botany* 90: 700-706.
- SLATKIN, M. Y N. H. BARTON. 1989. A comparison of three methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43: 1358-1368.
- SLATKIN, M. 1994. Gene Flow and Population Structure. Ecological Genetics. L. A. Real. New Jersey, Princenton University Press: 4-17.
- SOKAL, R. R. Y P. H. A. SNEATH. 1963. Principles of Numerical Taxonomy. San Francisco: Freeman Publ.
- STAUB, J. E., F. C. SERQUEN, Y M. GUPTA. 1996. Genetics markers, map construction and their application in plant breeding. *Horticultural Science* 31 (5): 729-739.
- TAUTZ, D. 1989. Hyperbriability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17 (16): 6463-6471.

- TSUMURA, Y., K. OHBA, Y S. H. STRAUS.1996. Diversity and inheritance of Inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglasfir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theoretical and Applied Genetics* 92: 40-45.
- VOS, P., R. HOGERS., M. BLEEKER., M. REIJANS., T. VAN DE LEE., M. HORNES., A. FRIJTERS., J. POT, J. PELEMAN., M. KUIPER, Y M. ZABEAU. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- VIRK, P. S., J. ZHU., H. J. NEWBURY., G. J. BRYAN., M. T. JACKSON, Y B. V. FORD-LLOYD. 2000. Effectiveness of different classes of molecular markers for classifying and revealing variations in rice (*Oryza sativa*) germplasm. *Euphytica* 112: 275-284.
- WEIR, B. S. Y 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, Mass.
- WILLIAMS, J. G. K., A. R. KUBELIK., K. J. LIVAK., J. A. RAFALSKI, Y S. V. TINGEY. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- WOLFE, A. D. Y A. LISTON. 1998. Contribution of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. En: D. E. Soltis, P. S. Soltis, y J. J. Doyle [eds.], Molecular systematics of plants, 43-86. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- WOLFE, A. 2000. ISSR Resource Website.
<http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/ISSR.html>
- WOLFF, K, M. Y MORGAN-RICHARDS. 1998. PCR Markers distinguish *Plantago major* subspecies. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 282-286.
- WRIGHT, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138.
- WRIGHT, S. D. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 395-420.
- WRIGHT, S. 1969. Evolution and the genetics of populations. Volúmen II: The theory of gene frequencies. The University of Chicago Press, Chicago.
- WU, K., R. JONES., L. DANNAEBERGER, Y P. A. SCOLNIK.1994. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Research* 22: 3257-3258.

ZIETKIEWICZ, E., A. RAFALSKI, Y D. LABUDA. 1994. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored polimerase chain reactions amplification. *Genomics* 20: 176-183.