



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA**

“Genética de Poblaciones de *Agave striata* Zucc.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA AMBIENTAL)

P R E S E N T A

LAURA TREJO HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS

MÉXICO, D.F.

Septiembre 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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología, UNAM, bajo la dirección del Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns y con apoyo de los proyectos:

Ecología, genética y biología de la conservación de las poblaciones del género *Agave* en la Reserva de la Biósfera de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo, SEMARNAT-CONACYT 2002 CO1-0246.

Proyecto CONACYT-SEP 2004 CO1-46475-Q (CONACYT-Fondo sectorial de investigación para la educación) “Diversificación de angiospermas de México: relojes moleculares, tasas de especiación, biomecánica y espacios ecológicos”

Agradezco el apoyo económico a través de la beca de maestría otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, además del complemento de beca de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM.

Gracias a los miembros del Comité Tutorial: Dr. Alejandro Casas Fernández, Dr. Juan Núñez Farfán y Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns, por su orientación y por las correcciones a esta tesis.

Agradecimientos

Al Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns por su apoyo y tiempo invertido en dirigir este trabajo.

Al Biól. Aldo Varela por enseñarme a extraer DNA y el montaje de la técnica de los ISSR's.

A la Biól. Andrea Gonzáles por su ayuda en el manejo de los datos y por sus observaciones hechas al escrito.

A la Dra. Martha Rocha por su apoyo en la dirección y la revisión de este trabajo.

Al Dr. Juan Núñez por ser parte de mi comité tutorial, por sus valiosas sugerencias y por la revisión del escrito.

Al Dr. Alejandro Casas por su colaboración dentro de mi comité tutorial y por sus importantes rectificaciones al escrito.

Al Dr. Daniel Piñero por revisar y enriquecer esta tesis.

A Manuel Rosas y Doña Silvia por su ayuda en la obtención de los resultados de esta tesis.

A la Dra. Valeria Souza por sus valiosos comentarios y entusiasmo.

A todos los estudiantes del laboratorio por su compañerismo, por sus consejos y enseñanzas.

A Armando por su apoyo en el manejo de los datos estadísticos.

A mi familia

A Elizabeth

A Ofelia

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Diversidad genética y estructura poblacional.....	3
1.1.1 Variación genética.....	3
1.1.2 Estructura genética.....	4
1.1.3 Distancias genéticas.....	6
1.2 Inter simple sequence repeats (ISSR's).....	7
1.3 El género <i>Agave</i>	10
1.3.1 <i>Agave striata</i>	12
1.4 Planteamiento del problema de estudio.....	17
2. OBJETIVOS	18
3. HIPÓTESIS	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1 Colecta de campo.....	19
4.2 Extracción de DNA.....	22
4.3 Amplificación de DNA por medio de ISSR's.....	22
4.4 Frecuencias alélicas.....	24
4.5 Variación genética.....	25
4.6 Estructura genética.....	26
4.7 Distancias genéticas y aislamiento por distancia.....	28
5. RESULTADOS	29
5.1 Extracción de DNA.....	29
5.2 Variación genética.....	30
5.3 Estructura genética.....	36
5.4 Distancias genéticas y aislamiento por distancia.....	38
6. DISCUSIÓN	46
6.1 Inter simple sequence repeats (ISSR's).....	46
6.2 Variación genética.....	46
6.3 Estructura genética.....	49
6.4 Distancias genéticas y aislamiento por distancia.....	52
7. CONCLUSIONES	57
8. APÉNDICES	58
8.1 APÉNDICE 1.....	58
8.2 APÉNDICE 2.....	61
8.3 APÉNDICE 3.....	62
8.4 APÉNDICE 4.....	65
8.5 APÉNDICE 5.....	66
9. LITERATURA CITADA	68

Resumen

Agave striata pertenece al subgénero *Littaea*, grupo *Striatae* y consta de dos subespecies: *striata* de amplia distribución en el norte-centro de México y *falcata* de distribución más restringida en el norte de México (Gentry, 1982). En este trabajo se describe la genética de poblaciones de *Agave striata* (*A. striata* ssp. *striata* y *A. striata* ssp. *falcata*) en términos de su diversidad genética y estructura poblacional. Utilizando ISSR's (Inter Simple Sequence Repeats) como marcador molecular, se analizaron 12 poblaciones de *Agave striata*, 6 por subespecie. Se encontraron niveles de variación genética relativamente altos: *A. striata* $H_E=0.27$; %P= 81, *A. striata* ssp. *striata* $H_E=0.25$; %P= 70, *A. striata* ssp. *falcata* $H_E=0.28$; %P= 81. La estructura genética para *A. striata* fue de $\theta=0.19$; para la subespecie *striata* se observó mayor estructura genética ($\theta=0.27$) que la subespecie *falcata* $\theta=0.1$. El flujo génico para *A. striata* fue de $Nm=1.05$, la subespecie *striata* presentó menor flujo génico ($Nm=0.74$) que la subespecie *falcata* ($Nm=1.89$). Se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA), el cual indicó que el 75% de la variación genética de la especie se encuentra dentro de cada una de las poblaciones. La distancia genética promedio fue alta, tanto para *A. striata* ($D=0.08$) como para sus subespecies *striata* ($D=0.09$) y *falcata* ($D=0.04$). La relación entre las distancias geográficas y las genéticas calculadas nos indica que *A. striata* y las subespecies *striata* y *falcata* siguen un modelo de aislamiento por distancia. Los resultados encontrados en este trabajo describen a *A. striata* ssp. *striata* y *A. striata* ssp. *falcata* como dos grupos cercanos entre sí, pero con claras diferencias en sus historias evolutivas y posiblemente se encuentren bajo procesos de especiación.

Abstract

Agave striata belongs to the subgenus *Littaea*, group *Striatae* and has two subspecies: *striata* with a wide distribution throughout Northern-Central Mexico and *falcata* with a more restricted distribution in Northern Mexico (Gentry, 1982). In this study the population genetics of *Agave striata* (*A. striata* ssp. *striata* and *A. striata* ssp. *falcata*) is described, from data of genetic diversity and genetic differentiation. Using ISSR's (Inter Simple Sequence Repeats) as the molecular marker, we analyzed twelve populations of *Agave striata*, six per subspecies. We found relatively high levels of genetic variation: *A. striata* $H_E=0.27$; %P= 81, *A. striata* ssp. *striata* $H_E=0.25$; %P= 70, *A. striata* ssp. *falcata* $H_E=0.28$; %P= 81. The genetic differentiation of *A. striata* was high ($\theta=0.19$), being in *A. striata* ssp. *striata* ($\theta=0.27$) higher than in *A. striata* ssp. *falcata* ($\theta=0.1$). Gene flow in *A. striata* was $Nm= 1.05$, being in *A. striata* ssp. *falcata* ($Nm= 1.89$) higher than in *A. striata* ssp. *striata* ($Nm= 0.74$). The analysis of molecular variance indicated that 75% of the genetic variation is found in each population. The average genetic distance was high for *A. striata* ($D=0.04$) as well as for each subspecies in *striata* ($D= 0.09$) and *falcate* ($D=0.04$). The relationship between the geographic and genetic distances suggests a model of isolation by distance for *A. striata* as well as for the subspecies *striata* and *falcata*. The results of this study indicate that *A. striata* ssp. *striata* and *A. striata* ssp. *falcata* are two closely related groups that show clear differences in their evolution apparently reflecting a speciation process.

1. Introducción

1.1 Diversidad genética y estructura poblacional

1.1.1 Variación genética

Los estudios de genética de poblaciones pretenden determinar cuánta variación genética existe en las poblaciones naturales y a explicarla en términos de su origen, mantenimiento e importancia evolutiva (Hartl y Clark, 1997). Estas variaciones son cuantificadas en función de la estructura genética, lo que permite determinar y predecir el estado actual de las poblaciones, hacer predicciones o reconstruir su historia evolutiva (Hedrick, 2000).

Las fuerzas evolutivas afectan la variación genética en las poblaciones naturales. La fuente principal del aumento de la variación es la mutación. La endogamia y la deriva génica disminuyen la variación. La selección y el flujo génico pueden aumentar o disminuir los niveles de variación dependiendo de cada situación en particular (Hedrick, 2000). El resultado final de variación genética en las poblaciones se deberá, en gran medida, a la acción de una o de varias fuerzas evolutivas.

La variación genética de una población se puede medir como la cantidad de heterocigotos que ésta presenta y a esta medida se le denomina heterocigosis esperada (H_E), parámetro conocido también como “diversidad genética” (Nei, 1978). La heterocigosis esperada para un locus cualquiera con n alelos en una población en equilibrio H.-W. es la probabilidad de que al tomar dos alelos al azar de una población, éstos sean iguales.

Otra medida común para cuantificar la variación genética es el porcentaje de loci polimórficos ($\%P$), que es la proporción de loci en los cuales el alelo más común se encuentra en una frecuencia igual o menor a 0.95 (Hedrick, 2000).

1.1.2 Estructura genética

La manera en cómo se distribuye la variación genética dentro y entre las poblaciones constituye su estructura genética. Las especies frecuentemente presentan poblaciones subdivididas o estructuradas, en las cuales el apareamiento no es al azar ni las poblaciones forman unidades panmícticas (Hedrick, 2000).

La estructura de las poblaciones se puede ver afectada por factores ecológicos o geográficos, provocando que haya diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas de una región a otra. 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 está estructurada sus subpoblaciones estarán subdivididas dependiendo de la magnitud de flujo génico que presenten. Cuando el flujo es alto, su efecto es la homogenización de la variación genética entre los grupos. Cuando es bajo, la deriva génica, la selección y la mutación pueden provocar una diferenciación genética mayor entre las subpoblaciones (Hartl y Clark, 1997; Hedrick, 2000).

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

Para evaluar el efecto que tiene la subdivisión en las poblaciones, Wright (1921) definió tres coeficientes F diferentes en términos de un locus con dos alelos, relacionados directamente con los tres niveles que presenta una población subdividida,

es decir la variación genética distribuida a nivel poblacional (T), subpoblacional (S) e individual (I) (Hartl y Clark, 1997; Hedrick, 2000).

La F_{ST} , conocida como índice de fijación subpoblacional estima la diferenciación genética entre las poblaciones. Este coeficiente se obtiene a partir de H_S y H_T , donde H_S es la proporción de heterocigos esperada promedio a nivel subpoblacional y H_T es la proporción de heterocigos a nivel global, con equilibrio de H.-W.: $F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$. La G_{ST} (Nei, 1972) es análoga a la F_{ST} cuando se trabaja con loci multialélicos.

Si F_{ST} es igual a cero significa que las frecuencias alélicas son iguales en todas las poblaciones, lo cual implica que el total de la variación se encuentra en cualquier subpoblación. Si F_{ST} es igual a 1, todas las poblaciones son distintas entre sí y se tendrían que juntar todas las subpoblaciones para tener el total de la variación y el máximo de estructuración.

Otro parámetro que se utiliza 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 qué tan diferenciadas están las poblaciones (Weir, 1996).

F_{IS} , también llamado coeficiente de endogamia, mide la reducción de la heterocigosis de un individuo debido al apareamiento no aleatorio dentro de su subpoblación (Hartl y Clark, 1997): $F_{IS} = (H_S - H_I) / H_S$.

F_{IT} o coeficiente de endogamia total de un individuo, mide la reducción en la heterocigosis de ese individuo con respecto a la población total (Hartl y Clark; 1997): $F_{IT} = (H_T - H_I) / H_T$.

1.1.3 Distancia Genética

La distancia genética representa las diferencias de las frecuencias alélicas entre poblaciones. Permite evaluar la cantidad y el patrón de variación compartida entre diferentes grupos. La existencia de distancias genéticas pequeñas puede deberse a que la separación de las poblaciones es reciente. También puede deberse a que las poblaciones son grandes o a que presentan el flujo génico suficientemente alto para contrarrestar los efectos de la deriva génica. Si las distancias genéticas son grandes puede deberse a que las poblaciones se separaron mucho tiempo atrás, el flujo génico es limitado, permitiendo que la deriva génica genere grandes diferencias entre las poblaciones.

Cuando la estructura genética está fuertemente influenciada por la distribución geográfica de las poblaciones, es de esperarse que las poblaciones más cercanas presenten menores distancias genéticas que aquellas poblaciones que se encuentran más alejadas entre sí geográficamente. A este principio se le conoce como “aislamiento por distancia” (Wright, 1951) e indica que los individuos tienden a aparearse más con aquellos más cercanos geográficamente de lo que se esperaría al azar.

1.2 Inter simple sequence repeats (ISSR's)

Marcadores Moleculares

Las estrategias clásicas para la detección de variación genética (análisis de tamaño, forma, color, morfología, cariotipos, experimentos de jardín común) han sido completadas con técnicas moleculares. Estas técnicas incluyen el análisis de los constituyentes químicos y la caracterización de macromoléculas. Los marcadores moleculares constituyen métodos de análisis genético-moleculares que se basan en la detección de polimorfismos en proteínas y en DNA. Sus principios y técnicas se han utilizado para resolver problemas específicos en genética y ecología de poblaciones, evolución de sistemas reproductivos, mapeo genético de caracteres de interés agronómico, procesos de hibridación e introgresión, determinación de patrones biogeográficos, resolución e identificación de relaciones taxonómicas, reconstrucción de filogenias y biología de la conservación (Parker *et al.*, 1998; Soltis y Soltis, 1989; Otero *et al.*, 1999; Nybom, 2004; Schlötterer, 2004).

La introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Polymerase Chain Reaction), es un método *in vitro* de amplificación enzimática de segmentos específicos de DNA, ha simplificado el estudio de la variación genética y ha transformado la manera en que se llevan a cabo los análisis genéticos (Saiki *et al.*, 1988; Otero *et al.*, 1999). Entre las técnicas más utilizadas de este tipo en el análisis de la variación genética tenemos:

RAPD's (Random Amplified Polymorphic) (Williams *et al.*, 1990), emplean oligonucleótidos o primers al azar sin previo conocimiento de las secuencias de los genes que se quiere estudiar. Son altamente polimórficos, relativamente fáciles y rápidos de realizar, pero poseen baja reproducibilidad y poca especificidad, debido a las bajas temperaturas de alineación de los primers (Parker *et al.*, 1998; Nybom, 2004; Schlötterer, 2004).

En el caso de los AFLP's (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Vos *et al.*, 1995), son altamente reproducibles, polimórficos y no requieren del conocimiento previo de la secuencia de DNA, pero esta técnica resulta más laboriosa y costosa que la de RAPD's (Parker *et al.*, 1998; Nybom, 2004; Schlötterer, 2004).

Los microsatélites o SSR's (Simple Sequence Repeats) (Litt y Luty, 1989), son codominantes, específicos y polimórficos, pero requieren del conocimiento de la secuencia genómica para diseñar los primers y tienen un alto costo (Parker *et al.*, 1998; Nybom, 2004; Schlötterer, 2004).

Los ISSR's (Inter simple sequence repeats) (Zietkiewicz *et al.*, 1994) son marcadores semiarbitrarios. No requieren información previa sobre las secuencias del genoma a estudiar son, polimórficos y altamente reproducibles por el uso de altas temperaturas de alineación. Son sensibles a encontrar variación genética entre individuos muy cercanos (variedades agrícolas). Además, son relativamente fáciles, rápidos de realizar y son de bajo costo. Sin embargo, son marcadores dominantes.

ISSR's

En este trabajo se utilizó la técnica de los ISSR's o (Inter Simple Sequence Repeats) (Zietkiewicz *et al.*, 1994), la cual permite obtener los niveles de variación genética en regiones internas de los microsatélites. Los microsatélites son secuencias simples repetidas (SSR) ubicadas entre secuencias no repetidas del genoma nuclear de organismos eucariontes y pueden ser di-, tri-, tetra y pentanucleótidos (Pradeep *et al.*, 2002).

En los ISSR's (Fig. 1) se utilizan primers cuya secuencia está formada por di- o trinucleótidos- con un nucleótido extra en la terminación 3'. El primer es complementario al microsatélite y los nucleótidos extras sirven como anclas, asegurando que la amplificación se lleve a cabo desde el extremo 5' del microsatélite. El primer localiza dos regiones microsatélite separadas por una secuencia genómica amplificable del DNA

blanco, dando como resultado una molécula de un tamaño particular (peso molecular), la cual es considerada como un locus que representa el fragmento de DNA entre los microsatélites (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Bornet y Branchard, 2001).

Los productos finales de PCR que se observan en los geles son considerados como un patrón variable de bandas que representan las regiones amplificadas, el cual es considerado como huella digital genética de cada individuo. Las bandas obtenidas son analizadas como un genotipo dominante ya sea homócigo o heterócigo. La ausencia de las bandas se considera como el genotipo homócigo recesivo.

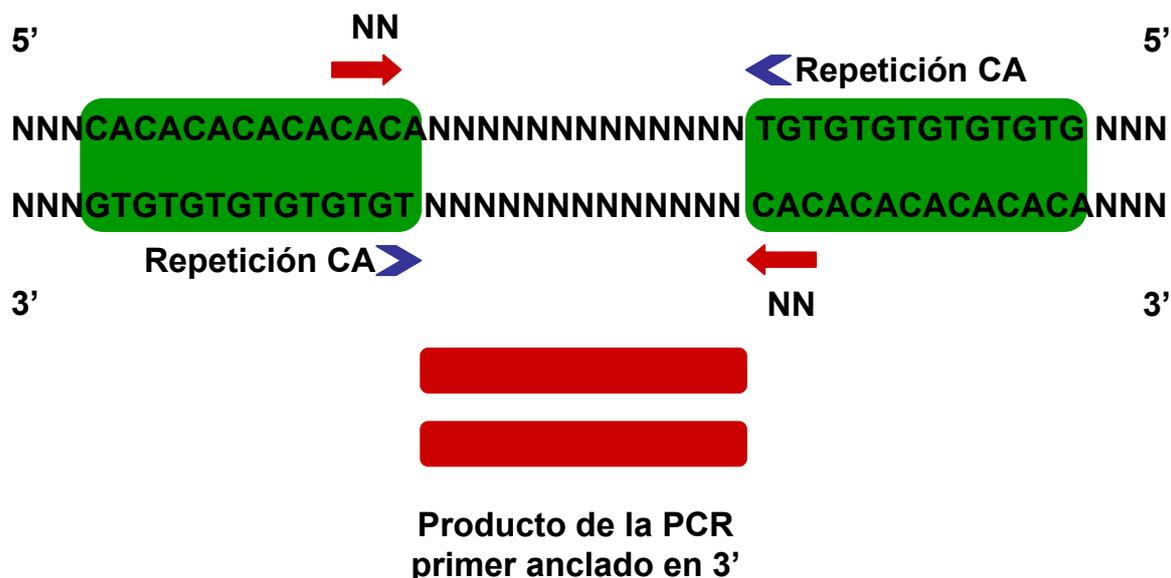


Figura 1. Representación esquemática del PCR de los ISSR's con un primer (CA)₇ anclado en la terminación 3' mediante dos nucleótidos extras (NN), alineado a regiones específicas del DNA y produciendo bandas claras.

1.3 El género *Agave*

El género *Agave*, cuyo nombre viene del griego “agavos” que significa admirable, fue descrito inicialmente por Linneo en 1753 y la especie tipo es *Agave americana* (Gentry, 1982; García-Mendoza, 2002). Este género presenta una taxonomía muy compleja, Gentry (1982) reporta 136 especies, 26 subespecies, 29 variedades y 7 formas, dando un total de 197 taxa. Por otro lado, García-Mendoza (2002) considera alrededor de 200 especies para el género *Agave* con un total de 247 taxa. Un total de 150 especies de *Agave* se encuentran en México, siendo este el país con mayor diversidad de agaves.

Se considera que el centro de origen y diversificación para el género *Agave* es la meseta central de México, este centro posiblemente se encuentra en la zona árida de Tehuacán, Puebla, donde hay más especies de *Agave* (15, de las cuales 8 son, endémicas) que en cualquier otra parte de México (García-Mendoza y Galván, 1995).

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

El género *Agave* se encuentra distribuido desde el nivel del mar hasta los 3400 msnm, siendo entre los 1000 y 2000 msnm el rango altitudinal en el que se encuentra el mayor número de especies. Los principales ambientes donde se encuentra 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).

Las características del néctar y flores del subgénero *Agave* sugieren que sus polinizadores coadaptados son los murciélagos, aunque en algunas especies han sido sustituidos por animales diurnos, principalmente abejas y colibríes. En el subgénero *Littaea* las visitas de murciélagos no son tan comunes como en el subgénero *Agave*, siendo las polillas, abejas y esfíngidos los polinizadores más importantes (Eguiarte *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2005).

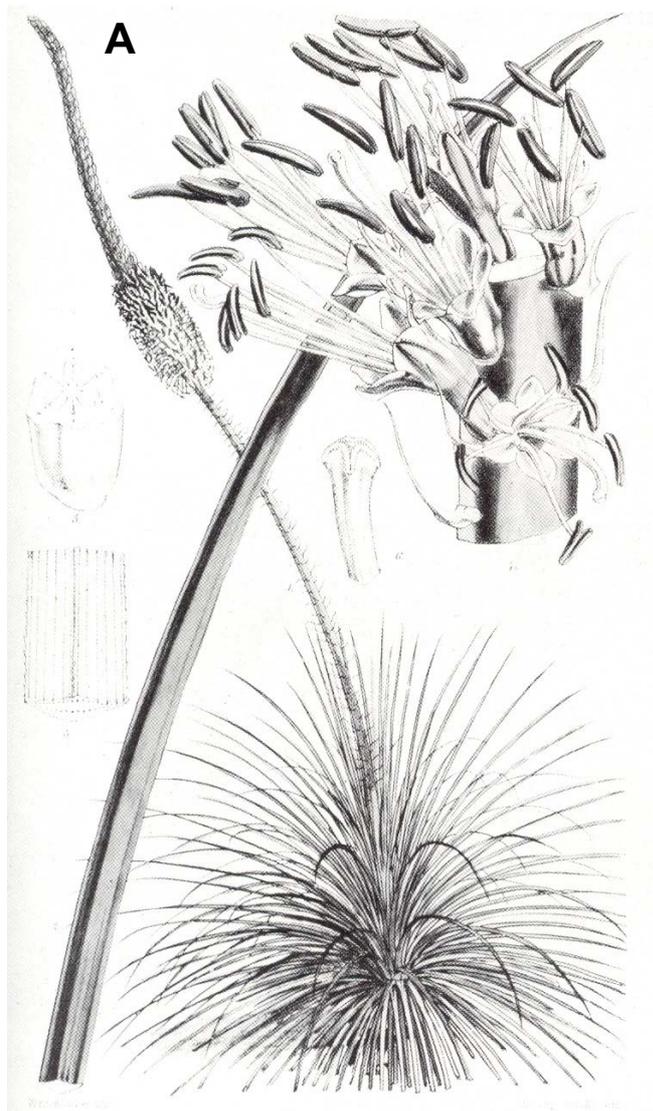
Por otro lado, durante el florecimiento de las culturas precolombinas, las agaváceas jugaron un papel importante, proporcionándole al hombre alimento, techo, vestido, medicina, bebida, uso religioso, ornato, muebles, forrajes y otros usos diversos. En la actualidad se señalan en la literatura etnobotánica más de 70 formas de empleo, entre los que destacan: la obtención de bebidas fermentadas (pulque), bebidas destiladas (tequila y mezcal) y la obtención de fibras de numerosas especies (henequén, lechuguilla y espadín). A menor escala se usan en la construcción, como alimento, ornato, medicina y para la elaboración de artículos domésticos diversos (Martínez, 1979; Gentry, 1982; García-Mendoza, 1998).

1.3.1 *Agave striata*

Agave striata pertenece al subgénero *Littaea*, grupo *Striatae*. Este grupo consta de 5 especies: *A. dasylirioides*, *A. striata*, *A. stricta* (Gentry, 1982), *A. rzedowskiana* (Carrillo *et al.*, 2003) y *A. tenuifolia* (Zamudio, 1995). Se distribuyen en las regiones áridas del centro de México y desde el desierto chihuahuense hasta el sur de Oaxaca. Estas especies se consideran como “primitivas” porque posiblemente se originaron antes (hace aproximadamente 8 millones de años) que el resto de los agaves, los cuales se separaron más recientemente, hace aproximadamente 4 millones de años (Bogler y Simpson, 1996; Eguiarte *et al.*, 2000). Posiblemente el ancestro de las agavaceas sería parecido a *A. dasylirioides* (Gentry, 1982).

Las especies del grupo *Striatae* se caracterizan por presentar plantas iteróparas, rosetófilas, con hojas lineares, algo rígidas con márgenes crenados y con dientes pequeños; inflorescencia en espiga de 1.5 a 3 m de altura con flores pequeñas en pares, generalmente los tépalos son más cortos que el tubo; los filamentos se insertan en la parte media del tubo y las cápsulas son oblongas (Gentry, 1982).

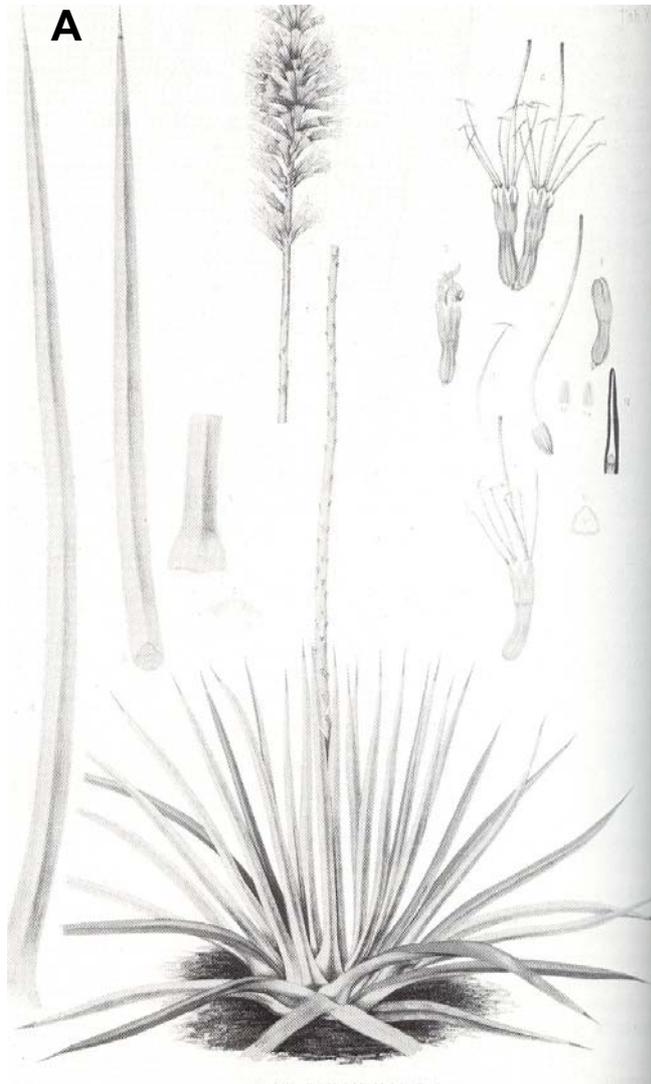
La especie *Agave striata* presenta dos subespecies *Agave striata* ssp. *striata* (Cuadro 1; Fig. 2) y *Agave striata* ssp. *falcata* (Cuadro 1; Fig. 3). Gentry (1982) describe *A. striata* ssp. *striata* como una planta iterópara pero para *Agave striata* ssp. *falcata* no indica si se trata de una planta iterópara o semélpara. La biología reproductiva de estas subespecies no es clara, no se cuenta con los suficientes datos sobre sus ciclos de vida o demográficos para conocer realmente su condición iterópara o semélpara.



B



Figura 2. *Agave striata* ssp. *striata*: A) Dibujo de la planta, la hoja y un agregado floral (Gentry, 1982). B) Individuos de la población F15, San Luis Potosí.



B



Figura 3. *Agave striata* ssp. *falcata*: A) Dibujo de la planta, las hojas, espiga, flores (Gentry 1982). B) Individuo de la población F9, Coahuila.

Cuadro 1. Comparación de los caracteres morfológicos, hábitat, distribución, nombres comunes y usos de *Agave striata* ssp. *striata* y *Agave striata* ssp. *falcata* (Gentry, 1982; Martínez, 1979; García Mendoza y Galván, 1995).

Caracter	<i>Agave striata</i> ssp. <i>striata</i>	<i>Agave striata</i> ssp. <i>falcata</i>
Forma de crecimiento	cespitosa	simple o cespitosa
Forma de la hoja	ambas caras convexas, lineares, rígidas, estriadas.	haz plano, envés convexa, lineares, rígidas, falcadas
Número de hojas	Numerosas, más de 100	menos de 100
Largo de la Hoja	25-60 cm	30-60 cm
Ancho de la hoja	0.5-1 cm	0.8-1.8 cm
Color de las hojas	verde pálido a rojo púrpura	verde pálido a verde glauco o rojizas
Altura de la espiga	1.5-2.5 m	1.5-3 m
Largo de la flor	25-40 mm	28-40 mm
Forma de la flor	cilíndrica	cilíndrica
Color de la flor	amarillo-verdoso o rojo púrpura	amarillo-verdoso o rojo púrpura
Ovario	ínfero de 12 a 15 mm	ínfero de 10 a 15 mm
Relación largo de los	1/3 a 1/4	1/3 a 1/4

tépalos / largo del tubo del
perianto

Largo de los filamentos	30-50 mm	30-60 mm
Anteras	12-16 mm, céntricas, café oscuro a púrpura	15-17 mm, céntricas, café
Cápsulas	13-16 mm x 8-10mm, ovoides, café	12-15 mm x 12-13 mm, ovoides, café
Semillas	3-3.5 mm, negras de forma de media luna	4-5 mm, negras de forma de media luna
Hábitat	matorral xerófilo, bosque de pino-encino, selva baja caducifolia	matorral xerófilo, bosque de pinos
Altitud	1000-2000 msnm	1000 a más de 2000 msnm
Distribución	Coahuila, Durango, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Zacatecas, Querétaro e Hidalgo	Coahuila, Durango, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí
Nombres comunes	espadín, estoquillo, peinecillo y junquillo	espadín, guapilla, soyate, sotolito, palmita
Usos	forrajeros, se consumen los quiotes tiernos	forrajeros, fibras duras, se consumen los quiotes tiernos

1.4 Planteamiento del problema de estudio

Agave striata es una especie clave en el estudio del género *Agave* debido a que representa, junto con el resto de las especies del grupo Striatae, a los agaves más antiguos y son los únicos agaves iteróparos (Gentry, 1982; Bogler y Simpson, 1996). Sus diferencias morfológicas, de biología reproductiva y filogenéticas con el resto de los agaves hacen algunos autores pensar que el grupo Striatae podría no pertenecer al género *Agave*. Sin embargo, no se tienen caracteres claros para separarlos. (Bogler y Simpson, 1996; Eguiarte *et al.*, 2000). El análisis de la diversidad genética y estructura poblacional de *Agave striata* con una subespecie probablemente iterópara (*A. striata* ssp. *striata*) y otra semélpara (*A. striata* ssp. *falcata*) proporciona información comparable con las historias evolutivas de otras especies de agaves semélparas y recientes. Además contribuye al establecimiento de los límites inferiores del género *Agave*.

2. Objetivos

Objetivo General

Describir la genética de poblaciones de *Agave striata* (*Agave striata* ssp. *striata* y *Agave striata* ssp. *falcata*), en términos de sus niveles de variación genética, estructura poblacional y distancias genéticas.

Objetivos Particulares

- ❖ Mediante el uso del marcador molecular ISSR's obtener los patrones de variación genética.
- ❖ Calcular los niveles de variación genética utilizando los estimadores de heterocigosis esperada (H_E) y porcentaje de loci polimórficos (% P).
- ❖ Determinar la estructura de la variación genética en términos de los estadísticos F_{ST} .
- ❖ Calcular la partición de la variación genética por medio de un análisis de AMOVA (*Analysis of Molecular variance*).
- ❖ Estimar las distancias genéticas que separan a las poblaciones y determinar sus relaciones de similitud.
- ❖ Evaluar si las poblaciones siguen un patrón de aislamiento por distancia.
- ❖ Establecer las relaciones genéticas entre las poblaciones a través de un dendrograma construido mediante el método UPGMA.

3. Hipótesis

Se espera que *Agave striata* ssp. *striata* de amplia distribución presente mayores niveles de variación genética, diferenciación genética y distancias genéticas mayores que *A. striata* ssp. *falcata* de menor distribución.

4. Materiales y Métodos

4.1 Colecta de campo

Con base en las descripciones de las subespecies y los datos de distribución geográfica reportados por Gentry (1982), junto con los datos de colecta de los ejemplares de *Agave striata* depositados en el Herbario Nacional (MEXU) se seleccionaron las 12 poblaciones analizadas en este estudio. Para *Agave striata ssp. striata* se colectaron 6 poblaciones desde Hidalgo hasta Nuevo León y se estudiaron 6 poblaciones de *Agave striata ssp. falcata* de Nuevo León y Coahuila abarcando así la mayor parte de su distribución geográfica (Cuadro 2; Fig. 4).

Se colectaron de 40 a 70 individuos por población, exceptuando la población F4, en la que sólo se encontraron 28 individuos. Cada individuo se tomó de una roseta o de un conjunto de rosetas diferente, procurando que estuvieran lo suficientemente alejadas entre sí para evitar que fueran el mismo genet. De cada individuo o roseta se tomó la hoja más joven para obtener mayor cantidad y calidad de ADN.

Las muestras se etiquetaron y conservaron en N₂ líquido hasta su almacenamiento en un ultracongelador en el Instituto de Ecología de la UNAM. Además, se registró la posición geográfica y altitud de cada población con un geoposicionador, así como la vegetación asociada (Cuadro 2).

La colecta de la mayoría de las poblaciones se realizó en septiembre del 2004, las poblaciones de *Agave striata ssp. striata* de Hidalgo y Querétaro (F3, F4 y F5) se colectaron en abril del 2003.

Cuadro 2. Nomenclatura, ubicación geográfica y características de la vegetación asociada a las 12 poblaciones de *Agave striata* utilizadas en el estudio.

Población	N	Estado	Altitud (msnm)	Coordenadas		Vegetación
				N	W	
<i>Agave striata ssp. striata</i>						
F 3	40	Hidalgo, Venados	1400	20°28'	98°40'45"	<i>Prosopis, Myrtillocactus, Hechtia, Mammillaria, Yucca.</i>
F 4	28	Querétaro, Bucareli	1600	21°05'6"	99°36'24"	<i>Prosopis, Myrtillocactus, Hechtia, Mammillaria.</i>
F 5	47	Hidalgo, Zimapán	1780	20°43'6"	99°39'	<i>Prosopis, Hechtia, Mammillaria.</i>
F 14	60	Nuevo León, Dr. Arroyo	1897	23°42'20"	100°08'32"	<i>Prosopis, Astrophytum, Opuntia.</i>
F 15	60	San Luis Potosí, Guadalcazar	1527	22°38'14"	100°30'22"	<i>Yucca, Prosopis, Opuntia, Echinocactus.</i>
F 16	60	San Luis Potosí Matehuala-México	1899	22°17'46"	100°48'44"	<i>Yucca, Agave lechuguilla, Opuntia, Larrea</i>
<i>Agave striata ssp. falcata</i>						
F 8	60	Coahuila, Saltillo –Monclova Km 17-18	1126	25°41'19"	100°59'39"	<i>Agave lechuguilla, Yucca, Dasyllirion, Mammillaria, Yucca, Opuntia, Euphorbia.</i>
F 9	65	Coahuila, Saltillo –Monclova Km 120-121	1296	26°19'9"	101°21'10"	<i>Agave lechuguilla, Dasyllirion, Larrea, Mammillaria, Yucca, A .americana.</i>
F 10	60	Coahuila, Ramos Arizpe	1267	25°37'16"	100°49'32"	<i>Agave lechuguilla, Yucca, Dasyllirion, Mammillaria, Yucca.,</i>
F 11	70	Coahuila Saltillo–Matehuala Km 24	1873	25°23'20"	100°47'47"	<i>Agave lechuguilla, Yucca, Dasyllirion.</i>
F 12	70	Nuevo León Saltillo–Matehuala Km 112	1905	24°32'18"	100°16'44"	<i>Agave lechuguilla, Yucca, Dasyllirion, Opuntia, Larrea, Echinocactus.</i>
F 13	60	Coahuila 28 Km al N de Matehuala	1868	23°50'20"	100°30'52"	<i>Agave lechuguilla, Dasyllirion, Mammillaria, Prosopis, Astrophytum</i>

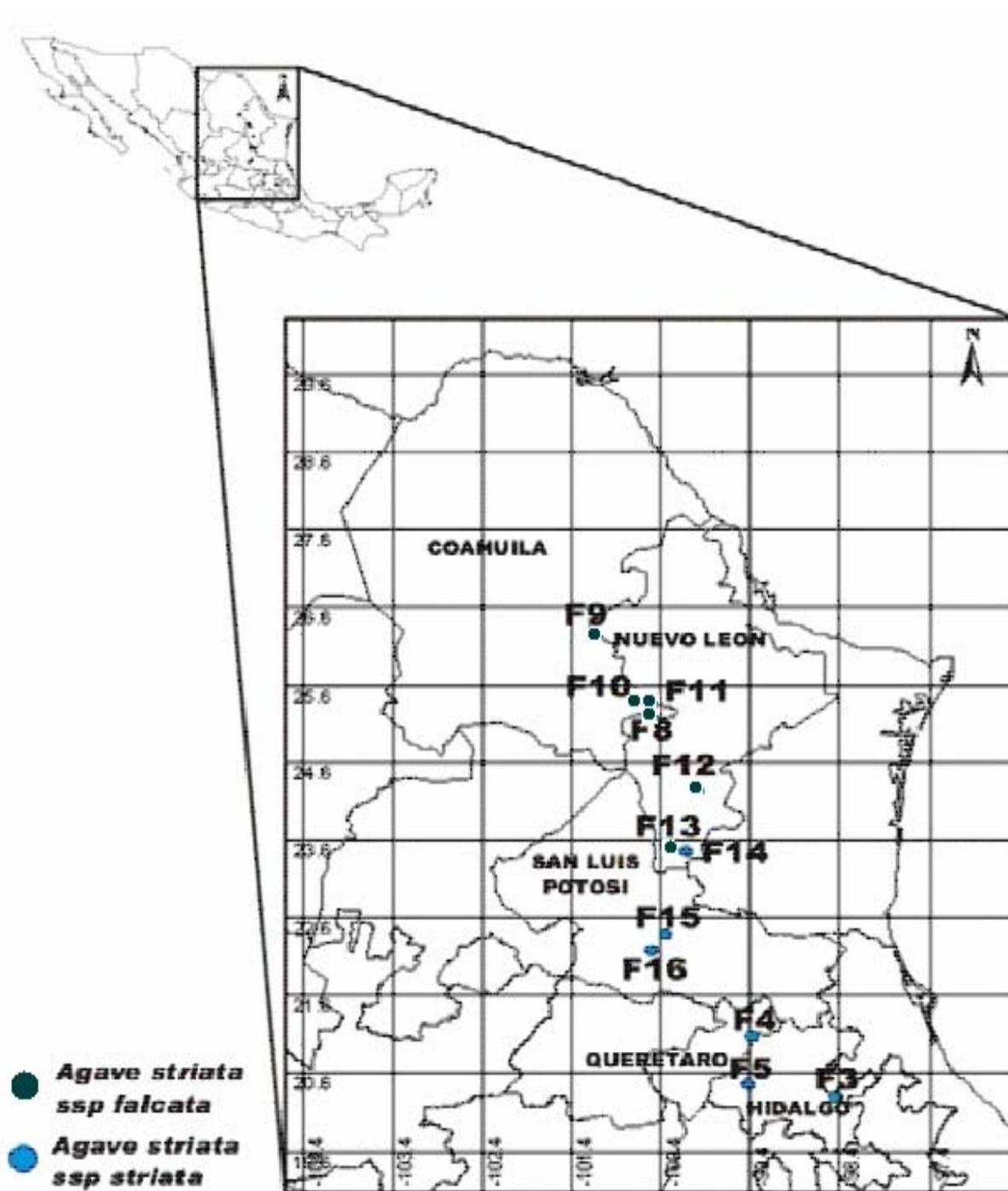


Fig. 4. Localización de las poblaciones de: *Agave striata ssp. striata* (F3, F4, F5, F14, F15, F16) y *Agave striata ssp. falcata* (F8, F9, F10, F11, F12, F13).

4.2 Extracción de DNA

La extracción de DNA de los individuos colectados se realizó siguiendo el protocolo de CTAB (bromuro de cetiltrimetil amonio) de Doyle y Doyle (1987) modificado con STE (buffer de NaCl, EDTA y Tris-HCl) (Apéndice 1). Este método consistió de manera general en la obtención de DNA del tejido vegetal rompiendo las paredes celulares con nitrógeno líquido y mediante detergentes catiónicos (CTAB, CTAB 2X y STE), solubilizando las membranas celulares y eliminando los carbohidratos. Después se añadió RNasa y proteinasa K para digerir el RNA y las proteínas respectivamente. Para eliminar de la solución de restos celulares y otras moléculas se utilizó cloroformo-octanol. El DNA se precipitó con isopropanol frío y se limpió con etanol al 70%. Finalmente, de cada individuo se obtuvieron dos muestras, una se rehidrató con agua ultrapura y la otra se almacenó como ADN seco a -80°C. Los detalles del protocolo se pueden ver en el Apéndice 1.

Para cuantificar la concentración y evaluar la calidad del DNA de uso (rehidratado) se utilizó un biofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf). La mitad del volumen de cada muestra se llevó a una concentración de 30 ng/μl y la otra mitad se conservó a -20°C.

4.3 Amplificación de DNA por medio de ISSR's

Se emplearon 3 primers u oligonucleótidos con dinucleótidos repetidos, que incluyen motivos AC, AG y CT. Estos primers fueron determinados por análisis previos realizados en el laboratorio en otras especies del subgénero *Agave Littaea* (Rocha, 2006). La secuencia de los primers utilizados en este estudio fue:

811: GAG AGA GAG AGA GAG AC

846: CAC ACA CAC ACA CAC ART

853: TCT CTC TCT CTC TCT CRT

R= A ó G

R= C ó T

Las amplificaciones se llevaron a cabo utilizando termocicladores PCR-Express marca Hybaid y enzima Taq polimerasa recombinante (Roche). Para una reacción de PCR de 30µl se agregaron 3 µl de amortiguador para PCR 10X, 2.4 µl de DNTP's mix (mezcla de 4 di-deoxinucleótidos a 10 mM Fermentas), 1.2 µl de primer cuya concentración inicial era de 10 mM, 0.2 µl de Taq polimerasa a 5 u/µl. El volumen de ADN a 30 ng/µl y de MgCl₂ (concentración inicial de 30 mM) depende de la concentración óptima para cada primer y para completar los 30 µl se agregó el volumen de agua ultrapura correspondiente, según la optimización de cada primer. Las mezclas finales de reacción pueden consultarse en el Apéndice 2. Los programas de amplificación fueron:

Primer 811		Primer 846		Primer 853	
94°C	3 min.	95°C	4 min.	95°C	4 min.
94°C	40 seg.	94°C	30 seg.	94°C	40 seg.
56°C	20 seg.	55°C	40 seg.	55.5°C	30 seg.
70°C	50 seg.	72°C	1 min.	72°C	1 min.
	+ 4 seg.		+ 4 seg.		+ 4 seg.
	(c/ciclo)		(c/ciclo)		(c/ciclo)
} 38 ciclos		} 37 ciclos		} 37 ciclos	
70°C	5 min.	70°C	5 min.	70°C	5 min.
4°C	12 hrs.	4°C	12 hrs.	4°C	12 hrs.

Para verificar que los reactivos empleados estuvieran libres de contaminación por DNA se preparó un control negativo en cada amplificación preparando una mezcla de reacción a la cual se le añadió agua ultrapura en lugar de DNA.

Una vez amplificados los productos de PCR se separaron mediante electroforesis, utilizando TAE 1X como buffer de corrida para geles de agarosa al 2%, los cuales se tiñeron con bromuro de etidio a 1.0 mg/ml para poderlos visualizar con una lámpara de luz ultravioleta. Para determinar el peso aproximado de las bandas se empleó un

marcador con un peso molecular de 100 pares de bases (Nucleic Acid Marker, 100 pb DNA ladder, Invitrogen) de 250 µg (1.0 µ/ul) que corría junto con las muestras.

Cada gel fue fotografiado con una cámara digital Kodak EDAS 240 y las imágenes fueron digitalizadas usando el programa Kodak ID ver. 3.5. La lectura de los geles se realizó de forma manual, identificando los patrones de los diferentes loci amplificados y los datos se ordenaron en una matriz de presencia (1) y ausencia (2) por población, subespecie y especie. Con estas matrices se realizaron los análisis estadísticos.

4.4 Frecuencias alélicas

Debido a que los marcadores moleculares ISSR's (Inter Simple Sequence Repeat) son marcadores dominantes, los heterocigotos no pueden ser distinguidos, por lo que las frecuencias alélicas se estimaron con base en la frecuencia de los alelos recesivos a partir de los individuos sin banda. Suponiendo que la población se encuentra en equilibrio de Hardy - Weinberg, en un locus la frecuencia del alelo recesivo (q) es la raíz cuadrada de la frecuencia de las ausencias; esto es, $x = q^2$, siendo $q = x^{1/2}$ y la frecuencia del alelo dominante es $p = 1 - q$.

Además, se utilizó la corrección para marcadores dominantes propuesta por Lynch y Milligan (1994) empleando el programa TFGA (Tools for Population Genetic Analysis) versión 1.3 (Miller, 1997). Esta corrección recomienda ignorar aquellas muestras que estén sesgadas estadísticamente para las cuales el número de individuos homocigotos nulos no excede a tres y también para aquellas bandas cuya frecuencia sea $< 1 - (3/N)$, para evitar seleccionar loci con altas frecuencias de alelos nulos (Lynch y Milligan, 1994).

Para conocer si entre las frecuencias alélicas existen diferencias significativas se aplicó la prueba de probabilidad combinada de Fisher (Raymond y Rousset, 1995). Este método realiza simulaciones Monte Carlo con cadenas de Markov. Los valores de p igual a 1 indican que las diferencias se deben al azar un 100% y cuando los valores de

probabilidad son menores de $p < 0.05$, las frecuencias alélicas entre las poblaciones difieren estadísticamente.

4.5 Variación genética

La variación genética se estimó utilizando dos índices: la heterocigosis esperada (H_E) y el porcentaje de loci polimórficos (% P). Ambos índices fueron calculados a nivel poblacional, por subespecie y para la especie.

La heterocigosis esperada promedio en un locus particular para una población se calculó como $H_E = 2pq$. En el caso de dos alelos equivale a $H_E = 1 - \sum p_i^2$, donde p_i es la frecuencia promedio del alelo p para todos los loci (Eguiarte, 1990; Nybom y Bartish, 2000).

Además, para la H_E se realizó una corrección propuesta para marcadores dominantes (Lynch y Milligan, 1994) a partir de la siguiente fórmula: $H_E = 2q(1-q) + 2Var(q)$, donde $Var(q) = (1-x)/4N$, donde N es el número de individuos de la muestra (x) y la frecuencia del alelo q se calcula a partir de $q = x^{1/2} [1 - Var(x)/8x^2]^{-1}$ (Nybom y Bartish, 2000). Cuando se analizan simultáneamente varios loci, H_E en la población es: $H_E = 1/m (\sum H_j)$, donde H_j es la heterocigosis del locus j y m el número total de loci.

Para calcular el promedio de loci polimórficos (% P), se utilizó un criterio del 95%; esto es que un locus se consideró polimórfico cuando el alelo más común no exceda de una frecuencia alélica del 95% (Hedrick, 2000).

Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias entre los valores promedio de la heterocigosis esperada (H_E) entre poblaciones y primers. Para la comparación múltiple de medias de la H_E entre las poblaciones se utilizó el método LSD de Fisher (Least Significant Difference) para ordenar la variación de la heterocigosis entre las poblaciones. Para la realización de estos dos análisis se utilizó el programa Statistical Discovery (JMP) ver. 4.0. (SAS Institute Inc., 2000).

4.6 Estructura genética

Se calculó como análogo a la F_{ST} (Wright, 1921) al coeficiente de coancestría θ (Cockerham, 1969), el cual estima la varianza entre las frecuencias de la población total y de las subpoblaciones. Se estimó utilizando el programa TFPGA, el cual a su vez emplea el algoritmo de Weir y Cockerham (1984) con base en un análisis de las frecuencias esperadas y la correlación de estos valores en las poblaciones con respecto al total de la especie. Éste programa realiza los cálculos de θ para cada locus y por medio del muestreo o jackknife, estima un intervalo de confianza asimétrico de θ , además de generar un bootstrap para estimar los intervalos de confianza del conjunto de los loci y las poblaciones (Navarro *et al.*, 1999).

Flujo génico

Para estimar el flujo genético se utilizó un método indirecto. Mediante el valor de θ estimado previamente se calculó el valor de Nm para cada una de las poblaciones estudiadas. El flujo génico se obtuvo según la fórmula del modelo de islas (Wright, 1951) con la corrección de Crow y Aoki (1984):

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

El flujo génico (Nm = número de migrantes por generación) se calculó a partir de θ de la siguiente manera:

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

Donde α corresponde a $(n/n-1)^2$, como corrección para el tamaño de muestra, ya que n es el número de poblaciones que se analizan (Hedrick, 2000).

Análisis jerárquico de la variación

Para saber cómo se encuentra repartida la variación genética dentro de la especie se hizo un AMOVA (Analysis of Molecular Variance) (Excoffier *et al.*, 1992) utilizando el programa Arlequin ver. 2.0 (Schneider *et al.*, 2000). Este análisis arroja estimados de los componentes de varianza y valores análogos a los estadísticos F , designados como estadísticos Φ , reflejando la correlación de la diversidad haplotípica a diferentes niveles de subdivisión jerárquica.

En este trabajo los niveles analizados fueron a nivel regional y de subespecie. A nivel regional se organizaron las 12 poblaciones en tres regiones. La región 1 fue llamada Norte agrupando a las poblaciones de Coahuila y una de Nuevo León (F8-F12). La región 2 nombrada como Centro incluye dos poblaciones de Nuevo León (F13 y F14) y las poblaciones de San Luis Potosí (F15 y F16). La última región llamada Sur esta formada por las poblaciones de Querétaro e Hidalgo (F3-F5).

El AMOVA puede ser considerado como una extensión del análisis de varianza de Cockerham de las frecuencias génicas (1969), en el cual los coeficientes de correlación dentro de los grupos dependen de un proceso mutacional (Excoffier, 2001).

4.7 Distancias genéticas y aislamiento por distancia

Distancias genéticas

En este estudio se trabajó con la distancia genética de Nei (1972, 1978), la cual realiza una estimación directa de las diferencias genéticas entre pares de poblaciones con base en la diferenciación alélica dada por la presencia o ausencia de los loci.

La fórmula para estimar la distancia genética es $D = -\ln(I)$, donde I es la identidad que es calculada como $I = J_{xy} / (J_x J_y)^{1/2}$. En esta expresión, $J_x = \sum x_i^2$ y es llamada la

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

El valor de I puede ir de cero, cuando no se comparten alelos entre las poblaciones, hasta uno, cuando las poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas. La distancia genética (D) puede adquirir un valor de cero, para las poblaciones con frecuencias alélicas iguales, hasta infinito, cuando las poblaciones no comparten ningún alelo (Hedrick, 2000).

A partir de la matriz de distancia genética, se construyó un árbol de distancias genéticas utilizando el algoritmo UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic means) mediante el programa TFPGA para visualizar el grado de similitud entre las poblaciones.

Aislamiento por distancia

Para conocer si la especie y las subespecies de *Agave striata* siguen un patrón de aislamiento por distancia; es decir, si existe una correlación positiva ($p < 0.05$) entre las distancias genéticas y geográficas se utilizó la prueba de Mantel (1967) mediante el programa TFPGA.

Las distancias geográficas fueron calculadas a partir de las coordenadas geográficas mediante el programa ARCVIEW 3.

5. Resultados

5.1 Extracción de DNA

De un total de 12 poblaciones, 6 de *Agave striata ssp. striata* y 6 de *Agave striata ssp. falcata* (Cuadro 3; Figura 5), se extrajo el DNA de un promedio de 48 individuos (exceptuando la población F4 que sólo cuenta con 28 individuos).

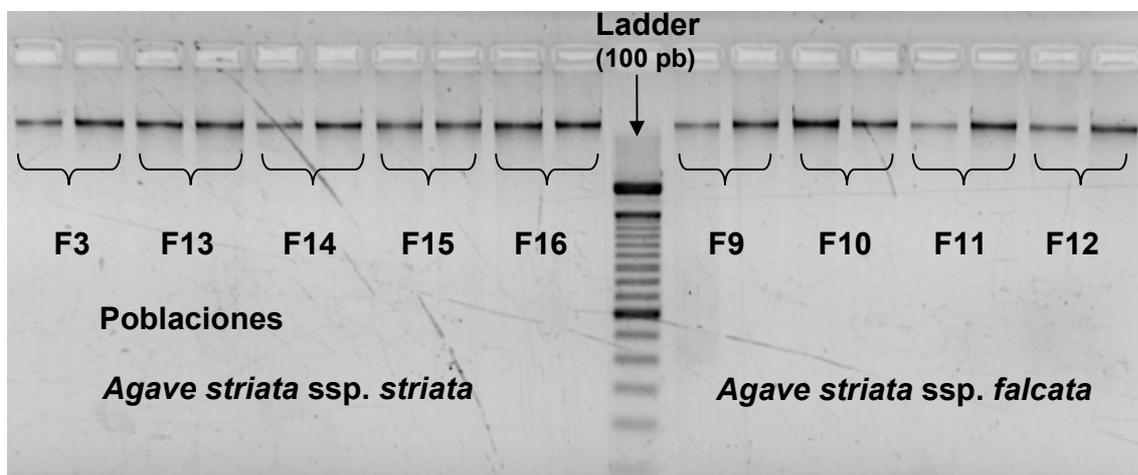
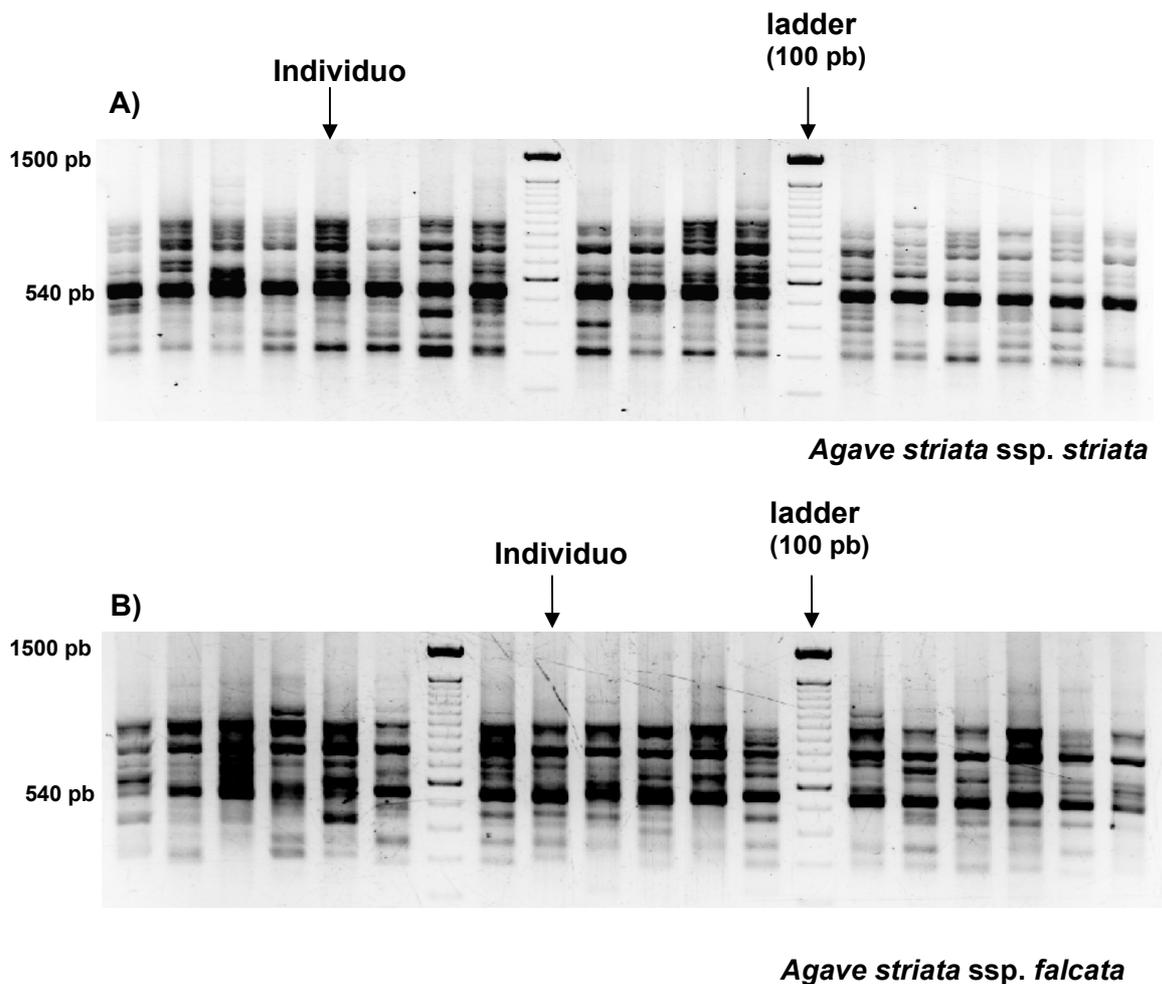


Figura. 5. Gel de DNA total de individuos de 9 poblaciones de *Agave striata ssp striata* (F3, F5, F14, F15, F16) y *Agave striata ssp falcata* (F9, F10, F11, F12).

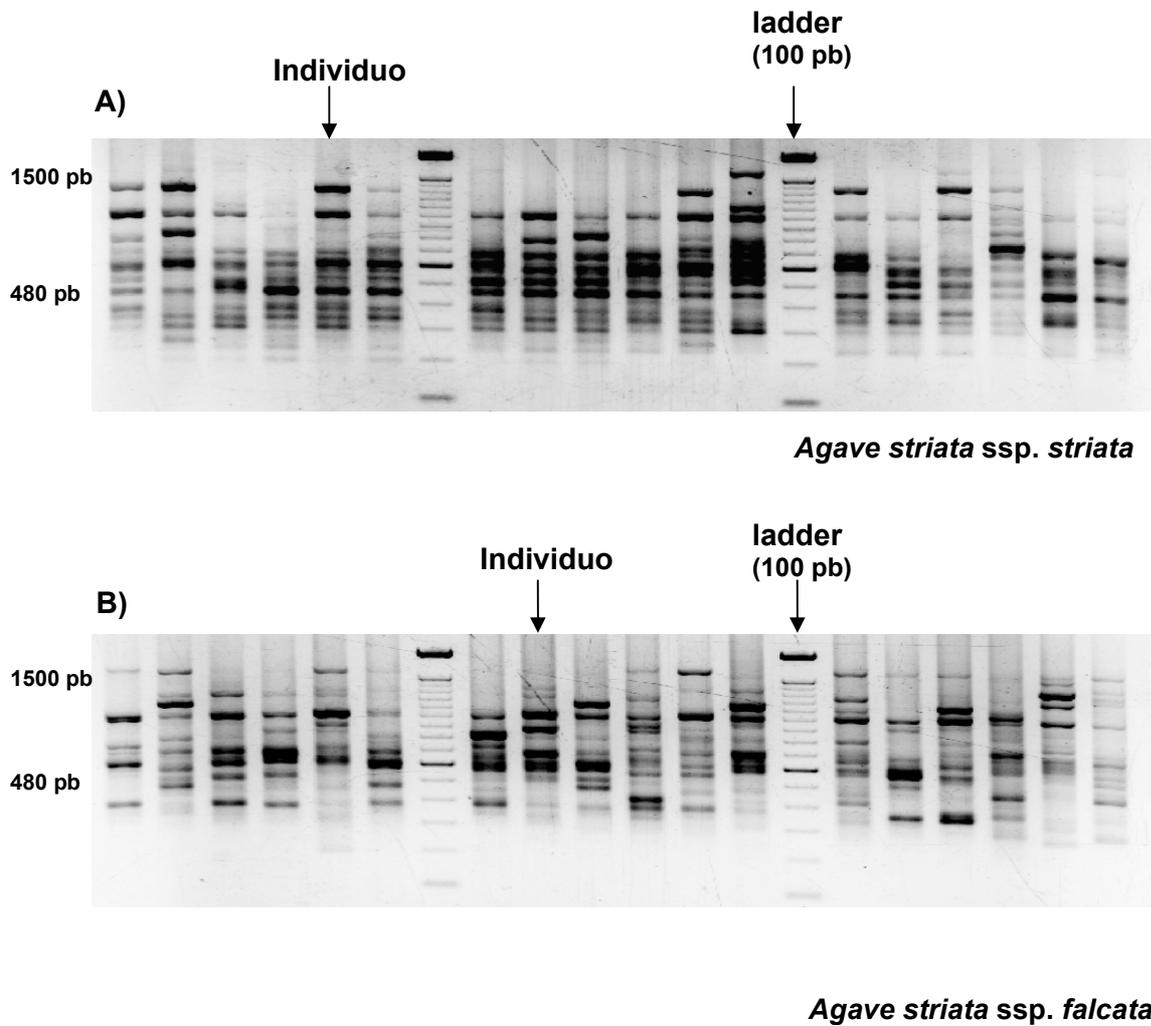
5.2 Variación genética

Para la amplificación de los ISSR's se optimizaron las condiciones de tres primers 811, 846 y 853, los cuales presentaron bandas definidas, repetibles y polimórficas. Se obtuvo un total de 47 bandas, cada una considerada como un locus (Figuras 6-8), 17 para el primer 811 enumeradas del 1 al 17, 18 bandas para el primer 846 (18 - 35) y 12 para el primer 853 (36 - 47).



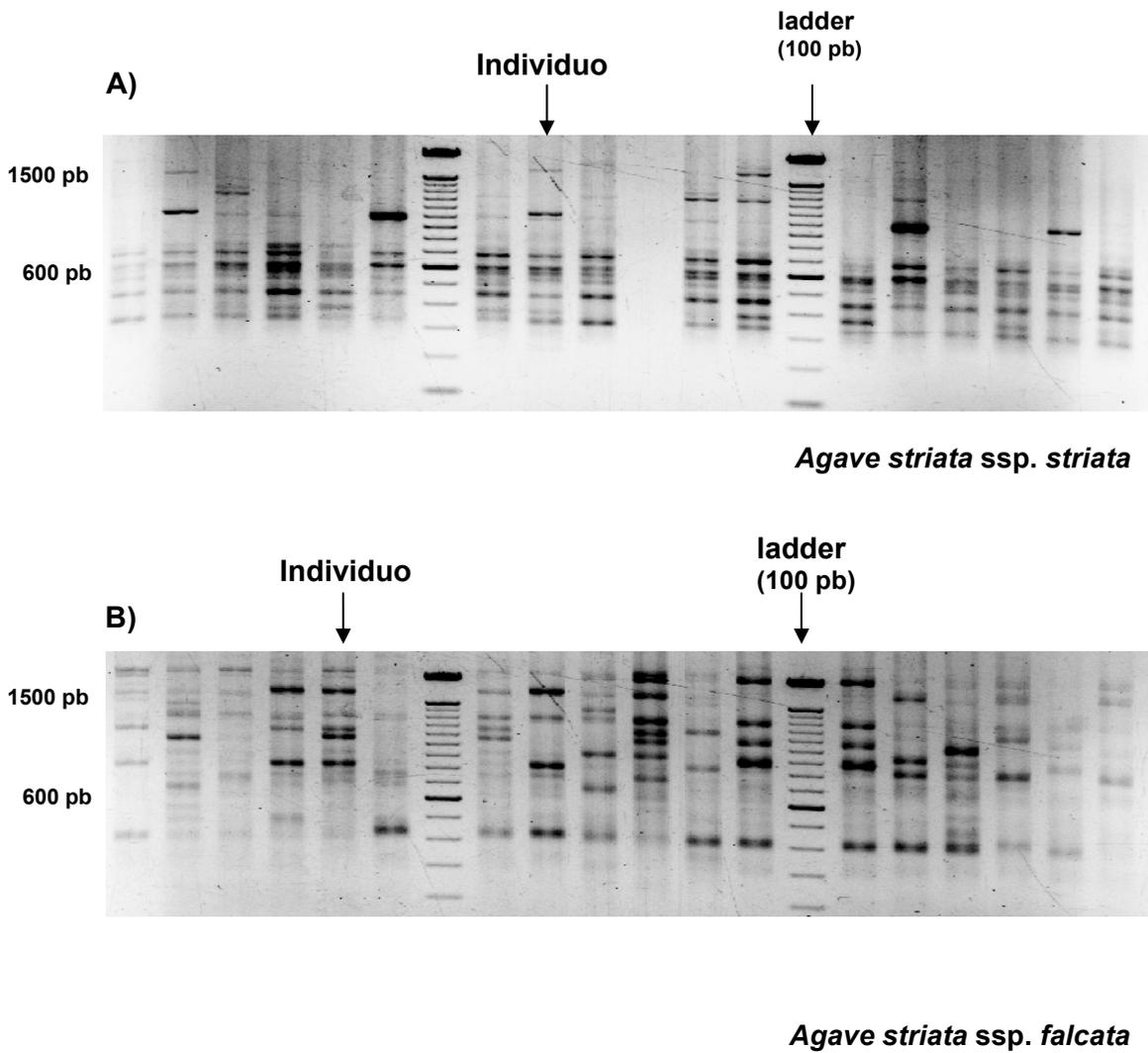
Locus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Tamaño (pb)	1500	1400	1300	1100	1000	900	840	800	700	620	590	540	500	460	400	350	300

Figura 6. ISSR's amplificados por el primer 811 en *Agave striata*. A) Individuos de la población F5 de *Agave striata ssp. striata*. B) Individuos de la población F13 de *Agave striata ssp. falcata*. Se obtuvieron 17 loci con tamaños de 1500 pb a 300 pb. El marcador de peso molecular o ladder es de 100 pb.



Locus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Tamaño (pb)	2000	1700	1600	1400	1300	1200	1100	1000	900	800	750	680	640	500	480	380	340	300

Figura 7. ISSR's amplificados por el primer 846 en *Agave striata*. A) Individuos de la población F5 de *Agave striata ssp. striata*. B) Individuos de la población F13 de *Agave striata ssp. falcata*. Se obtuvieron 17 loci con tamaños de 2000 a 300 pb. El ladder es de 100 pb.



Locus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tamaño (pb)	2000	1700	1300	1150	1000	900	800	700	600	500	400	320

Figura 8. ISSR's amplificados por el primer 853 en *Agave striata*. A) Individuos de la población F14 de *Agave striata ssp. striata*. B) Individuos de la población F9 de *Agave striata ssp. falcata*. Se obtuvieron 12 loci con tamaños de 320 a 2000 pb. El ladder es de 100 pb.

Las frecuencias de los alelos de los 47 loci en cada una de las poblaciones estudiadas y de la especie pueden consultarse en el Apéndice 3.

A través del análisis estadístico de probabilidad combinada de Fisher (Raymond y Rousset, 1995) se encontró que 40 de 47 loci son significativamente diferentes entre las poblaciones (Apéndice 4).

Utilizando el programa TFPGA (Tools for Population Genetics Analysis) con la corrección de Lynch y Milligan (1994), se encontró que la especie *Agave striata* presenta niveles de heterocigosis y porcentajes de loci polimórficos relativamente altos ($H_E=0.27 \pm 0.195$, % $P=80.9$) (Cuadro 3).

A nivel de subespecie, *Agave striata* ssp. *striata* presentó niveles de heterocigosis y porcentajes de loci polimórficos ($H_E =0.2506$, % $P=70.28$) menores que *Agave striata* ssp. *falcata* ($H_E =0.2881$, % $P=80.85$). La población que presentó el valor más alto de variación genética fue F8-Coahuila, Saltillo – Monclava, de la subespecie *falcata* ($H_S =0.2812$, % $P=72.3$) y la población que presentó menor variación genética fue F16- San Luis Potosí, de la subespecie *striata* ($H_S =0.1573$, % $P=44.7$) (Cuadro 3).

Por otra parte, el primer 853 presentó los niveles más altos de heterocigosis esperada así como de porcentaje de loci polimórficos ($H_E =0.3311$, % $P=83.3$) (Cuadro 4).

Al correlacionar los datos obtenidos de H_S por cada población y su latitud se encontró que la H_E aumenta hacia el Norte para el total de la especie ($r= 0.81$). Lo mismo ocurre con *Agave striata* ssp. *falcata* ($r= 0.81$), pero *Agave striata* ssp. *striata* no presenta tal correlación ($r= 0.15$).

Cuadro 3. Índices de variación genética en cada población y en cada especie con los datos de 47 loci. H_E = heterocigosis esperada \pm desviación estándar (DE), %P= porcentaje de loci polimórficos, N= número de individuos.

Subespecie	Población	N	$H_E \pm DE$	%P
<i>A. striata ssp. striata</i>	F3 Hidalgo, Venados	30	0.2071 \pm 0.197	53.19
	F4 Querétaro, Bucareli	28	0.2161 \pm 0.186	48.93
	F5 Hidalgo, Zimapán	43	0.1698 \pm 0.108	42.55
	F14 Nuevo León, Dr. Arroyo	36	0.1902 \pm 0.136	48.93
	F15 San Luis Potosí, Guadalcazar	50	0.2033 \pm 0.185	55.31
	F16 San Luis Potosí, Matehuala-México	44	0.1573 \pm 0.105	44.68
Subespecie		231	0.2506\pm0.198	70.2789
<i>A. striata ssp. falcata</i>	F8 Coahuila, Saltillo – Monclova Km 17	58	0.2812 \pm 0.181	72.34
	F9 Coahuila, Saltillo – Monclova Km 120	61	0.2778 \pm 0.186	74.46
	F10 Coahuila, Ramos Arizpe	50	0.2898 \pm 0.183	74.46
	F11 Coahuila, Saltillo –Matehuala Km24	39	0.2533 \pm 0.197	65.95
	F12 Nuevo León, Saltillo –Matehuala Km 112	48	0.2620 \pm 0.184	70.21
	F13 Nuevo León, 28 Km al N de Matehuala	54	0.2231 \pm 0.190	59.57
	Subespecie		310	0.2881\pm0.196
Especie		541	0.2793\pm0.197	80.85

Cuadro 4. Heterocigosis esperada (H_E) \pm desviación estándar (DE) y porcentaje de loci polimórficos (%P) para el total de las poblaciones por primer.

Primer	$H_E \pm DE$	%P
811	0.2546 \pm 0.190	82.35
846	0.2683 \pm 0.185	77.77
853	0.3311 \pm 0.199	83.33

A los resultados obtenidos de heterocigosis se les efectuó un análisis de varianza (ANOVA) observando que la diferencia entre las poblaciones fue significativa ($F=2.3192$; $P=0.0087$). Se utilizó el método LSD de Fisher (Least Significant Difference) para ordenar la variación de la heterocigosis entre las poblaciones (Cuadro 5). El primer grupo incluye las seis poblaciones de *Agave striata* ssp. *falcata* (F8, F9, F10, F11, F12 y F13). En el segundo grupo se encuentran las poblaciones de *Agave striata* ssp. *striata* (F3, F4, F5, F14, F15, F16) junto con una población de la subespecie *falcata* (F13). Para los valores obtenidos de heterocigosis entre primers no se observó diferencias significativas.

Cuadro 5. Prueba de LSD (Least Significant Difference) para la comparación de medias de la heterocigosis de las 12 poblaciones de *Agave striata*.

Subespecie	Población	Media de la Heterocigosis	Agrupamiento LSD	
<i>A. striata</i> ssp. <i>falcata</i>	F10 Coahuila	0.2898	a	
<i>A. striata</i> ssp. <i>falcata</i>	F8 Coahuila	0.2812	a	
<i>A. striata</i> ssp. <i>falcata</i>	F9 Coahuila	0.2778	a	
<i>A. striata</i> ssp. <i>falcata</i>	F12 Nuevo León	0.2620	a	
<i>A. striata</i> ssp. <i>falcata</i>	F11 Coahuila	0.2533	a	
<i>A. striata</i> ssp. <i>falcata</i>	F13 Nuevo León	0.2231	a	b
<i>A. striata</i> ssp. <i>striata</i>	F4 Querétaro	0.2161		b
<i>A. striata</i> ssp. <i>striata</i>	F3 Hidalgo	0.2071		b
<i>A. striata</i> ssp. <i>striata</i>	F15 San Luis Potosí	0.2033		b
<i>A. striata</i> ssp. <i>striata</i>	F14 Nuevo León	0.1902		b
<i>A. striata</i> ssp. <i>striata</i>	F5 Hidalgo	0.1698		b
<i>A. striata</i> ssp. <i>striata</i>	F16 San Luis Potosí	0.1573		b

5.3 Estructura genética

Mediante el uso del algoritmo del coeficiente de coancestría de Weir y Cockerham (1984) se compararon los niveles de variación entre poblaciones y se encontró que *Agave striata* es una especie que presenta una diferenciación genética medianamente alta ($\theta = 0.1922$). El intervalo de confianza al 95% para la θ de todas las poblaciones es de 0.1503 - 0.2351 es decir, θ es diferente de 0. *Agave striata* ssp. *striata* presentó mayor diferenciación genética ($\theta = 0.2789$) que *Agave striata* ssp. *falcata* ($\theta = 0.1055$).

El valor de Nm para la especie en su conjunto, calculado a partir de θ según Crow y Aoki (1984) es de 1.05, valor mayor a 1 pero menor a 4. En el caso de las subespecies, *Agave striata* ssp. *striata* ($Nm= 0.64$) presenta un flujo génico menor que en *Agave striata* ssp. *falcata* ($Nm=2.11$).

Se encontró que el 74.31% de la variación genética de la especie está dentro de cada una de las poblaciones con un valor de $\Phi_{FST} = 0.25694$ (valor equivalente a la F_{ST} (θ)). El 15.20% se encontró entre las poblaciones dentro de las regiones. La región Norte agrupa a las poblaciones de Coahuila y Nuevo León. La región Centro incluye las poblaciones de San Luis Potosí y la región Sur abarca las poblaciones de Querétaro e Hidalgo. El resto de la variación genética (10.49%) se ubicó entre las regiones (Cuadro 6).

A nivel subespecie los resultados del AMOVA son similares a los obtenidos por regiones, aunque un poco mayores. El 75.47% de la variación también se encuentra entre poblaciones con un valor de $\Phi_{FST} = 0.24529$. El 6.99% se encuentra entre las subespecies y el resto de la variación genética (17.53%) entre subespecies (Cuadro 7).

Cuadro 6. Análisis de la varianza molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992) para *Agave striata*, *=P<0.05. La región Norte agrupa a las poblaciones de Coahuila y Nuevo León. La región Centro incluye las poblaciones de San Luis Potosí y la región Sur abarca las poblaciones de Querétaro e Hidalgo.

Origen de la variación	g.l	Suma de cuadrados	Componente de la varianza	% de la variación	Estadístico Φ
Entre regiones	2	336.595	0.83858	10.49*	Φ_{CT} 0.10491
Entre poblaciones/dentro de las regiones	9	555.709	1.21516	15.20*	Φ_{SC} 0.16984
Entre poblaciones	529	3141.935	5.93939	74.31*	Φ_{ST} 0.25694

Cuadro 7. Análisis de la varianza molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992) para las subespecies de *Agave striata*, *=P<0.05.

Origen de la variación	g.l	Suma de cuadrados	Componente de la varianza	% de la variación	Estadístico Φ
Entre subespecies	2	214.399	0.55043	6.99*	Φ_{CT} 0.06994
Entre poblaciones/dentro de las subespecies	9	677.905	1.37991	17.53*	Φ_{SC} 0.18853
Entre poblaciones	529	3141.935	5.93939	75.47*	Φ_{ST} 0.24529

5.4 Distancia genética y aislamiento por distancia

La distancia genética promedio entre todos los pares de poblaciones posibles es $D = 0.0830$. El valor más alto, es decir el par de poblaciones que están genéticamente menos emparentadas, se encuentra entre F3-Hidalgo, Venados (subespecie *striata*) y F8-Coahuila, Saltillo- Monclova Km 17 (subespecie *falcata*) ($D = 0.1594$). Los valores más bajos, (i.e, las poblaciones que más se parecen genéticamente) son la F11-Coahuila, Saltillo- Matehuala Km 24 y F12-Nuevo León, Saltillo- Matehuala Km 112 de la subespecie *falcata* ($D = 0.0209$) (Cuadro 8). Se construyó un dendograma por medio del método UPGMA, utilizando bootstrap con 1000 permutaciones, donde se puede observar de manera gráfica las relaciones genéticas entre las poblaciones analizadas (Fig. 9).

El análisis de aislamiento por distancia entre la matriz de distancias genéticas (Nei, 1972) y la matriz de distancias geográficas (km) indica que en esta especie existe un patrón de aislamiento por distancia ($r = 0.562$, $b = 0.001$) (Fig. 10).

En el caso de *Agave striata* ssp. *striata*, las distancias genéticas fueron las mayores (0.0406 - 0.1379) con un promedio de $D = 0.0992$ (Cuadro 9). Las más cercanas fueron entre F3-Hidalgo, Venados y F4-Querétaro, Zimapán; y las más lejanas entre F4-Querétaro, Zimapán y F14-Nuevo León, Dr. Arroyo (Fig. 10). Esta subespecie presenta también claramente un aislamiento por distancia ($r = 0.696$, $b = 0.002$) contribuyendo más a esta relación las poblaciones de Nuevo León y San Luis Potosí (Fig. 12).

Agave striata ssp. *falcata* presentó distancias genéticas menores (0.0209-0.076) que las encontradas en la subespecie *striata*, con un promedio de $D = 0.039$ (Cuadro 10). Las poblaciones que más se parecen genéticamente son F11-Coahuila, Saltillo- Matehuala Km 24 y F12-Nuevo León, Saltillo- Matehuala Km 112. Las poblaciones más lejanas genéticamente son la F9-Coahuila, Saltillo- Monclova Km 17 y la F13- Coahuila 28 Km al N de Matehuala (Fig. 13). También esta subespecie presenta aislamiento por distancia con una correlación un poco menor que la subespecie *striata* ($r = 0.6433$, $b =$

0.0007). Las poblaciones que más contribuyen a esta correlación positiva son las de Nuevo León (Fig 14).

Por último, se observa claramente como las pendientes de la correlación de aislamiento por distancia entre las subespecies de *A. striata* son distintas entre sí. *A. striata ssp. striata* presenta mayor valor de la pendiente ($b = 0.002$) que *A. striata ssp. falcata* ($b = 0.0007$) (Fig. 15).

Cuadro 8. Distancias genéticas (Nei, 1972) y geográficas (km, en *itálicas*) entre las poblaciones de *Agave striata*. Entre paréntesis, valor de θ entre cada par de poblaciones. Para los datos generales de cada población se encuentra en el Cuadro 1.

Población	F3	F4	F5	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16
F3	-											
F4	0.0406 (0.1030) <i>118.01</i>	-										
F5	0.071 (0.1702) <i>103.97</i>	0.0754 (0.1700) <i>38.77</i>	-									
F8	0.1594 (0.3171) <i>553.03</i>	0.1271 (0.2779) <i>459.43</i>	0.1503 (0.3390) <i>495.13</i>	-								
F9	0.1270 (0.2813) <i>698.93</i>	0.1161 (0.2537) <i>606.48</i>	0.1433 (0.3117) <i>643.75</i>	0.0492 (0.1232) <i>149.04</i>	-							
F10	0.1343 (0.2891) <i>609.55</i>	0.1007 (0.2467) <i>518.66</i>	0.1440 (0.3025) <i>555.85</i>	0.0338 (0.0959) <i>70.63</i>	0.0326 (0.0981) <i>87.79</i>	-						
F11	0.1162 (0.2420) <i>584.86</i>	0.1039 (0.2007) <i>193.17</i>	0.0883 (0.2208) <i>530.94</i>	0.0351 (0.1239) <i>46.43</i>	0.0425 (0.1280) <i>113.05</i>	0.029 (0.0679) <i>25.5</i>	-					
F12	0.0867 (0.2158) <i>478.29</i>	0.0674 (0.1806) <i>389.75</i>	0.076 (0.2136) <i>427.3</i>	0.0361 (0.1276) <i>85.92</i>	0.0508 (0.1677) <i>219.58</i>	0.0335 (0.0859) <i>130.93</i>	0.0209 (0.0515) <i>106.74</i>	-				
F13	0.0971 (0.2236) <i>416.15</i>	0.0928 (0.2290) <i>319.259</i>	0.0957 (0.2533) <i>40.12</i>	0.0444 (0.1934) <i>302.8</i>	0.076 (0.2375) <i>452.04</i>	0.0541 (0.1728) <i>369.68</i>	0.0308 (0.1142) <i>343.33</i>	0.0264 (0.0983) <i>252.5</i>	-			
F14	0.1327 (0.3362) <i>387.24</i>	0.1379 (0.3371) <i>296.59</i>	0.1069 (0.3255) <i>333.95</i>	0.0975 (0.3100) <i>266.26</i>	0.1131 (0.3168) <i>415.24</i>	0.1192 (0.3193) <i>331.4</i>	0.0778 (0.2600) <i>305.86</i>	0.0703 (0.2592) <i>210.35</i>	0.0835 (0.3009) <i>39.25</i>	-		
F15	0.1196 (0.3049) <i>298.72</i>	0.106 (0.2729) <i>186.18</i>	0.0999 (0.2832) <i>213.22</i>	0.0443 (0.1994) <i>301.82</i>	0.0600 (0.2034) <i>452.23</i>	0.0566 (0.2170) <i>369.29</i>	0.0288 (0.1263) <i>343.2</i>	0.0428 (0.1808) <i>255.3</i>	0.0392 (0.2073) <i>72.26</i>	0.076 (0.2594) <i>171.05</i>	-	
F16	0.1375 (0.3497) <i>303.35</i>	0.1001 (0.2850) <i>197.72</i>	0.0790 (0.2552) <i>230.77</i>	0.1228 (0.2928) <i>267.12</i>	0.0995 (0.2532) <i>416.78</i>	0.0779 (0.1832) <i>332.27</i>	0.0653 (0.1459) <i>306.17</i>	0.0610 (0.1559) <i>211.76</i>	0.1115 (0.2752) <i>179.19</i>	0.12 (0.3373) <i>124.09</i>	0.0859 (0.2556) <i>48.48</i>	-

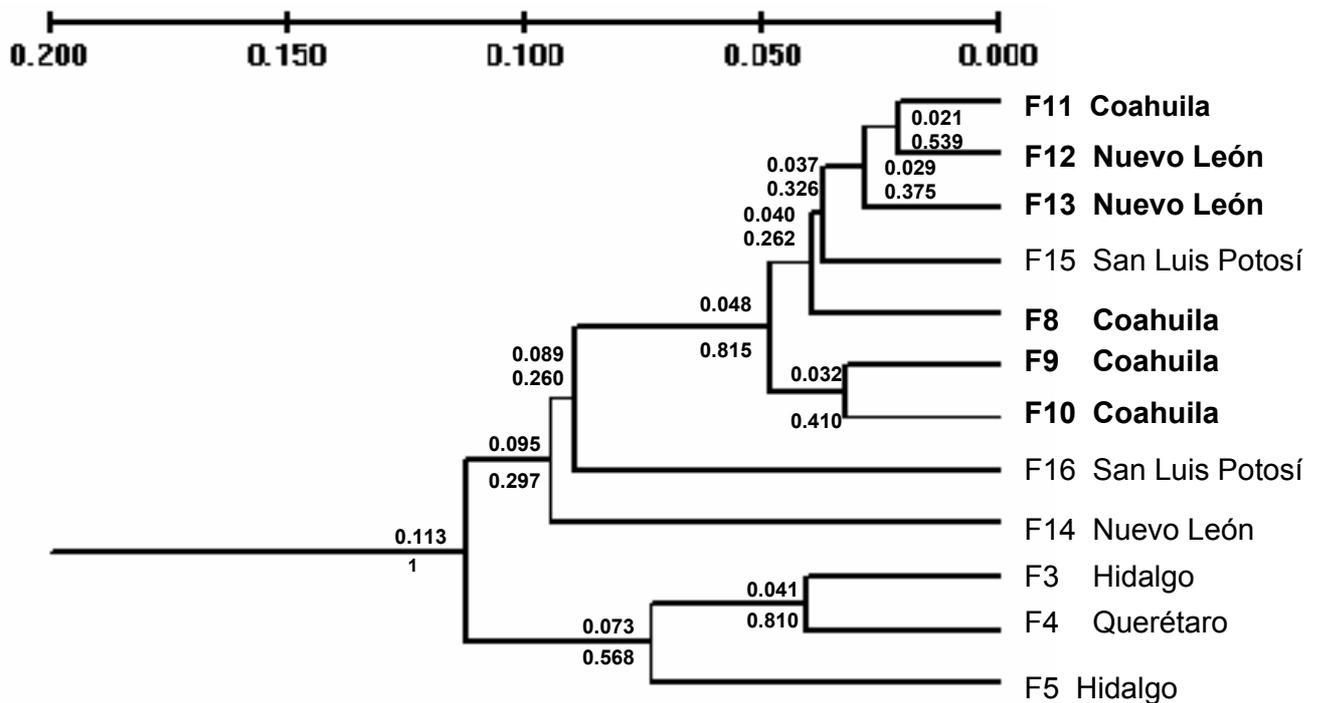


Figura 9. Dendrograma UPGMA de las poblaciones estudiadas de *Agave striata* con base en las distancias de Nei (1972), en claro las de *Agave striata* ssp. *striata* y en oscuro las de *Agave striata* ssp. *falcata*. Sobre cada nodo se muestran la distancia genética y por debajo los valores de bootstrap que lo soportan.

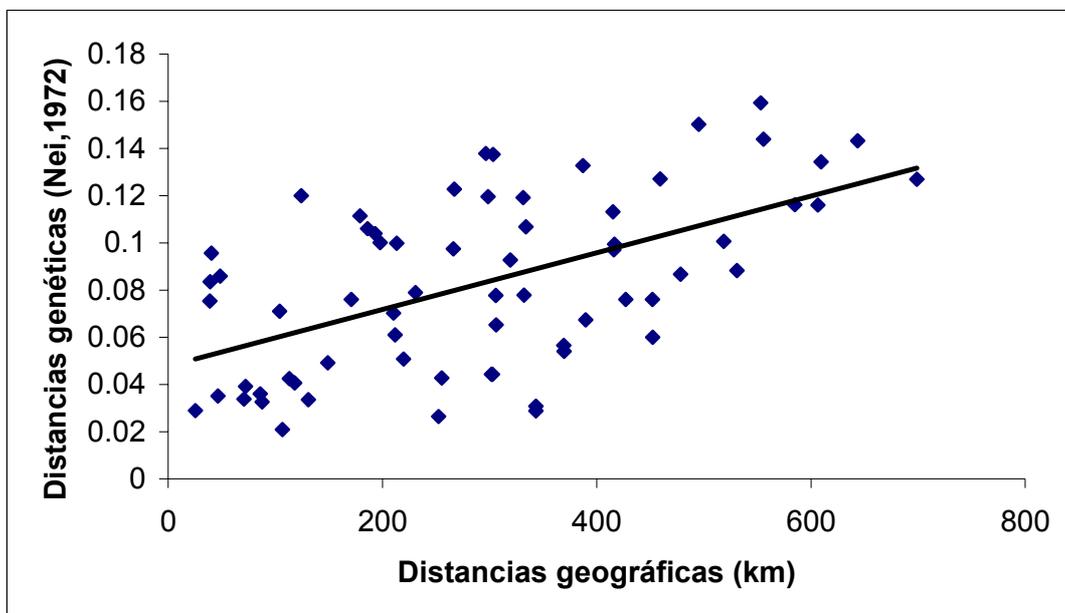


Figura 10. Aislamiento por distancia entre las doce poblaciones de *Agave striata* analizadas de acuerdo a la prueba de Mantel.

Cuadro 9. Distancias genéticas (Nei, 1972) y geográficas (km, en *itálicas*) entre las poblaciones de *Agave striata ssp. striata*. Entre paréntesis, valor de θ entre cada par de poblaciones. Para los datos generales de cada población referirse al Cuadro 1.

Población	F3	F4	F5	F14	F15	F16
F3	-					
F4	0.0406 (0.1030) <i>118.01</i>	-				
F5	0.071 (0.1702) <i>103.97</i>	0.0754 (0.1700) <i>38.77</i>	-			
F14	0.1327 (0.3362) <i>387.24</i>	0.1379 (0.3371) <i>296.59</i>	0.1069 (0.3255) <i>333.95</i>	-		
F15	0.1196 (0.3049) <i>298.72</i>	0.106 (0.3049) <i>186.18</i>	0.0999 (0.2832) <i>213.22</i>	0.076 (0.2594) <i>171.05</i>	-	
F16	0.1375 (0.3497) <i>303.35</i>	0.1001 (0.2850) <i>197.72</i>	0.0790 (0.2552) <i>230.77</i>	0.12 (0.3373) <i>124.09</i>	0.0859 (0.2556) <i>48.48</i>	-

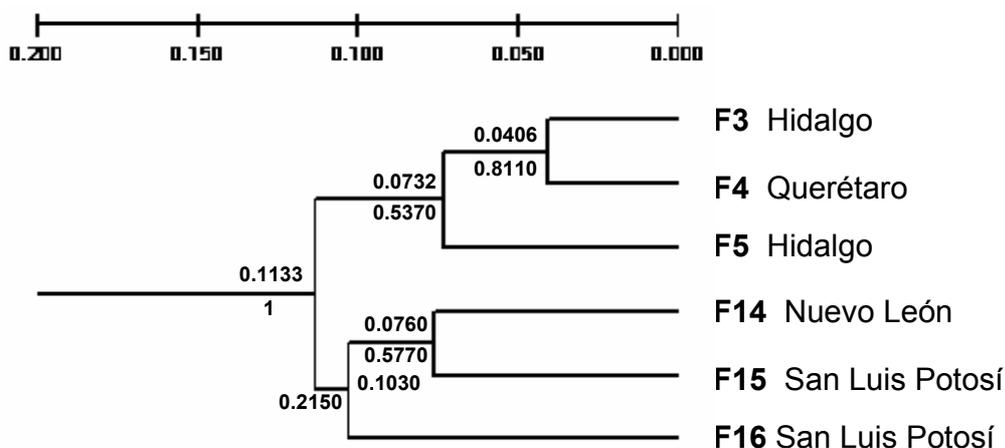


Figura 11. Distancias genéticas entre las poblaciones de *Agave striata ssp. striata*. En cada nodo se muestra arriba la distancia genética y abajo el valor de bootstrap que lo soporta.

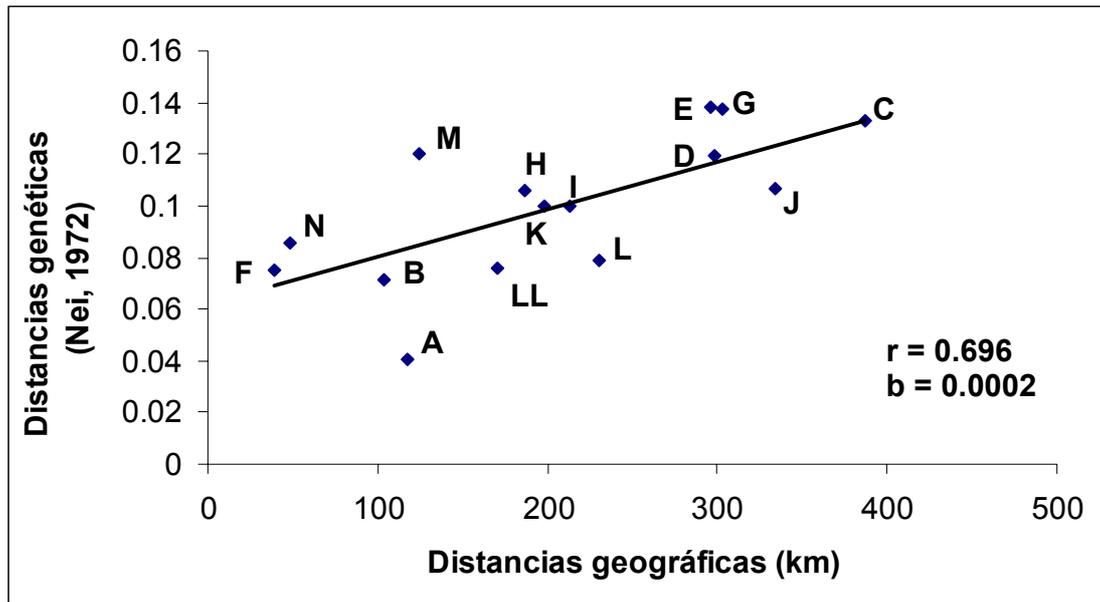


Figura 12. Prueba de Mantel para evaluar aislamiento por distancia entre las poblaciones de *Agave striata ssp. striata*. Para las letras de cada par de poblaciones referirse al Cuadro 9.

Cuadro 10. Distancias genéticas (Nei, 1972) y geográficas (km, en *itálicas*) entre las poblaciones de *Agave striata ssp. falcata*. Entre paréntesis, valor de la θ entre cada par de poblaciones. Para los datos generales de cada población referirse al Cuadro 1.

Población	F8	F9	F10	F11	F12	F13
F8	-					
F9	0.0492 (0.1232) <i>149.04</i>	-				
F10	0.0338 (0.0959) <i>70.63</i>	0.0326 (0.1981) <i>87.79</i>	-			
F11	0.0351 (0.1239) <i>46.43</i>	0.0425 (0.1280) <i>113.05</i>	0.029 (0.0679) <i>25.5</i>	-		
F12	0.0361 (0.1276) <i>85.92</i>	0.0508 (0.1677) <i>219.58</i>	0.0335 (0.0859) <i>130.93</i>	0.0209 (0.0515) <i>106.74</i>	-	
F13	0.0444 (0.1934) <i>302.8</i>	0.076 (0.2375) <i>452.04</i>	0.0541 (0.1728) <i>369.68</i>	0.0308 (0.1142) <i>343.33</i>	0.0264 (0.0983) <i>252.5</i>	-

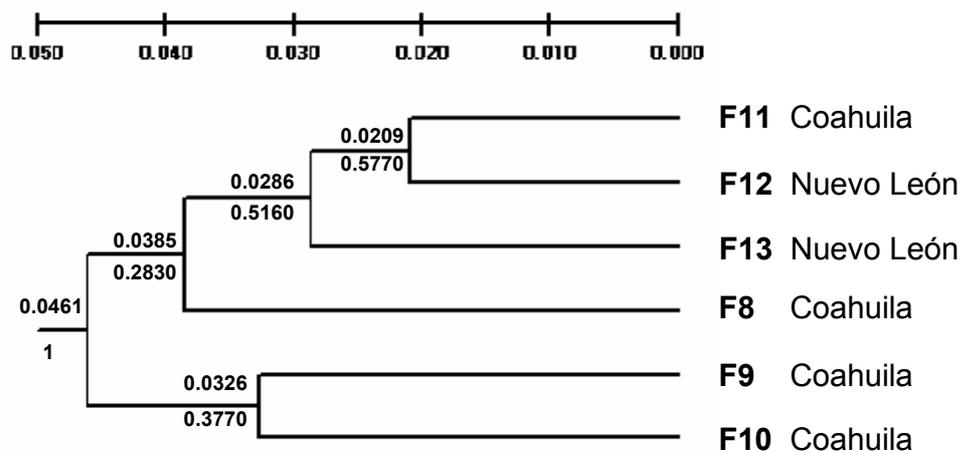


Figura 13. Distancias genéticas entre las poblaciones de *Agave striata ssp. falcata*. En cada nodo se muestra arriba la distancia genética y abajo el valor de bootstrap que lo soporta.

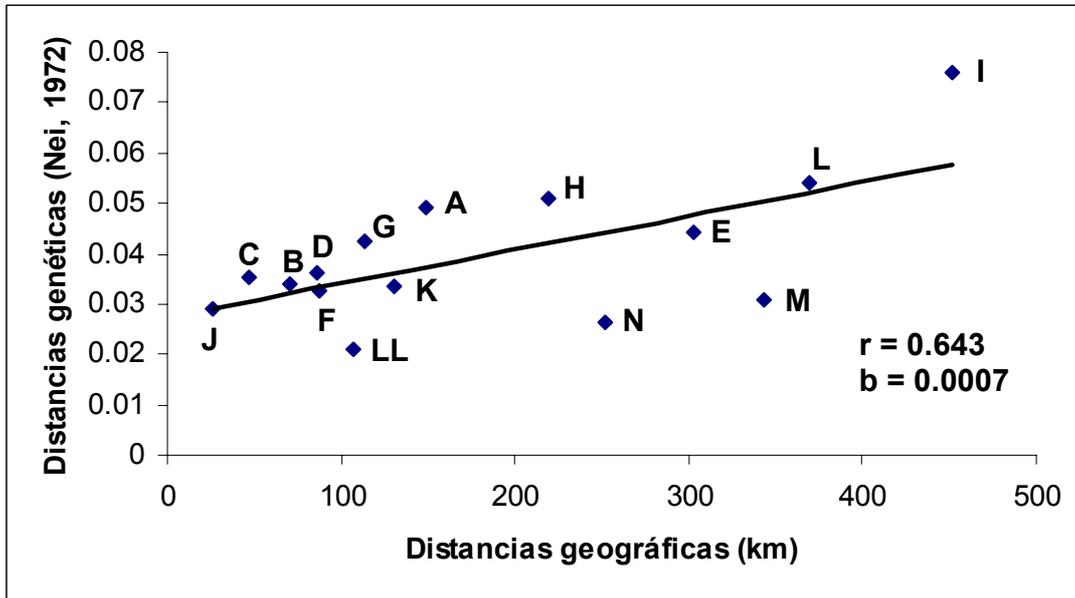


Figura 14. Prueba de Mantel para evaluar aislamiento por distancia entre las poblaciones de *Agave striata ssp. falcata*. Para las letras de cada par de poblaciones referirse al Cuadro 10.

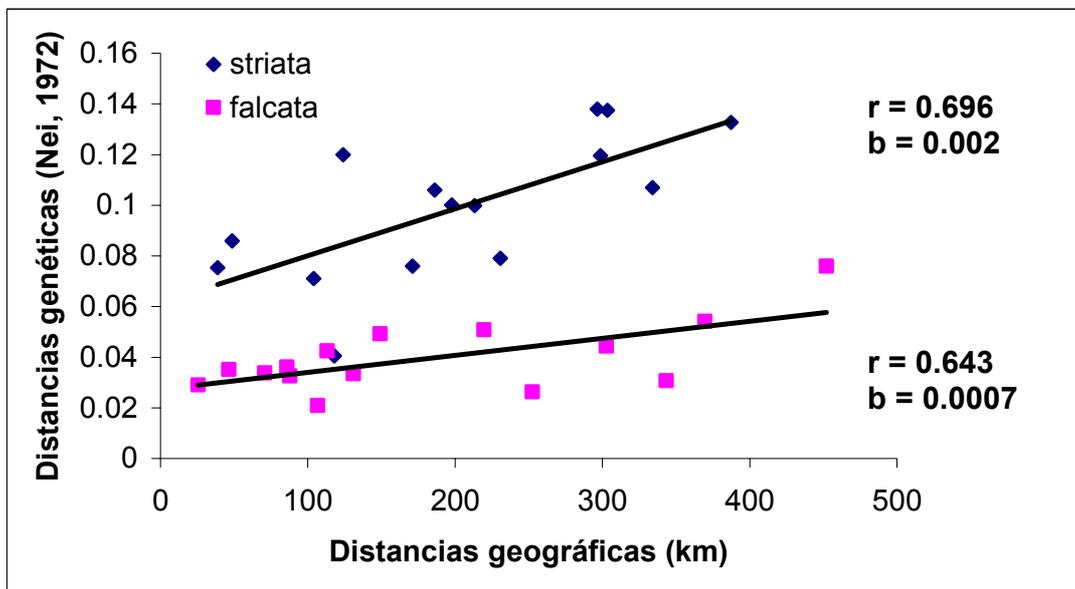


Figura 15. Comparación de la Prueba de Mantel para *Agave striata ssp. striata* y *Agave striata ssp. falcata*.

6. Discusión

6.1 Inter simple sequence repeats (ISSR's)

Los ISSR's (Inter simple sequence repeats) resultaron ser una herramienta útil en el estudio de la genética de poblaciones de *Agave striata* por su alto polimorfismo, reproducibilidad y por ser fáciles de visualizar en geles de agarosa. Estos marcadores pueden ser utilizados confiablemente en los estudios de genética de poblaciones, ya que se heredan de manera mendeliana y experimentalmente son poco sensibles a variaciones de la concentración del primer y del DNA de la muestra (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Wolfe y Liston, 1998; Bornet y Brachard, 2001).

En este trabajo se obtuvieron aproximadamente 16 loci por cada uno de los tres primers utilizados, sumando en total 47 loci que van de 2000 a 300 pb. Con éste número de loci relativamente alto se aseguró que cualquiera de los estimados de variación, diferenciación y distancias genéticas que se hicieron, arrojaran valores confiables.

6.2 Variación genética

Se encontró que *Agave striata* presenta niveles de variación genética relativamente altos ($H_E = 0.2793$, %P= 80.8). La subespecie *Agave striata* ssp. *falcata* presentó mayores niveles de diversidad ($H_E = 0.2881$, %P=80.8) que la subespecie *Agave striata* ssp. *striata* ($H_E = 0.1906$, %P=70.2). En general, estos valores presentan el mismo patrón que los propuestos por Hamrick y Godt (1989, 1996) para monocotiledóneas longevas, perennes, con un sistema predominante de fertilización cruzada, como es el caso de *A. striata*; esto es, niveles de variación mayores en comparación con especies autopolinizables las cuales generalmente tienen menor diversidad genética (Cuadro 11; Fig. 16). Los valores que se obtienen son generalmente mayores con respecto a los promedios reportados para isoenzimas ($H = 0.15$, %P= 50,

Hamrick *et al.*, 1992) y para RAPD's ($H= 0.19$, Nybom y Bartish, 2000) (Cuadro 11; Fig. 16).

Los valores estimados de diversidad genética con diversos marcadores moleculares son similares para las especies del género *Agave* y de la familia Agavaceae. Utilizando la técnica de los ISSR's, otros autores han encontrado valores de diversidad genética similares a los reportados en este estudio. González (2004) reportó valores muy similares con *A. garciae-mendozae* ($H=0.27$, %P=84.6), al igual que Aguirre (2004) en *A. cupreata* ($H=0.2944$, %P=88.8) y *A. potatorum* ($H=0.2689$, %P=83.3). También son similares los datos reportados por Rocha (2006) en 5 especies de *Agave* del subgénero *Littaea*: *A. celsii albicans* ($H=0.24$, %P=89), *A. hidalguensis* ($H=0.23$, %P=71), *A. xylonacantha* ($H=0.21$, %P=75) y *A. difformis* ($H=0.20$, %P=62) (Cuadro 11; Fig. 16).

Rocha (2006) analizó 4 poblaciones de *Agave striata* ssp. *striata* de la Barranca de Meztitlán, Hidalgo, reportando valores similares a los encontrados en este trabajo ($H=0.23$, %P=76). Colín (2006) analizó 4 poblaciones de *A. xylonacantha* y también se encontró valores muy similares a los encontrados reportados por Rocha (2006) para *A. xylonacantha* ($H= 0.21$, %P=75). Es necesario indicar que tanto Rocha (2006) y Colín (2006) como en el presente trabajo se utilizaron los mismos primers. Es muy claro que este tipo de parámetros de variación genética obtenidos a través de los ISSR's en distintas poblaciones por diferentes personas los resultados son similares.

Utilizando RAPD's Navarro *et al.*, (2003) encontraron valores un poco más bajos al estudiar *A. cerulata* ($H= 0.24$, %P= 90), *A. subsimplex* ($H= 0.14$, %P= 76) y *A. deserti* ($H= 0.19$, %P= 78), mientras que con las isoenzimas la diversidad genética de *A. subsimplex* ($H= 0.28$, %P= 88) es mucho mayor, presentado valores similares a los encontrados en este trabajo. Silva-Montellano y Eguiarte (2003b) encontraron en *A. lechuguilla* un valor promedio de variación genética alto ($H= 0.39$, %P= 96) (Cuadro 11; Fig. 16).

En términos generales la especie *Agave striata* ($r= 0.81$) presenta una correlación positiva entre H_E y latitud; es decir, que la variación genética aumenta hacia el norte. Lo mismo sucede con *Agave striata* ssp. *falcata* ($r= 0.81$), pero no con *Agave striata* ssp. *striata* ($r= 0.15$). En contraste, Silva-Montellano y Eguiarte (2003b), encontraron que para el caso de *Agave lechuguilla* H_E generalmente aumenta hacia el Sur (aunque no es significativo). Lo mismo ocurre con *Agave xylonacantha* ($r= 0.94$) (Colín, 2006).

En el caso de *Agave lechuguilla*, se encontró que a lo largo de su distribución geográfica las visitas de los polinizadores y la formación de frutos disminuían significativamente con la latitud. La falta de flujo en las poblaciones sureñas posiblemente sea la causa de que presenten mayor variación y estructuración (Silva-Montellano y Eguiarte, 2003a). Las visitas de los polinizadores (murciélagos y abejas) son abundantes en las poblaciones de *A. xylonacantha* en Metztitlán, Hidalgo (Rocha et al., 2005). Es probable de que el alto flujo génico que presenta esta especie ($N=6.6$) determine sus bajos niveles de variación genética y su débil estructura poblacional. Colín (2006) reporta que los valores de H_E disminuyen hacia el norte por lo cual el origen de *A. xylonacantha* podría ser Metztitlán.

Rocha (2006) encontró que *A. striata* ssp. *striata* en Metztitlán es visitada por abejas, colibríes y abejorros en frecuencias similares. En este trabajo la población analizada de *A. striata* ssp. *striata* en Metztitlán, Hidalgo (F3) presentó baja variación genética, al igual que otras poblaciones de esta subespecie en el sur. Aunque no se tienen más datos sobre la biología reproductiva de *A. striata* y sus subespecies posiblemente los polinizadores están jugando un papel importante en los niveles de variación de esta especie.

6.3 Estructura genética

La especie *Agave striata* presenta diferenciación genética alta ($\theta = 0.1922$). Para *A. striata* ssp. *striata* la diferenciación genética es más alta ($\theta = 0.27893$) que para *A. striata* ssp. *falcata* ($\theta = 0.1055$). La mayor estructuración para la subespecie *striata* puede deberse a que esta subespecie presenta la distribución geográfica más amplia, ya que va desde Hidalgo hasta Coahuila, abarcando diversos tipos de vegetación que incluyen el desierto Chihuahuense hasta el bosque de pino encino. Por lo cual es posible que a lo largo de la distribución de esta subespecie sus polinizadores cambien. En el caso de *Agave striata* ssp. *falcata* se distribuye de manera más restringida en los estados del norte de México en ambientes más homogéneos, que en general comprende matorral xerófilo.

Los valores de diferenciación genética obtenidos en otras especies de agaves utilizando ISSR's son cercanas. Por ejemplo, *A. garciae-mendozae* ($\theta = 0.1$) (González, 2004); *A. potatorum* ($\theta = 0.084$), *A. cupreata* ($\theta = 0.145$) (Aguirre, 2004); *A. celsii albicans* ($\theta = 0.130$), *A. hidalguensis* ($\theta = 0.063$), *A. xylonacantha* ($\theta = 0.059$) y *A. difformis* ($\theta = 0.113$) (Rocha, 2006) (Cuadro 11).

También los resultados de diferenciación genética obtenidos a través de RAPD's en agavaceas son parecidas: *A. cerulata* ($\theta = 0.1$), *A. subsimplex* ($\theta = 0.08$) y *A. deserti* ($\theta = 0.14$) (Navarro *et al.*, 2003). En el caso de *A. lechuguilla* ($\theta = 0.083$) (Silva y Eguiarte, 2003b) utilizando isoenzimas los resultados también indican baja diferenciación genética; sin embargo, son mucho más bajos que los reportados en *A. subsimplex* ($\theta = 0.31$) y *A. victoria-reginae* ($\theta = 0.23$) (Martínez-Palacios *et al.*, 1999) utilizando isoenzimas (Cuadro 11; Fig 16).

Comparando con plantas de otros grupos taxonómicos y utilizando RAPD's, Nybom y Bartish (2000) encuentran un valor promedio de F_{ST} de 0.35 y de G_{ST} de 0.29, por lo que se puede concluir que los niveles de diferenciación genética encontrados en este trabajo son medianamente altos.

Con respecto a la prueba de heterogeneidad realizada mediante el análisis de diferenciación exacta de Raymond y Rousset (1995), se encontraron diferencias significativas para 40 de los 47 loci examinados, lo cual indica que esta especie presenta una diferenciación genética alta entre las poblaciones.

El valor de la diferenciación genética (Φ) encontrado con el análisis de varianza molecular (AMOVA) es ligeramente mayor al obtenido mediante los coeficientes de Wright (θ) (1931), esto debido a la naturaleza de cada uno de los métodos. No obstante, el patrón de alta diferenciación genética y la presencia de una gran proporción de la variación dentro de las poblaciones son congruentes con lo propuesto tanto por Hamrick y Godt (1996) como Nybom y Bartish (2000) para especies cuyo sistema de fecundación es preferentemente polinización cruzada.

En la Figura 16 se graficó la heterocigosis contra la diferenciación genética de las diferentes especies de agaváceas, plantas monocotiledóneas, perennes y de distribución regional (Cuadro 12). En esta gráfica, *Yucca filamentosa* (Massey y Hamrick, 1998), *A. deserti* (Navarro *et al.*, 2003) *A. difformis* (Rocha, 2006), *A. subsimplex* (Navarro *et al.*, 2003) y *A. xylonacantha* (Colín, 2006; Rocha, 2006) presentaron baja variación y diferenciación genética y posiblemente esto se deba a que la mayoría de estas especies tienen un alto flujo génico (Ej. *A. xylonacantha* $Nm= 6.6$. Colín, 2006). Otras especies presentaron heterocigosis más altas, pero su estructura poblacional continuó siendo baja, como en los casos de *A. potatorum* (Aguirre, 2004), *A. cupreata* (Aguirre, 2004) y *A. striata* ssp. *falcata*. En estos casos posiblemente el flujo génico no es tan eficiente para homogenizar las poblaciones de estos taxa y otras fuerzas evolutivas como la deriva génica pueden estar incrementando la variación genética.

A. victoria-reginae (Martínez Palacios, *et al.*, 1999), *A. striata* ssp. *striata* y las plantas perennes longevas (Nybom y Bartish, 2000) presentaron alta variación y diferenciación genética y en estos casos la deriva puede estar actuando debido a que el flujo génico es bajo. *A. lechuguilla* (Silva y Eguiarte, 2003b) y *Manfreda brachstachya*

(Eguiarte *et al.*, 2000) presentaron la mayor variación genética pero con baja estructuración poblacional lo que implica que el flujo génico en estas dos especies es alto, pero se sigue manteniendo la variación, tal vez por fuerzas evolutivas que están actuando localmente. Finalmente, las monocotiledóneas (Nybom y Bartish, 2000), las plantas perennes de vida corta (Nybom y Bartish, 2000) y las plantas de distribución regional (Nybom y Bartish, 2000) tuvieron tanto alta variación como diferenciación genética donde seguramente la falta de flujo génico y su distribución geográfica influyeron en dichos parámetros.

El flujo génico es el principal componente de la estructura poblacional, ya que determina qué tanto se comporta cada población de una especie como una unidad evolutivamente independiente. El valor estimado de Nm para *Agave striata* fue de $Nm=1.05$, lo cual sugiere que existe suficiente flujo génico como para contrarrestar los efectos de la deriva génica y mantener las poblaciones conectadas evolutivamente. Sin embargo, *Agave striata* ssp. *striata* ($Nm=0.74$) presenta un flujo génico mucho menor que *Agave striata* ssp. *falcata* ($Nm=1.89$). Debido a que los polinizadores de *Agave striata* ssp. *striata* (abejas, colibríes y abejorros) abarcan menores áreas de distribución que los murciélagos, es posible que cambien a lo largo de la distribución de esta subespecie e incrementen su estructura poblacional.

Los valores de flujo génico reportados para otras especies de agaves son cercanos a los reportados en este trabajo. En *A. garcía-mendozae* (González, 2004) se encontró un flujo génico similar ($Nm = 1$) al igual que los presentados por *A. cupreata* ($Nm = 1.49$) (Aguirre, 2004), *A. potatorum* ($Nm = 2.99$) (Aguirre, 2004) y mucho menor que *A. xylonacantha* ($Nm=6.61$) (Colín, 2006); todos ellos obtenidos utilizando como marcador a los ISSR's.

Los valores de Nm obtenidos con RAPD's son altos para el complejo *A. deserti* (rango 2.91 - 6.14) (Navarro *et al.*, 2003). De los estudios realizados con isoenzimas, *A. victoriae-reginae* arroja niveles bajos ($Nm = 0.655$, isoenzimas) (Martínez-Palacios, *et al.*, 1999) en comparación con *A. lechuguilla* (Silva y Eguiarte, 2003b) cuyo valor declina

desde el sur de su distribución hacia el norte (12.23 sur; 2.23, centro y 1.08 en el norte, isoenzimas).

6.4 Distancias genéticas y aislamiento por distancia

La distancia genética promedio para *Agave striata* es de $D = 0.0830$, con un intervalo de 0.0209-0.1594. Las distancias genéticas en la subespecie *striata* ($D = 0.0992$; 0.0406-0.1379) fueron mayores que en la subespecie *falcata* ($D = 0.0397$; 0.0209-0.076). Las distancias genéticas de *Agave striata* se encuentran entre las más grandes del género *Agave*. La subespecie *striata* presenta distancias genéticas similares a *Agave lechuguilla* (Silva y Eguiarte, 2003b). Esto se puede deber a que las dos especies presentan amplia distribución y los polinizadores podrían estar cambiando a lo largo de su distribución. En el caso específico de *A. striata* ssp. *striata* también podría influir su alta estructuración poblacional y su bajo flujo génico. En *Agave victoria-regineae* se observan datos similares exceptuando que su distribución es más restringida (endémica de Tehuacán, Puebla) donde es posible que la deriva génica influya fuertemente en la alta estructuración de sus poblaciones.

Las distancias genéticas de la subespecie *falcata* son similares a otras especies de agaves de distribución restringida: *A. cupreata* (Aguirre, 2004), *A. celsii albicans* (Rocha, 2006) y *A. cerulata* (Navarro *et al.*, 2003). Estas especies presentan flujo génico similar, el suficiente para mantener conectadas a las poblaciones y probablemente así reducir las diferencias genéticas entre las poblaciones. Finalmente las grandes distancias genéticas *Agave striata* podrían reflejar que fue una de las primeras especies *Agave* que divergió hace 8 millones de años.

Tanto la especie *Agave striata* ($r = 0.56$, $b = 0.001$) como sus subespecies *striata* ($r = 0.69$, $b = 0.002$) y *falcata* ($r = 0.64$, $b = 0.0007$) presentan un patrón de aislamiento por distancia; es decir, las distancias genéticas y las geográficas se encuentran correlacionadas positivamente, lo que significa que conforme más alejadas estén las poblaciones unas de otras, serán más diferentes genéticamente hablando. Las

pendientes de las subespecies *striata* ($b= 0.002$) y *falcata* son claramente distintas entre sí ($b=0.0007$) (Fig. 15).

En el dendrograma generado para las 12 poblaciones de *Agave striata* (Fig. 9) se asocian en la parte inferior las poblaciones de *Agave striata* ssp. *striata*, con excepción de la población F15 de San Luis Potosí, la cual se ubica en la parte superior del dendrograma con las poblaciones de *A. striata* ssp. *falcata*. Posiblemente esta población presente algunos eventos de introgresión entre las dos subespecies de *A. striata*, aunque la morfología de sus individuos sigue siendo de *A. striata* ssp. *falcata*.

En el caso particular de *Agave striata* ssp. *striata* el dendrograma (Fig. 11) generado para 6 poblaciones también refleja su alta estructuración poblacional, quedando separadas las poblaciones del Sur con las del Centro-Norte. La población F16 de San Luis Potosí se separó del resto de los clados, pero resultó cercana a la población F15 que también es de San Luis Potosí.

Para *Agave striata* ssp. *falcata*, el dendrograma de la Fig. 13 agrupa a las 6 poblaciones de esta subespecie cercanas entre sí, debido a que sus distancias genéticas son las más pequeñas. La población F10 y F9 de Coahuila quedan separadas del resto de las demás. Estas poblaciones son las más norteñas, presentan la mayor heterocigosis y quedan cerca de otras poblaciones de Coahuila que también presentan altos niveles de variación genética.

Con base en la agrupación de las subespecies de *Agave striata* ssp. *striata* y *Agave striata* ssp. *falcata* en el dendrograma de la Fig. 9, aunada a las diferencias significativas en heterocigosis de las dos subespecies y sus claras diferencias en estructura poblacional, flujo génico y distancias genéticas (Cuadro 11; Fig. 16). Los resultados se sugieren que estas dos subespecies son dos grupos cercanos entre sí, pero con diferencias claras en sus historias evolutivas que posiblemente se encuentran bajo procesos de especiación.

Cuadro 11. Parámetros de estructura genética en especies de la familia *Agavaceae* así como valores promedio para diferentes rasgos especie específicos de varias especies de plantas. * Valores Φ_{ST}

Especie	H	%P	F_{ST}	Nm	D_{min}-D_{max}	Técnica	Referencia
<i>A. striata</i>	0.27	81	0.19	1.05	0.02-0.16	ISSR's	Este estudio
<i>A. striata ssp. striata</i>	0.25	70	0.27	0.74	0.04-0.13	ISSR's	Este estudio
<i>A. striata ssp. striata</i>	0.23	76	0.10		0.01-0.05	ISSR's	Rocha (2006. Sin publicar)
<i>A. striata ssp. falcata</i>	0.28	81	0.1	1.89	0.02-0.07	ISSR's	Este estudio
<i>A. garciae-mendozae</i>	0.27	85	0.1	1.30	0.02-0.04	ISSR's	González (2004)
<i>A. cupreata</i>	0.29	89	0.14	1.49	0.03-0.09	ISSR's	Aguirre (2004)
<i>A. potatorum</i>	0.27	83	0.08	2.99	0.02-0.05	ISSR's	Aguirre (2004)
<i>A. xylonacantha</i>	0.19	68	0.06	6.61	0.01-0.02	ISSR's	Colín (2006)
<i>A. xylonacantha</i>	0.21	75	0.06		0.01-0.02	ISSR's	Rocha (2006)
<i>A. celsii albicans</i>	0.24	89	0.13		0.03-0.09	ISSR's	Rocha (2006)
<i>A. hidalguensis</i>	0.23	71	0.06		0.02	ISSR's	Rocha (2006)
<i>A. difformis</i>	0.20	62	0.11		0.01-0.06	ISSR's	Rocha (2006)
<i>A. subsimplex</i>	0.14	76	0.08	2.91	0.01-0.02	RAPD's	Navarro <i>et al.</i> , (2003)
<i>A. cerulata</i>	0.24	90	0.1		0.01-0.09	RAPD's	Navarro <i>et al.</i> , (2003)
<i>A. deserti</i>	0.19	78	0.14	2.91-6.14	0.006 -0.02	RAPD's	Navarro <i>et al.</i> , (2003)
<i>A. lechuguilla</i>	0.39	96	0.083	2.23-12.2	0.03-0.12	Isoenzimas	Silva y Eguiarte (2003b)
<i>A. victoriae-reginae</i>	0.33	83	0.24	0.65	0.18	Isoenzimas	Martínez Palacios <i>et al.</i> , (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 <i>et al.</i> , (2000)
Monocotiledóneas	0.19		0.38*	RAPD's	Nybom y Bartish (2000)
Perenes longevas	0.242		0.25*	RAPD's	Nybom y Bartish (2000)
Anuales	0.125		0.70*	RAPD's	Nybom y Bartish (2000)
Distribución regional	0.222		0.43*	RAPD's	Nybom y Bartish (2000)
Perenes de vida corta	0.207		0.39*	RAPD's	Nybom y Bartish (2000)
Heterocruza	0.260		0.28*	RAPD's	Nybom y Bartish (2000)
Autocruza	0.091		0.70*	RAPD's	Nybom y Bartish (2000)

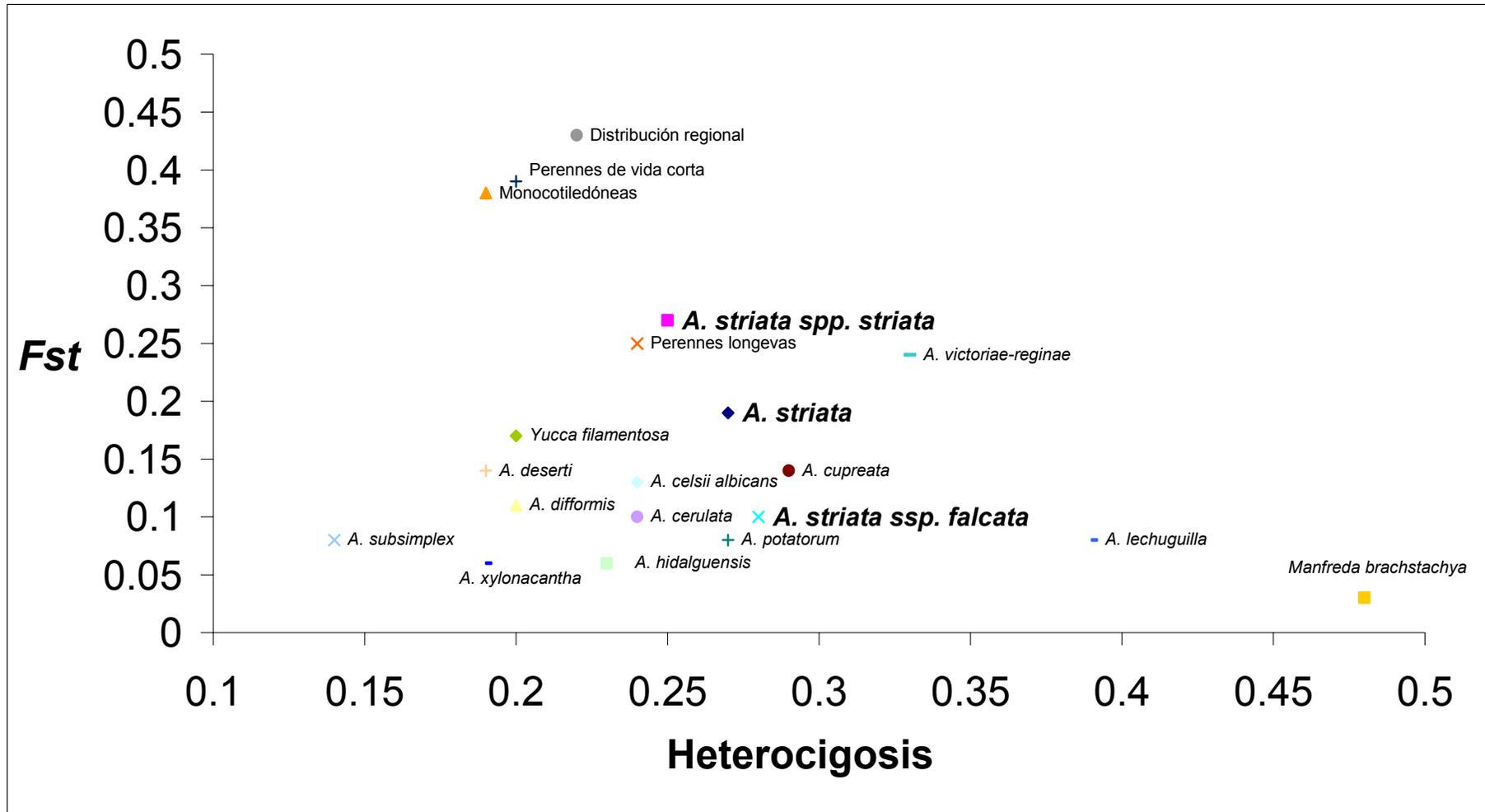


Figura 16. Datos de diversidad (en términos de heterocigosis) y de estructuración (en términos de F_{ST}) de *A. striata*, *A. striata ssp. striata* y *A. striata ssp. falcata* en comparación con otras especies de Agavaceas, plantas monocotiledóneas, perennes longevas y de distribución regional. Técnicas utilizadas y referencias en el Cuadro 11.

7. Conclusiones

- Los marcadores moleculares ISSR's resultaron ser una técnica relativamente sencilla y rápida para estudios intraespecíficos de genética de poblaciones por ser específicos, repetibles y polimórficos.
- Los niveles de variación genética son altos tanto para la especie *Agave striata* ($H_E = 0.27$, %P= 80.85) como para *Agave striata* ssp. *striata* ($H_E = 0.25$, %P= 70.27) y *Agave striata* ssp. *falcata* ($H_E = 0.28$, %P= 80.85). La mayor parte de la variación genética (75%) se encuentra dentro de las poblaciones.
- La especie *Agave striata* presenta una alta estructuración poblacional ($\theta = 0.19$), un flujo génico moderado ($Nm = 1.05$) y distancias genéticas que van de pequeñas a grandes (0.02-0.15).
- *Agave striata* ssp. *striata* presenta una mayor estructuración poblacional ($\theta = 0.27$), menor flujo génico ($Nm = 0.74$) y distancias genéticas mayores ($D = 0.09$) que *Agave striata* ssp. *falcata* ($\theta = 0.1$; $Nm = 1.89$; $D = 0.04$). Esto indica que la *Agave striata* ssp. *striata* y *Agave striata* ssp. *falcata* son dos grupos cercanos entre sí, pero con diferentes historias evolutivas que posiblemente están especiando.
- Tanto la especie *Agave striata* como las subespecies *striata* y *falcata* siguen un modelo de aislamiento por distancia, ya que la correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas de cada par de poblaciones fue positiva.
- Es necesario realizar estudios de biología reproductiva en la mayoría de las poblaciones analizadas de *Agave striata* para tener una idea más clara del papel de los polinizadores en la diversidad y estructuración genética de esta especie.

8. Apéndices

Apéndice 1

Protocolo de extracción de ADN con CTAB de acuerdo con Doyle y Doyle (1987) modificado con STE para *Agave striata*

1. En un mortero colocar 3 pedazos pequeños de hoja, alrededor de 1g de tejido. Moler con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y eliminar el máximo de fibras. Tratar de moler en un sólo evento y no remoler la muestra excesivamente, por que esto provocaría que el ADN se fraccionara.
2. Agregar 400 µl de buffer de extracción CTAB y 600 µl de buffer STE, seguir moliendo y recuperar en un microtubo de 1.5ml. Es importante conservar las proporciones de Buffer, sin embargo las cantidades pueden variar según la textura y consistencia de la muestra tratando de obtener un jarabe.
3. Centrifugar a 10 000 rpm durante 8 min. y eliminar el sobrenadante.
4. Repetir del paso 2 al 3 (Segundo lavado).
5. Resuspender con 400 µl de CTAB 2X y 600 µl de STE.
6. Centrifugar a 10 000 rpm durante 8 min.
7. Eliminar el sobrenadante y resuspender con 500 µl de CTAB 2X.
8. Agregar 8 µl de RNAsa (14 000 u/ml). Incubar 30 min. a 37° C. Durante la incubación es conveniente invertir los tubos 2 a 3 veces.
9. Agregar 40 µl de proteinasa K (400U/ml) e incubar a 65°C por 30 minutos. Durante la incubación también es conveniente invertir los tubos 2 a 3 veces.
10. Agregar a cada tubo 600 µl de cloroformo:octanol (24:1), agitar en vortex hasta homogeneizar, (no exceder la agitación).
11. Centrifugar a 9000rpm durante 12 min.
12. 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, recupere con una pipeta de 200µl sólo 400 µl.
13. Volver lavar con cloroformo:octanol (24:1).

14. Recuperar 200 µl para uso y 200 µl de respaldo.
15. Precipitar el ADN con 400 µl isopropanol frío a -20°C . Dejar reposar 2 horas a -20°C . No es recomendable dejar precipitando muchas horas pues el producto resulta más sucio.
16. Centrifugar a 9000rpm durante 5 min. Eliminar el sobrenadante. Se observará un pequeño botón al fondo del tubo, este debe ser de color blanco translucido, si sólo es muy blanco y muy grande es posible que esté sucio.
17. Limpiar el ADN agregando 1ml de etanol 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 10 000g durante 5 min. Repetir dos veces.
18. Eliminar el sobrenadante sin perder de vista el botón. Si lo considera necesario se puede repetir el lavado con alcohol al 80%.
19. Eliminar el sobrenadante sin perder de vista el botón. Evaporar el resto del alcohol colocando los tubos destapados en el termoblock a 70°C durante 10 a 15 min.
20. Rehidratar uno de los tubos con ADN con agua ultra pura con 70 µl y otro conservarlo seco a -20°C .
21. Medir la cantidad y calidad del ADN hidratado en el biofotómetro 24 hrs después de haber sido hidratado.

Reactivos:

- **Buffer de extracción CTAB 2X**

Tris-HCl 100 mM pH8

NaCl 0.7 M (66%)

EDTA 20 mM pH8

CTAB 2%

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

- **Buffer de extracción CTAB**

Tris-HCl 100 mM pH8

NaCl 0.75 M (66%)

EDTA 20 mM pH8

CTAB 4%

PVP40 4%

Ac. Ascorbico 0.1%

DIECA 0.1%

β-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 50 mM (66%)

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

Apéndice 2

Condiciones de amplificación de los ISSRs por medio de PCR

Reactivo Concentración inicial	Primer 811		Primer 846		Primer 853	
	Reacción 30 (µl)	Concentración final	Reacción 30 (µl)	Concentración final	Reacción 30 (µl)	Concentración final
Buffer 10X	3 µl	1X	3 µl	1X	3 µl	1X
MgCl ₂ 30 mM	2.4 µl	2.4 mM	1.83 µl	1.83 mM	2.7 µl	2.7 mM
dNTPs 2.5 mM c/u	2.4 µl	0.2 mM	2.4 µl	0.2 mM	2.4 µl	0.2 mM
Primer 10 µM	1.2 µl	0.4 µM	1.2 µl	0.4 µM	1.2 µl	0.4 µM
DNA 30 ng/µl	1.5 µl	45 ng	2.2 µl	66 ng	2 µl	30 ng
Taq 5 U/µl	0.2 µl	1U	0.2 µl	1U	0.2 µl	1U
Agua	19.3 µl		19.17 µl		18.5 µl	

Apéndice 3

Frecuencias alélicas en cada uno de los 47 loci en *Agave striata*

Locí/Pobl.	F3	F4	F5	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	TOTAL
1 p	0.000	0.000	0.000	0.2572	0.6864	0.1633	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.092
1 q	1.000	1.000	1.000	0.7428	0.3136	0.8367	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.908
2 p	0.000	0.000	0.000	0.1390	0.3225	0.2126	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.056
2 q	1.000	1.000	1.000	0.8610	0.6775	0.7874	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.944
3 p	0.000	0.000	0.000	0.1094	0.1316	0.1168	0.1835	0.000	0.000	0.2362	0.000	0.1472	0.077
3 q	1.000	1.000	1.000	0.8906	0.8684	0.8832	0.8165	1.000	1.000	0.7638	1.000	0.8528	0.923
4 p	0.000	0.000	0.000	0.2344	0.1702	0.2254	0.1527	0.1220	0.1502	0.000	0.1398	0.0955	0.108
4 q	1.000	1.000	1.000	0.7656	0.8298	0.7746	0.8473	0.8780	0.8498	1.000	0.8602	0.9045	0.892
5 p	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
5 q	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
6 p	0.000	0.3732	1.000	0.1390	0.2318	0.3367	0.4453	0.2783	0.1835	0.4472	0.4523	1.000	0.407
6 q	1.000	0.6268	0.000	0.8610	0.7682	0.6633	0.5547	0.7217	0.8165	0.5528	0.5477	0.000	0.593
7 p	0.1633	0.000	0.2375	0.1592	0.0762	0.2126	0.000	0.1461	0.000	0.000	0.000	0.2167	0.101
7 q	0.8367	1.000	0.7625	0.8408	0.9233	0.7874	1.000	0.8539	1.000	1.000	1.000	0.7833	0.899
8 p	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
8 q	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9 p	0.2697	0.4024	0.5178	0.2457	0.3860	0.3072	0.4226	0.2929	0.4557	0.3991	0.4	0.2615	0.393
9 q	0.7303	0.5976	0.4822	0.7543	0.6140	0.6928	0.5774	0.7071	0.5443	0.6009	0.6	0.7385	0.637
10 p	1.000	1.000	1.000	0.1695	0.1507	0.3519	0.4226	0.4410	0.6151	0.3333	0.2384	0.6307	0.529
10 q	0.000	0.000	0.000	0.8305	0.8493	0.6481	0.5774	0.5590	0.3849	0.6667	0.7616	0.3693	0.471
11 p	0.000	0.000	0.000	0.4915	0.2212	0.3218	0.1835	0.2929	0.2183	0.000	0.000	0.1340	0.155
11 q	1.000	1.000	1.000	0.5085	0.7788	0.6782	0.8165	0.7071	0.7817	1.000	1.000	0.8660	0.845
12 p	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
12 q	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
13 p	1.000	0.4655	0.5687	0.000	0.1702	0.000	0.2662	0.1220	0.1502	0.1025	0.000	0.000	0.237
13 q	0.000	0.5345	0.4313	1.000	0.8298	1.000	0.7338	0.8780	0.8498	0.8975	1.000	1.000	0.763

14	p	0.2254	0.3732	1.000	1.000	0.4721	0.5528	1.000	0.8557	1.000	1.000	1.000	1.000	0.790
	q	0.7746	0.6268	0.000	0.000	0.5279	0.4472	0.000	0.1443	0.000	0.000	0.000	0.000	0.210
15	p	0.3675	0.2208	0.3712	0.1800	0.1702	0.1876	0.000	0.000	0.1181	0.000	0.000	0.000	0.135
	q	0.6325	0.7792	0.6288	0.8200	0.8298	0.8124	1.000	1.000	0.8891	1.000	1.000	1.000	0.866
16	p	0.5170	0.2929	1.000	0.6526	1.000	0.5757	1.000	0.8557	0.6151	1.000	0.5528	0.6307	0.724
	q	0.4830	0.7071	0.000	0.3474	0.000	0.4243	0.000	0.1443	0.3849	0.000	0.4472	0.3693	0.276
17	p	0.4523	0.3186	1.000	0.4748	0.1222	0.2384	0.3398	0.4796	0.5093	0.2929	0.4	0.2615	0.407
	q	0.5477	0.6814	0.000	0.5252	0.8778	0.7616	0.6602	0.5204	0.4907	0.7071	0.6	0.7385	0.593
18	p	0.000	0.000	0.000	0.3985	0.0946	0.1168	0.1527	0.1340	0.000	0.000	0.0835	0.000	0.082
	q	1.000	1.000	1.000	0.6017	0.9054	0.8832	0.8473	0.8660	1.000	1.000	0.9165	1.000	0.918
19	p	0.000	0.000	0.000	0.3052	0.2425	0.2517	0.2839	0.4796	0.000	0.000	0.3072	0.000	0.156
	q	1.000	1.000	1.000	0.6948	0.7575	0.7483	0.7161	0.5204	1.000	1.000	0.6928	1.000	0.844
20	p	0.3675	0.3453	0.2224	0.6286	0.6379	0.6536	0.4453	0.1220	0.5093	0.3764	0.5528	0.0830	0.412
	q	0.6325	0.6547	0.7776	0.3714	0.3621	0.3464	0.5547	0.8780	0.4907	0.6236	0.4472	0.9170	0.588
21	p	0.000	0.000	0.000	0.3052	0.2212	0.2	0.1679	0.1340	0.000	0.000	0.1056	0.000	0.094
	q	1.000	1.000	1.000	0.6948	0.7788	0.8	0.8321	0.8660	1.000	1.000	0.8944	1.000	0.906
22	p	0.1633	0.2929	0.1373	0.3567	0.3598	0.000	0.1377	0.2929	0.1502	0.1667	0.4	0.000	0.205
	q	0.8367	0.7071	0.8627	0.6433	0.6402	1.000	0.8623	0.7071	0.8498	0.8333	0.6	1.000	0.795
23	p	0.2254	0.2441	0.000	0.1592	1.000	0.2789	0.1679	0.1708	0.3061	0.000	0.000	0.000	0.213
	q	0.7746	0.7559	1.000	0.8408	0.000	0.7211	0.8321	0.8292	0.6939	1.000	1.000	1.000	0.787
24	p	0.1437	0.000	0.1931	0.000	1.000	0.2384	0.1377	0.1708	0.1722	0.2546	0.000	0.1210	0.203
	q	0.8563	1.000	0.8069	1.000	0.000	0.7616	0.8623	0.8292	0.8278	0.7454	1.000	0.8790	0.797
25	p	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	q	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
26	p	0.1437	0.000	0.000	0.000	0.2212	0.1515	0.1229	0.1220	0.2423	0.000	0.000	0.000	0.084
	q	0.8563	1.000	1.000	1.000	0.7708	0.8485	0.8771	0.8780	0.7577	1.000	1.000	1.000	0.916
27	p	0.5170	0.5774	0.3900	0.2929	0.2871	0.2929	0.3798	0.5918	0.5286	0.3991	0.4708	0.3604	0.424
	q	0.4830	0.4226	0.6100	0.7071	0.7129	0.7071	0.6202	0.4082	0.4714	0.6009	0.5292	0.6396	0.576
28	p	0.1633	0.2208	0.1373	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.043
	q	0.8367	0.7792	0.8627	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.957
29	p	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	q	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
30	p	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	q	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

31	p	1.000	1.000	1.000	0.2344	0.6612	0.4169	0.3595	0.6181	0.4557	0.5590	0.4901	1.000	0.650
	q	0.000	0.000	0.000	0.7656	0.3388	0.5831	0.6405	0.3819	0.5443	0.4410	0.5099	0.000	0.350
32	p	1.000	1.000	1.000	0.3052	0.3471	0.2929	0.3595	0.3595	0.1611	0.7113	0.3836	1.000	0.577
	q	0.000	0.000	0.000	0.6948	0.6529	0.7071	0.6405	0.6405	0.8389	0.2887	0.6164	0.000	0.423
33	p	0.5918	0.4024	0.5425	0.3567	0.3995	0.3072	0.3798	0.6464	0.6400	0.7643	0.1515	0.2929	0.456
	q	0.4082	0.5976	0.4575	0.6433	0.6005	0.6928	0.6202	0.3536	0.3600	0.2357	0.8485	0.7071	0.544
34	p	0.5528	0.4655	0.5965	0.1695	0.3727	0.2384	0.3020	0.3708	0.2423	0.6667	0.2384	0.5736	0.399
	q	0.4472	0.5345	0.4035	0.8305	0.6273	0.7616	0.6980	0.6292	0.7577	0.3333	0.7616	0.4264	0.601
35	p	0.6349	0.5371	0.6950	0.2457	0.3225	0.2652	0.2321	0.3230	0.1286	0.4730	0.2929	0.2023	0.393
	q	0.3651	0.4629	0.3050	0.7543	0.6775	0.7348	0.7679	0.6770	0.8714	0.5270	0.7071	0.7977	0.637
36	p	0.2042	0.2208	0.2224	0.2457	0.6379	0.6536	0.5146	0.3545	0.1076	0.1181	0.3836	1.000	0.389
	q	0.7958	0.7792	0.7776	0.7543	0.3621	0.3464	0.4804	0.6455	0.8924	0.8819	0.6164	0.000	0.611
37	p	0.2254	0.3732	0.2847	0.5087	0.5753	0.6838	0.4936	0.6464	0.2065	0.1502	0.2	1.000	0.446
	q	0.7746	0.6268	0.7153	0.4913	0.4247	0.3162	0.5064	0.3536	0.7935	0.8498	0.8	0.000	0.554
38	p	0.3945	0.4331	0.3900	0.4429	0.6159	0.7172	0.6797	0.4226	0.3914	0.1667	0.4901	0.4359	0.465
	q	0.6055	0.5669	0.6100	0.5571	0.3841	0.2828	0.3203	0.5774	0.6086	0.8333	0.5099	0.5641	0.535
39	p	0.2697	0.3732	0.3012	0.4586	0.3598	0.4523	0.4009	0.3386	0.5093	0.000	0.000	0.000	0.289
	q	0.7303	0.6268	0.6988	0.5414	0.6402	0.5477	0.5991	0.6614	0.4907	1.000	1.000	1.000	0.711
40	p	0.2254	0.2208	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.037
	q	0.7746	0.7792	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.963
41	p	0.2472	1.000	0.4094	0.5451	0.3727	0.5101	0.3595	0.5918	0.3617	0.000	0.1876	0.3092	0.408
	q	0.7528	0.000	0.5906	0.4549	0.6273	0.4899	0.6405	0.4082	0.6383	1.000	0.8124	0.6908	0.592
42	p	0.3675	0.6727	0.2529	0.4915	0.5384	0.5757	0.3020	0.4796	0.3474	0.1025	0.2120	0.3258	0.389
	q	0.6325	0.3273	0.7471	0.5085	0.4616	0.4243	0.6980	0.5204	0.6526	0.8975	0.7874	0.6742	0.611
43	p	0.1835	0.4655	0.2224	0.4748	0.3995	0.6	0.4009	0.3230	0.1611	0.2362	0.1282	0.4161	0.334
	q	0.8165	0.5345	0.7776	0.5252	0.6005	0.4	0.5991	0.6770	0.8389	0.7638	0.8718	0.5839	0.666
44	p	0.3169	0.3453	0.1788	0.2013	0.1129	0.000	0.000	0.000	0.000	0.6273	0.1398	0.000	0.160
	q	0.6831	0.6547	0.8212	0.7987	0.8871	1.000	1.000	1.000	1.000	0.3727	0.8602	1.000	0.840
45	p	0.000	0.000	0.000	0.0903	0.1802	0.1633	0.0942	0.0986	0.000	0.5286	0.0726	0.0830	0.109
	q	1.000	1.000	1.000	0.9097	0.8198	0.8367	0.9058	0.9014	1.000	0.4714	0.9274	0.9170	0.891
46	p	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	q	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
47	p	0.000	0.000	0.000	0.3703	0.0856	0.1876	0.1377	0.2362	0.2302	1.000	0.1282	0.0955	0.206
	q	1.000	1.000	1.000	0.6297	0.9144	0.8124	0.8623	0.7638	0.7638	0.000	0.8718	0.9045	0.794

Apéndice 4

Estructuración genética en *Agave striata* en términos de θ y de la prueba de diferenciación de Raymond y Rousset (1995). En negritas $p < 0.05$

loci	θ	R&R
1	0.1875	0.0000
2	0.1920	0.0000
3	0.1933	0.0000
4	0.1943	0.0000
5	0.1921	1.0000
6	0.1856	0.0000
7	0.1936	0.0000
8	0.1921	1.0000
9	0.1981	0.0112
10	0.1857	0.0000
11	0.1925	0.0000
12	0.1921	1.0000
13	0.1861	0.0000
14	0.1855	0.0000
15	0.1930	0.0000
16	0.1906	0.0000
17	0.1921	0.0000
18	0.1924	0.0000
19	0.1930	0.0000
20	0.1951	0.0000
21	0.1932	0.0000
22	0.1941	0.0000
23	0.1931	0.0000
24	0.1938	0.0000
25	0.1921	1.0000
26	0.1932	0.0000
27	0.1977	0.0023
28	0.1923	0.0000
29	0.1921	1.0000
30	0.1921	1.0000
31	0.1882	0.0000
32	0.1843	0.0000
33	0.1949	0.0000
34	0.1952	0.0000
35	0.1947	0.0000
36	0.1887	0.0000
37	0.1902	0.0000
38	0.1967	0.0000
39	0.1949	0.0000
40	0.1921	0.0000
41	0.1934	0.0000
42	0.1965	0.0000
43	0.1952	0.0000
44	0.1919	0.0000
45	0.1930	0.0000
46	0.1921	1.0000
47	0.1879	0.0000

Apéndice 5

Valores de heterocigosis esperada por locus en *Agave striata*

Loci/Pobl.	F3	F4	F5	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	TOTAL
1	0.000	0.000	0.000	0.3821	0.4305	0.2733	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.090
2	0.000	0.000	0.000	0.2393	0.4370	0.3348	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.084
3	0.000	0.000	0.000	0.1949	0.2286	0.2064	0.2997	0.000	0.000	0.3609	0.000	0.2511	0.128
4	0.000	0.000	0.000	0.3589	0.2825	0.3492	0.2587	0.2143	0.2552	0.000	0.2405	0.1727	0.178
5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
6	0.000	0.4679	0.000	0.2393	0.3561	0.4466	0.4940	0.4017	0.2997	0.4944	0.4954	0.000	0.308
7	0.2733	0.000	0.3622	0.2677	0.1417	0.3348	0.000	0.2495	0.000	0.000	0.000	0.3394	0.164
8	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
9	0.3939	0.4809	0.4994	0.3707	0.4740	0.4256	0.4880	0.4142	0.4961	0.4796	0.4800	0.3862	0.449
10	0.000	0.000	0.000	0.2816	0.2560	0.4561	0.4880	0.4930	0.4735	0.4444	0.3632	0.4658	0.310
11	0.000	0.000	0.000	0.4999	0.3445	0.4365	0.2997	0.4142	0.3412	0.000	0.000	0.2321	0.214
12	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
13	0.000	0.4976	0.4906	0.000	0.2825	0.000	0.3907	0.2143	0.2552	0.1839	0.000	0.000	0.193
14	0.3492	0.4679	0.000	0.000	0.4984	0.4944	0.000	0.2470	0.000	0.000	0.000	0.000	0.171
15	0.4649	0.3441	0.4668	0.2952	0.2826	0.3048	0.000	0.000	0.2083	0.000	0.000	0.000	0.197
16	0.4994	0.4142	0.000	0.4534	0.000	0.4885	0.000	0.2470	0.4735	0.000	0.4944	0.4658	0.295
17	0.4954	0.4342	0.000	0.4987	0.2146	0.3632	0.4487	0.4992	0.4998	0.4142	0.4800	0.3862	0.395
18	0.000	0.000	0.000	0.4783	0.1714	0.2064	0.2587	0.2321	0.000	0.000	0.1530	0.000	0.125
19	0.000	0.000	0.000	0.4241	0.3674	0.3767	0.4066	0.2321	0.000	0.000	0.4256	0.000	0.186
20	0.4649	0.4522	0.3459	0.4669	0.4620	0.4528	0.4940	0.4992	0.4694	0.4694	0.4944	0.1522	0.435
21	0.000	0.000	0.000	0.4241	0.3445	0.3200	0.2795	0.2143	0.000	0.000	0.1889	0.000	0.148
22	0.2733	0.4142	0.2370	0.4589	0.4607	0.000	0.2375	0.2321	0.2778	0.2778	0.4800	0.000	0.279
23	0.3492	0.3090	0.000	0.2677	0.000	0.4022	0.2795	0.4142	0.000	0.000	0.000	0.000	0.168
24	0.2460	0.000	0.3116	0.000	0.000	0.3632	0.2375	0.2833	0.3796	0.3796	0.000	0.2126	0.201

25	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
26	0.2460	0.000	0.000	0.000	0.3445	0.2571	0.2127	0.2143	0.000	0.000	0.000	0.000	0.106
27	0.4994	0.4880	0.4758	0.4142	0.4094	0.4142	0.4711	0.4832	0.4796	0.4796	0.4983	0.4610	0.464
28	0.2733	0.3441	0.2370	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.071
29	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
30	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
31	0.000	0.000	0.000	0.3589	0.4480	0.4862	0.4605	0.4721	0.4961	0.4930	0.4930	0.000	0.309
32	0.000	0.000	0.000	0.4241	0.4533	0.4142	0.4605	0.4721	0.2703	0.4107	0.4107	0.000	0.276
33	0.4832	0.4832	0.4964	0.4589	0.4798	0.4256	0.4711	0.4576	0.4608	0.3603	0.3603	0.4142	0.446
34	0.4944	0.4944	0.4814	0.2816	0.4676	0.3632	0.4216	0.4666	0.3672	0.4444	0.4444	0.4892	0.435
35	0.4636	0.4636	0.4239	0.3707	0.4370	0.3897	0.3564	0.4373	0.2242	0.4985	0.4985	0.3227	0.407
36	0.3250	0.3250	0.3459	0.3707	0.4620	0.4528	0.4992	0.4577	0.1921	0.2083	0.2083	0.000	0.321
37	0.3492	0.3492	0.4073	0.4998	0.4880	0.4325	0.4999	0.4571	0.3277	0.2552	0.2552	0.000	0.360
38	0.4777	0.4777	0.4758	0.4935	0.4731	0.4057	0.4354	0.4880	0.4764	0.2778	0.2778	0.4918	0.438
39	0.3939	0.3939	0.4209	0.4966	0.4607	0.4954	0.4803	0.4479	0.4998	0.000	0.000	0.4704	0.380
40	0.3492	0.3492	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.058
41	0.3722	0.3722	0.4836	0.4959	0.4676	0.4998	0.4605	0.4832	0.4618	0.1839	0.1839	0.4272	0.408
42	0.4649	0.4649	0.3779	0.4999	0.4971	0.4885	0.4216	0.4992	0.4534	0.3609	0.3609	0.4393	0.444
43	0.2997	0.2997	0.3459	0.4987	0.4998	0.4800	0.4803	0.4373	0.2703	0.4676	0.4676	0.4859	0.426
44	0.4329	0.4329	0.2936	0.3215	0.2004	0.000	0.000	0.000	0.000	0.4984	0.4984	0.000	0.223
45	0.000	0.000	0.000	0.1643	0.2954	0.2733	0.1706	0.1778	0.000	0.4944	0.4944	0.1522	0.185
46	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
47	0.000	0.000	0.000	0.4663	0.1566	0.3048	0.2375	0.3609	0.3544	0.000	0.000	0.1727	0.171
Promedio	0.2071	0.2161	0.1698	0.2812	0.2778	0.2898	0.2533	0.2620	0.2231	0.1902	0.2033	0.1573	0.2793
DE	0.197	0.186	0.108	0.181	0.186	0.183	0.197	0.184	0.190	0.136	0.185	0.105	0.195

9. Literatura citada

- Aguirre, 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, D.F., 73 p.
- 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.
- Bogler, D.J. y B. B. Simpson. 1996. Phylogeny of Agavaceae based on ITS rDNA sequence variation. *American Journal of Botany* 83:1225-1235.
- Carrillo, P., R. A. Vega, y R. R. Delgadillo, 2003. *Agave rzedowskiana*, a new species in subgenus *Littaea* (Agavaceae) from western Mexico. *Brittonia* 55(3) 240-244.
- Cockerham, C. C., 1969. Variance of gene frequencies. *Evolution* 23: 72-83.
- Cockerham, C. C. y B. S. Weir, 1993. Estimation of gene flow from F-statistics. *Evolution* 47: 855-863.
- Colín, R., 2006. Análisis de la diversidad genética y estructura poblacional de *Agave xylonacantha* (AGAVACEAE) utilizando Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) como marcador molecular. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, D.F., 61 p.
- Crow, J. F. y K. Aoki, 1984. Group selection for a polygenic behavioral trait: Estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA 81: 6073-6077.

Doyle, J. J. y J. L. Doyle, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11-15.

Eguiarte, L. E., 1990. Genética de poblaciones de *Astrocaryum mexicanum* Liebm. En Los Tuxtlas, Ver. Tesis doctoral. Centro de Ecología. México, D. F., UNAM.

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.

Excoffier L., P., Smouse and J. Quattro, 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 Balding *et al.*, (eds.) Handbook of Statistical Genetics, USA, John Wiley y Sons, Ltd.

García-Mendoza, A. y R. Galván, 1995. Riqueza de la familia Agavaceae y Nolinaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 56:7-24.

Gentry, H. S., 1982. Agaves of continental North American. Tucson, Arizona. University of Arizona. Press, EUA.

González, A. 2004. Biología Reproductiva y Genética de Poblaciones del *Agave garciae-mendozae*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. 88pp.

Hamrick, J.L. y J.W. Godt, 1989. Alloenzyme diversity in plant species. En: H. D. Brown, M. T. Clegg, A. L. Kaher y B. S. Weir (eds.) Plant population

genetics, breeding, and genetic resources. Sinauer Ass. Sunderland, M.A., pp:43-63.

Hamrick, J.L., J.W. Godt, S. Sherman-Broyles, 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* 6:95-124.

Hamrick, J.L. y J.W. Godt, 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 351: 1291-1298.

Hartl, D. L. y A. G. Clark, 1997. Principles of Population Genetics. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, M.A.

Hedrick, P. W, 2000. Genetics of Populations. USA, Jones and Bartlett Publishers. Sudbury, Massachusetts.

Litt, M. y J. A. Luty, 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Genetics*. 44:397-401.

Lynch, M. y B. G. Milligan, 1994. Analysis of population genetic structure with RADP 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, M. 1979. Catálogo de nombres vulgares y científicos de Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica México, D.F.

- Martínez-Palacios, A., L. E. Eguiarte y G. Furnier, 1999. Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. *American Journal of Botany* 86 (6): 1093-1098.
- Massey, L. K. y J. L. Hamrick, 1998. Genetic diversity and Population structure of *Yucca filamentosa* (Agavaceae). *American Journal of Botany* 85(3): 340-345.
- Miller, M., 1997. Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA) 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author. Flagstaff, Arizona, USA.
- Navarro, A., R. González, 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(949): 283-292.
- Nei, M., 1978. The theory of genetic distance and evolution of humane races. *Japanese Journal of Human Genetics* 23:341-369.
- Nybom, H., 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13: 1143-1155.
- Nybom, H. y I. Bartish, 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates contained with RAPD marker in plants. *Perspectives in Plant Ecology. Evolution and Systematics* 3(2): 93-114.

- Otero, A. A., M. De la Cruz y K. Oyama, 1999. El uso de los RAPD's como marcadores moleculares en plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 85-117.
- Parker, P. G., A. A. Snow, G. Booton, M. Schung y P. Fuerst, 1998. What molecules can tell us about populations: Choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79(2): 361-382.
- Pradeep, R.M., Sarla, N y E. A. Siddiq, 2002. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.
- Raymond M. L. y F. Rousset, 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.
- Rocha, M., 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., 2006. Ecología evolutiva comparada de 5 especies de *Agave*. Tesis doctoral. Instituto de Ecología. México, D. F., UNAM.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich, 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Schneider S., D. Roessli, L. Excoffier, 2000. Arlequin ver. 2.000. A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

Schlötterer, C., 2004. The evolution of molecular markers-just a matter of fashion?
Nature Reviews Genetics 5:63-69.

Silva, A. y L. E. Eguiarte, 2003a. Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. I. Floral characteristics, visitors, and fecundity. *American Journal of Botany* 90(3): 377-387.

Silva, A. y L. E. Eguiarte, 2003b. 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(5): 700-706.

Slatkin, M., 1987. Gene flow and the geographic structure. En *Ecological Genetics*, L. A. Real (ed.). New Jersey, Princeton University Press: 4-17.

Soltis D. E. and P. S. Soltis, 1989. Isozymes in plant biology. Dioscorides Press, Portland, Or.

Vos, P., J. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van der 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.

Weir, S., 1996. *Genetic Data Analysis II*. USA, Sinauer Associates, Sunderland, Mass.

Weir, B. S. and C. Cockerham, 1984. Estimating F – Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

- Williams, J. G. K.; A. R., Kubelik, K. J., Livak, J. A. Rafalski, S. V., Tingey, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6231-6235.
- Wolfe, A. D. y A. Liston, 1998. Contributions of PCR-Based methods to Plant Systematics and Evolutionary Biology. En: Soltis, Soltis y Doyle (eds.) *Molecular Systematics of Plants II*, 45-82, Kluwer academic Publishers, USA.
- Wright, S., 1921. Systems of mating. *Genetics* 6: 111-178.
- Wright, S., 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenetics* 15: 323-354.
- Zamudio, S. R., 1995. Una nueva especie de *Agave* del subgénero *Littaea* (Agavaceae) de la Sierra Madre Oriental, México. *Acta Botánica Mexicana* 32: 47-52.
- Zietkiewick, E., A. Rafalski and D. Labuda, 1994. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored polymerase chain reactions amplification. *Genomics* 20: 176-183.