

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---



**FACULTAD DE CIENCIAS**

Diversidad clonal y estructura genética espacial en escala fina de  
*Agave striata* Zucc.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

ROXANA CELESTE RIVES GUENDULAIN

TUTOR: M en C. ENRIQUE SCHEINVAR GOTTDIENER



2009



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.

---

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de  
Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología de la  
Universidad Nacional Autónoma de México

---

Gracias a los proyectos

Proyecto Conacyt SEP-2004-C01-46475-Q (Conacyt -Fondo sectorial de  
investigación para la educación) “Diversificación de angiospermas de  
México: relojes moleculares, tasas de especiación, biomecánica y espacios  
ecológicos”

“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 C01- 0246”

Papiit IN224309-3 “Genética de poblaciones molecular y filogeografía de  
plantas mexicanas”

Un especial agradecimiento al Dr. Luis Eguiarte, la Dra. Valeria Souza y  
técnicos del laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del  
Instituto de Ecología Erika Aguirre Planter, Laura Espinosa Asuar, Manuel  
Rosas y Silvia. Así como a las personas que colaboraron en la colecta del  
material: Dr. René Cerritos, M en C. Enrique Scheinvar, Biol. Rodrigo  
Gonzáles y Biol. Alejandra Rodríguez.

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

<p><b>1. Datos del alumno</b> Rives Guendulain Roxana Celeste Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 404054825</p>
<p><b>2. Datos del tutor</b> M. en C. Enrique Scheinvar Gottdiener</p>
<p><b>3. Datos del sinodal 1</b> Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns</p>
<p><b>4. Datos del sinodal 2</b> Dra. María del Carmen Mandujano Sánchez</p>
<p><b>5. Datos del sinodal 3</b> Dr. Francisco Elizandro Molina Freaner</p>
<p><b>6. Datos del sinodal 4</b> Dra. Erika Aguirre Planter</p>
<p><b>7. Datos del trabajo escrito</b> Diversidad clonal y estructura genética espacial en escala fina de <i>Agave striata</i> Zucc. 89 p. 2009</p>

## AGRADECIMIENTOS

En este proceso han participado muchas personas de distinta manera y no puedo más que agradecerles infinitamente:

Agradezco con toda mi admiración al Dr. Luis Eguiarte por observaciones al trabajo y a la Dra. Valeria Souza, ambos por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y trascender en mi formación científica. Muchas gracias por su apoyo moral, físico y fiscal.

A mi tutor Enrique: por el apoyo técnico y mental que se requirió terminar con este “momento tesista” en especial por ayudarme con los programas computacionales y algunas imágenes, y más por la tenacidad para incitarme a desarrollar las ideas de esta tesis y no conformarte con la explicación más simple. ¡Gracias por tu tiempo y amistad!

A mis sinodales: Dr. Luis, Dra. Erika, Dr. Francisco Molina, Dr. Mandujano y Enrique.

A todos los miembros del laboratorio “más hacinado” del Instituto de Ecología, por las buenas pláticas, apoyo y amistad: Jaime, Alex y Richard (por los buenos consejos técnicos); René, Ale y Rodrigo (por acompañarme al campo); Andrea, Esmeralda, Yis, Rober, Marco, Eria, Morena, Germán, Alicia, Ana, Santiago, Manuel, Julia, Nuria y las chicas que hacen que el Lab. funcione perfecto Doña Chivis, Erika y Laura.

A la gente divertida que conocí en “El movimiento” Ale C. y Carlos (gracias por el soporte técnico computacional), Chivis, Laura, Lorena, Geo, Toy, Cris, Omar y todos los “critters” que están en esto ¡gracias por todos los momentos divertidos! ¡Ah, y a mi  $P(4,1)$  donde  $f(r) = r^2 \rightarrow \infty$  por cambiar mi perspectiva!).

A mi Papi y el resto de mis tíos y tías que han sido siempre un gran ejemplo, en especial a Gina, Liliana, Malena, Ana, Lupita y Temo, ¡Ah! y también a Zora (lo prometido es deuda).

A “las niñas” (Giovis, Dayis, Pris, Montse, Dani, Carmen, Abi, Bella, Eve, Ana, Brenda y en especial a Karolie por ser mi compañera de “parranda” y todas esas travesuras de juventud). A Jesús y Daniela.

A los amigos que reaparecieron:(Rodri, Gabi, Cintia, Aurora, Minerva, Adriana, Alejandra y demás jóvenes del bachillerato, gracias por crecer conmigo). A los que surgieron en la “fac” Karla, Larisa, Dianis, Tanni (por mi primer empleo), Juan, “La Guzmán”, Carlitos, Yoli y otros que quizá olvido mencionar (¡Qué buenos momentos los de las prácticas de campo!). A Jani, Migue y Pili por ser instrumentos 3:16.

Román y Paola, gracias por ser jóvenes 180° e invitarme a serlo. Alex, Ale, Esthelita y Mine gracias por su gran amistad y todas las aventuras juntos.

A mis hermanos Mari (“*soulmates never die*”, gracias por todos estos años de amistad), Vely (con Iván incluido, gracias por ser mi patrocinadora oficial), Kumar (eres mi verdadero hermano mayor), Zerldachis (por tu buen humor), César y Oscar.

A mi abuelita Ana y mi abuelito Lalo por el asilo y los buenos momentos.

A mi propio “Capitán Spock”, ¡Gracias por ser un papá super correcto!, por tu paciencia, las noches de larga plática y tu entrega. Y a quien ya no pudo estar, por los buenos recuerdos que dejó.

Y principalmente a Quien Es y mi Rosi por la eterna inspiración y mostrarme el camino.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>Variación Genética Y Estructuración Poblacional</b> .....	3
Evolución y Genética .....	3
Inter Simple Sequence Repeats como Marcadores Moleculares .....	4
La ley de Hardy-Weinberg .....	6
Variación genética .....	7
Estructura Poblacional .....	7
Análisis de Autocorrelación espacial .....	9
Estructura genética y los análisis de autocorrelación espacial .....	11
<b>Clonalidad</b> .....	13
<b>El Género <i>Agave</i> y <i>Agave striata</i></b> .....	16
<b><i>Agave striata</i> Zucc.</b> .....	18
Clasificación .....	18
Descripción .....	18
Distribución .....	20
Historia Natural y Ecología .....	21
Antecedentes .....	21
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	23
<b>OBJETIVOS</b> .....	24
<b>Objetivo General</b> .....	24
<b>Objetivos Particulares</b> .....	24
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	25
<b>Área de estudio</b> .....	25
<b>Colecta de material biológico</b> .....	26
<b>Extracción de ADN</b> .....	26
<b>Amplificación de ADN</b> .....	27
<b>Análisis de datos</b> .....	28

Caracterización de Genotipos Multi Locus (GML) .....	28
Diversidad clonal .....	30
Variación genética .....	30
Estructura poblacional .....	30
Análisis de autocorrelación espacial .....	31
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
<b>Caracterización de Genotipos Multilocus</b> .....	<b>32</b>
<b>Diversidad clonal</b> .....	<b>41</b>
<b>Variación Genética</b> .....	<b>41</b>
<b>Estructura poblacional</b> .....	<b>42</b>
<b>Análisis de autocorrelación espacial</b> .....	<b>43</b>
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>46</b>
<b>ISSR como marcador para identificar GML</b> .....	<b>46</b>
<b>Caracterización de GML</b> .....	<b>46</b>
<b>Diversidad Clonal</b> .....	<b>47</b>
<b>Variación genética</b> .....	<b>53</b>
<b>Estructura poblacional</b> .....	<b>53</b>
<b>Autocorrelación espacial</b> .....	<b>55</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>57</b>
<b>APÉNDICES</b> .....	<b>58</b>
<b>Apéndice I</b> Poblaciones de los estudios de Rocha (2006) y Trejo (2006) .....	<b>58</b>
<b>Apéndice II</b> Tamaño de los macollos e individuos que contienen .....	<b>58</b>
<b>Apéndice III</b> Protocolo de extracción de ADN .....	<b>60</b>
<b>Apéndice IV</b> Fórmulas .....	<b>61</b>
Probabilidad de identidad mediante eventos reproductivos independientes .....	<b>61</b>
Proporción de genotipos distinguibles .....	<b>61</b>
Índice de diversidad de Simpson ( <i>D</i> ) .....	<b>61</b>
Linajes clonales aparentes .....	<b>62</b>
Equitatividad genotípica .....	<b>62</b>
Análisis de Diversidad Genotípica con las correcciones de Lynch-Milligan (1994) .....	<b>62</b>
Análisis de Autocorrelación espacial .....	<b>63</b>

Regla de Sturges .....	64
Distribución de Pareto .....	64
<b>Apéndice V</b> Valores de $P_{SEX}$ y frecuencias alélicas con el método de “round-robin” ..	65
<b>Apéndice VI</b> Frecuencias alélicas por loci con la corrección de Lynch-Milligan .....	68
<b>Apéndice VII</b> Valores de significancia $R$ y $R$ (Raymond y Rousset, 1995) .....	69
<b>Apéndice VIII</b> Análisis de Autocorrelación espacial Global .....	70
<b>Apéndice IX</b> Número de bandas compartidas entre GML.....	74
<b>Apéndice X</b> Variación genética en el género <i>Agave</i> .....	78
<b>LITERATURA CONSULTADA</b> .....	79

## RESUMEN

En este trabajo se analizó a nivel de microescala la variación y la estructura genética espacial de *Agave striata* con ISSRs. Se utilizaron 2 marcadores que produjeron 30 loci y 109 genotipos multilocus (GML) de las 208 muestras analizadas obtenidas de cuadrantes de dos poblaciones de la Barranca de Metztitlán, Hgo. de 12 m x 15 m (Venados; 98 individuos analizados; 0.6individuos/m<sup>2</sup>) y 15 m x 20 m (San Bernardo; 128 individuos analizados 0.6individuos/m<sup>2</sup>). Se encontraron 50 genotipos en Venados ( $G/N=0.5$ ; Diversidad de Simpson  $D=0.97$ ) y 58 en San Bernardo ( $G/N=0.45$ ;  $D=0.98$ ), siendo la mayoría de los genotipos únicos y encontrando clonas con un máximo de 8 individuos. La variación genética encontrada fue alta,  $P=0.93$  y  $H_E=0.4$ , sugiriendo que la propagación clonal no es el principal mecanismo de regeneración. El análisis de autocorrelación espacial reveló una estructura espacial genética que puede ser resultado de una baja dispersión de semillas, pues sólo se encontró autocorrelación positiva en los primeros 3 m de distancia, mostrando un patrón de agrupación espacial de los individuos del mismo genet. El análisis de varianza molecular (AMOVA) revela que la mayor parte de la variación (60.7%) se encuentra dentro de los macollos. Los patrones de alta variación genética y la estructura poblacional observados son similares a otras plantas que pueden reproducirse de manera sexual y clonal.

## ABSTRACT

Genetic variation and genetic spatial structure of *Agave striata* was analyzed in a micro-scale with ISSR's. The two primers used produced 30 polymorphic loci and 109 multilocus genotypes (MLG) among 208 individuals from quadrants of two populations located in Metztitlán, Hgo., México, of 130m<sup>2</sup> (Venados; 98 individuals analyzed; 0.6individuals/m<sup>2</sup>) and 300m<sup>2</sup> (San Bernardo; 128 individuals; 0.6individuals/m<sup>2</sup>). We found 50 MLG in Venados ( $G/N = 0.5$ ;  $D=0.97$ ) and 58 in San Bernardo ( $G/N = 0.45$ ;  $D=0.98$ ), most of the genotypes were unique and the clones found were composed by 8 individuals at the most. The high levels of genetic variation found ( $P = 0.93$  y  $H_E = 0.4$ ) suggest that clonality is not the main reproduction process. The spatial autocorrelation analysis revealed that the genetic structure might be a consequence of low seed dispersal, as it was only positive within the first 3m, proving the strength of the genetic relationship of plant clusters. An AMOVA revealed that most of the variation is due to genetic differences within clusters. The observed patterns of high genetic variation and spatial structure are similar to other plants that are capable of sexual and clonal reproduction.

# INTRODUCCIÓN

## Variación Genética y Estructuración Poblacional

### Evolución y Genética

La distribución y cuantificación de la diversidad de los seres vivos ha sido de gran interés en biología. Discutir sobre diversidad biológica hace pensar inevitablemente en la teoría evolutiva, pues ésta explica las causas de diversificación de las especies. La genética de poblaciones estudia los mecanismos que determinan la similitud entre antecesores y sus descendientes, relacionándose íntimamente con la explicación de los mecanismos evolutivos que han generado la biodiversidad que se observa. Es por esto que los estudios evolutivos se han desarrollado en gran medida con ayuda de la genética de poblaciones (Dobzhansky, 1937).

Comprender las fuerzas evolutivas como la selección natural, flujo genético, deriva génica ó mutación es posible a través del estudio de la cantidad de variación genética que se presenta en las poblaciones, ya que tales fenómenos la afectan directamente (Hedrick, 2005). La genética de poblaciones se encarga de estudiar los procesos y mecanismos que determinan la variación genética en las poblaciones naturales. Esta variación puede ser cuantificada en función de la estructura genética (Hartl y Clark, 1997).

La estructura genética es la diferencia en las frecuencias génicas entre distintas poblaciones, lo que produce patrones geográficos de variación genética. Esta diferenciación surge del balance entre las fuerzas que producen diferenciación genética -que favorecen la adaptación local- y las que promueven homogeneidad genética entre las poblaciones (Slatkin, 1987).

Entender la estructura genética espacial dentro de las poblaciones de especies de las que no se tiene mucho conocimiento en cuanto a patrones de dispersión de semillas y polinización, favorece la comprensión de su ecología y provee información valiosa para su conservación

y cultivo (Vaughan *et al.*, 2007). Además, la estructura genética espacial permite comprender el papel de la clonalidad en las poblaciones (van Loo *et al.*, 2007; Suvanto *et al.*, 2005).

### Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) como Marcadores Moleculares

La evaluación de fenotipos permite elucidar el efecto de la acción de fuerzas evolutivas, sin embargo de esta manera no se logra capturar toda la riqueza genética de los seres vivos, pues hay información genética que no se refleja en el fenotipo. Por su parte, los datos moleculares proveen información genética que puede asociarse a características morfológicas o fisiológicas, o simplemente permiten cuantificar variación genética no codificante. Así, los datos moleculares permiten comparar directamente los niveles de diferenciación genética entre taxa (Awise, 2004).

Los marcadores moleculares constituyen métodos de análisis basados en la detección de polimorfismos de proteínas y ADN. Éstos se han utilizado para resolver desde problemas ecológicos hasta de medicina forense (Frankham *et al.*, 2002). Se han diseñado diversos marcadores; su elección depende de la pregunta que se desea resolver, la cantidad de polimorfismo encontrado con cada marcador, las capacidades analíticas y estadísticas de las que se dispone y el tiempo y costo del material requerido (Parker *et al.*, 1998).

Los primeros marcadores moleculares desarrollados para obtener estimaciones adecuadas de variación genética fueron las isoenzimas (Lewontin y Hubby, 1966). Éstas utilizan electroforesis para diferenciar proteínas mediante diferencias en sus cargas eléctricas y/o tamaño. Otros marcadores se basan en la técnica de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*), que permite amplificar cadenas de ADN que inician con una secuencia conocida. Algunas de esas técnicas son: RAPD (*Randomly amplified polymorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), AFLP (*Amplified fragment length polymorphism*), SSR (*Short Sequence Repeat*), ISSR (Parker *et al.*, 1998).

Los ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) son segmentos de ADN que se encuentran entre dos secuencias de repeticiones simples (SSR -*Simple Sequence Repeats* ó microsatélites-). Los primers de ISSR son motivos de 16 a 25 pb de repeticiones de di o trinucleótidos con secuencias de anclaje 5' ó 3' de uno o tres nucleótidos (Figura 1).

En la técnica de amplificación con PCR, el iniciador se alinea en dos sitios orientados en cadenas opuestas de ADN, amplificando la región entre ambos sitios de anclaje. Si hay cambios en la secuencia de los sitios de unión, un sitio de unión perdido o si han sucedido rearrreglos cromosómicos, la región no se amplificará, permitiendo detectar la variación que existe en una secuencia (Figura 1) (Wolfe *et al.*, 1998).

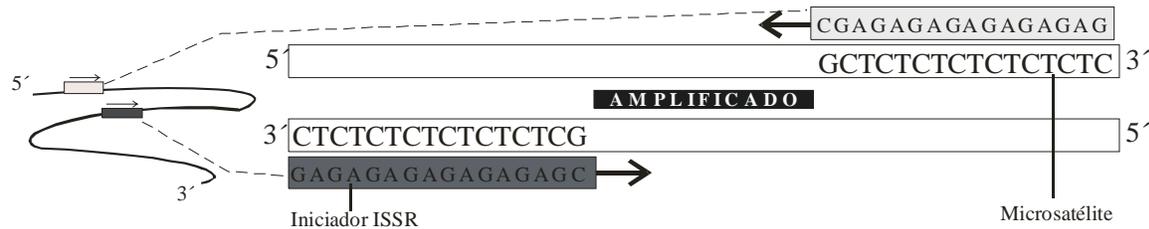


Figura 1. Amplificación con ISSR. Los ISSR (en colores gris) se unen a la secuencia de microsatélite en ambas cadenas de ADN. Durante la PCR, se extiende la región que se encuentra entre los microsatélites de ambas cadenas. Elaborado a partir de Zietkiewics *et al.*, (1994).

Además de permitir calcular la variación genética entre poblaciones, estos marcadores han mostrado tener gran poder de discriminación para identificar genets de ramets clonales dentro de poblaciones (Zietkiewics *et al.*, 1994; Chung *et al.*, 2006; Zong *et al.*, 2008). Entre las ventajas de estos marcadores se puede mencionar que son altamente reproducibles, fáciles de montar e hipervariables (debido a su longitud), además las bandas que se observan son homólogas (Zietkiewics *et al.*, 1994). Dentro de las desventajas de estos marcadores podemos mencionar que segregan de manera dominante, siendo imposible distinguir directamente al heterócigo del homócigo dominante a menos que se suponga equilibrio de Hardy-Weinberg (Wolfe *et al.*, 1998; Pradeep *et al.*, 2002).

## La ley de Hardy-Weinberg (H-W)

Los fundamentos de la genética de poblaciones se expresan en la ley de Hardy-Weinberg (1908) que establece que “después de una generación de apareamiento al azar, las frecuencias genotípicas de un locus pueden representarse por una función binomial o multinomial de las frecuencias alélicas” (Hedrick, 2005).

Este principio permite simplificar la descripción de la genética de las poblaciones mediante las frecuencias alélicas de ciertos loci. Esta ley describe lo que le ocurre a los alelos y genotipos en una población ideal que sea infinitamente grande, que tenga apareamiento al azar y donde no hay entrada ni salida de genes y todos los alelos tienen la misma probabilidad de pasar a la siguiente generación, es decir una población en la que no actúan las fuerzas evolutivas (mutación, selección natural, deriva génica y flujo genético). Bajo estas condiciones, el modelo establece que:

- Las frecuencias genotípicas no cambiarán a través de las generaciones.
- En una población después de una generación con apareamiento al azar las frecuencias de los genotipos  $A_1A_1$ ;  $A_1A_2$ ;  $A_2A_2$  pueden calcularse mediante:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

si consideramos que  $A_1$  y  $A_2$  son los dos alelos de un locus  $A$  (que en frecuencia son  $p$  y  $q$ , respectivamente).

En las poblaciones naturales las fuerzas evolutivas (selección natural o flujo génico) modifican las proporciones de Hardy-Weinberg a través del tiempo. Es por esto que este principio constituye un modelo nulo que nos permite inferir las fuerzas que actúan en una población (Hedrick, 2005).

## Variación genética

La variación genética debe cuantificarse de manera estandarizada para poder comparar poblaciones y especies. La *heterocigosis esperada* ( $H_E$ ) es la medida de variación genética más utilizada, ya que las especies diploides sólo pueden ser heterocígas u homocígas en un locus (Hedrick, 2005). Para el cálculo de este valor se supone que las poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, mediante la siguiente fórmula:

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

donde  $n$  es el número de alelos y  $p$  es la frecuencia alélica (Hedrick, 2005).

Los marcadores dominantes, como los ISSR, no proveen la información genotípica completa, ya que no permiten distinguir los individuos homocígos dominantes de los heterocígos, imposibilitando el cálculo directo de las frecuencias alélicas. Lynch y Milligan (1994) presentaron una serie de estimadores que consideran la desviación que supone la dominancia del marcador y proveen valores veraces de las frecuencias génicas y genotípicas.

## Estructura Poblacional

La estructura poblacional se presenta cuando hay diferencias en la distribución de la variación genética entre las partes de una población. Esto puede ocurrir debido a factores geográficos, ecológicos o conductuales que provoquen aislamiento entre subpoblaciones y lleven a éstas a dinámicas propias (Hedrick, 2005). En poblaciones vegetales, los eventos relacionados con el flujo génico y el tipo de apareamiento pueden tener un papel fundamental en la estructuración poblacional (Eguiarte, 1990).

La estructura poblacional de las especies se ha estudiado mediante los valores de frecuencias alélicas y su desviación de los valores esperados bajo equilibrio de H-W (Excoffier *et al.*, 1992), pues en una población panmíctica, las frecuencias se mantendrían

constantes de una generación a otra como lo predice la ley de H-W, pero cuando hay estructuración los alelos se fijan de manera asimétrica.

Wright (1951) introdujo los estadísticos  $F$  (índice de fijación) para analizar las frecuencias génicas entre subpoblaciones, (Nei, 1973; 1977; Wright, 1965). Los estadísticos de Wright son:

$F_{ST}$ , que mide la diferenciación genética entre las subpoblaciones mediante la correlación entre los gametos de los individuos dentro de su subpoblación con respecto a los gametos de toda la población. Este parámetro se acerca a 1 cuando las subpoblaciones son muy distintas entre sí y no comparten ningún alelo. Se define mediante la siguiente ecuación:

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

donde  $H_T$  es la heterocigosis esperada a nivel global y  $H_S$  es la heterocigosis promedio esperada a nivel subpoblacional. Si no hay subdivisión poblacional  $F_{ST}$  tenderá a cero, de lo contrario, si hay subpoblaciones muy distintas  $F_{ST}$  tenderá a 1.

Otro parámetro que detecta el efecto de la subdivisión es el índice de fijación  $F_{IS}$  que mide la reducción de la heterocigosis de un individuo debido al apareamiento no aleatorio dentro de su subpoblación (Hartl y Clark, 1997), mediante la fórmula:

$$F_{IS} = \frac{H_S - H_0}{H_S}$$

donde  $H_0$  es la heterocigosis promedio observada a nivel subpoblacional. Este coeficiente puede tomar valores negativos indicando un exceso de heterocigos en la subpoblación y positivos indicando el exceso de homocigos en la misma. Cuando el valor de  $F_{IS}$  no difiere significativamente de cero, la subpoblación presenta apareamiento al azar.

El estadístico  $F_{IT}$  o *coeficiente de endogamia total de un individuo* mide la reducción en la heterocigosis de un individuo con respecto a la población total (Hartl y Clark, 1997) y se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_0}{H_T}$$

Los estadísticos de Wright se asocian con otros parámetros de la siguiente manera:

\*  $F \approx F_{IT}$ ,  $\theta \approx F_{ST}$  y  $f \approx F_{IS}$  donde  $F$  es la correlación entre genes en los individuos respecto al total,  $\theta$  (coeficiente de ancestría) es la probabilidad de que dos genes de individuos tomados al azar sean idénticos por descendencia y  $f$  es la correlación de genes en individuos dentro de subpoblaciones respecto al total (Weir y Cockerham, 1984; Kitada *et al.*, 2007).

### Análisis de Autocorrelación espacial

Los análisis de autocorrelación espacial prueban la dependencia de una variable en una localidad respecto a otras localidades. En caso de encontrar dependencia, se dirá que la variable exhibe autocorrelación espacial, la cual mide el nivel de interdependencia de variables, si son positivas o negativas y su intensidad. La autocorrelación puede ser positiva, si los valores relacionados muestran un patrón de asociación geográfico o negativa si no hay dicho patrón (Sokal y Oden, 1978).

Muchos fenómenos ecológicos, así como genéticos, presentan autocorrelación espacial a distintas escalas (Legendre, 1993). En estos casos, es posible predecir los valores de una variable genética en el espacio a partir de los valores conocidos en otros puntos del muestreo (Escudero *et al.*, 2003). La autocorrelación espacial genética se presenta cuando las frecuencias alélicas de los individuos se correlacionan con la presencia o ausencia de los mismos alelos en otros individuos cercanos (Sokal y Oden, 1978). La autocorrelación espacial se puede determinar mediante diversas pruebas estadísticas: prueba de Mantel (1967), correlogramas, variogramas o análisis de patrón de puntos.

*Prueba de Mantel* (1967): busca la correlación entre dos matrices con datos de distintas poblaciones, por ejemplo una de distancia genética y otra basada en distancia espacial. Se

ha utilizado para identificar patrones de aislamiento por distancia. También se puede utilizar con individuos mapeados en vez de poblaciones, utilizando la medida adecuada de distancia genética. La prueba de Mantel utiliza todos los pares posibles de las localidades, siendo esto su principal desventaja cuando las relaciones no son lineales entre todas las parejas de las matrices, como puede ocurrir en los análisis de autocorrelación espacial en los que la relación genética varía de manera no lineal en el espacio (Heywood, 1991).

*Correlograma* (Sokal y Oden, 1978): describe la estructura genética espacial mediante un análisis de autocorrelación espacial sin hacer suposiciones sobre la escala o la estructura espacial. En éste se utilizan coeficientes de autocorrelación espacial que indican si los valores de una variable se influyen entre sí y miden la intensidad de la relación, como son los coeficientes “Moran  $I$ ” y “Geary  $c$ ” y “ $r$ ”. Se utiliza para estudiar fenómenos en áreas continuas en las que se señalen intervalos de distancia. Existen variantes metodológicas que se ajustan mejor a algunos datos. Por ejemplo, en los *distogramas* (Degen *et al.*, 2001) se grafica la distancia genética media entre pares de individuos que pertenecen a cierta clase de distancia contra clases de distancia o “*join-count autocorrelation statistic*” (Sokal y Oden, 1978) en la que los pares de individuos con el mismo genotipo se cuentan y se comparan con el número esperado de identidades bajo la hipótesis nula de que los genotipos presentan una distribución aleatoria.

*Variograma* (Legendre y Fortín, 1989): son gráficas en las que la varianza entre el coeficiente que compara a los individuos es una función de la distancia de separación que hay entre ellos.

*Análisis de patrón de puntos*: que permite establecer si la distribución de puntos ocurre al azar, mediante el uso de distintos índices para crear funciones de densidad (Escudero *et al.*, 2003). Describe patrones de localidades en cuanto a eventos puntuales y prueba si hay significancia en la ocurrencia de los puntos que aparecen agrupados en un área particular (Chakravorty, 1995).

## Estructura genética y los análisis de autocorrelación espacial

La selección natural y la dispersión son probablemente fuerzas que afectan en gran medida los patrones de estructura genética dentro de las poblaciones (Epperson, 1990), ya que tienen una influencia en la distribución de los alelos en el espacio. El movimiento de algunas plantas suele ser limitado, porque sólo ocurre mediante propágulos, polen o semillas que pueden tener restricción fuerte o moderada en su dispersión, por esto es altamente probable que dentro de las poblaciones de estas plantas se presente una estructura genética con autocorrelación espacial (Vekemans y Hardy, 2004). Tal estructura se verá caracterizada por una autocorrelación espacial positiva en las clases de distancia más pequeñas que declinará hasta cero y se hará negativa en las más grandes (Peakall *et al.*, 2003).

La reproducción clonal vegetativa contribuye de manera importante en la estructura genética en tanto que determina la distribución espacial de individuos genéticamente idénticos. Hay poblaciones que pueden reproducirse de ambas maneras, sexual y clonal; en éstas se espera que la magnitud de estructura genética de todos los individuos fenotípicos sea distinta de la de los individuos sexuales, como consecuencia de la probable agrupación de los ramets clonales (Chung y Epperson, 1999; Chung *et al.*, 2005).

Diferenciar la estructura poblacional causada por propagación vegetativa de la originada por reproducción sexual puede proveer información relevante en evolución. Pues el patrón y cantidad de estructura genética local basada únicamente en los organismos sexuales puede utilizarse para comprender el impacto de la dinámica de la dispersión de semillas y polen o el sistema de apareamiento en la distribución de las frecuencias alélicas (Chung *et al.*, 2005).

La estructura genética puede cuantificarse mediante análisis de autocorrelación espacial ya que permiten investigar los procesos que ocurren en las poblaciones como la dispersión (Chung *et al.*, 2005). La teoría predice que la autocorrelación espacial positiva decae con la distancia (Epperson, 1990; Sokal y Jacquez, 1991; Smouse y Peakall, 1999), sin embargo

entre loci la señal de autocorrelación puede ser débil (Heywood, 1991). Por eso, estos análisis se han hecho de distintas maneras; un alelo a la vez, con el promedio de todos los alelos y loci y con genotipos multilocus (GML) (Vekemans y Hardy, 2004).

Los análisis de autocorrelación se pueden realizar con distintos coeficientes de relación entre individuos. Estos coeficientes describen algún aspecto de la similitud genética entre individuos relativa al promedio de similitud genética de los individuos de una población. El estimado seleccionado dependerá del tipo de marcador utilizado en el análisis. Algunos de estos coeficientes son (Hardy, 2003):

*Coancestría (kinship)*: comúnmente conocido como la probabilidad de identidad por descendencia (IBD). Indica la probabilidad de identidad en estado entre un gen tomado al azar de un individuo  $i$  y un gen tomado al azar de un individuo  $j$ , ambos tomados de la misma población.

*Parentesco (relationship)*: indica la probabilidad de identidad en estado entre dos genes tomados al azar de dos individuos diploides que tengan el mismo nivel de endogamia, incluyendo así la probabilidad de identidad en estado entre los genes de un mismo individuo.

*Fraternidad*: que indica la probabilidad de que los dos genes homólogos de dos individuos sean idénticos por descendencia (Lynch y Walsh, 1998).

*Endogamia*: que indica la probabilidad de identidad por descendencia entre dos genes homólogos de un mismo individuo (Hardy, 2003).

## Clonalidad

La forma en la que se reproducen los organismos determina la transmisión de genes en el tiempo y espacio. Así, la forma de reproducción tendrá un efecto determinante en la estructuración genética de una población. Muchas especies perennes presentan reproducción sexual mediante semillas y reproducción clonal mediante propagación vegetativa (Richards, 1986), la producción y reclutamiento de prole sexual vs. clonal suele variar en las especies como respuesta a factores ecológicos o genéticos que limitan algún modo reproductivo (Eckert, 2001).

En la reproducción clonal un solo padre produce un nuevo individuo sin que ocurra recombinación genética, teniendo como principal consecuencia que el hijo sea genéticamente idéntico a su padre, a no ser que ocurran mutaciones (Halkett *et al.*, 2005).

La clonalidad es una estrategia de historia de vida muy común en plantas. A pesar de que las especies clonales son dominantes en muchos hábitats, los estudios ecológicos y evolutivos se habían visto limitados por la dificultad de describir el número, tamaño y longevidad de los organismos clonales. Esta área ha progresado debido al desarrollo de marcadores moleculares que permiten cuantificar clonalidad (Arnaud *et al.*, 2007).

Dado que la reproducción clonal produce individuos idénticos genéticamente, se cree que las poblaciones altamente clonales presentarán baja diversidad genotípica (Silander, 1985 en Eckert *et al.*, 2003). Una gran cantidad de trabajos con especies clonales se han concentrado en caracterizar la proporción de individuos clonales en las poblaciones mediante índices de diversidad como los de: *riqueza clonal*, que describen la proporción de muestra que es variable, *equitatividad clonal*, para conocer como se distribuyen los individuos clonales de una muestra, y *heterogeneidad clonal*, como el de Simpson o el de Shannon-Wiener que permiten conocer como se compone una muestra (*i.e.* si hay pocos genotipos clonales altamente representados y algunos genotipos raros o si la población es homogénea) (Arnaud *et al.*, 2007).

La clonalidad tiene un efecto importante en la distribución espacial de la variación genética. Para un genet individual el crecimiento clonal significa ocupar espacio e incrementar en tamaño. Desde este punto de vista, este crecimiento resulta en la formación de metapoblaciones de ramets en el sentido de White (1979), en el que este concepto se define por todos los elementos que conforman la estructura morfológica de un solo individuo genético (White, 1979). Dependiendo en la forma en que un genet coloniza mediante ramets a su vecindario, esas metapoblaciones se distribuirán como parches más o menos agregados (McLellan *et al.*, 1997).

Se ha hecho una distinción de las plantas clonales que tienen distribución dispersa de aquellas que presentan agregación de ramets. Estas formas de crecimiento se llaman de *guerrilla* y *falange* respectivamente (Lovett-Doust, 1981). En la arquitectura de guerrilla, los genets se presentan entremezclados y puede haber conexión entre ramets mediante estolones o largos rizomas; los individuos que crecen con esta estrategia presentan la posibilidad de tener interacciones con otras especies u otros genets de su misma especie. En la arquitectura de falange, los individuos del mismo genet se presentan muy juntos y pueden estar unidos mediante pequeñas conexiones; estos grupos se expanden lentamente, logrando ocupar un mismo sitio durante largo tiempo, por lo que la mayoría de las interacciones ocurren entre los módulos del mismo genet (Begon *et al.*, 2006).

Se ha observado que estas dos formas de crecimiento se ven favorecidas en distintas condiciones. El crecimiento de guerrilla se observa fácilmente en estadios sucesionales tempranos y hábitats de distribución heterogénea de recursos en los que se hayan presentado disturbios. Por lo contrario, la forma de crecimiento en falange se ha observado con mayor frecuencia en estadios sucesionales tardíos y hábitats en los que los recursos se distribuyen relativamente de manera homogénea y poco perturbados (Schmid y Bazzaz, 1987). El crecimiento en falange permite a un “cluster” monopolizar el uso de recursos en sitios locales, mientras que las plantas que crecen en guerrilla pueden explorar microhábitats rápidamente, lo que es una ventaja en sitios donde los recursos no son abundantes (Lovett-Doust, 1981). La forma de crecimiento clonal también afecta la estructura genética de una población pudiendo conformar poblaciones de parches

monoclonales cuando hay crecimiento en falange o poblaciones con clones dispersos en el caso del crecimiento de guerrilla (Figura 2; Schmid, 1985).

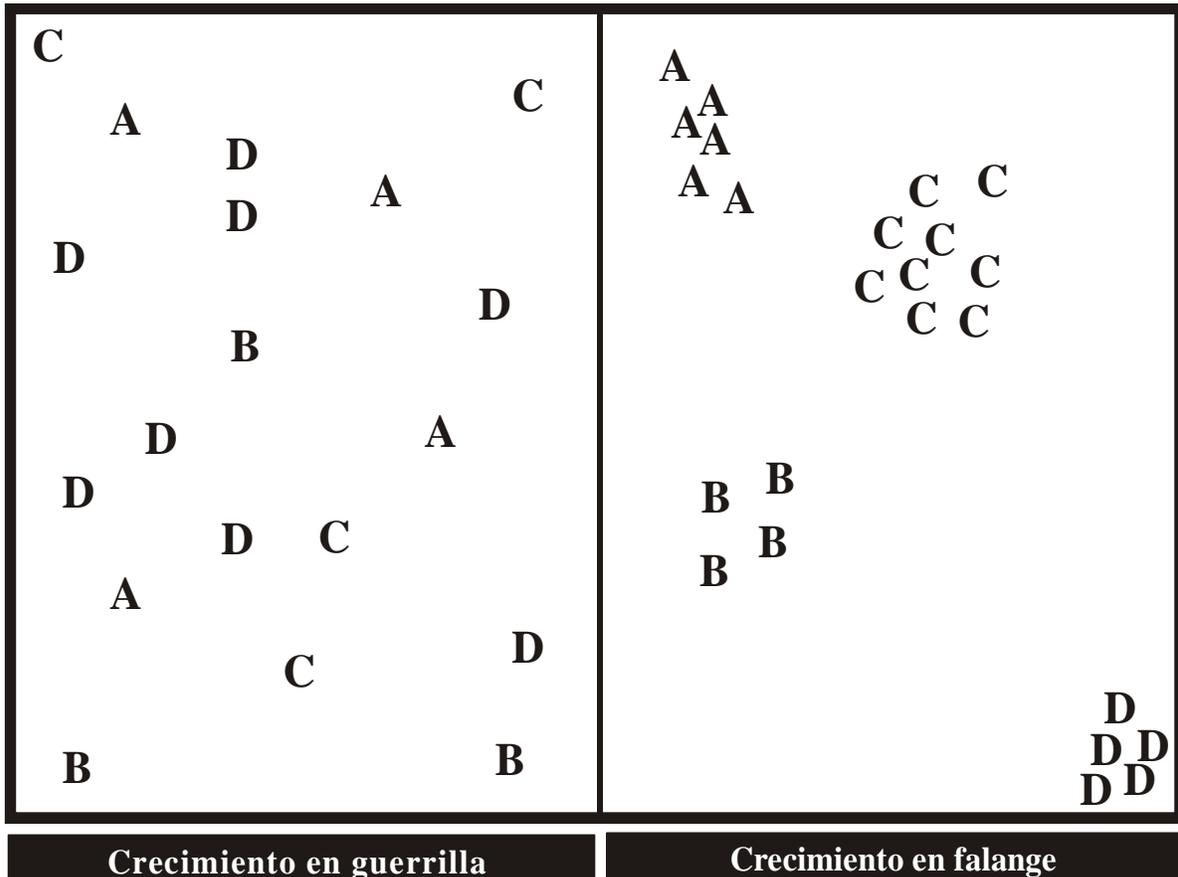


Figura 2. Crecimiento en guerrilla en el que se observan los clones dispersos en el espacio y Crecimiento en falange que muestra los clones formando agrupaciones. Las letras representan genotipos. Realizado a partir de Lovett-Doust, 1981.

## **El Género *Agave* y *Agave striata***

Los agaves son plantas xerófitas, sus hojas son suculentas, gruesas y especializadas con parénquima esponjoso para retener agua. Su arreglo radial permite colectar agua en la axila foliar y dirigirla hacia la base del tallo. Las hojas presentan una espina terminal y un borde lateral cuticular grueso que puede presentar serraduras. También presentan metabolismo CAM y facultativamente C3 en las primeras etapas de la vida (Nobel, 1988).

Los agaves son monocárpicos, pues se reproducen una vez y mueren. Tienen un síndrome de polinización quiropterofílico, aunque son visitados por distintos polinizadores (Trejo, 2007). Durante el evento de la floración las hojas comienzan a secarse conforme las semillas y bulbilos maduran (Gentry, 1982; Molina-Freaner y Eguiarte, 2003; Rocha et al., 2006; Flores, 2007).

El género *Agave sensu stricto* es el más diverso de la familia Agavaceae, se considera que contiene 166 especies descritas que según el tipo de inflorescencia se ubican en dos subgéneros (Gentry, 1982; García-Mendoza y Galván, 1995); *Littaea* (53 especies) y *Agave* (113 especies) (Good-Ávila et al., 2006). *Littaea* tiene inflorescencias de apariencia espigada y flores en pares, mientras que en *Agave* las inflorescencias son paniculadas y las flores se encuentran en agregados umbelados sobre pedúnculos laterales (Gentry, 1982). El subgénero *Littaea* se distribuye desde Utah, Arizona y Nevada en Estados Unidos hasta Guatemala, exceptuando Baja California y Yucatán en México, mientras que *Agave* se encuentra desde California, Texas y el sur de Florida en Estados Unidos hasta Perú, Colombia y Venezuela (García-Mendoza y Galván, 1995).

Las especies pertenecientes al subgénero *Agave* son polinizadas principalmente por murciélagos, lo que es un factor clave en la alta diversificación del subgénero (Good-Ávila et al., 2006; Flores, 2007) y puede tener un efecto importante en la estructura de las poblaciones de sus especies. Se ha propuesto que las especies pertenecientes al subgénero *Littaea* son polinizadas principalmente por insectos como abejas, pues los tubos florales

son más pequeños y presentan posición horizontal y la producción de polen es menor, pero con alta concentración de carbohidratos en el néctar (González, 2005; Rocha, 2006).

Las características reproductivas del género son que sus flores son protránderas, autocompatibles, con poca autofertilización y semélparas. También presentan en muchos casos alta depresión por endogamia (Eguiarte *et al.*, 2000).

El género *Agave* tiene importancia económica porque varias de sus especies se utilizan para proveer alimentos, bebidas, cuerdas y otras fibras textiles (Rocha *et al.*, 2006). Los agaves en México son un recurso fitogenético estratégico, ya que representan una alternativa para el desarrollo sostenible desde el punto de vista ecológico y social, siendo de particular importancia su capacidad bioproductiva en ambientes extremos de temperatura y disponibilidad de agua (Colunga-García *et al.*, Larqué-Saavedra A, 2007).

Las especies de este género también tienen un papel importante como especies clave en sus ecosistemas por su abundancia y las relaciones simbióticas que pueden establecer, ya que son capaces de ofrecer abundantes recursos a polinizadores (Stoner *et al.*, 2003; Rocha *et al.*, 2005).

## ***Agave striata* Zucc.**

### Clasificación

*Agave striata* Zucc. es un agave del grupo Striatae del subgénero **Littaea**. El grupo Striatae se distingue por tener hojas firmes y serruladas, flores con tubos profundos y tépalos pequeños. Se encuentra relacionado con el grupo Polycephaleae en cuanto a estructura floral. Estos grupos tienen hábitats distintos, pues Polycephaleae se halla en clima húmedo mientras que Striatae habita cañones áridos o las planicies occidentales que sufren la sombra de montaña de la Sierra Madre Occidental. Se encuentran desde el desierto de Coahuila hasta el sur de Oaxaca. Las especies del grupo son: *A. dasyliroides*, *A. stricta*, *A. striata* (Gentry, 1982) *A. rzedowskiana* (Carrillo *et al.*, 2003) y *A. tenuifolia* (Zamudio, 1995).

### Descripción

*A. striata striata* (Figura 3) es una roseta compacta que forma agrupaciones grandes (macollos de 2-3 m de ancho) mediante ramificación axilar. Las características físicas de esta planta se presentan en la Tabla 1.

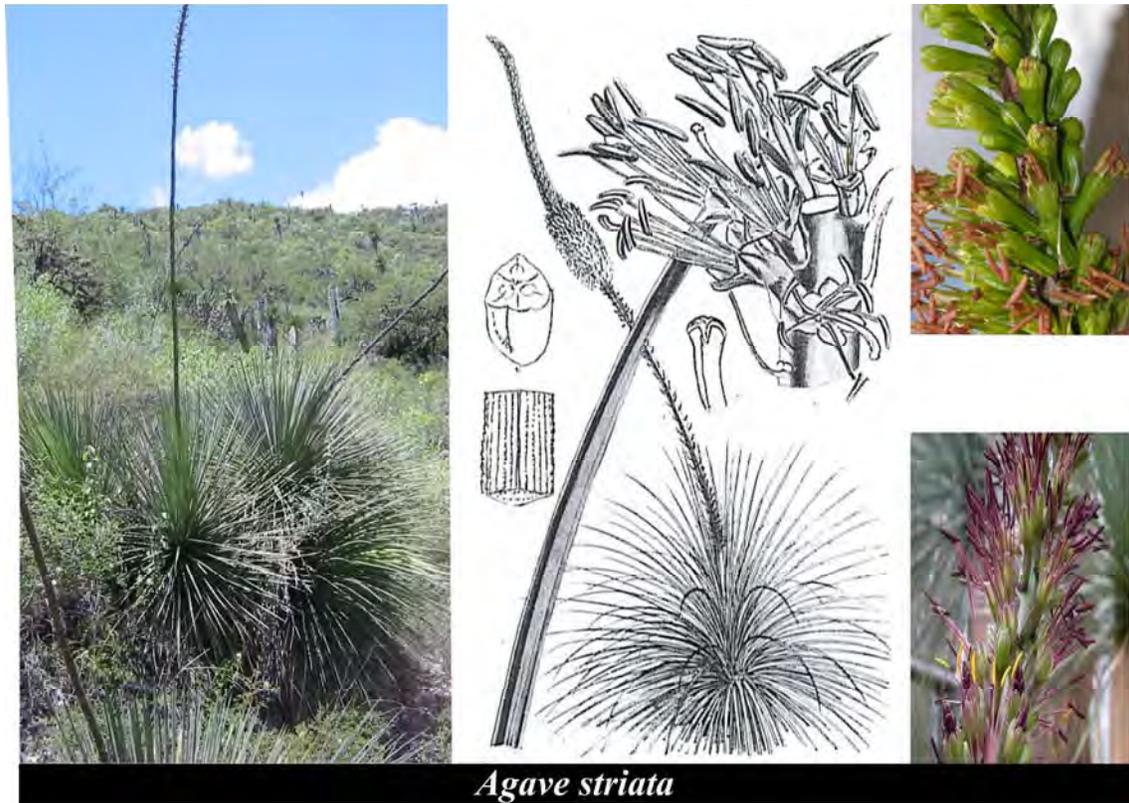


Figura 3. *Agave striata* (fotos: Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Luis Eguiarte; Gentry, 1982).

Tabla 1. Características físicas de *A. striata* (Gentry, 1982).

Estructura	Características
Hoja	Más de 100, 25-60 cm de largo y hasta 1 cm de ancho. Lineales, estriadas, gruesas y rígidas, convexa en el haz. Con quillas suaves o escabrosas en el haz y el envés.
Espina	Color rojizo a gris oscuro.
Inflorescencia	Espiga erecta de 1.5-2.5 m. Con brácteas de 5-10 cm más cortas que las flores.
Flor	Geminadas, tubulares de 25-40 mm de largo. Amarillo-verde o rojo-púrpura. Ovario ínfero sin cuello y mide 12-15 mm. Anteras de color bronce o café. De 12-16 mm de largo. Filamentos de 30-50 mm de largo. Insertos (en dos niveles). Ovalados. Tépalos de 5-7 mm de largo y 3-5 mm de ancho
Fruto	Cápsula trígona de 13-16 mm x 8-10 mm. Color café. Truncada en la base y apiculada.
Semilla	En forma de media luna. Gruesa en la parte curva. 3-3.5 mm.

## Distribución

Esta especie se encuentra en el noreste de México en ambos lados de la Sierra Madre Oriental en los valles y planicies más secas, con una precipitación promedio menor a 500 mm y entre los 1000 y 2000 msnm. Esto corresponde a los tipos de vegetación de matorral xerófilo, bosque de Pino-Encino y selva baja caducifolia. La especie se encuentra en: Coahuila, Durango, Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Zacatecas, Querétaro e Hidalgo (Figura 4). La especie es conocida con los nombres de espadín, estoquillo, peinecillo y junquillo. Se le ha dado un uso como forraje y se consumen los quiotes cuando están tiernos (Gentry, 1982; Trejo, 2006).

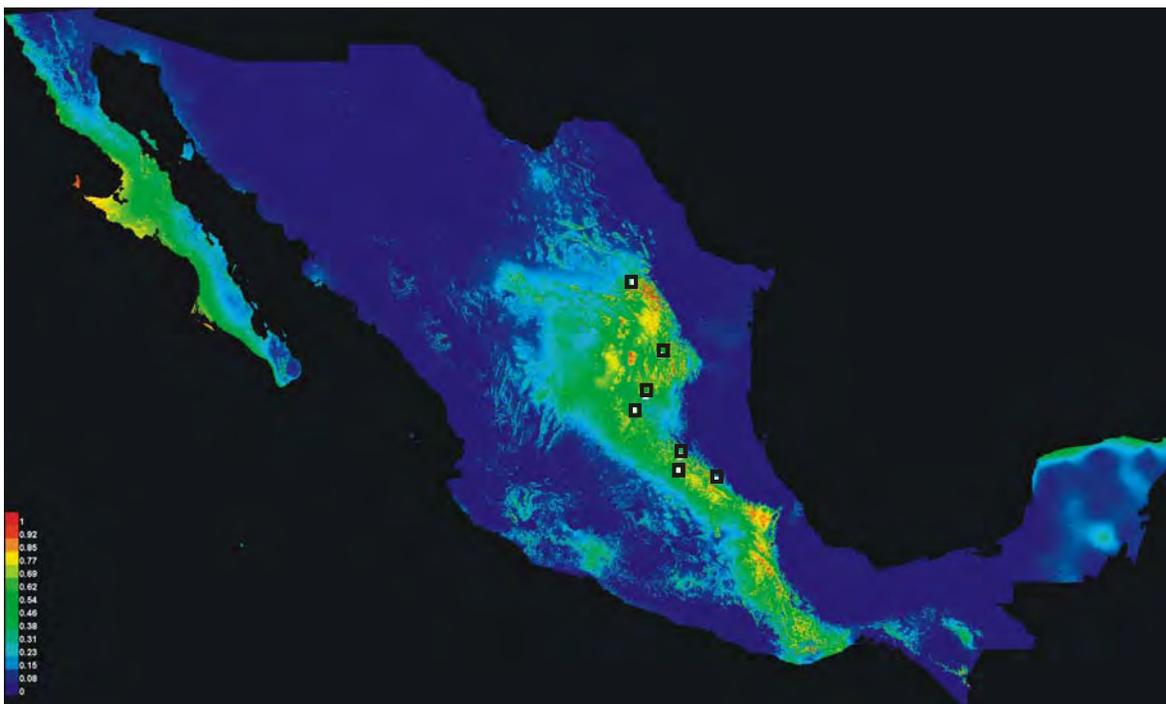


Figura 4. Distribución potencial de *A. striata* en México (Scheinvar *com. pers.*). En rojo se muestran los sitios con mayor potencial. Los cuadros negros son puntos donde se presenta la especie (Gentry, 1982). Aunque en el mapa se presenta como región potencial las penínsulas de Baja California y Yucatán, se sabe que esta especie no se encuentra en tales lugares.

## Historia Natural y Ecología

El periodo de floración en esta especie ocurre de junio a septiembre. La producción de néctar es principalmente nocturna, aunque comienza al atardecer, la producción máxima ocurre cerca de las 20:00 horas. Produce más de 200  $\mu$ L de néctar con una concentración aproximada al 20%. Las flores son protándricas, la dehiscencia de la antera ocurre uno o dos días antes de que el estigma sea receptivo. La corola y el ovario de las flores se encuentran fusionados (Rocha *et al.*, 2005).

Los experimentos de polinización de Rocha y colaboradores (2005) encontraron que en *A. striata* hay mayor éxito de establecimiento de frutos y semillas cuando hay fertilización cruzada, indicando depresión por endogamia (Apéndice 1). En cuanto a las visitas florales, se encontró que esta especie es visitada por un ensamble muy diverso en especies, incluyendo murciélagos, aunque únicamente cerca del pico de producción máxima de néctar. El estudio de Trejo (2007) en la Barranca de Metztitlán mostró que el mayor número de visitas que recibe esta planta es de *Apis mellifera* seguida por *Lassioglossum* sp. y algunas especies de esfíngidos. En ese trabajo también se observaron visitantes diurnos como los colibríes *Cynanthus latirostris* y *Eugenes fulgens*.

## Antecedentes

Aunque el género *Agave* es muy diverso, son relativamente pocos los estudios que se avocan en explicar la distribución de la diversidad genética de alguna de sus especies (Rocha, 2006b). La diversidad genética de *A. striata* ha sido analizada por Rocha (2006b) en varias poblaciones de la Barranca de Metztitlán (Apéndice I) y Trejo (2006) que hizo un muestreo para analizar la diversidad genética de poblaciones de *A. striata* var *striata* (Apéndice I) y *A. striata* var *falcata* desde Coahuila hasta Hidalgo. En ambos trabajos se utilizaron los mismos marcadores ISSR: ISSR-811, ISSR-846 e ISSR-853.

En estos trabajos se encontraron valores similares de *Heterocigosis esperada* ( $H_E$ ) de 0.237 para las poblaciones de Rocha y de 0.191 para las poblaciones de Trejo (Apéndice I).

En general, estos altos valores de diversidad genética presentan el mismo patrón que los propuestos para monocotiledóneas longevas, perennes con un sistema predominante de fertilización cruzada como es el caso de *A. striata* (Hamrick y Godt, 1989 y 1996)

El análisis de estructura poblacional de Rocha (2006) mostró que esta especie presenta bajos valores de diferenciación poblacional con amplios intervalos de confianza ( $G_{ST} = 0.087$  y  $\theta = 0.103(0.056 - 0.168)$ ). Para el análisis de diferenciación genética clasificó las poblaciones de *A. striata* según su ubicación, observando que las poblaciones de la Barranca de Metztlán presentan el 100% de la variación de la especie. Los resultados de Rocha (2006) permitieron observar que en esta especie el porcentaje más alto de la variación se explica mediante el componente intrapoblacional (75.7%) mientras que el resto se explica entre las poblaciones. Las poblaciones estudiadas por Rocha (2006) no presentaron aislamiento por distancia entre ellas (prueba de Mantel:  $r = 0.494$  y  $p = 0.163$ ) y el análisis de flujo génico arrojó un valor de  $Nm = 1.2$  a  $2.4$ .

El estudio de Trejo (2006) encontró que la especie presenta una diferenciación genética medianamente alta ( $\theta = 0.1922$ ) siendo mayor para el caso de la subespecie *A. striata* var. *striata* ( $\theta = 0.2789$ ), el valor de flujo génico ( $Nm$ ) que encontró para las poblaciones fue de  $0.64$ . En este estudio se encontró que el 74% de la variación genética de la especie está dentro de cada una de las poblaciones ( $F_{ST} \approx 0.256$ ). Asimismo, mediante la prueba de Mantel (1973) se encontró aislamiento por distancia entre las poblaciones analizadas de la variedad *striata* ( $r = 0.696$  y  $p = 0.002$ ).

## JUSTIFICACIÓN

La estructura genética espacial dentro de una población de plantas es determinada por el balance entre la deriva genética y el flujo génico a través de reproducción sexual. Por lo tanto, la estructura genética de una población depende de varios factores, como la contribución relativa de polen, la densidad de la población y de los polinizadores y la cantidad de propagación vegetativa, pues el acomodo espacial de los genotipos en estos casos tiende a incrementar los apareamientos consanguíneos (Heywood, 1991). Dado que los patrones generales observados en la diversidad genética se originan por eventos que suceden en las poblaciones de manera local, comprender la dinámica de la estructura genética en microescala es importante para determinar el impacto de la reproducción clonal y sexual en la variación genética local y entender la historia natural de las especies.

*A. striata* es una especie en la que se han realizado estudios de estructura poblacional a nivel de especie, por lo que resulta ser un organismo de estudio adecuado para realizar un análisis local de estructura genética, ya que nos permite comprender los factores que moldean la estructura genética local de las poblaciones y determinan en gran medida los patrones globales de diversidad.

La mayoría de los estudios empíricos en los que se ha analizado el patrón de variación genética se ha hecho entre poblaciones (Epperson, 1990). En casos en los que la distribución de los individuos no es uniforme y la dispersión no es grande, se ha recomendado hacer muestreos extensivos en los que se colecte un individuo de cada agrupación (Epperson, 2005). El caso de los estudios de estructura del género *Agave* y también los que se han realizado en *A. striata*, no han sido la excepción, pues al considerarse altamente clonales, los muestreos realizados han sido extensivos (Aguirre, 2004; González, 2005; Colín, 2006; Rocha, 2006; Trejo, 2006), faltando en todo momento estudios a nivel local en escala fina como el de este trabajo.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

El propósito de este trabajo es describir la estructura genética en microescala dentro de poblaciones de *Agave striata* de la Barranca de Metztitlán en Hidalgo, con el fin de entender cómo interactúan los factores ecológicos y genéticos que moldean la estructura genética a nivel intrapoblacional.

### **Objetivos Particulares**

- Conocer la diversidad genotípica de las poblaciones utilizando ISSR's como marcador molecular.
- Encontrar los valores de variación genética utilizando los estimadores  $H_E$  y  $\%P$ .
- Describir la estructura genética poblacional.
- Realizar análisis de autocorrelación espacial en las poblaciones
- Caracterizar a las poblaciones en términos de genotipos multilocus.
- Describir la distribución espacial de los genotipos multilocus de las poblaciones.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Área de estudio

Se seleccionaron dos poblaciones de *Agave striata* de la Reserva de la Biósfera Barranca de Metztitlán: San Bernardo y Venados (Figura 5, Tabla 2) ubicadas en la región central de la Reserva.

La Reserva de la Biósfera Barranca de Metztitlán se encuentra en el centro-este del estado de Hidalgo, entre la Sierra de Pachuca y la Sierra de Zacualtipán. La región forma parte del desierto Queretano-Hidalgense y se considera como refugio pleistocénico de la biota mexicana (Sánchez-Mejorada, 1978; Axelrod, 1983).

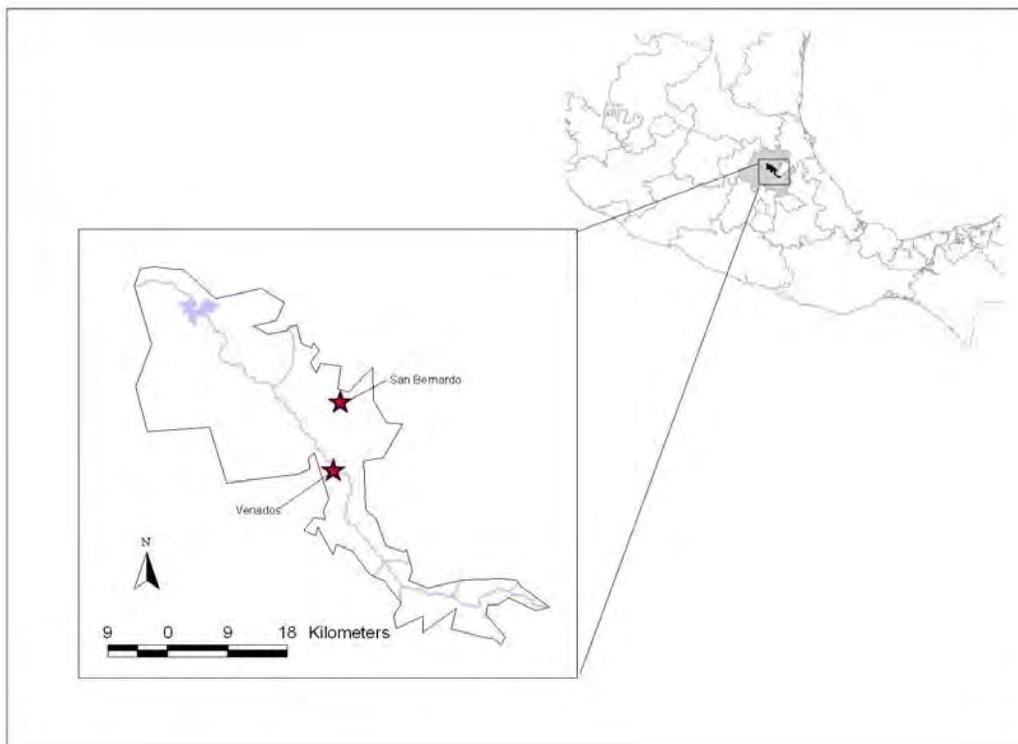


Figura 5. Localización de las poblaciones de *Agave striata* en la Reserva de la Biósfera Barranca de Metztitlán.

Tabla 2. Ubicación de las poblaciones de estudio. Área muestreada, número de individuos colectados y número de agrupaciones espaciales encontradas en cada población.

<b>Población</b>	<b>Coord. N</b>	<b>Coord. W</b>	<b>msnm</b>	<b>Área muestreada</b>	<b>Individuos</b>	<b>Grupos</b>
San Bernardo	20° 33' 35''	98°40'13''	1840	300 m <sup>2</sup>	128	22
Venados	20° 28'	98°40'45''	1400	180 m <sup>2</sup>	98	19

### **Colecta de material biológico**

En cada población se trazó una parcela de 300m<sup>2</sup> (San Bernardo) y 180m<sup>2</sup> (Venados) en los que se etiquetaron y ubicaron espacialmente en un mapa de coordenadas (x,y) todas las rosetas. Todos los individuos que se encontraban contiguos fueron asignados a un mismo grupo espacial (macollo) (Apéndice II). De cada roseta se cortó tejido de la hoja más joven para facilitar el proceso de extracción de ADN. Las muestras fueron almacenadas en nitrógeno líquido a -80° C. La colecta se realizó en junio de 2007.

### **Extracción de ADN**

La extracción de ADN de los individuos colectados se realizó siguiendo el protocolo de CTAB (Bromuro de cetiltrimetil amonio) de Doyle y Doyle (1987) modificado con STE (Apéndice III).

La concentración de ADN de cada muestra se cuantificó mediante un biofotómetro (Biophotometer, Eppendorf) y se visualizó en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio para corroborar su calidad. De cada muestra se tomó un volumen de 30 µl, que fue llevado a una concentración de 30ng/µl. El resto del volumen de las muestras se almacenó en el banco de ADN del laboratorio de Evolución Molecular y Experimental a -80° C con el fin de tener un respaldo.



## Análisis De Datos

### Caracterización de Genotipos Multi Locus (GML)

La lectura de los geles se realizó de forma manual, identificando los patrones de loci producidos por los marcadores en cada individuo. Se realizó una matriz de presencia y ausencia de loci.

Para visualizar los individuos idénticos en patrón multilocus y conocer el número de GML se realizó un dendrograma Neighbor Joining con el programa MEGA (Tamura *et al.*, 2007) a partir de una matriz del índice de Jaccard obtenida mediante el programa FAMD (Schlüter y Harris, 2006).

Cuando las distancias genéticas pareadas entre muestras no tienen una distribución unimodal estricta y se presentan picos altos cerca de las distancias más pequeñas, es posible que existan mutaciones somáticas o errores asociados a la lectura de geles y que distintos GML sean en realidad resultado de un solo evento reproductivo. Para asegurar que cada GML perteneciera a una clona diferente y no sea resultado de ninguna de las causas mencionadas, se realizó un histograma de frecuencias de la distancia genética pareada entre individuos (Douhovnikoff y Dodd, 2003, Rozenfeld *et al.*, 2007), en términos del índice de similitud de Jaccard, que se calculó con el programa FAMD (Schlüter y Harris, 2006), buscando la señal de mutaciones somáticas o errores asociados a la lectura de geles que provocasen un aumento en el número de GML observados.

Dado que *A. striata* puede reproducirse de manera clonal y sexual, podría ocurrir que de manera aleatoria dos genotipos que se observan idénticos fueran producto de eventos de reproducción sexual independientes. Con la finalidad de conocer si los GML idénticos pertenecían a la misma clona reproductiva, se calculó la probabilidad de que el número de muestras con el mismo genotipo se derivaran de un evento reproductivo distinto ( $P_{sex}$ ). Para obtener este valor se estimó también la probabilidad de existencia de cada genotipo en la

muestra ( $P_{gen}$ ), así como sus frecuencias alélicas mediante el método *round-robin* (Parks y Werth, 1993) en el programa GenClone 2.0 (Arnaud-Haond y Belkhir, 2007).

Dado que la estimación de frecuencias alélicas incluye contar genotipos, resulta problemático cuando éstos ya fueron utilizados para determinar la separación genética entre individuos, y si sólo se utilizaran los genotipos distintos para calcular las frecuencias alélicas se corre el riesgo de sobreestimar la frecuencia de los alelos raros que pueden estar definiendo genotipos. Esta dificultad puede ser sorteada con un método de remuestreo como el de *round-robin* que estima las frecuencias alélicas de cada locus utilizando todos los genotipos obtenidos cuando se elimina el locus para el que se estima la frecuencia alélica. Este procedimiento se repite con todos los loci (Parks y Werth, 1993; Arnaud *et al.*, 2005).

Se realizaron histogramas de la frecuencia de los genotipos multilocus para conocer la distribución de los ramets entre los genets. Con este fin también se realizó la prueba de la distribución de Pareto (Vidondo *et al.*, 1997; Arnaud-Haond *et al.*, 2007; Apéndice IV), que es un modelo que describe curvas de distribución sesgadas con decaimiento exponencial. Se ha observado que varias plantas clonales presentan un comportamiento en la distribución de densidad que se ajusta al modelo de Pareto (Hangelbroek *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2004). La prueba de Pareto es una aproximación continua que describe la distribución discreta de las unidades muestreadas de los ramets dentro de los grupos clonales, donde el tamaño clonal es definido por el número de unidades muestreadas que pertenecen a la misma clona. Se representa mediante  $N_{s \geq S} = \alpha S^{-\beta}$  donde  $\beta$  describe la distribución de los ramets entre las clonas y toma valores cercanos a cero cuando todos los tamaños de clonas son equitativamente representados y valores grandes cuando hay algunas clases más representadas.

### Diversidad clonal

Se estimó la diversidad de GML en las poblaciones calculando la proporción de genotipos distinguibles (Apéndice IV; Ellstrand y Roose, 1987), el índice de diversidad de Simpson (1949) ( $D$ ) modificado para muestras finitas (Apéndice IV; Pielou, 1969) y la equitatividad genotípica (Apéndice IV; Fager, 1972). Con el recíproco del índice de Simpson ( $D$ ) se calculó el número aparente de linajes clonales en la muestra  $\left(\frac{1}{\lambda}\right)$  (Apéndice III; Hurlbert, 1971; Hill, 1973; Arnaud-Haond *et al.*, 2007).

### Variación genética

Se calcularon los parámetros básicos descriptivos de variación genética: frecuencias genotípicas, frecuencias alélicas, porcentaje de loci polimórficos con el criterio del 95% ( $P$ ) y heterocigosis esperada ( $H_E$ ) mediante la corrección de Lynch y Milligan (1994) (Apéndice IV).

### Estructura poblacional

Con el programa TFPGA se aplicó la prueba de diferenciación exacta (Raymond y Rousset, 1995) para determinar si existían diferencias significativas entre las frecuencias alélicas observadas entre las poblaciones.

Se calculó con TFPGA el *coeficiente de coancestría*  $\theta$  (Weir y Cockerham, 1984), análogo a  $F_{ST}$ , este cálculo se realiza para cada locus y su intervalo de confianza se obtiene mediante *jackknife*.

Se calculó el porcentaje de variación inter e intra poblacional, para las dos poblaciones y dentro de las poblaciones considerando a los macollos observados como subpoblaciones, mediante la prueba de análisis de varianza molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) utilizando el programa Arlequín 2.0 (Schneider *et al.*, 2000).

Con el programa *TFPGA* se calcularon los valores de  $\theta$  (Weir y Cockerham, 1984) realizando 5,000 iteraciones y con un nivel de confianza de 95% (Weir, 1996) para las dos poblaciones juntas. A partir de los valores de  $\theta$ , análogo de  $F_{ST}$ , se calculó el número de migrantes en las poblaciones utilizando la ecuación  $Nm = \left[ \left( \frac{1}{\theta} \right) - 1 \right] / 4$  (Reisch y Kellermeier, 2007).

### Análisis de autocorrelación espacial

Para cada población se realizó una prueba de Mantel (Mantel, 1967) utilizando el programa GenAlex6 para determinar si existía correlación entre la matriz de distancia genética y la matriz de distancia geográfica (Reisch y Kellermeier, 2007).

Se realizaron correlogramas a escala global (Sokal *et al.*, 1998) para describir la estructura genética espacial de todo el sitio de estudio para cada población de manera independiente. Este análisis permite evaluar simultáneamente la señal espacial generada por varios loci (es un análisis multivariado), reduciendo el ruido estocástico que genera hacerlo alelo-por-alelo o locus-por-locus (Smouse y Peakall, 1999). Los correlogramas muestran el índice de correlación ( $r$ ) (Apéndice IV), que está cercanamente relacionado con el índice de Moran ( $Moran-I$ ). El índice de correlación ( $r$ ) provee una medida de similitud genética entre pares de individuos cuya separación espacial cae dentro de una clase de distancia de amplitud especificada. El análisis se realizó con el programa GenAlex6 utilizando la opción *Single Pop* con 999 permutaciones y clases de distancia de amplitud de 0.5 m, 5 m y la definida mediante la regla de Sturges (1926; Apéndice IV), se utilizó esta regla dado que la distancia entre individuos presentó una distribución normal y ella permite definir clases en histogramas de frecuencia de datos que se distribuyen de manera normal. El análisis de autocorrelación espacial mediante correlogramas se realizó con todos los individuos de las poblaciones y eliminando a los individuos de genotipos clonales, dejando a un representante de cada genet.

Con el objeto de obtener un estimado de la relación de parentesco entre los distintos GML se contaron el número de bandas compartidas entre cada par de GML.

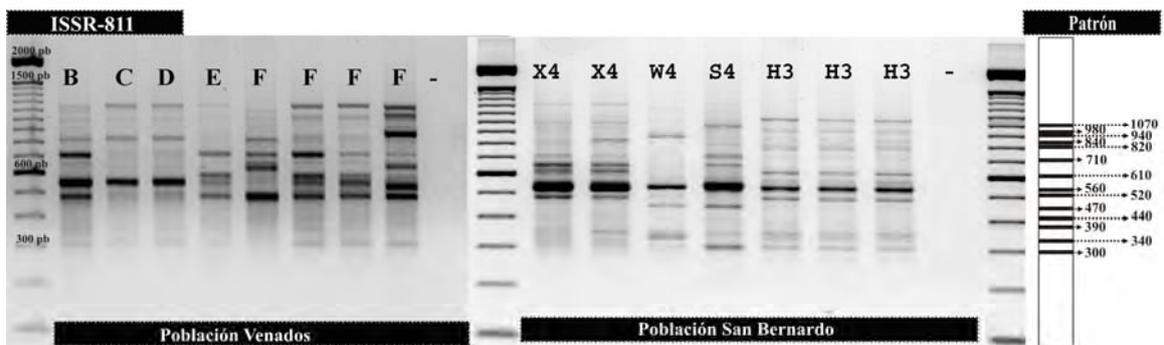
## RESULTADOS

### Caracterización de Genotipos Multilocus

Las amplificaciones con los dos iniciadores de ISSR mostraron un total de 30 loci, 27 de ellos polimórficos: 14 con el iniciador 811 y 16 con el 846 (Figura 6).

Con el objeto de saber si el número de loci era suficientemente representativo de la muestra, se realizó un remuestreo del número de loci, que mostró saturación en el número de GML distintos, indicando que se obtienen datos representativos del número de GML observados con tan sólo 21 loci en Venados y 25 en San Bernardo de los 30 utilizados (Figura 7).

a )



b )

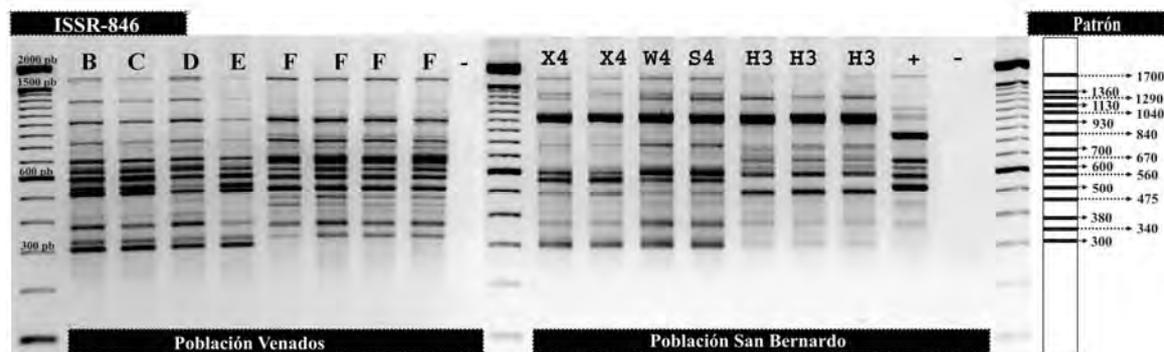


Figura 6. Patrones de loci amplificados con los iniciadores (a) 811 y (b) 846 en individuos de las poblaciones de Venados y San Bernardo con marcador de peso molecular de 100pb.

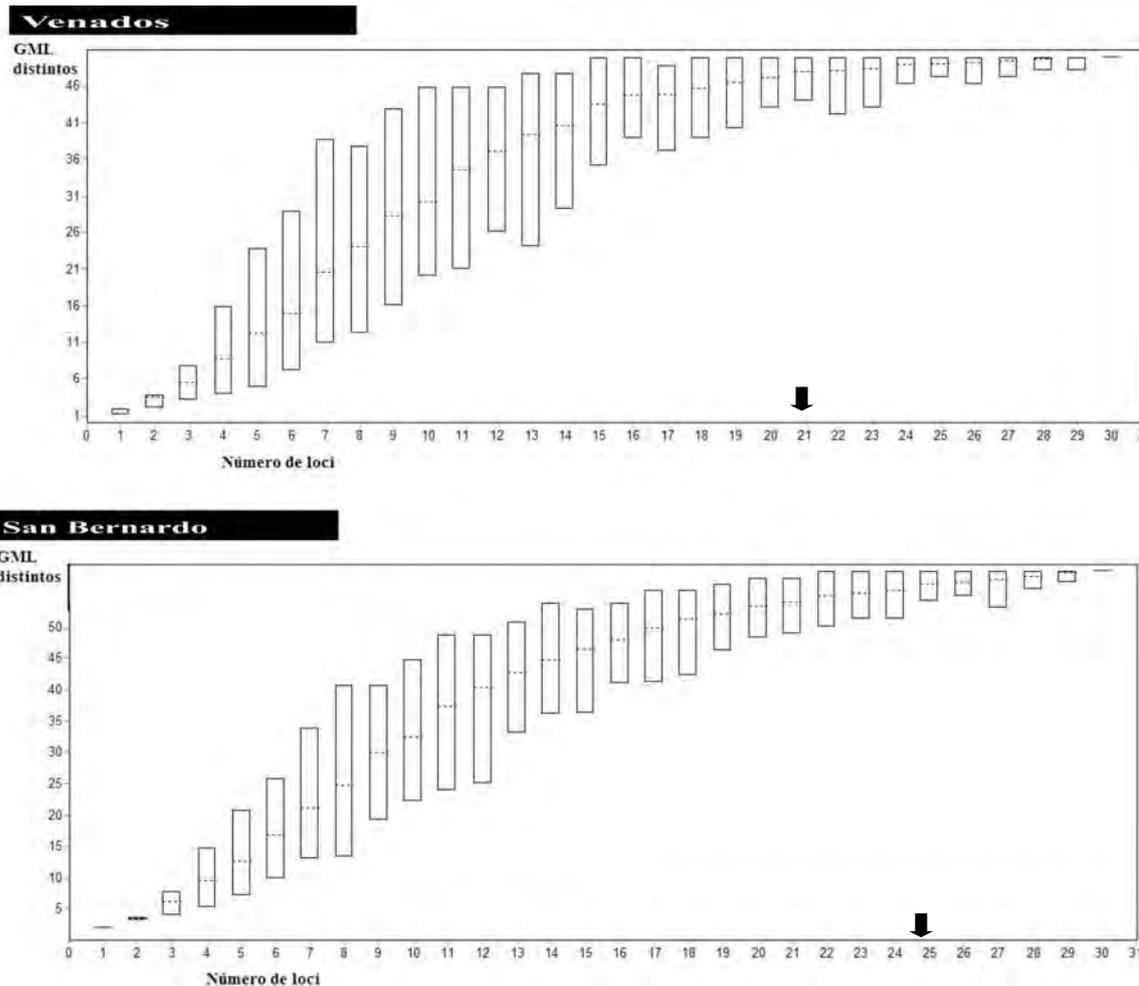


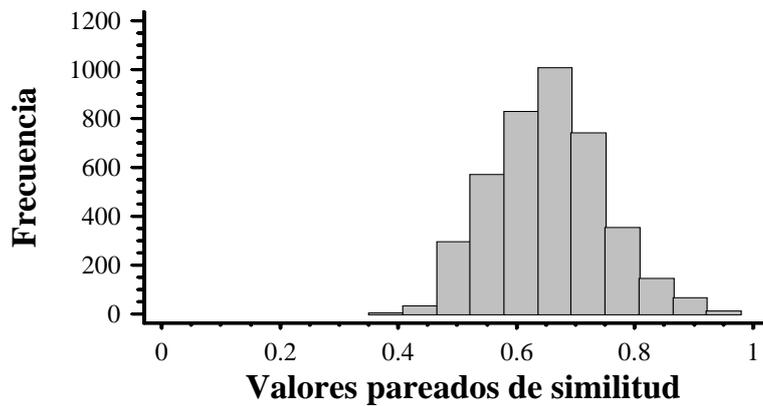
Figura 7. Remuestreo de número de loci con 100 permutaciones. Muestra el número de Genotipos Multilocus (GML) que se encontrarían con cada número de loci y las barras de error. Las flechas indican el número de loci donde no hay cambio en el número de GML observados.

Los histogramas de valores pareados de distancia genética entre individuos presentaron una tendencia unimodal y distribución normal (Figura 8), indicando que el efecto de mutaciones somáticas o errores metodológicos no son significativos, por lo que fue innecesaria la detección de Linajes Multilocus<sup>1</sup> y bastó el uso de Genotipos Multilocus.

La probabilidad de que dos genotipos idénticos se hubieran derivado mediante eventos reproductivos independientes ( $P_{sex}$ ) tomó valores muy bajos en ambas poblaciones [ $1.15 \times 10^{-8} - 1.53 \times 10^{-63}$ ] (Apéndice V), por lo tanto, se cuenta con evidencia estadística de que los genotipos idénticos son clonales y no son resultado de reproducción sexual.

<sup>1</sup> Linaje Multilocus: Genets representados por GML ligeramente distintos (Arnaud-Haond *et al.*, 2007).

a)



b)

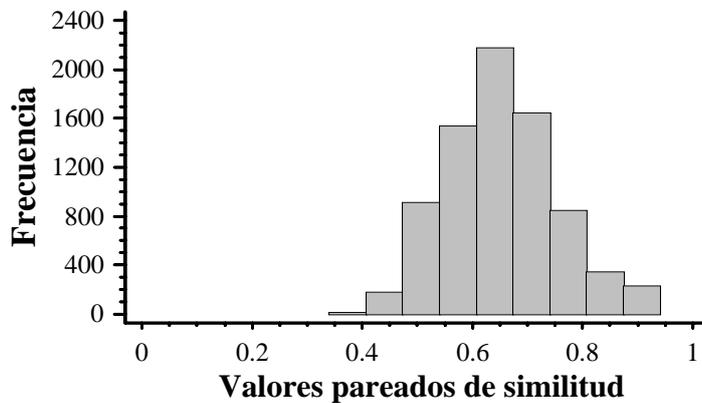


Figura 8. Histogramas de frecuencias de valores pareados de similitud de Jaccard entre los individuos de cada población. a) Venados y b) San Bernardo.

Mediante Neighbor Joining se hizo evidente que en la población Venados hay 50 GML distintos para 98 individuos en la población Venados y en San Bernardo 59 GML entre 128 individuos (Figura 9 y 10). La distribución espacial de los GML se presenta en las Figuras 11 y 12. En ambas poblaciones se observó que la mayoría de los genotipos son únicos y que el tamaño máximo de rosetas del mismo genet es de ocho individuos (Figura 13).

## NJ; Población Venados

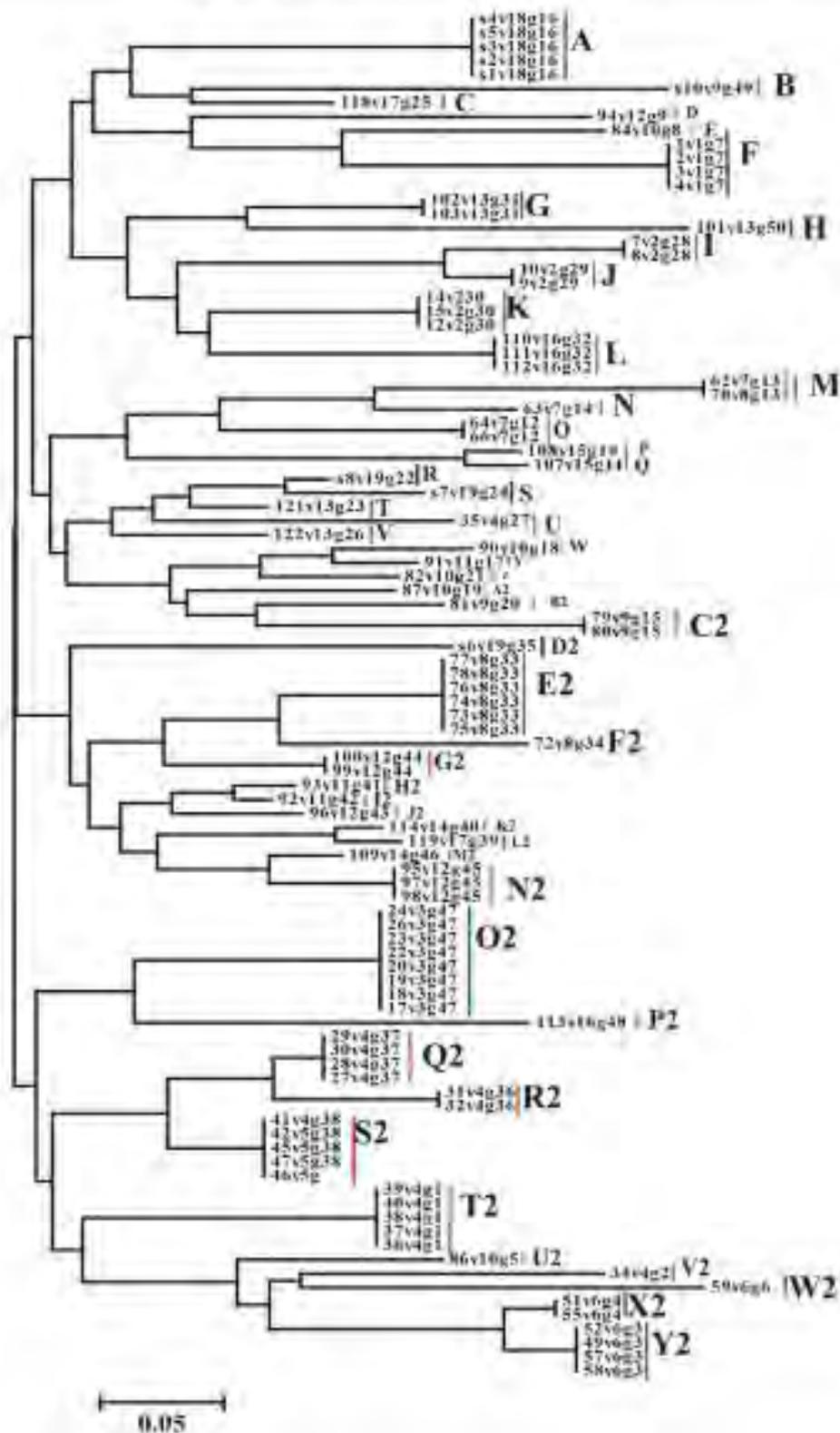


Figura 9. Neighbor Joining (MEGA) mediante el índice de Jaccard (FAMD) de GML de Venados con etiqueta (el primer número indica individuo, el número con la letra “v” indica el macollo y la letra “g” el genotipo) cada letra mayúscula representa un GML distinto.

**NJ; Población San Bernardo**

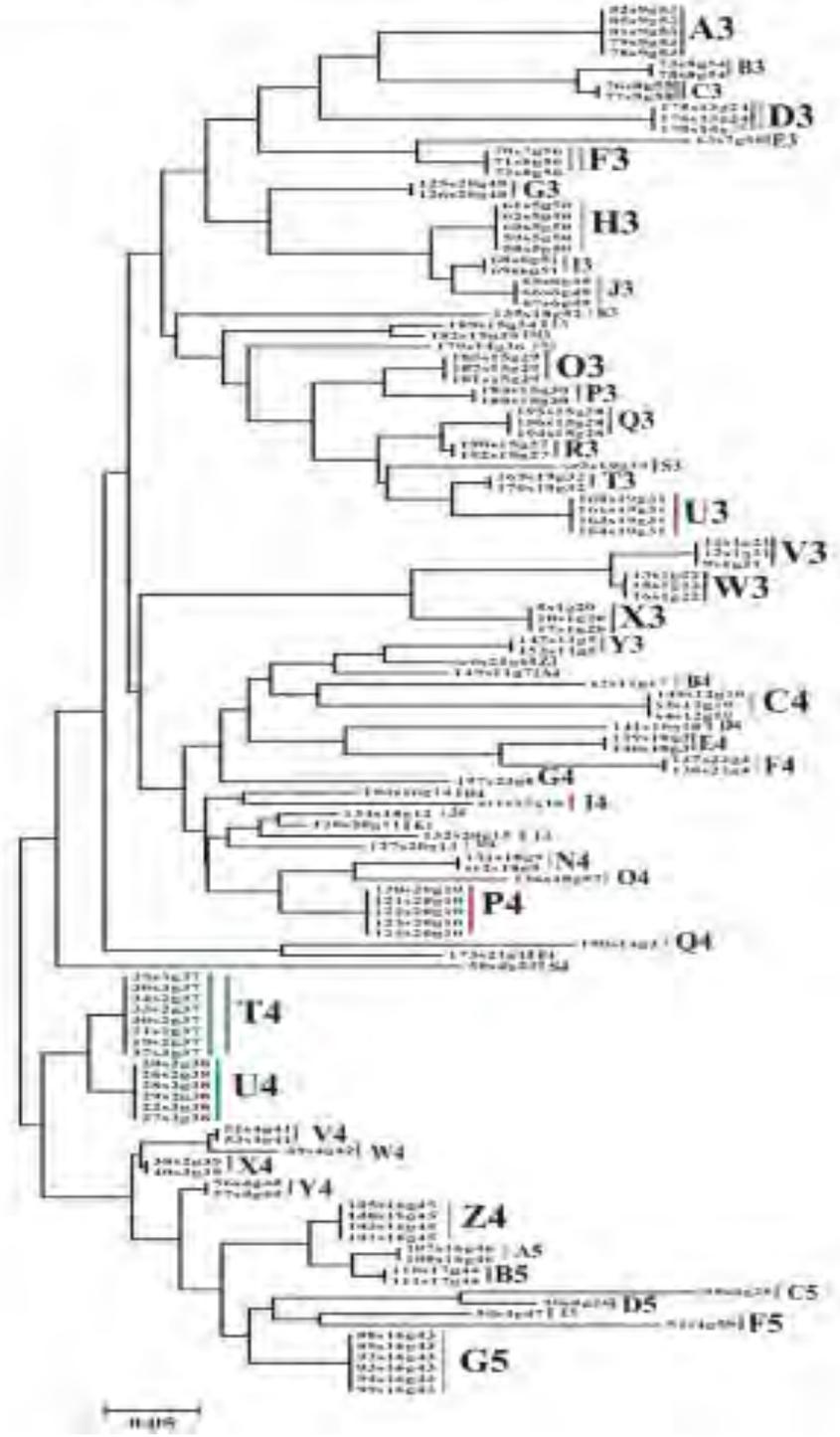


Figura 10. Neighbor Joining (MEGA) mediante el índice de Jaccard (FAMD) de GML de San Bernardo con etiqueta (el primer número indica individuo, el número con la letra “s” indica el macollo y la letra “g” el genotipo) cada letra mayúscula representa un GML distinto.

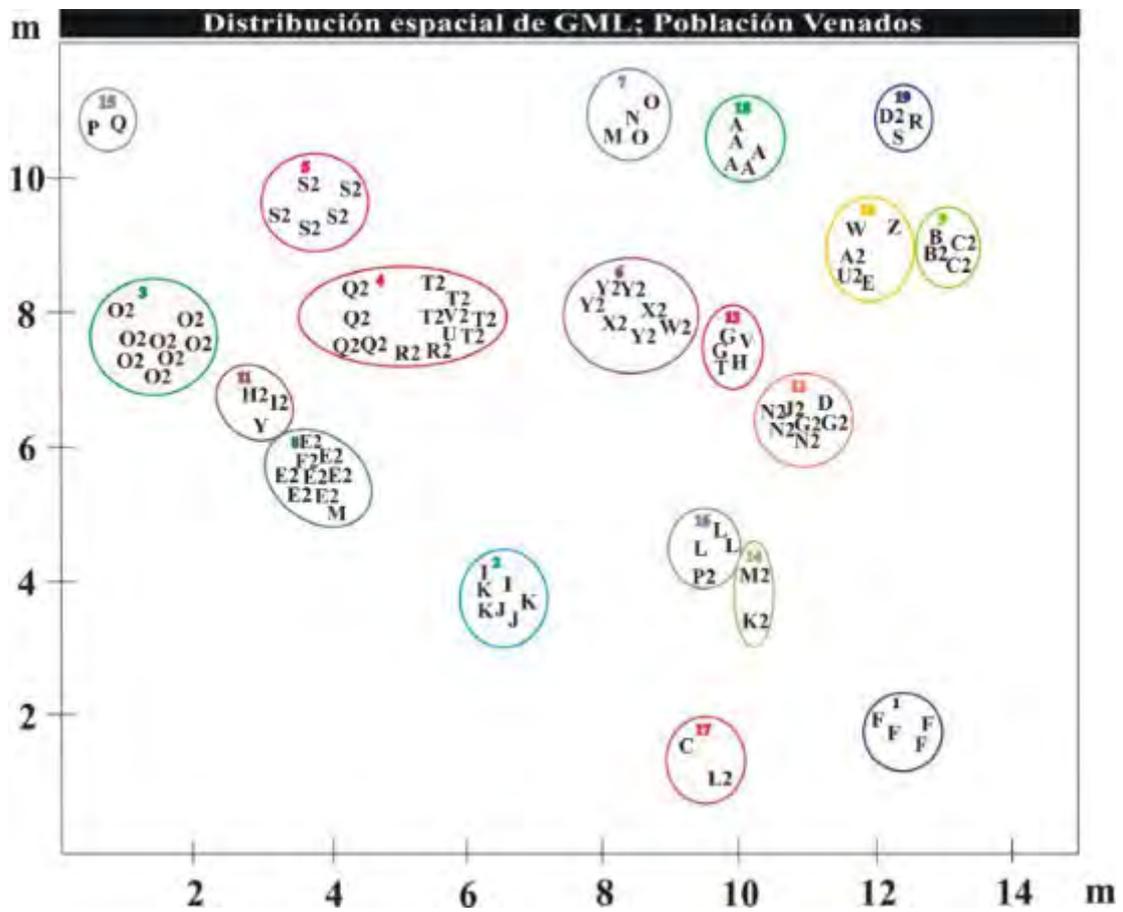


Figura 11. Mapa de la distribución espacial de los GML en la parcela de Venados. Los círculos indican los macollos observados en el campo y las letras los GML detectados.

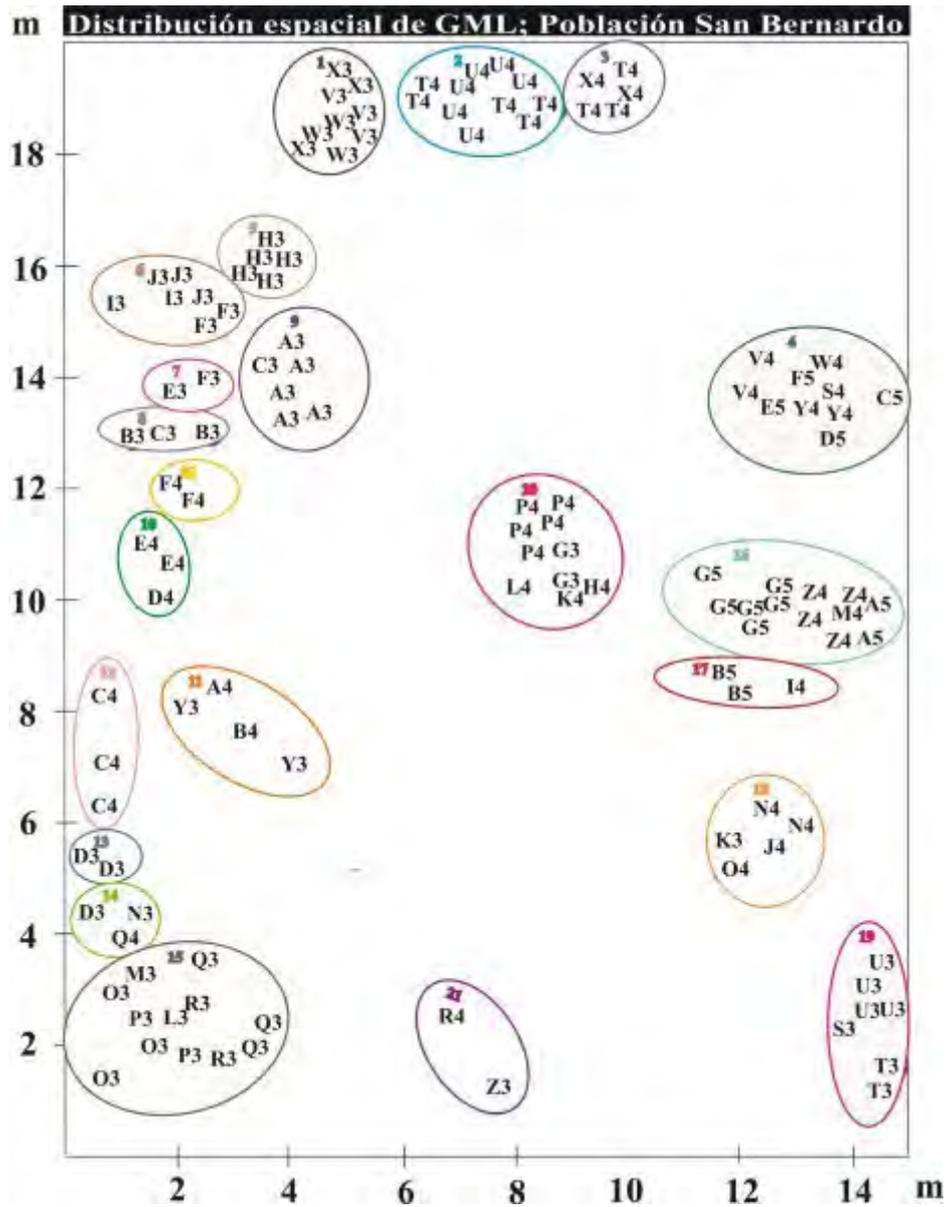
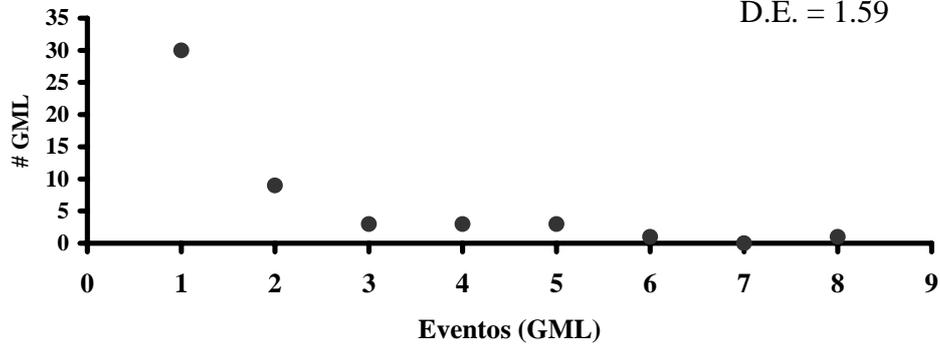


Figura 12. Mapa de la distribución espacial de los GML en la parcela de San Bernardo. Los círculos indican los macollos observados en el campo y los símbolos los GML detectados.

a)

**Frecuencia de GML población Venados**

$\bar{x} = 1.96$   
D.E. = 1.59



b)

**Frecuencia de GML población San Bernardo**

$\bar{x} = 2.22$   
D.E. = 1.52

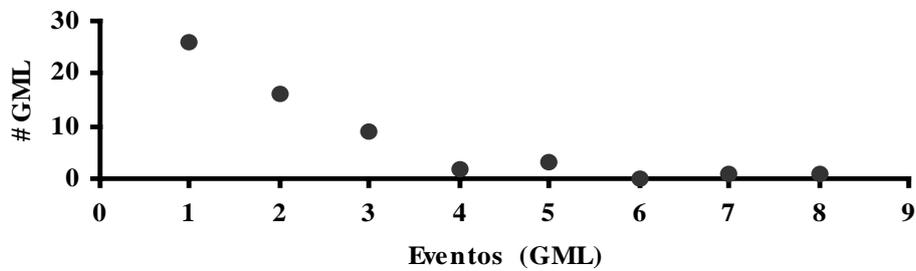
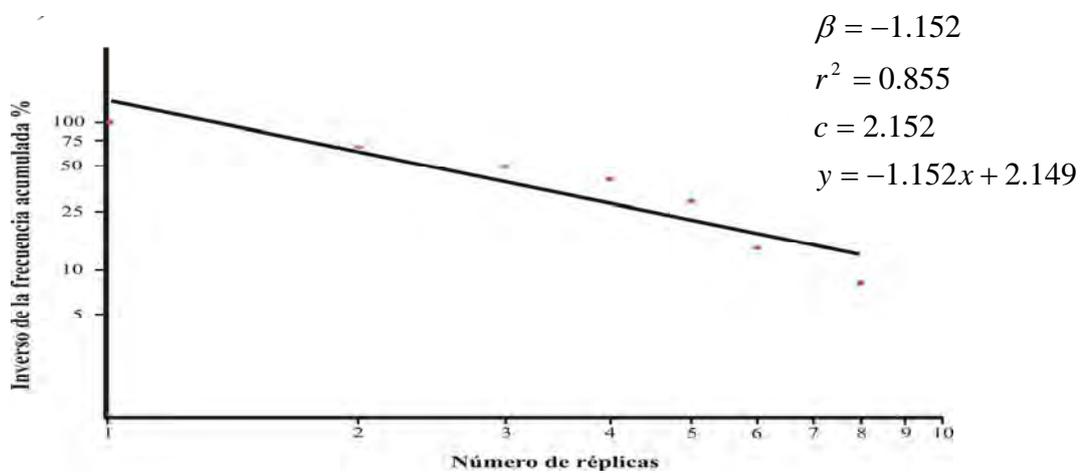


Figura 13. Histograma de frecuencia de los Genotipos Multilocus (GML) en Venados (a) donde se encontraron 50 genotipos de 98 individuos y San Bernardo (b) donde se encontraron 58 genotipos en 128 individuos.  $\bar{x}$  indica el promedio del tamaño de las clonas y D.E. su desviación estándar.

Por otro lado, la prueba de Pareto (Apéndice IV; Figura 14) muestra que los datos de las poblaciones analizadas se ajustan relativamente bien a este modelo de distribución ( $r^2 = 0.855$  en Venados y  $r^2 = 0.85$  en San Bernardo). Los valores de  $c$  indican que la probabilidad de presentar individuos conforme aumenta el tamaño de clase disminuye con una tasa de 2 ( $c=2.15$  en Venados y  $c=2.25$  en San Bernardo) entre clases. Esta tasa de disminución se observa de manera logarítmica con el valor de la pendiente  $\beta$  ( $\beta=1.15$  en Venados y  $\beta=1.25$  en San Bernardo) indicando la distribución sesgada en la repartición de los ramets entre genets y mostrando el comportamiento similar en las dos poblaciones.

a)



b)

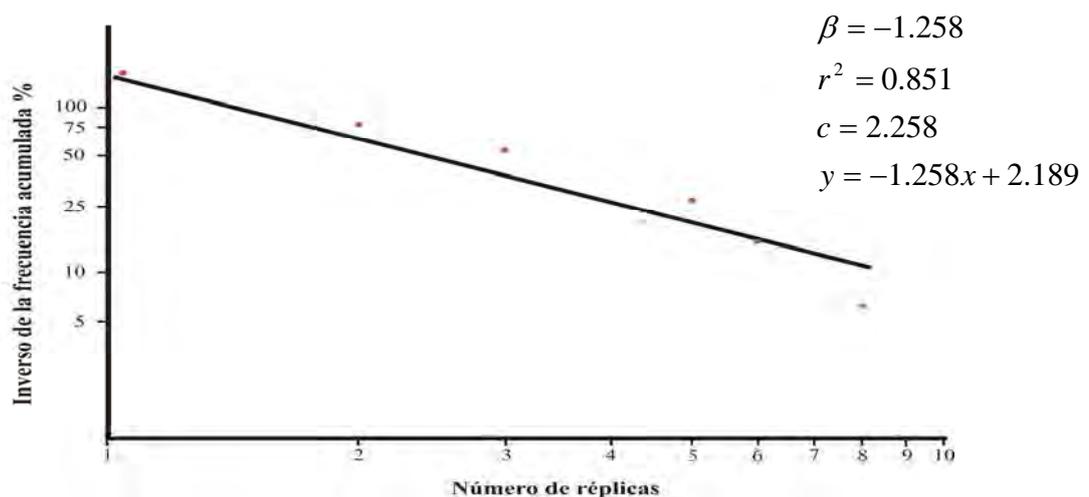


Figura 14. Prueba de Pareto de la frecuencia de GML para las poblaciones a) Venados y b) San Bernardo.

Los dos ejes se encuentran en escala  $\log$ ;  $\beta$  indica el valor de la pendiente,  $r^2$  la significancia y  $c$  la disminución de probabilidad de presentar individuos conforme se aumentan las clases, se presenta la ecuación de la recta.

## Diversidad clonal

En la Tabla 4 se presentan los valores de índices de diversidad de GML en ambas poblaciones. Se observa que el índice de Diversidad de Simpson y la equitatividad presentan valores altos, indicando mucha diversidad (baja probabilidad de obtener dos individuos idénticos al azar) de genotipos, sin una clona dominante en particular. El número de linajes clonales aparentes  $\left(\frac{1}{\lambda}\right)$  obtenido a partir con el recíproco del índice de Simpson mostró valores similares al número de GML observados. El índice de proporción genotípica ( $G/N$ ) muestra valores cercanos a 0.5 (0.51 para Venados y 0.45 para San Bernardo), indicando que en ambas poblaciones al menos 1 de cada 2 genotipos se encuentra repetido al menos una vez.

Tabla 4. Índices de diversidad de las poblaciones estudiadas.

Población	$N$	$G$	$G/N$	$D$	$\frac{1}{\lambda}$	$E$
Venados	98	50	0.51	0.977	43.47	0.945
San Bernardo	128	58	0.45	0.982	55.55	0.972
Todas	226	108	0.48	0.990	100	0.981

$N$  es el número de individuos;  $G$  el número de genotipos multilocus (GML);  $G/N$ = proporción genotípica;  $D$ =diversidad de Simpson;  $1/\lambda$ = número de linajes clonales aparentes y  $E$ =equitatividad.

## Variación Genética

En la Tabla 5 se presentan los valores de *Heterocigosis esperada* ( $H_E$ ) y de polimorfismo (con criterio del 95%) para las poblaciones juntas y por separado. Se observan altos niveles de  $H_E$  y  $P$ . Las frecuencias alélicas por loci y  $H_E$  se presentan en el Apéndice VI.

Tabla 5. Heterocigosis esperada y polimorfismo con criterio del 95% de cada población y del total de individuos analizados en este trabajo.

<b>Población</b>	$H_E$	$Var(H_E)$	$P_{(95\%)}$	$Var [P_{(95\%)}]$
Venados	0.388	0.0005	0.800	0.031
San Bernardo	0.395	0.0003	0.833	0.028
Todas	0.407	0.0003	0.933	0.111

$H_E$  representa el valor de heterocigosis esperada y  $var(H_E)$  su varianza,  $P_{(95\%)}$  el polimorfismo al 95% y  $var[P_{95\%}]$  su varianza

### Estructura poblacional

Los valores de significancia obtenidos con la prueba exacta de Fisher (Apéndice VII) muestran que en la mayoría de los loci entre Venados y San Bernardo, las frecuencias alélicas son significativamente distintas entre las dos poblaciones ( $p < 0.05$  para 18 de 30 loci) y en mayor medida dentro de las poblaciones ( $p < 0.05$  para 24 loci de Venados y 28 de San Bernardo). Los valores de diferenciación  $\theta$  obtenidos al interior las poblaciones de San Bernardo y Venados considerando a los macollos como subpoblaciones, indican mayor diferenciación entre los macollos al interior de las poblaciones ( $\theta = 0.64$  y  $\theta = 0.70$  para Venados y San Bernardo respectivamente) que entre las poblaciones ( $\theta = 0.07$ ) (Tabla 6). En el mismo sentido, el AMOVA (Tabla 7) indicó que tan sólo el 6.49% de la variación se explica por diferencias entre las poblaciones de San Bernardo y Venados mientras que el 60.7% de la variación se encuentra en los macollos de las dos poblaciones y el 32.81% dentro de cada una de las poblaciones.

Los valores de los índices análogos a los estadísticos  $F$  fueron de  $F_{SC} \approx F_{IS} = 0.649$ ,  $F_{ST} = 0.672$  y  $F_{CT} \approx F_{IT} = 0.064$ .

Tabla 6. Valores de  $\theta$  y  $Nm$  para las poblaciones y sus subgrupos

<b>Población</b>	$\theta$	$Nm$	$N_{subpop}$
Venados	0.6438 (0.5887-0.6944)	0.158	19
San Bernardo	0.7045 (0.6700-0.7413)	0.123	22
Todas	0.0710 (0.0343-0.1174)	2.275	2

$\theta$  indica el índice de Cockerham,  $Nm$  el número de migrantes por generación ( $N_m = [(1/\theta) - 1] / 4$ , Reisch y Kellermeier, 2007) y  $N_{subpop}$  que indica el número de macollos en cada población.

Tabla 7. Análisis de la varianza molecular (AMOVA, Excoffier *et al*, 1992).  $P < 0.05$

<b>Fuente de la variación</b>	<b>g.l.</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Varianza de los componentes</b>	<b>Porcentaje de la variación</b>
Entre poblaciones	1	58,373	0,31938	6,49%
Entre poblaciones dentro de grupos	40	696,723	2,98733	60,70%
Dentro de poblaciones	184	297,138	1,61488	32,81%
Total	225	1052,235	4,92	100%

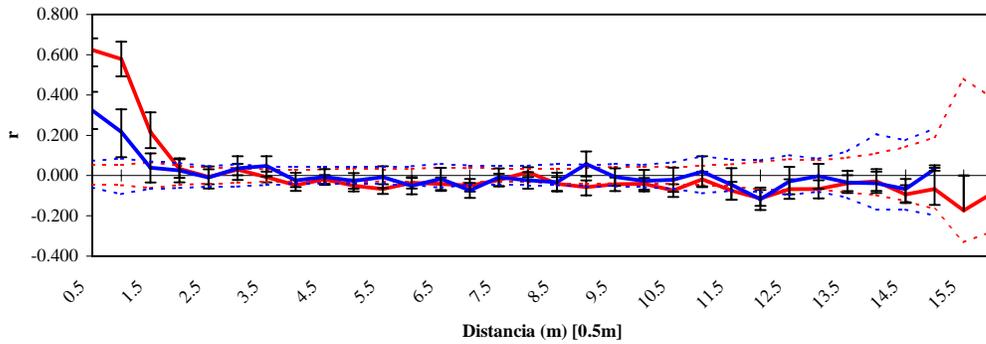
### **Análisis de autocorrelación espacial**

La prueba de Mantel que se hizo entre los individuos de cada población mostró una ligera pero significativa relación positiva entre las matrices de distancia genética y geográfica (Venados:  $r^2 = 0.0716$ ,  $P < 0.001$  y San Bernardo:  $r^2 = 0.0709$ ,  $P < 0.001$ ).

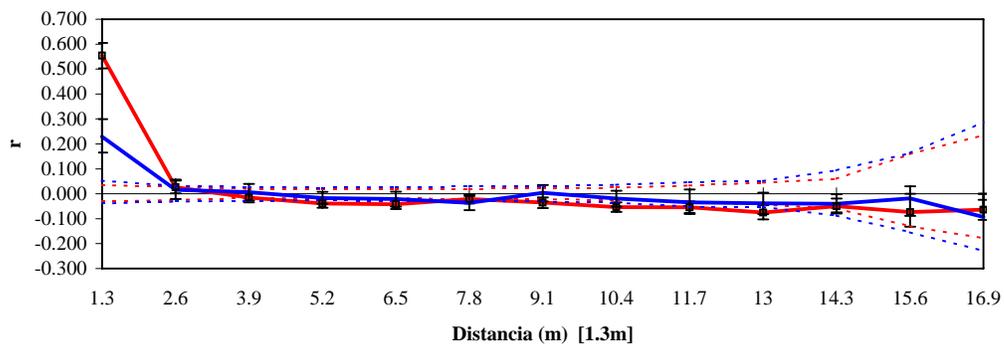
Los correlogramas del análisis global para las dos poblaciones (Figura 15 y 16; Apéndice VIII) muestran que sólo en los primeros metros de distancia existe autocorrelación positiva en la estructura genética, donde el índice “ $r$ ” presentó valores positivos. En Venados se observa que hasta antes de los 2.5 m de distancia, el valor de “ $r$ ” es positivo, mientras que en San Bernardo lo es hasta los primeros 3.5 m de distancia. Después de esos 3 primeros metros de distancia, el valor de “ $r$ ” se hace cercano a cero y negativo en la distancia máxima. Los resultados del análisis eliminando a los genotipos clonales permite observar valores iniciales de menor magnitud del coeficiente “ $r$ ”, sin embargo, se observa que éste se vuelve cero en la misma clase de distancia que para el análisis completo. El conteo de bandas compartidas (Apéndice IX) mostró que el número de loci compartidos entre distintos GML fue de máximo 29 y mínimo 13.

### Correlogramas (Global); Venados

a)



b)



c)

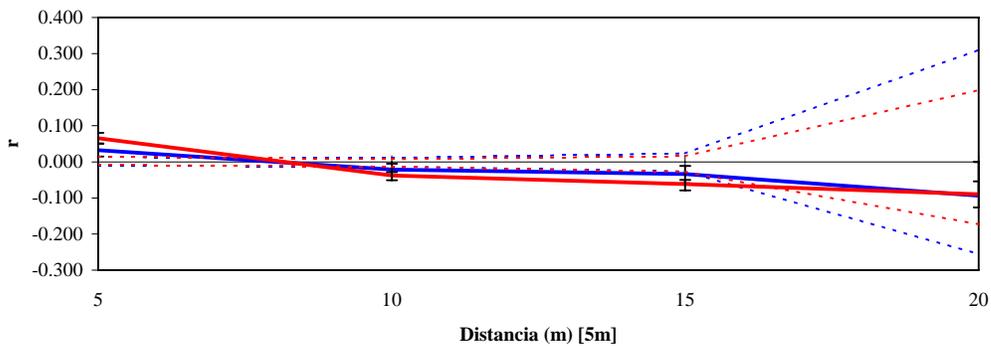
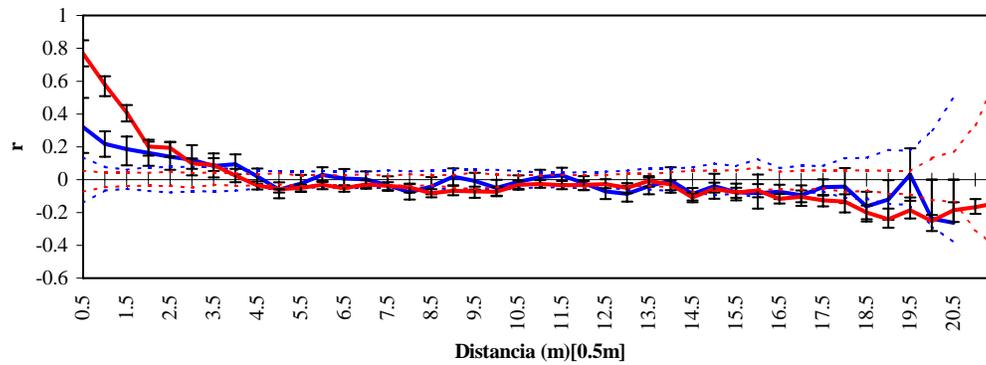


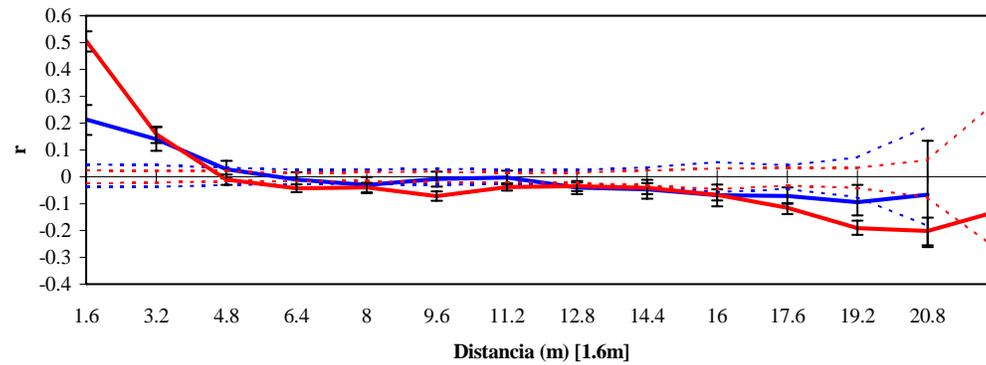
Figura 15. Correlograma de población Venados, en rojo todos los individuos y en azul GML únicos. a) clases de 0.5m b) 1.3 m (clases determinadas con el criterio de Sturges para distribuciones normales) 7 c) 5m. Se presentan el intervalo de confianza de 95%.

Correlogramas (Global); San Bernardo

a)



b)



c)

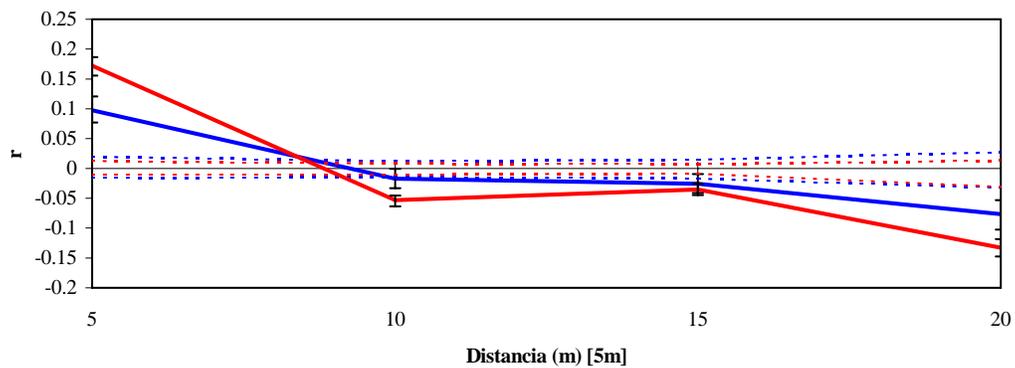


Figura 16. Correlograma de población San Bernardo, en rojo todos los individuos y en azul GML únicos a) clases de 0.5m b) 1.6 m (clases determinadas con el criterio de Sturges para distribuciones normales) 7 c) 5m. Se presentan el intervalo de confianza de 95%.

## **DISCUSIÓN**

### **ISSR como marcador para identificar GML**

Los iniciadores 811 y 846 fueron utilizados en *A. striata* por Trejo (2006) quien encontró 17 y 16 loci respectivamente y Rocha (2006) que reportó 17 y 22 loci para los mismos. En este trabajo se encontraron 14 loci para el marcador 811 y 16 para el 846. No todos los loci de este estudio coincidieron con los reportados por Trejo (2006), estas diferencias pueden atribuirse a la metodología utilizada en la electroforesis, que provocaron una resolución distinta en los geles, especialmente en la región de alto peso molecular. También es posible que algunos de los loci de este estudio sean nuevos, pues una de las poblaciones no es parte de las poblaciones que Trejo (2006) analizó.

De manera general los ISSR representan una técnica de bajo costo y de fácil montaje que permite distinguir una gran cantidad de loci polimórficos, útil para el análisis de diversidad genética. Sin embargo, en la práctica estos marcadores presentan ciertos inconvenientes, pues son muy sensibles a contaminarse y la detección del polimorfismo mediante geles de electroforesis tiene un componente de subjetividad, ya que determinar el peso molecular de los loci depende del observador (Scheinvar, 2008).

### **Caracterización de GML**

Si bien los ISSR presentan la desventaja de ser marcadores dominantes, resultaron ser adecuados para los objetivos de este trabajo, pues al ser aleatorios e hipervariables han permitido conducir el análisis de autocorrelación espacial. Como muestra la curva de acumulación de loci, el número de loci encontrados fue suficiente para caracterizar a los GML observados.

Por los bajos valores obtenidos de  $P_{SEX}$  (la probabilidad de ser idéntico como resultado de apareamiento sexual, Arnaud-Haond *et al.*, 2007), se consideró que los genotipos idénticos son resultado de eventos de clonalidad, y dado que siempre se encontraban juntos, es

probable que entre ellos únicamente ocurra propagación mediante ramificación axilar. Esta distribución agregada de los individuos del mismo genet corresponde con la arquitectura clonal de “falange”, en la que los ramets del mismo genotipo están separados por internodos pequeños provocando mosaicos de agrupamientos de ramets idénticos (Lovett-Doust, 1981). Se piensa que este crecimiento optimiza la captura de recursos y de espacio (de Kroon *et al.*, 1994), y que debido al agrupamiento de genotipos idénticos se incrementa la probabilidad de polinización geitonógama (cuando la polinización ocurre entre flores del mismo individuo) (Honnay y Jacquemyn, 2008).

Los datos de Rocha *et al* (2006) sugieren que *A. striata* pudiera encontrarse bajo el efecto de depresión por endogamia, evidente en los experimentos de autofertilización. En el presente trabajo se observaron poblaciones con altos valores de diversidad y grupos clonales que son distintos entre si. Esto sugiere que la arquitectura clonal de la especie no ha tenido efecto en la disponibilidad de entrecruzamientos, siendo posible además mantener a estas poblaciones de *A. striata* en un balance demográfico en el que tanto la reproducción sexual y la clonal se presentan en proporciones semejantes (según el valor  $G/N = 0.5$ ), lo que ha permitido que estas poblaciones alcancen una densidad poblacional de 0.6 individuos/m<sup>2</sup>.

### **Diversidad Clonal**

El índice de proporción de genotipos distinguibles ( $G/N$ ) mostró que al menos una tercera parte de los individuos de estas poblaciones son resultado de propagación vegetativa, pues al ser este valor cercano a 0.5, sabemos que la mitad de los individuos tienen al menos una réplica genética en las poblaciones analizadas.

Eriksson (1993) observó que en especies clonales perennes (de larga vida) con bajo reclutamiento sexual, se presentan genotipos particulares que parecen más “exitosos” que otros. Él propone que esta dominancia de ciertos genotipos puede desplazar a aquéllos que son menos competitivos en algunos años. Pues los genets se favorecen cuando los ramets

individuales se especializan en el uso de recursos localmente abundantes si hay interdependencia fisiológica entre ellos y no hay algún recurso limitado que provoque competencia entre ramets (Eckert, 1999). Esto puede provocar que la diversidad clonal decrezca y se formen grupos monogenéticos al paso del tiempo.

En las poblaciones de *A. striata* analizadas se observan macollos monoclonales ( $G/N \approx 0$ ) y macollos con muchos genotipos ( $G/N \approx 1$ ). Los macollos que presentan genotipos predominantes (Apéndice II), recuerdan las observaciones de Eriksson (1993) en las que hay ciertos genotipos predominantes que desplazan a otros por ser más exitosos bajo ciertas condiciones físicas. Sin embargo, para poder afirmar que en *A. striata* este fenómeno sea un efecto de la colonización en la que el genotipo dominante sea más exitoso que los demás, como sugiere Eriksson (1993), se requeriría evaluar a la población bajo ciertas condiciones físicas, y hacer el análisis incluyendo datos demográficos que permitan conocer la dinámica de la propagación de genets en el tiempo. Por otro lado, los grupos que son muy diversos pueden funcionar como bancos de variación que pueden aumentar la probabilidad de sobrevivencia cuando ocurren cambios ambientales. La presencia de esos dos tipos de grupos hacen que las poblaciones de *A. striata* tengan una alta diversidad genética y estrategias que aumentan su probabilidad de permanencia.

Diversos estudios han mostrado que en especies clonales hay diferencias en la cantidad de clonalidad entre poblaciones según se presenten diferencias físicas entre éstas (i.e., zonas de disturbio y conservadas, diferencia en cantidad de sales, etc) (Kuhdo *et al.*, 1999; Stehlik y Holderegger, 2000; Franks *et al.*, 2004). Estos estudios indican que bajo estas condiciones la propagación clonal se ve favorecida. En este estudio no se midieron parámetros ambientales de las poblaciones, por lo que no es posible encontrar algún factor fundamental que promueva la propagación vegetativa clonal. La única diferencia apreciable entre las poblaciones es la pendiente pronunciada en San Bernardo, sin embargo las posibles diferencias entre éstas parecen no tener efecto en la diversidad genética dado que las poblaciones presentaron valores similares de  $G/N$ .

Honnay y Jacquemyn (2008) analizaron diversos estudios en los que se calculó el cociente ( $G/N$ ) y observan que uno de los factores que lo afectan son el tipo de marcador utilizado y el número de loci polimórficos, por lo que sugieren hacer comparaciones entre especies con marcadores semejantes. Podría esperarse que el tipo de marcador pudiera no tener efecto si se utilizara el número suficiente de loci polimórficos para calcular el G, como en este estudio. Por lo anterior, se hace una comparación de los resultados de *A. striata* con los de especies que fueron analizadas con marcadores dominantes.

El valor obtenido de la proporción de genotipos distinguibles ( $G/N$ ) fue similar al promedio obtenido por Honnay y Jacquemyn (2008) a partir de 25 análisis de clonalidad hechos con ISSR, RAPD o AFLP ( $G/N = 0.53$ ). También es parecido al de la *Ferocactus robustus* ( $G/N = 0.44$ ) (Carrillo, 2006), que se multiplica mediante ramificaciones de la base del tallo que se enraizan con el tiempo y *Stenocereus eruca*  $G/N = 0.39$  (Clark-Tapia *et al.*, 2005) de la familia Cactaceae o a los obtenidos en análisis de microescala realizados con *Dysosma pleiantha*, *Prunus avium* y *Fagus grandifolia* (Tabla 8) que son capaces de reproducirse de manera sexual y asexual. La autocorrelación espacial en *P. avium* y *F. grandifolia* reveló que son especies con baja dispersión, por lo que *A. striata* puede considerarse como una especie de reproducción sexual y clonal con baja dispersión de semillas. Esto se puede observar en los análisis de *Neighbor Joining* (Figura 9 y 10) y los correlogramas (Figura 15 y 16) en los que se hace evidente que generalmente los individuos con mayor relación genética se presentan espacialmente asociados y pueden reflejar la baja dispersión de semillas, dado que cada macollo es distinto de su vecino y además sólo se encuentra relación genética en los primeros 3 metros de distancia, lo que coincide con el tamaño de los macollos observados en el campo.

Se ha propuesto que la propagación clonal se asocia con bajas frecuencias de reclutamiento sexual (Eckert, 1999). El valor obtenido de ( $G/N$ ) para *A. striata* indica que en esta especie el reclutamiento sexual no es deficiente. Si se considera que decrece el establecimiento de

frutos y semillas cuando hay autopolinización, entonces la diversidad observada en estas poblaciones es posiblemente cercana a la máxima probable, ya que es determinada por la cantidad de entrecruzas. Considerando que *A. striata* puede sufrir depresión por endogamia, es probable que si en el campo llegan a ocurrir autocruzas, los frutos de éstas no sean exitosos, por lo que se establecerán sólo aquellos frutos de origen exogámico. Así se producirá la alta diversidad observada en estas poblaciones y siendo esta la probable causa de la diferenciación entre los macollos que se discutirá con más detalle adelante.

El índice de diversidad de Simpson ( $D$ ) resultó cercano a 1 para las dos poblaciones, esto indica que la probabilidad de tomar aleatoriamente dos individuos que sean idénticos al azar es baja. Así que, para esta especie no es necesario colectar individuos muy alejados para evitar muestrear clonas cuando se busca analizar la diversidad clonal global de las poblaciones. Los altos valores de equitatividad indican que no hay genotipos dominantes en la población muestreada, sin embargo, el que este valor no sea 1 refleja que los genotipos idénticos se presentan con una distribución agregada. Estas poblaciones de *A. striata* pueden catalogarse como multiclonales (Ellstrand y Roose, 1987), muy diversas y de GML locales.

El estudio realizado por Honnay y Jacquemyn (2008) en el que se comparó la diversidad genética de 77 especies clonales, encontró que las especies auto-incompatibles presentan de manera general una diversidad menor y una distribución menos equitativa ( $D=0.76\pm 0.04$  y  $E=0.67\pm 0.05$ ) en comparación con las que son auto-compatibles ( $D=0.86\pm 0.02$  y  $E=0.77\pm 0.03$ ). La disminución en la diversidad genotípica de las especies auto-incompatibles se asocia a una menor disponibilidad de apareamientos. Los valores de proporción de genotipos distinguibles de *A. striata* caen dentro de los obtenidos por Honnay y Jacquemyn (1998) para especies auto-compatibles, en cuanto a equitatividad y diversidad de Simpson, esto sugiere que *A. striata* es una especie auto-compatibile confirmando los datos de los experimentos de polinización de Rocha (2006).

**Tabla 8.** Análisis de diversidad clonal y autocorrelación espacial en otras especies

<b>Especie</b>	<b>Familia</b>	<b>MDVM</b>	<b>G/N</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>Pobs</b>	<b>Cuadrantes</b>	<b>individuo</b>
<i>Primula minima</i>	Primulaceae	AFLP	1	-	-	1	9m <sup>2</sup> /144	86
<i>Potamogeton pectinatus</i>	Potamogetonaceae	RAPDs	0.76	0.99	-	1	2	128
<i>Eichornia crassipes</i>	Pontederiaceae	RAPDs	0.070-0.116	0.42-0.626	0.56-0.76	5	1 de 20m <sup>2</sup>	43 en 1 y 37 en 1
<i>Ferocactus Robustus</i>	Cactaceae	RAPDs	0.4	0.98	-	1	1	217
<i>Stenocereus eruca</i>	Cactaceae	RAPDs	0.38	0.94	-	1	600m <sup>2</sup>	282
<i>Ilex leucoclada</i>	Aquifoliaceae	RAPDs	0.245	0.937	0.915	1	1	2013
<i>Mikania micrantha</i>	Asteraceae	ISSR	0.7	0.957	0.77	1	1	20
<i>Dyosma Pleiantha</i>	Berberidaceae	ISSR	0.51(0.2-0.597)	0.73(0.73-0.99)	-	3	3	113
<i>Agave striata</i>	Agavaceae	ISSR	0.45-0.51	0.977-0.982	0.94-0.97	2	2	226
<i>Fagus grandifolia</i>	Fagaceae	ISSR	0.42-1	-	-	5	1 de 20m <sup>2</sup>	123
<i>Echinophora koreensis</i>	Fabaceae	ISSR	0.39 y 0.38	-	-	2	120m <sup>2</sup>	150y 136
<i>Cuscuta campestris</i>	Convolvulaceae	ISSR	0.2	0.763	0.947	1	1	20
<i>Anemone nemerosa</i>	Ranunculaceae	Isoenzimas	0.8-1	-	-	20	16m (tramsecto)	30por pob
<i>Utiola paniculata</i>	Poaceae	Isoenzimas	0.3-0.263	0.064-0.851	-	2	8 de 64m <sup>2</sup>	60 por cuad.
<i>Uvularia perfoliata</i>	Liliaceae	Isoenzimas	0.03-0.16	0.68-0.82	-	1	4	753
<i>Prunus avium</i>	Rosaceae	Microsatélites	0.446	-	-	2	1	551
<i>Salix herbaceae</i>	Salicaceae	Microsatélites	0.18	-	-	1	9m <sup>2</sup> /144	132

Especie	Genets	%P	$H_E$	Loci	$F_{ST}$	autocorrelación	Propagación y reproducción		Referencia
							cruzamiento	reproducción	
<i>Primula minima</i>	84	60.9 %	0.22	3	0.18	-	E	Estolón-propág. ¿?	Reisch y Kellermeier (2007)
<i>Potamogeton pectinatus</i>	97	-	-	7	-	-	E+A	Propágulo ¿?	Hangelbroek et al (2002)
<i>Eichornia crassipes</i>	3.8 en promedio	31%	-	69	-	-	E	Estolón-propág. Sex+veg	Ren y Zhang (2007)
<i>Ferocactus robustus</i>	116	-	-	37	-	-	¿?		Carrillo (2006)
<i>Stenocereus eruca</i>	107	98%	0.359	6	0.337	7m	¿?	Fragmentos ¿?	Clark-Tapia et al (2005)
<i>Ilex leucoclada</i>	156	-	-	10	-	-	¿?	Esquejes Sex+veg	Torimaru y Tomaru (2005)
<i>Mikania micrantha</i>	14	-	-	123	-	2m	A	Estolón-propág. ¿?	Li y Dong (2008)
<i>Dyosma Pleiantha</i>	45	-	-	12	-	-	E	Propágulo ¿?	Zong et al (2008)
<i>Agave striata</i>	108	0.8	0.388 y 0.395	30	0.67	3 y 4.5 m	E+A	Bulbilos sex+veg	Este estudio
<i>Fagus grandifolia</i>	100	45.8% - 91.7%	-	-	-	15m	¿?	Estolón Sex+veg	Morris et al (2004)
<i>Echinosophora koreensis</i>	59 y 52	80.5% y 87.9%	0.18 y 0.22	41	0.22	-	¿?	Rizomas Sex+veg	Chung et al (2006)
<i>Cuscuta campestris</i>	4	-	-	136	-	2m	A	Estolón ¿?	Li y Dong (2008)
<i>Anemone nemerosa</i>	24 por pob.	93%	0.49-0.73	14	-	-	¿?	Rizomas ¿?	Stehlik y Holderegger (2000)
<i>Uniola paniculata</i>	2-13	77.5 %	-	27	0.304	-	E	Rizomas Sex-veg	Franks et al (2004)
<i>Uvularia perfoliata</i>	41	-	-	22	-	0.2m	¿?	Estolón Sex+veg	Kuhdo et al (1999)
<i>Prunus avium</i>	246	-	0.71	13	0.022	200m	¿?	Propágulo Sex+veg	Vaughan et al (2007)
<i>Salix herbaceae</i>	24	-	-	6	-	-	¿?	Rizomas ¿?	Reisch et al (2007)

MDVM= método de detección de variación molecular; G/N=proporción de genotipos distintos; D=Diversidad de simpson; Pobs=número de poblaciones analizadas; en cruzamiento “E” indica entrecruzamiento y “A” autocruzamiento.

## Variación genética

Las especies de plantas con altos valores de diversidad genética dentro de sus poblaciones usualmente se caracterizan por ser longevas, con grandes tamaños poblacionales, entrecruzamiento, amplia distribución y hábitats de estadios sucesionales tardíos (Loveless y Hamrick, 1984). Estas características se han confirmado para *A. striata*, excepto la del estadio sucesional del ecosistema.

Los estudios previos de genética de poblaciones realizados en el género *Agave* con ISSR y RAPDs (Apéndice X) indican valores altos de diversidad con valores promedio de heterocigosis esperada y porcentaje de polimorfismo de 0.22 y 72.6% respectivamente para todo el grupo (Scheinvar, 2008). En este trabajo se observaron valores de *Heterocigosis esperada* ( $H_E$ ) y *polimorfismo* (%P) mayores que los observados por Rocha (2006) y Trejo (2006). Los altos valores de variación en este trabajo son acordes a los resultados del análisis de AMOVA de Rocha y Trejo, en los que se observa que la mayor proporción de la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones ( $\theta=0.103$  en Rocha (2006) y  $\theta=0.1922$  en Trejo (2006)). Así, en el trabajo presente, se observan altos valores de variación porque se ha logrado recuperar toda la variación intrapoblacional.

Este fenómeno se observó también en el estudio realizado por Clark-Tapia *et al.* (2005) en el que se realizó el análisis a microescala con un mayor número de individuos y presentó un valor más alto de  $H_E$ .

## Estructura poblacional

En los análisis de clonalidad, el índice  $F_{IS}$  es el más informativo, ya que mide la desviación de las proporciones alélicas que habría si sucediera apareamiento al azar dentro de las subpoblaciones. Bajo condiciones de reproducción clonal total se puede esperar una reducción en la diversidad genotípica y que  $F_{IS}$  tome valores negativos (exceso de heterocigos) y una diferenciación poblacional reducida debido a que la deriva genética no actúa como se esperaría debido al gran tamaño poblacional. Pues como mostraron las

simulaciones de Balloux *et al.* (2003), la reproducción totalmente clonal puede mantener un mayor número de alelos en loci neutrales de una población, además los dos alelos de cada loci pueden comportarse como dos loci haploides, manteniendo así la diversidad alélica en cada locus con una cantidad pequeña de genotipos y un número alto de heterocigos. En los casos en los que hay reproducción clonal y sexual, las consecuencias genéticas poblacionales pueden ser similares a las poblaciones estrictamente sexuales (Balloux, 2004; Halkett *et al.*, 2005; Gaudeul *et al.*, 2007). El valor de  $\Phi_{SC}$  fue positivo, indicando un déficit en el número de heterocigotos respecto a lo esperado en clonalidad y reflejando la sexualidad parcial de *A. striata*.

Los valores que se obtuvieron en la partición de la variación genética mediante el AMOVA ( $Nm=2.25$ ) indican la existencia de fenómenos que mantienen a las poblaciones similares, y que muy probablemente ocurra polinización a larga distancia, por lo que hay poca diferenciación entre las dos poblaciones. Esta estimación del flujo genético fue similar en los trabajos de Rocha (2006) y Trejo (2006).

Por otro lado, la mayor parte de la variación se explica por las diferencias dentro de los grupos de las poblaciones; esta variación indica que los macollos que se observan en el campo no son totalmente clonales, pero que sí tienen tal cohesión genética que forman agrupaciones naturales de relación genética que pueden observarse en el campo y que tienen un alto grado de diferenciación con respecto a los grupos vecinos.

Si hay polinización entre grandes distancias, los individuos de origen sexual serán distintos de sus vecinos, debido a que las semillas no se dispersan a grandes distancias de la planta parental, teniendo así la mayor similitud genética con ésta. Después, cuando se presente la propagación vegetativa, el resultado serán grandes grupos muy similares dentro de si y distintos a los grupos vecinos que han sufrido la misma dinámica. La baja dispersión de las plantas también puede ser un efecto de la necesidad de nodricismo que requiere esta especie para el establecimiento de sus plántulas que al presentar metabolismo  $C_3$  tiene requerimientos microambientales de humedad ó intensidad lumínica.

## Autocorrelación espacial

Se ha observado que en los análisis de estructuración espacial de escala fina se presentarán valores de autocorrelación positivos cuando la dispersión de semillas es baja, generando agrupamiento espacial entre los individuos genéticamente relacionados (Barbujani, 1987; Hamrick y Nason, 1996). El análisis de autocorrelación espacial de este trabajo revela que las plantas están emparentadas con individuos que se encuentran a distancias menores de 2.5 m en Venados y 3.5 m en San Bernardo, después de las que el coeficiente  $r$  se hace negativo y se mantiene cercano a cero.

Con el fin de conocer el efecto de las clonas en el coeficiente de correlación, se realizó el análisis eliminando a los genotipos repetidos, en este caso el comportamiento del coeficiente  $r$  no cambió, ya que se hizo cero en la misma distancia que en el análisis con todos los individuos, aunque su valor si disminuyó en las primeras clases de distancia, es este cambio el que refleja el efecto de los grupos clonales. El comportamiento de la curva del coeficiente  $r$  en ambos casos refleja que la distribución a corta distancia de los ramets pudiera ser efecto de la baja dispersión de semillas, que provoca que se formen los grupos de alta relación genética que se corresponden con los macollos que se observan en el campo.

La distancia hasta la que se encontró autocorrelación positiva entre los individuos fue similar a la que se encontró en *Cuscuta campestris* y *Mikania macrantha* (Li y Dong, 2008) que son especies que se propagan vegetativamente mediante estolones, permitiendo saber que las plantas que se propagan vegetativamente mediante alguna estrategia que favorezca la arquitectura de falange, como la ramificación axilar que se observa en *A. striata* podrán presentar autocorrelación positiva genética con facilidad.

En el análisis en el que se eliminaron las clonas también es posible observar la agrupación de los individuos más emparentados, pues se observan valores positivos del coeficiente “ $r$ ”, sin embargo, en la primer clase de distancia, este coeficiente tiene un valor menor comparado con el valor en la misma clase para el análisis completo, mostrando que la

clonalidad influencia significativamente el grado del parentesco en las primeras clases de distancia y que la expansión clonal ocurre de manera local. Trame *et al* (1995) encontraron que en *A. Scotti*, sólo a un metro de distancia se compartía la totalidad de bandas de RAPDs entre individuos.

Además, el coeficiente  $r$  (que es análogo al Índice de Morán (GenAlex 6)) sólo depende de la dispersión y no de la tasa de autofertilización (Epperson, 1990). En *A. striata* aún no se conocen los patrones de dispersión de semillas. Sin embargo, el resultado del análisis de autocorrelación espacial indica que éstas tienen dispersión restringida, lo que es un factor importante, si no es que el principal, que provoca la estructura espacial de grupos de alta relación genética y que son distintos a los grupos vecinos como efecto de la eficiencia en la polinización a distancia. La dispersión de semillas podría ocurrir como en *A. schotti*, que es limitada, ya que las semillas caen en la vecindad de la planta parental cuando las aves o el viento mueven el escapo (Trame *et al.*, 1995). Por otro lado, las plántulas de *A. striata*, por su metabolismo  $C_3$ , pueden verse favorecidas para su establecimiento mediante un efecto nodriza, por lo que es altamente probable que germinen muy cerca de su planta parental.

Por lo tanto, la gran diversidad genética observada en estas poblaciones puede considerarse como un efecto del éxito en el establecimiento de frutos de entrecruza junto con la dispersión eficiente de polen. *A. striata* puede considerarse como una especie con una alta capacidad de dispersión polínica gracias a la capacidad de sus polinizadores para recorrer grandes distancias como los colibríes *Cynanthus latirostris* y *Eugenes fulgens* y murciélagos del género *Leptonycteris* (Trejo, 2007).

## CONCLUSIONES

El presente trabajo permite concluir que:

- Las poblaciones de *A. striata* son multiclonales y altamente diversas, pero con los individuos clonales agregados en el espacio.
- La propagación clonal no es fundamental en esta especie como método reproductivo, sin embargo si afecta de manera fuerte y directa la estructura genética en el espacio.
- La autocorrelación espacial positiva ocurre entre individuos muy cercanos a distancias máximas menores de 10 m.
- Los macollos que se observan en el campo son grupos de alta relación genética
- La expansión clonal ocurre de manera local mediante una colonización de tipo falange
- *A. striata* es una especie clonal con reclutamiento sexual.

## APÉNDICES

### Apéndice I. Poblaciones de los estudios de Rocha (2006) y Trejo (2006)

N	Localidad	N	W
<b>Rocha (2006)</b>			
36	Camino almolón-Gilo, Barranca de Metztlán, Hgo.	20°43.66'	98°53.24'
37	Carretera El salitre-Jilotla, Barranca de Metztlán, Hgo.	20°33.31'	98°44.66'
37	Venados, Barranca de Metztlán, Hgo.	20°28.00'	98°40.75'
40	Camino a la presa Zimapán, Qro.	20°43.10'	98°39.00'
<b>Trejo (2006)</b>			
40	Venados, Barranca de Metztlán, Hgo.	20°28'00"	98°40'45"
47	Zimapán, Hgo.	20°43'16"	99°36'24"
28	Bucareli, Qro.	21°05'06"	99°39'00"
60	Dr. Arroyo, N.L.	23°42'20"	100°08'32"
60	Guadalcazar, S.L.P.	22°38'14"	100°30'22"
60	Matehuala-México, S.L.P.	22°17'46"	100°48'44"

Establecimiento de frutos y semillas de *A. striata*, tomado de Rocha (2005)

<b>Producción natural de frutos y semillas</b>					
Año	Establecimiento de frutos	Establecimiento de semillas	Producción total de frutos	Frutos viables totales	Semillas viables totales por inflorescencia
2001-2002	0,509(0,032)	0,319(0,033)	208(14,5)	37(3,53)	126,756

#### Experimentos de polinización (Valores aproximados)

	<i>Fruit set</i>	Establecimiento de semillas
Autofertilización	0,27	0,15
Fertilización cruzada	0,48	0,42
Control	0,45	0,32

Apéndice II. **Tamaño de los macollos e individuos que contienen.**

Macollo	Diámetro mayor (m)	Diámetro menor (m)	Número de individuos	Número de genotipos
<b>Venados</b>				
1	1.2	0.7	4	1
2	1.2	0.9	7	3
3	1.9	1.8	8	1
4	2.4	1.4	13	5
5	1.5	0.9	5	1
6	1.6	1	7	3
7	1.7	1.2	4	3
8	1.2	1.1	8	2
9	0.7	0.6	4	3
10	1.3	1.1	5	5
11	0.5	0.4	3	2
12	1.1	0.8	7	4
13	0.8	0.7	5	4
14	1	0.4	2	2
15	1.3	4	2	2
16	1.3	0.9	4	2
17	1	0.9	2	2
18	0.9	0.8	5	1
19	0.6	5	3	3
<b>San Bernardo</b>				
1	2.1	1.9	9	3
2	2.6	1.6	11	2
3	1	0.9	5	2
4	2.8	2.5	10	8
5	1	0.9	6	1
6	1.7	1	7	4
7	0.5	0.4	2	1
8	1.8	1	3	2
9	1.5	1.2	6	2
10	1.6	0.9	3	2
11	2	1.5	4	2
12	2.4	0.5	3	1
13	0.6	0.4	2	1
14	0.9	0.8	4	4
15	3.5	2.7	12	6
16	3.6	1.9	13	4
17	0.9	0.8	3	2
18	1.9	1.8	5	4
19	2.4	1.2	7	3
20	2	1.9	10	4
21	1.8	0.9	2	2
22	0.8	0.6	2	1

### Apéndice III. Protocolo de extracción de ADN

Método “Mini-Prep” de extracción de ADN (Vázquez-Lobo, 1996; modificado por Valera, 2007).

1. Colocar aproximadamente 1 g de tejido en un mortero y moler con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino.
2. Terminar de moler con 400 µl de CTAB y 600 µl de STE. El homogenizado se debe recuperar en un tubo Eppendorf™ de 2 ml.
3. Centrifugar a 10,000 rpm por 8 minutos y eliminar el sobrenadante.
4. Realizar un segundo lavado, repitiendo los pasos 2 y 3.
5. Agregar 400 µl de CTAB2x y 600 µl de STE y agitar con el vortex.
6. Centrifugar a 10,000 rpm por 8 minutos y eliminar el sobrenadante.
7. Agregar 500 µl de CTAB2X, resuspendiendo la muestra agitando en el vortex.
8. Incubar durante 30 minutos a 65 °C.
9. Agregar 600 µl de cloroformo-octanol (24:1). Agitar bien
10. Centrifugar por 12 minutos a 9000 rpm.
11. Recuperar 200 µl del sobrenadante (o puedes recuperar 400 µl y agregar 600ml de cloroformo-octanol (24:1) ).
12. Agregar 400µl de Isopropanol y agitar bien.
13. Dejar precipitar a -20°C durante 2 horas.
14. Centrifugar a 9000 rpm por 5 minutos y eliminar el sobrenadante con cuidado de no perder el *pellet*.
15. Agregar 1 ml de etanol al 70%, agitar durante 5 minutos a temperatura ambiente
16. Centrifugar a 10,000 rpm por 5 minutos y eliminar el sobrenadante (los pasos 14 y 15 pueden repetirse si se considera que las muestras tienen exceso de sales)
17. Secar en ultracentrifuga durante 30 minutos a 60°C.
18. Hidratar con 70µl de agua ultrapura.

<p>Buffer de extracción CTAB2X</p> <p>Tris-HCl 100mM pH8 EDTA 20mM pH8 NaCl 0.7M CTAB 2% * β-mercaptoetanol 0.3%</p>	<p>Buffer de extracción CTAB</p> <p>Tris-HCl 100mM pH8 EDTA 20mM pH8 NaCl 0.75M CTAB 4% PVP40 4% Ácido ascórbico 0.1% DIECA 0.1% * β-mercaptoetanol 0.3%</p>	<p>Buffer de extracción STE</p> <p>Tris-HCl 100mM pH8 EDTA 50mM pH8 NaCl 50mM * β-mercaptoetanol 0.3%</p>
--	--	---

\* el β-mercaptoetanol se agrega hasta el momento de la extracción.

#### Apéndice IV. Fórmulas

Probabilidad de identidad mediante eventos reproductivos independientes (Arnaud-Haond *et al.*, 2007)

$$P_{sex} = \sum_{i=n}^N \frac{N!}{i!(N-i)!} [P_{gen}]^i [1 - P_{gen}]^{N-i}; \quad P_{gen} = \prod_{i=1}^l (f_i g_i) 2^h$$

Donde  $l$  es el número de loci,  $h$  es el número de loci heterócigos,  $f$  y  $g$  son las frecuencias alélicas (de los alelos  $p$  y  $q$ ) en el  $i^{th}$  locus,  $n$  es el número de unidades muestreadas encontradas con el mismo Genotipo Multilocus (GML),  $N$  es el número de unidades muestreadas.  $P_{gen}$  es la probabilidad de que ocurra un genotipo  $i$  en la muestra bajo el supuesto de equilibrio de Hardy-Weinberg y  $P_{sex}$  es la probabilidad de que dos genotipos idénticos de la muestra se hayan producido mediante dos eventos reproductivos distintos.

Proporción de genotipos distinguibles  $\left(\frac{G}{N}\right)$

Donde  $G$  es el número de genotipos distintos en la población y  $N$  el número de individuos de la muestra.

Índice de diversidad de Simpson ( $D$ ) (Arnaud-Haond *et al.*, 2007)

$$D = 1 - \sum \left\{ \frac{[n_i(n_i - 1)]}{[N(N - 1)]} \right\}$$

Donde  $n_i$  es el número de individuos de un genotipo y  $N$  es el tamaño de la muestra. Va de 0 a 1, siendo 1 la máxima diversidad. En los estudios de clonalidad el índice de Simpson puede interpretarse como la probabilidad de que dos muestras tomadas al azar de una muestra pertenezcan al mismo linaje clonal (Arnaud *et al*, 2007).

Linajes clonales aparentes  $\left(\frac{1}{\lambda}\right)$  (Hill, 1973; Arnaud-Haond *et al.*, 2007)

$L = D - 1$  y  $L \approx \lambda$  donde  $D$  es el índice de diversidad de Simpson.  $\left(\frac{1}{\lambda}\right)$  toma valores de 1 a  $G$  y se puede interpretar como el número de linajes multilocus requerido para obtener la misma heterogeneidad que se observa en la muestra ó como el número de linajes clonales aparentes.

Equitatividad genotípica ( $E$ ) (Arnaud-Haond *et al.*, 2007)

$$E = \frac{(D_{obs} - D_{min})}{(D_{max} - D_{min})} \text{ Donde } D_{min} = \frac{[(G-1)(2N-G)]}{[N(N-1)]} \text{ y } D_{max} = \frac{[(G-1)N]}{[G(N-1)]}$$

Análisis de Diversidad Genotípica con las correcciones de Lynch-Milligan (1994)

**Frecuencia del genotipo recesivo ( $\hat{Q}$ ) para marcadores dominantes**

$$\hat{x} = \frac{\text{Ausencias}}{N} \text{ y } \text{Var}(\hat{x}) = \frac{\hat{x}(1-\hat{x})}{N}$$

**Frecuencia del alelo recesivo ( $\hat{q}$ ) para marcadores dominantes**

$$\hat{q} = \frac{\sqrt{\hat{x}}}{1 - \frac{\text{Var}(\hat{x})}{8\hat{x}^2}} \text{ y } \text{Var}(\hat{q}) = \frac{1-\hat{x}}{4N}$$

**Heterocigosis esperada por locus**

$$\hat{H}_j(i) = 2\hat{q}_j(i)[1-\hat{q}_j(i)] + 2\text{Var}[\hat{q}_j(i)] \text{ y } \text{Var}[H_j(i)] = 4[1-2\hat{q}_j(i)]^2 \text{Var}[\hat{q}_j(i)]$$

## Heterocigosis esperada en la población

$$\hat{H}_j = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L \hat{H}_j(i) \quad \text{y} \quad \text{Var}(\hat{H}_j) = \frac{1}{L(L-1)} \sum_{i=1}^L [\hat{H}_j(i) - \hat{H}_j]^2$$

Donde  $j$  refiere a una población e  $i$  a un alelo.

## Proporción de loci polimórficos

$P_{(95\%)} = \frac{x}{m}$  Donde  $x$  son los loci polimórficos (en los que la frecuencia del alelo más abundante es menor de 0.95) y  $m$  es el total de loci.

$\text{Var}[P_{(95\%)}] = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$  Donde  $n$  es el total de loci.  $x_i$  es la frecuencia del alelo más abundante y  $\bar{x}$  es  $P_{(95\%)}$ .

## Análisis de Autocorrelación espacial

Índice de correlación ( $r$ ) (Smouse y Peakall, 1999)

$$r^{(h)} = \frac{\left( \sum_{i \neq j}^N x_{ij}^{(h)} c_{ij} \right)}{\left( \sum_{i=1}^N x_{ii}^{(h)} c_{ii} \right)} \quad C = \begin{bmatrix} c_{11} & c_{12} & \dots & c_{1N} \\ c_{21} & c_{22} & \dots & c_{2N} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ c_{N1} & c_{N2} & \dots & c_{NN} \end{bmatrix} \quad X^{(h)} = \begin{bmatrix} x_{11}^{(h)} & x_{21}^{(h)} & \dots & x_{N1}^{(h)} \\ x_{12}^{(h)} & x_{22}^{(h)} & \dots & x_{N2}^{(h)} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ x_{N1}^{(h)} & x_{2N}^{(h)} & \dots & x_{NN}^{(h)} \end{bmatrix}$$

Donde  $h$  es la clase de distancia;  $c_{ii}$  y  $c_{ij}$  son los elementos de una matriz de covarianza inter-individuos ( $C$ ) en la que:  $c_{ii}$  (la diagonal) mide la distancia Euclideana ( $y$ ) al cuadrado de cada genotipo individual al centroide multivariado del espacio genético y  $c_{ij}$  (la covarianza interindividual) provee una medida de la tendencia de los  $i$ th y  $j$ th individuos a variar en la misma dirección genética con respecto al centroide, estos términos se determinan mediante:

$c_{ii} = \sum_{m=1}^M W_{mm} (y_{im} - \bar{y}_m)^2$  y  $c_{ij} = \sum_{m=1}^M W_{mm} (y_{im} - \bar{y}_m)(y_{jm} - \bar{y}_m)^2$ , en la que el término  $W_{mm}$  refiere al impacto de cada alelo; y los términos  $x_{ii}$  y  $x_{ij}$  son los elementos de una matriz de distancia geográfica para clases de distancia ( $X^{(h)}$ ).

### Regla de Sturges (1926)

$$k = \lceil 1 + \log_2 n \rceil$$

Para determinar la amplitud de clases en datos de distribución normal

### Distribución de Pareto (Vidondo *et al.*, 1997)

La prueba de Pareto es un modelo que describe distribuciones que de manera general se comportan de una forma:

$$N_{s \geq S} = \alpha S^{-\beta}$$

Donde  $N_{s \geq S}$  es el número de objetos mayores que un tamaño umbral ( $S$ ),  $\alpha$  es el parámetro ajustado que describe al número total de objetos del conjunto de datos y  $\beta$  la tasa logarítmica de decaimiento del número de objetos respecto a la clase.

La distribución de Pareto tiene una función de probabilidad de densidad que se define por:

$$pdf(s) = ck^c s^{-(c+1)} \text{ donde } (c > 0, s \geq k > 0)$$

en este caso  $s$  indica el tamaño,  $c$  la forma de la distribución y  $k$  la escala. En este caso  $k$  también es un parámetro que puede representar el tamaño del objeto de menor tamaño ( $k < s < \infty$ ) ó una medida compuesta del rango de tamaño. El parámetro  $c$  es una constante empírica que describe la disminución de la probabilidad conforme aumenta el tamaño.

Apéndice V. Valores de  $P_{SEX}$  y frecuencias alélicas con el método de “round-robin”

Venados									
GML	$P_{gen}$	GML	reencuentros	$P_{sex}$	GML	$P_{gen}$	GML	reencuentros	$P_{sex}$
		idénticos		reencuentro			idénticos		reencuentro
1	8.24E-11	5	4	1.66E-34	26	8.38E-09			
2	1.22E-14				27	2.77E-16			
3	5.50E-14	4	3	2.53E-35	28	2.79E-14	2	1	2.73E-12
4	4.32E-14	2	1	4.23E-12	29	1.61E-12	2	1	1.57E-10
5	4.15E-11				30	4.19E-11	3	2	8.33E-18
6	1.51E-15				31	2.37E-11	2	1	2.32E-09
7	4.11E-16	4	3	1.05E-41	32	1.30E-12	3	2	8.07E-21
8	1.44E-15				33	2.39E-12	6	5	5.24E-51
9	1.52E-13				34	4.37E-15			
10	4.15E-14				35	2.86E-12			
11	5.29E-14				36	8.18E-12	2	1	8.02E-10
12	3.98E-13	2	1	3.90E-11	37	5.84E-10	4	3	3.02E-23
13	2.15E-16	2	1	2.11E-14	38	2.35E-08	5	4	1.11E-24
14	3.38E-13				39	4.27E-10			
15	1.40E-15	2	1	1.38E-13	40	3.35E-10			
16	6.04E-13	5	4	4.80E-43	41	6.26E-09			
17	8.03E-11				42	7.06E-09			
18	1.47E-12				43	1.53E-09			
19	6.28E-11				44	6.42E-10	2	1	6.29E-08
20	7.17E-13				45	1.05E-10	3	2	5.27E-17
21	3.19E-10				46	5.52E-10			
22	8.94E-11				47	3.78E-11	8	7	1.53E-63
23	3.39E-09				48	3.22E-15			
24	6.41E-13				49	2.99E-19			
25	4.03E-10				50	4.57E-20			

**San Bernardo**

<b>GML</b>	<b><i>Pgen</i></b>	<b>GML</b>	<b>reencuentros</b>	<b><i>Psex</i></b>	<b>GML</b>	<b><i>Pgen</i></b>	<b>GML</b>	<b>reencuentros</b>	<b><i>Psex</i></b>
		<b>idénticos</b>		<b>reencuentro</b>			<b>idénticos</b>		<b>reencuentro</b>
1	1.71E-12	2	1	2.19E-10	30	5.34E-12	2	1	6.84E-10
2	1.53E-19				31	5.83E-13	4	3	6.78E-32
3	8.20E-16	2	1	1.05E-13	32	2.74E-11	2	1	3.50E-09
4	4.69E-18	2	1	6.01E-16	33	1.85E-12			
5	4.79E-12	2	1	6.13E-10	34	2.30E-11			
6	2.02E-11				35	1.41E-11			
7	2.59E-12				36	3.55E-14			
8	1.22E-10				37	7.21E-09	8	7	9.62E-47
9	1.27E-11	2	1	1.63E-09	38	2.84E-09	6	5	4.89E-35
10	2.61E-10	5	4	4.92E-32	39	9.00E-10	2	1	1.15E-07
11	2.58E-09				40	4.85E-09	2	1	6.20E-07
12	8.59E-10				41	1.03E-10	2	1	1.32E-08
13	5.25E-10				42	1.94E-12			
14	2.83E-09				43	2.31E-11	6	5	1.75E-45
15	6.35E-11				44	5.17E-11	2	1	6.62E-09
16	1.99E-13				45	1.73E-09	4	3	1.77E-21
17	1.74E-14				46	5.97E-11	2	1	7.65E-09
18	7.93E-16				47	3.09E-13			
19	3.69E-14	3	2	1.11E-23	48	4.26E-11	2	1	5.45E-09
20	8.20E-16	3	2	5.46E-27	49	3.17E-13	3	2	8.18E-22
21	4.62E-19	3	2	1.73E-33	50	4.43E-13	5	4	4.09E-43
22	3.20E-16	3	2	8.34E-28	52	1.58E-13			
23	5.13E-16				53	6.02E-13	5	4	1.40E-42
24	1.25E-17	3	2	1.28E-30	54	7.67E-15	2	1	9.81E-13
25	3.72E-18				55	2.68E-13	2	1	3.44E-11
26	3.36E-14				56	6.53E-12	3	2	3.47E-19
27	4.42E-10	2	1	5.66E-08	57	1.38E-11			
28	7.31E-11	3	2	4.34E-17	58	9.67E-17			
29	8.31E-12	3	2	5.62E-19	59	2.24E-17			

Frecuencias alélicas estimadas con el método *round-robin* que evita la sobreestimación de las frecuencias de los alelos raros

Locus	Todas las poblaciones			Población Venados			Población San Bernardo		
	<i>p</i>	<i>q</i>	<i>Hnb</i>	<i>p</i>	<i>q</i>	<i>Hnb</i>	<i>p</i>	<i>q</i>	<i>Hnb</i>
<b>ISSR-811</b>									
1067	0.693	0.307	0.429	0.642	0.358	0.467	0.747	0.253	0.384
982	0.653	0.347	0.456	0.582	0.418	0.494	0.699	0.301	0.427
943	0.627	0.373	0.471	0.388	0.612	0.482	0.819	0.181	0.302
845	0.460	0.540	0.500	0.597	0.403	0.489	0.337	0.663	0.453
827	0.867	0.133	0.234	0.881	0.119	0.218	0.855	0.145	0.253
710	0.867	0.133	0.234	0.761	0.239	0.371	0.952	0.048	0.098
610	0.631	0.369	0.469	0.515	0.485	0.507	0.723	0.277	0.407
556	0.289	0.711	0.414	0.194	0.806	0.320	0.366	0.634	0.470
522	0.940	0.060	0.116	0.955	0.045	0.093	0.928	0.072	0.140
474	0.933	0.067	0.128	1.000	0.000	0.008	0.880	0.120	0.218
437	0.510	0.490	0.503	0.470	0.530	0.506	0.542	0.458	0.503
388	0.527	0.473	0.502	0.537	0.463	0.505	0.518	0.482	0.505
342	0.773	0.227	0.354	0.851	0.149	0.261	0.711	0.289	0.417
302	0.720	0.280	0.407	0.955	0.045	0.093	0.530	0.470	0.504
<b>ISSR-846</b>									
1695	0.707	0.293	0.418	0.851	0.149	0.261	0.590	0.410	0.490
1360	0.510	0.490	0.503	0.597	0.403	0.489	0.439	0.561	0.499
1289	0.513	0.487	0.503	0.642	0.358	0.467	0.410	0.590	0.490
1128	0.307	0.693	0.429	0.537	0.463	0.505	0.120	0.880	0.218
1036	0.980	0.020	0.043	0.985	0.015	0.037	0.976	0.024	0.053
934	0.403	0.597	0.484	0.470	0.530	0.506	0.337	0.663	0.453
840	0.853	0.147	0.254	0.866	0.134	0.240	0.843	0.157	0.270
704	0.900	0.100	0.183	0.910	0.090	0.171	0.892	0.108	0.199
667	0.887	0.113	0.204	0.940	0.060	0.120	0.843	0.157	0.270
605	0.973	0.027	0.056	0.970	0.030	0.065	0.963	0.037	0.077
557	0.940	0.060	0.116	0.896	0.104	0.195	0.976	0.024	0.053
503	0.940	0.060	0.116	0.955	0.045	0.093	0.928	0.072	0.140
475	0.540	0.460	0.500	0.448	0.552	0.502	0.614	0.386	0.480
377	0.987	0.013	0.030	0.985	0.015	0.037	0.988	0.012	0.030
337	0.847	0.153	0.263	0.836	0.164	0.282	0.855	0.145	0.253
300	0.907	0.093	0.173	0.881	0.119	0.218	0.928	0.072	0.140

Apéndice VI. Frecuencias alélicas por loci calculadas con la corrección de Lynch-Milligan (1994).

Loci	Todas las poblaciones			Población Venados			Población San Bernardo		
	$\hat{Q}$	$\hat{q}$	$\hat{H}_E$	$\hat{Q}$	$\hat{q}$	$\hat{H}_E$	$\hat{Q}$	$\hat{q}$	$\hat{H}_E$
<b>ISSR-811</b>									
1067	0,699	0,301	0,497	0,612	0,388	0,472	0,766	0,234	0,503
982	0,664	0,336	0,488	0,612	0,388	0,472	0,703	0,297	0,498
943	0,628	0,372	0,477	0,388	0,612	0,342	0,813	0,188	0,495
845	0,442	0,558	0,379	0,582	0,418	0,459	0,336	0,664	0,302
827	0,872	0,128	0,462	0,867	0,133	0,469	0,875	0,125	0,462
710	0,858	0,142	0,472	0,735	0,265	0,503	0,953	0,047	0,348
610	0,633	0,367	0,479	0,510	0,490	0,422	0,727	0,273	0,502
556	0,274	0,726	0,253	0,163	0,837	0,156	0,359	0,641	0,320
522	0,942	0,058	0,369	0,949	0,051	0,361	0,938	0,063	0,382
474	0,942	0,058	0,369	1,000	0,000	0,000	0,898	0,102	0,440
437	0,509	0,491	0,420	0,459	0,541	0,391	0,547	0,453	0,442
388	0,522	0,478	0,428	0,541	0,459	0,439	0,508	0,492	0,420
342	0,765	0,235	0,501	0,837	0,163	0,487	0,711	0,289	0,500
302	0,717	0,283	0,499	0,969	0,031	0,303	0,523	0,477	0,429
<b>ISSR-846</b>									
1695	0,726	0,274	0,500	0,847	0,153	0,482	0,633	0,367	0,480
1360	0,540	0,460	0,437	0,622	0,378	0,476	0,477	0,523	0,401
1289	0,531	0,469	0,433	0,663	0,337	0,490	0,430	0,570	0,371
1128	0,305	0,695	0,278	0,561	0,439	0,449	0,109	0,891	0,106
1036	0,987	0,013	0,214	0,990	0,010	0,209	0,984	0,016	0,235
934	0,412	0,588	0,358	0,490	0,510	0,410	0,352	0,648	0,314
840	0,850	0,150	0,477	0,847	0,153	0,482	0,852	0,148	0,478
704	0,916	0,084	0,415	0,929	0,071	0,401	0,906	0,094	0,431
667	0,872	0,128	0,462	0,918	0,082	0,416	0,836	0,164	0,486
605	0,973	0,027	0,279	0,980	0,020	0,263	0,969	0,031	0,302
557	0,942	0,058	0,369	0,898	0,102	0,442	0,977	0,023	0,272
503	0,947	0,053	0,359	0,969	0,031	0,303	0,930	0,070	0,397
475	0,549	0,451	0,442	0,429	0,571	0,370	0,641	0,359	0,482
377	0,991	0,009	0,183	0,990	0,010	0,209	0,992	0,008	0,185
337	0,854	0,146	0,475	0,847	0,153	0,482	0,859	0,141	0,473
300	0,894	0,106	0,442	0,847	0,153	0,482	0,930	0,070	0,397

Apéndice VII. Valores de significancia RyR (Raymond y Rousset, 1995)

Loci	Venados vs San		Venados		San Bernardo	
	p	S.E.	p	S.E.	p	S.E.
<b>ISSR-811</b>						
1067	0.0188	0.0046	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
982	0.1628	0.0080	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
943	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
845	0.0003	0.0003	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
827	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
710	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
610	0.0016	0.0008	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
556	0.0011	0.0004	0.0036	0.0027	0.0000	0.0000
522	0.7834	0.0044	0.0000	0.0000	0.0018	0.0016
474	0.0003	0.0002	1.0000	0.0000	0.0004	0.0004
437	0.2189	0.0148	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
388	0.7119	0.0101	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
342	0.0256	0.0044	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
302	0.0000	0.0000	0.7382	0.0221	0.0000	0.0000
<b>ISSR-846</b>						
1695	0.0002	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
1360	0.0283	0.0052	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
1289	0.0004	0.0002	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
1128	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
1036	1.0000	0.0000	0.3560	0.0176	0.0229	0.0040
934	0.0347	0.0048	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
840	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
704	0.6408	0.0115	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
667	0.0783	0.0074	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
605	0.0014	0.0013	0.2938	0.0198	0.2261	0.0212
557	0.0212	0.0028	0.1724	0.0212	0.0000	0.0000
503	0.2313	0.0074	0.0000	0.0000	0.0080	0.0028
475	0.0004	0.0013	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
377	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.1848	0.1760
337	0.8510	0.0030	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
300	0.0497	0.0032	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

Es una prueba en la que se busca rechazar la H0 (H0: no hay diferenciación entre las poblaciones) utilizando las frecuencias alélicas de cada muestra.

## Apéndice VIII Análisis de Autocorrelación espacial Global

### Análisis de Autocorrelación Espacial Global sin clonas; Población Venados

Clase (m)	n	r	U	L	Intervalo de confianza (permutación)		Intervalo de confianza (bootstrap)			Ur	Lr	Intercepción
					P(r-rand >= r-obs)	P(r-rand <= r-obs)	r (bootstrap)	Ur error	Lr error			
<b>Clases de distancia amplitud (0.5m)</b>												
0.5	33	0.323	0.074	-0.060	0.001	1.000	0.324	0.094	0.092	0.417	0.231	2.356
1	20	0.217	0.084	-0.093	0.001	1.000	0.215	0.112	0.126	0.329	0.091	
1.5	30	0.040	0.070	-0.065	0.146	0.855	0.038	0.070	0.074	0.110	-0.034	
2	35	0.025	0.062	-0.062	0.205	0.796	0.025	0.060	0.059	0.085	-0.033	
2.5	51	-0.010	0.046	-0.055	0.631	0.370	-0.010	0.055	0.054	0.045	-0.064	
3	46	0.036	0.055	-0.055	0.099	0.902	0.037	0.059	0.058	0.095	-0.022	
3.5	68	0.047	0.046	-0.047	0.020	0.981	0.047	0.048	0.052	0.095	-0.005	
4	80	-0.025	0.042	-0.038	0.901	0.100	-0.021	0.038	0.032	0.014	-0.057	
4.5	81	-0.006	0.041	-0.041	0.626	0.375	-0.005	0.039	0.035	0.033	-0.041	
5	76	-0.027	0.043	-0.042	0.882	0.119	-0.026	0.039	0.039	0.012	-0.066	
5.5	64	-0.008	0.042	-0.042	0.626	0.375	-0.004	0.054	0.055	0.046	-0.062	
6	67	-0.052	0.047	-0.046	0.987	0.014	-0.052	0.040	0.041	-0.012	-0.093	
6.5	42	-0.017	0.058	-0.060	0.679	0.322	-0.018	0.055	0.055	0.038	-0.071	
7	59	-0.074	0.050	-0.044	0.999	0.002	-0.074	0.037	0.038	-0.037	-0.112	
7.5	62	-0.009	0.048	-0.043	0.645	0.356	-0.010	0.045	0.045	0.036	-0.054	
8	62	-0.023	0.049	-0.049	0.820	0.181	-0.023	0.040	0.042	0.017	-0.065	
8.5	52	-0.033	0.057	-0.048	0.898	0.103	-0.033	0.046	0.046	0.014	-0.079	
9	50	0.057	0.054	-0.053	0.021	0.980	0.057	0.062	0.062	0.119	-0.005	
9.5	46	-0.006	0.056	-0.053	0.545	0.456	-0.006	0.042	0.045	0.036	-0.051	
10	41	-0.026	0.054	-0.058	0.781	0.220	-0.025	0.054	0.052	0.028	-0.079	
10.5	33	-0.020	0.065	-0.066	0.715	0.286	-0.020	0.060	0.061	0.040	-0.081	
11	19	0.019	0.096	-0.087	0.308	0.693	0.019	0.076	0.073	0.096	-0.053	
11.5	25	-0.045	0.080	-0.076	0.880	0.121	-0.045	0.082	0.075	0.037	-0.120	
12	23	-0.118	0.074	-0.081	0.996	0.005	-0.118	0.059	0.054	-0.059	-0.171	
12.5	15	-0.029	0.102	-0.096	0.709	0.292	-0.027	0.071	0.064	0.043	-0.093	
13	21	-0.003	0.082	-0.080	0.556	0.445	-0.002	0.061	0.063	0.058	-0.066	
13.5	10	-0.035	0.121	-0.111	0.723	0.278	-0.035	0.058	0.052	0.022	-0.087	
14	4	-0.039	0.206	-0.170	0.628	0.373	-0.038	0.071	0.048	0.032	-0.087	
14.5	5	-0.067	0.174	-0.169	0.756	0.245	-0.067	0.050	0.066	-0.017	-0.133	
15	3	0.032	0.235	-0.199	0.377	0.624	0.032	0.019	0.008	0.052	0.024	
<b>Clases de distancia amplitud (1.3m)</b>												
1.3	70	0.229	0.052	-0.040	0.001	1.000	0.230	0.070	0.063	0.299	0.166	4.265
2.6	113	0.016	0.032	-0.032	0.156	0.845	0.016	0.040	0.037	0.057	-0.021	
3.9	162	0.007	0.028	-0.028	0.326	0.675	0.007	0.033	0.034	0.039	-0.028	
5.2	207	-0.017	0.024	-0.025	0.914	0.087	-0.017	0.024	0.023	0.007	-0.040	
6.5	141	-0.021	0.027	-0.031	0.905	0.096	-0.022	0.029	0.031	0.008	-0.052	
7.8	156	-0.037	0.029	-0.029	0.994	0.007	-0.037	0.028	0.029	-0.008	-0.066	
9.1	137	0.003	0.031	-0.031	0.423	0.578	0.003	0.032	0.034	0.035	-0.031	
10.4	108	-0.019	0.036	-0.037	0.875	0.126	-0.018	0.031	0.033	0.012	-0.052	
11.7	57	-0.035	0.046	-0.052	0.910	0.091	-0.034	0.051	0.047	0.016	-0.081	
13	50	-0.038	0.051	-0.054	0.931	0.070	-0.038	0.043	0.043	0.004	-0.082	
14.3	16	-0.040	0.094	-0.088	0.814	0.187	-0.041	0.038	0.035	-0.002	-0.075	
15.6	6	-0.018	0.163	-0.154	0.584	0.417	-0.018	0.048	0.071	0.030	-0.089	
16.9	2	-0.093	0.287	-0.229	0.740	0.261	0.000	0.093	-0.093	0.000	0.000	
<b>Clases de distancia amplitud (5m)</b>												
5	520	0.032	0.013	-0.011	0.001	1.000	0.033	0.019	0.018	0.051	0.015	8.034
10	545	-0.021	0.011	-0.013	0.999	0.002	-0.021	0.016	0.015	-0.005	-0.036	
15	158	-0.034	0.023	-0.027	0.991	0.010	-0.034	0.022	0.026	-0.011	-0.060	
20	2	-0.093	0.310	-0.256	0.756	0.245	0.000	0.093	-0.093	0.000	0.000	

**Análisis de Autocorrelación espacial Global; Población San Bernardo**

Clase (m)	n	r	U	L	Intervalo de confianza (Permutación)		Intervalo de confianza (Bootstrap)					Intercepción
					P(r-rand $\geq$ r-obs)	P(r-rand $\leq$ r-obs)	F(Bootstrap)	Ur error	Lr error	Ur	Lr	
<b>Clases de distancia amplitud (0.5m)</b>												
0.5	79	0.768	0.054	-0.074	0.010	1.000	0.774	0.082	0.079	0.850	0.689	4.208
1	171	0.580	0.043	-0.046	0.010	1.000	0.580	0.051	0.071	0.630	0.508	
1.5	210	0.408	0.043	-0.039	0.010	1.000	0.406	0.047	0.053	0.455	0.355	
2	220	0.202	0.041	-0.034	0.010	1.000	0.202	0.041	0.056	0.243	0.146	
2.5	196	0.194	0.048	-0.038	0.010	1.000	0.192	0.037	0.054	0.231	0.140	
3	186	0.099	0.042	-0.048	0.010	1.000	0.100	0.031	0.032	0.130	0.066	
3.5	198	0.090	0.043	-0.030	0.010	1.000	0.089	0.041	0.037	0.131	0.053	
4	198	0.025	0.039	-0.037	0.150	0.860	0.023	0.042	0.039	0.067	-0.014	
4.5	246	-0.035	0.032	-0.036	0.980	0.030	-0.035	0.024	0.024	-0.011	-0.059	
5	256	-0.058	0.041	-0.029	1.000	0.010	-0.067	-0.001	0.020	-0.059	-0.078	
5.5	270	-0.051	0.025	-0.037	1.000	0.010	-0.050	0.022	0.021	-0.029	-0.072	
6	336	-0.030	0.028	-0.032	0.970	0.040	-0.030	0.021	0.028	-0.009	-0.058	
6.5	316	-0.052	0.026	-0.033	1.000	0.010	-0.052	0.019	0.022	-0.034	-0.074	
7	333	-0.029	0.034	-0.033	0.970	0.040	-0.030	0.026	0.025	-0.003	-0.054	
7.5	369	-0.038	0.023	-0.032	1.000	0.010	-0.038	0.022	0.026	-0.016	-0.064	
8	361	-0.047	0.034	-0.039	1.000	0.010	-0.049	0.020	0.030	-0.027	-0.077	
8.5	331	-0.083	0.024	-0.033	1.000	0.010	-0.082	0.024	0.024	-0.059	-0.107	
9	302	-0.067	0.028	-0.050	1.000	0.010	-0.068	0.031	0.027	-0.036	-0.094	
9.5	242	-0.072	0.043	-0.057	1.000	0.010	-0.074	0.030	0.039	-0.042	-0.111	
10	244	-0.073	0.029	-0.048	1.000	0.010	-0.073	0.027	0.029	-0.046	-0.101	
10.5	260	-0.031	0.026	-0.030	0.990	0.020	-0.029	0.026	0.029	-0.005	-0.060	
11	303	-0.026	0.027	-0.031	0.970	0.040	-0.026	0.024	0.023	-0.003	-0.049	
11.5	355	-0.033	0.027	-0.034	0.980	0.030	-0.033	0.026	0.024	-0.007	-0.057	
12	310	-0.032	0.027	-0.046	0.950	0.060	-0.034	0.025	0.031	-0.007	-0.062	
12.5	301	-0.028	0.028	-0.032	0.960	0.050	-0.026	0.031	0.024	0.003	-0.052	
13	221	-0.051	0.037	-0.040	1.000	0.010	-0.048	0.030	0.031	-0.021	-0.082	
13.5	184	-0.008	0.034	-0.037	0.630	0.380	-0.010	0.029	0.034	0.022	-0.042	
14	139	-0.029	0.045	-0.045	0.880	0.130	-0.032	0.027	0.035	-0.002	-0.064	
14.5	106	-0.108	0.054	-0.076	1.000	0.010	-0.108	0.030	0.030	-0.078	-0.138	
15	112	-0.054	0.056	-0.068	0.970	0.040	-0.050	0.037	0.023	-0.017	-0.077	
15.5	90	-0.078	0.057	-0.072	1.000	0.010	-0.077	0.030	0.032	-0.048	-0.110	
16	70	-0.066	0.074	-0.060	1.000	0.010	-0.067	0.039	0.041	-0.027	-0.107	
16.5	106	-0.116	0.049	-0.060	1.000	0.010	-0.116	0.029	0.029	-0.087	-0.145	
17	100	-0.103	0.056	-0.061	1.000	0.010	-0.100	0.037	0.034	-0.066	-0.138	
17.5	88	-0.125	0.057	-0.053	1.000	0.010	-0.128	0.032	0.038	-0.093	-0.163	
18	73	-0.134	0.057	-0.075	1.000	0.010	-0.133	0.044	0.066	-0.089	-0.200	
18.5	79	-0.199	0.056	-0.068	1.000	0.010	-0.201	0.042	0.042	-0.157	-0.241	
19	63	-0.241	0.054	-0.085	1.000	0.010	-0.238	0.064	0.052	-0.177	-0.293	
19.5	58	-0.186	0.051	-0.089	1.000	0.010	-0.183	0.077	0.050	-0.109	-0.236	
20	26	-0.252	0.131	-0.123	1.000	0.010	-0.257	0.037	0.062	-0.214	-0.313	
20.5	15	-0.186	0.173	-0.134	1.000	0.010	-0.187	0.048	0.071	-0.138	-0.257	
21	3	-0.167	0.332	-0.306	0.880	0.130	-0.166	0.050	0.041	-0.117	-0.208	
21.5	2	-0.141	0.630	-0.414	0.740	0.270	0.000	0.141	-0.141	0.000	0.000	
<b>Clases de distancia amplitud (1.6m)</b>												
1.6	502	0.507	0.023	-0.023	0.010	1.000	0.506	0.036	0.040	0.542	0.466	4.702
3.2	651	0.159	0.021	-0.022	0.010	1.000	0.159	0.026	0.033	0.185	0.126	
4.8	705	-0.010	0.020	-0.017	0.830	0.180	-0.009	0.019	0.020	0.009	-0.030	
6.4	963	-0.043	0.015	-0.016	1.000	0.010	-0.043	0.015	0.014	-0.028	-0.058	
8	1124	-0.040	0.017	-0.017	1.000	0.010	-0.039	0.018	0.018	-0.022	-0.058	
9.6	923	-0.073	0.019	-0.021	1.000	0.010	-0.071	0.018	0.017	-0.055	-0.089	
11.2	900	-0.039	0.015	-0.020	1.000	0.010	-0.039	0.014	0.013	-0.025	-0.051	
12.8	963	-0.035	0.016	-0.022	1.000	0.010	-0.035	0.013	0.019	-0.021	-0.054	
14.4	502	-0.041	0.022	-0.033	1.000	0.010	-0.041	0.017	0.024	-0.024	-0.065	
16	282	-0.068	0.031	-0.046	1.000	0.010	-0.068	0.021	0.021	-0.047	-0.088	
17.6	310	-0.116	0.032	-0.033	1.000	0.010	-0.116	0.017	0.023	-0.098	-0.139	
19.2	223	-0.192	0.033	-0.041	1.000	0.010	-0.191	0.029	0.024	-0.163	-0.216	
20.8	77	-0.202	0.062	-0.076	1.000	0.010	-0.202	0.050	0.053	-0.153	-0.255	
22.4	3	-0.129	0.287	-0.272	0.810	0.200	-0.131	0.023	0.049	-0.106	-0.178	
<b>Clases de distancia amplitud (5m)</b>												
5	1960	0.172	0.013	-0.010	0.010	1.000	0.172	0.014	0.017	0.187	0.156	8.822
10	3104	-0.053	0.008	-0.010	1.000	0.010	-0.054	0.008	0.010	-0.045	-0.063	
15	2291	-0.035	0.007	-0.009	1.000	0.010	-0.035	0.010	0.010	-0.025	-0.045	
20	753	-0.133	0.013	-0.031	1.000	0.010	-0.132	0.014	0.015	-0.118	-0.148	

## Análisis de Autocorrelación Espacial Global sin clones; Población Venados

Clase (m)	n	r	U	L	Intervalo de confianza (permutación)		Intervalo de confianza (bootstrap)				Intercepción	
					P(r-rand >= r-obs)	P(r-rand <= r-obs)	r (bootstrap)	Ur error	Lr error	Ur		Lr
<b>Clases de distancia amplitud (0.5m)</b>												
0.5	33	0.323	0.074	-0.060	0.001	1.000	0.324	0.094	0.092	0.417	0.231	2.356
1	20	0.217	0.084	-0.093	0.001	1.000	0.215	0.112	0.126	0.329	0.091	
1.5	30	0.040	0.070	-0.065	0.146	0.855	0.038	0.070	0.074	0.110	-0.034	
2	35	0.025	0.062	-0.062	0.205	0.796	0.025	0.060	0.059	0.085	-0.033	
2.5	51	-0.010	0.046	-0.055	0.631	0.370	-0.010	0.055	0.054	0.045	-0.064	
3	46	0.036	0.055	-0.055	0.099	0.902	0.037	0.059	0.058	0.095	-0.022	
3.5	68	0.047	0.046	-0.047	0.020	0.981	0.047	0.048	0.052	0.095	-0.005	
4	80	-0.025	0.042	-0.038	0.901	0.100	-0.021	0.038	0.032	0.014	-0.057	
4.5	81	-0.006	0.041	-0.041	0.626	0.375	-0.005	0.039	0.035	0.033	-0.041	
5	76	-0.027	0.043	-0.042	0.882	0.119	-0.026	0.039	0.039	0.012	-0.066	
5.5	64	-0.008	0.042	-0.042	0.626	0.375	-0.004	0.054	0.055	0.046	-0.062	
6	67	-0.052	0.047	-0.046	0.987	0.014	-0.052	0.040	0.041	-0.012	-0.093	
6.5	42	-0.017	0.058	-0.060	0.679	0.322	-0.018	0.055	0.055	0.038	-0.071	
7	59	-0.074	0.050	-0.044	0.999	0.002	-0.074	0.037	0.038	-0.037	-0.112	
7.5	62	-0.009	0.048	-0.043	0.645	0.356	-0.010	0.045	0.045	0.036	-0.054	
8	62	-0.023	0.049	-0.049	0.820	0.181	-0.023	0.040	0.042	0.017	-0.065	
8.5	52	-0.033	0.057	-0.048	0.898	0.103	-0.033	0.046	0.046	0.014	-0.079	
9	50	0.057	0.054	-0.053	0.021	0.980	0.057	0.062	0.062	0.119	-0.005	
9.5	46	-0.006	0.056	-0.053	0.545	0.456	-0.006	0.042	0.045	0.036	-0.051	
10	41	-0.026	0.054	-0.058	0.781	0.220	-0.025	0.054	0.052	0.028	-0.079	
10.5	33	-0.020	0.065	-0.066	0.715	0.286	-0.020	0.060	0.061	0.040	-0.081	
11	19	0.019	0.096	-0.087	0.308	0.693	0.019	0.076	0.073	0.096	-0.053	
11.5	25	-0.045	0.080	-0.076	0.880	0.121	-0.045	0.082	0.075	0.037	-0.120	
12	23	-0.118	0.074	-0.081	0.996	0.005	-0.118	0.059	0.054	-0.059	-0.171	
12.5	15	-0.029	0.102	-0.096	0.709	0.292	-0.027	0.071	0.064	0.043	-0.093	
13	21	-0.003	0.082	-0.080	0.556	0.445	-0.002	0.061	0.063	0.058	-0.066	
13.5	10	-0.035	0.121	-0.111	0.723	0.278	-0.035	0.058	0.052	0.022	-0.087	
14	4	-0.039	0.206	-0.170	0.628	0.373	-0.038	0.071	0.048	0.032	-0.087	
14.5	5	-0.067	0.174	-0.169	0.756	0.245	-0.067	0.050	0.066	-0.017	-0.133	
15	3	0.032	0.235	-0.199	0.377	0.624	0.032	0.019	0.008	0.052	0.024	
<b>Clases de distancia amplitud (1.3m)</b>												
1.3	70	0.229	0.052	-0.040	0.001	1.000	0.230	0.070	0.063	0.299	0.166	4.265
2.6	113	0.016	0.032	-0.032	0.156	0.845	0.016	0.040	0.037	0.057	-0.021	
3.9	162	0.007	0.028	-0.028	0.326	0.675	0.007	0.033	0.034	0.039	-0.028	
5.2	207	-0.017	0.024	-0.025	0.914	0.087	-0.017	0.024	0.023	0.007	-0.040	
6.5	141	-0.021	0.027	-0.031	0.905	0.096	-0.022	0.029	0.031	0.008	-0.052	
7.8	156	-0.037	0.029	-0.029	0.994	0.007	-0.037	0.028	0.029	-0.008	-0.066	
9.1	137	0.003	0.031	-0.031	0.423	0.578	0.003	0.032	0.034	0.035	-0.031	
10.4	108	-0.019	0.036	-0.037	0.875	0.126	-0.018	0.031	0.033	0.012	-0.052	
11.7	57	-0.035	0.046	-0.052	0.910	0.091	-0.034	0.051	0.047	0.016	-0.081	
13	50	-0.038	0.051	-0.054	0.931	0.070	-0.038	0.043	0.043	0.004	-0.082	
14.3	16	-0.040	0.094	-0.088	0.814	0.187	-0.041	0.038	0.035	-0.002	-0.075	
15.6	6	-0.018	0.163	-0.154	0.584	0.417	-0.018	0.048	0.071	0.030	-0.089	
16.9	2	-0.093	0.287	-0.229	0.740	0.261	0.000	0.093	-0.093	0.000	0.000	
<b>Clases de distancia amplitud (5m)</b>												
5	520	0.032	0.013	-0.011	0.001	1.000	0.033	0.019	0.018	0.051	0.015	8.034
10	545	-0.021	0.011	-0.013	0.999	0.002	-0.021	0.016	0.015	-0.005	-0.036	
15	158	-0.034	0.023	-0.027	0.991	0.010	-0.034	0.022	0.026	-0.011	-0.060	
20	2	-0.093	0.310	-0.256	0.756	0.245	0.000	0.093	-0.093	0.000	0.000	

## Análisis de Autocorrelación Espacial Global sin clonas; Población San Bernardo

Clase (m)	n	r	U	L	Intervalo de confianza (permutación)		Intervalo de confianza (bootstrap)				Intercepción	
					P(r-rand >= r-obs)	P(r-rand <= r-obs)	r (bootstrap)	Ur error	Lr error	Ur		Lr
<b>Clases de distancia amplitud (0.5m)</b>												
0.5	10	0.319	0.143	-0.125	0.001	1.000	0.313	0.183	0.161	0.502	0.158	4.627
1	36	0.218	0.068	-0.071	0.001	1.000	0.215	0.064	0.082	0.282	0.136	
1.5	48	0.186	0.063	-0.060	0.001	1.000	0.181	0.081	0.093	0.267	0.093	
2	34	0.163	0.078	-0.068	0.001	1.000	0.164	0.078	0.077	0.242	0.087	
2.5	31	0.140	0.072	-0.074	0.001	1.000	0.141	0.084	0.080	0.224	0.060	
3	29	0.121	0.074	-0.073	0.001	1.000	0.121	0.092	0.095	0.213	0.026	
3.5	30	0.083	0.077	-0.074	0.015	0.986	0.084	0.074	0.069	0.158	0.014	
4	44	0.094	0.068	-0.062	0.005	0.996	0.094	0.064	0.060	0.159	0.034	
4.5	57	0.021	0.056	-0.053	0.234	0.767	0.022	0.050	0.049	0.071	-0.028	
5	65	-0.062	0.053	-0.053	0.990	0.011	-0.062	0.046	0.044	-0.016	-0.105	
5.5	62	-0.025	0.052	-0.053	0.834	0.167	-0.026	0.050	0.055	0.025	-0.080	
6	74	0.030	0.050	-0.047	0.099	0.902	0.031	0.043	0.042	0.073	-0.012	
6.5	61	0.007	0.055	-0.054	0.387	0.614	0.007	0.054	0.055	0.061	-0.048	
7	72	0.002	0.051	-0.049	0.469	0.532	0.002	0.052	0.052	0.054	-0.049	
7.5	64	-0.033	0.053	-0.054	0.893	0.108	-0.034	0.040	0.045	0.006	-0.078	
8	70	-0.077	0.049	-0.053	0.999	0.002	-0.076	0.051	0.051	-0.026	-0.128	
8.5	62	-0.040	0.052	-0.053	0.935	0.066	-0.040	0.046	0.047	0.006	-0.088	
9	55	0.019	0.057	-0.056	0.253	0.748	0.020	0.053	0.047	0.072	-0.028	
9.5	56	-0.008	0.060	-0.053	0.590	0.411	-0.008	0.047	0.051	0.040	-0.059	
10	51	-0.050	0.058	-0.055	0.967	0.034	-0.050	0.045	0.044	-0.005	-0.094	
10.5	67	-0.014	0.050	-0.048	0.726	0.275	-0.013	0.041	0.042	0.027	-0.056	
11	74	0.015	0.043	-0.051	0.278	0.723	0.016	0.046	0.046	0.061	-0.031	
11.5	76	0.026	0.045	-0.047	0.134	0.867	0.026	0.047	0.048	0.074	-0.021	
12	84	-0.021	0.047	-0.042	0.839	0.162	-0.021	0.043	0.040	0.022	-0.061	
12.5	65	-0.072	0.056	-0.055	0.997	0.004	-0.071	0.045	0.046	-0.026	-0.117	
13	49	-0.086	0.059	-0.056	1.000	0.001	-0.085	0.047	0.043	-0.039	-0.129	
13.5	43	-0.040	0.062	-0.059	0.896	0.105	-0.040	0.054	0.049	0.015	-0.089	
14	35	-0.004	0.075	-0.070	0.549	0.452	-0.006	0.073	0.083	0.070	-0.086	
14.5	32	-0.087	0.074	-0.073	0.991	0.010	-0.093	0.059	0.064	-0.028	-0.151	
15	18	-0.039	0.093	-0.098	0.766	0.235	-0.041	0.075	0.079	0.036	-0.118	
15.5	25	-0.076	0.095	-0.079	0.972	0.029	-0.077	0.053	0.054	-0.023	-0.130	
16	13	-0.082	0.122	-0.112	0.916	0.085	-0.082	0.107	0.094	0.025	-0.176	
16.5	33	-0.073	0.071	-0.068	0.983	0.018	-0.073	0.043	0.047	-0.030	-0.120	
17	22	-0.096	0.090	-0.086	0.984	0.017	-0.095	0.061	0.062	-0.035	-0.157	
17.5	25	-0.046	0.083	-0.075	0.876	0.125	-0.046	0.052	0.056	0.006	-0.102	
18	12	-0.043	0.125	-0.117	0.751	0.250	-0.047	0.117	0.100	0.074	-0.143	
18.5	11	-0.163	0.121	-0.116	0.999	0.002	-0.163	0.092	0.098	-0.071	-0.260	
19	7	-0.121	0.163	-0.151	0.938	0.063	-0.121	0.129	0.129	0.008	-0.249	
19.5	6	0.031	0.169	-0.152	0.337	0.664	0.025	0.162	0.190	0.193	-0.159	
20	2	-0.237	0.344	-0.258	0.951	0.050	0.000	0.237	-0.237	0.000	0.000	
20.5	1	-0.262	0.468	-0.327	0.916	0.086	0.000	0.262	-0.262	0.000	0.000	
<b>Clases de distancia amplitud (1.6m)</b>												
1.6	101	0.213	0.046	-0.038	0.001	1.000	0.213	0.054	0.057	0.268	0.156	5.981
3.2	99	0.140	0.042	-0.038	0.001	1.000	0.141	0.046	0.043	0.186	0.096	
4.8	156	0.028	0.034	-0.031	0.047	0.954	0.028	0.031	0.034	0.059	-0.007	
6.4	215	-0.010	0.026	-0.028	0.753	0.248	-0.010	0.027	0.031	0.017	-0.041	
8	216	-0.031	0.026	-0.026	0.990	0.011	-0.031	0.029	0.030	-0.001	-0.061	
9.6	181	-0.009	0.030	-0.030	0.704	0.297	-0.009	0.027	0.028	0.018	-0.036	
11.2	213	-0.003	0.027	-0.027	0.594	0.407	-0.003	0.026	0.025	0.023	-0.028	
12.8	227	-0.040	0.025	-0.025	1.000	0.001	-0.040	0.025	0.025	-0.016	-0.065	
14.4	125	-0.047	0.034	-0.034	0.995	0.006	-0.047	0.036	0.035	-0.011	-0.081	
16	59	-0.068	0.054	-0.057	0.991	0.010	-0.070	0.039	0.042	-0.029	-0.110	
17.6	82	-0.071	0.042	-0.046	0.997	0.004	-0.071	0.031	0.030	-0.040	-0.101	
19.2	32	-0.095	0.072	-0.076	0.991	0.010	-0.097	0.066	0.048	-0.030	-0.144	
20.8	5	-0.067	0.188	-0.183	0.752	0.249	-0.078	0.202	0.195	0.135	-0.262	
<b>Clases de distancia amplitud (5m)</b>												
5	384	0.097	0.020	-0.016	0.001	1.000	0.097	0.023	0.020	0.121	0.077	9.257
10	627	-0.017	0.012	-0.014	0.989	0.012	-0.017	0.017	0.016	-0.001	-0.033	
15	543	-0.026	0.014	-0.017	0.999	0.002	-0.025	0.016	0.016	-0.010	-0.041	
20	156	-0.077	0.027	-0.032	1.000	0.001	-0.076	0.024	0.026	-0.053	-0.102	

Apéndice IX. Número de bandas compartidas entre GML.

Venados

GML	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	Y	Z	A2	B2	C2	D2			
A																																
B	21																															
C	25	24																														
D	21	22	22																													
E	21	20	22	22																												
F	20	19	23	23	25																											
G	23	18	22	22	22	21																										
H	17	18	18	18	20	17	24																									
I	21	20	22	22	22	21	22	18																								
J	21	20	22	22	22	21	24	20	28																							
K	24	21	25	19	19	20	25	19	23	25																						
L	21	20	24	20	18	21	24	22	22	24	25																					
M	18	17	19	23	19	20	19	17	19	17	18	17																				
N	18	19	21	23	19	20	21	19	17	19	20	21	26																			
O	19	18	24	20	20	21	20	18	18	18	19	20	23	25																		
P	22	19	21	21	19	18	21	19	21	21	20	21	22	22	21																	
Q	21	18	20	20	18	17	20	18	20	20	19	20	23	23	22	29																
R	22	21	25	19	17	18	21	19	19	19	24	23	18	20	21	22	21															
S	22	23	25	19	17	18	21	21	19	19	24	23	18	20	21	20	19	28														
T	22	21	25	21	19	20	23	19	21	21	24	23	20	22	23	24	23	28	26													
U	19	16	22	16	18	17	18	18	16	16	19	18	17	19	22	19	20	25	23	25												
V	25	20	26	20	22	21	24	20	22	22	25	22	21	21	24	23	22	25	25	27	24											
W	20	21	23	21	23	22	19	17	21	19	18	21	22	22	23	20	21	20	20	22	21	23										
Y	22	21	23	23	23	22	21	19	21	21	18	23	20	22	23	22	23	20	20	22	21	23	28									
Z	23	20	22	20	24	21	22	18	20	20	21	20	21	21	22	21	22	21	21	23	22	26	27	27								
A2	22	21	21	19	21	18	21	19	19	21	22	19	20	22	21	20	21	20	22	22	21	25	24	24	27							
B2	21	22	22	20	20	19	18	16	20	18	19	18	21	21	22	19	20	21	23	23	22	24	27	25	26	27						
C2	24	21	23	19	19	20	19	17	21	19	20	21	18	18	19	20	19	22	24	22	19	23	22	22	21	22	25					
D2	19	20	22	22	20	19	22	20	22	19	22	17	19	20	21	22	23	21	23	22	20	23	25	22	22	19	20	17				
E2	17	18	20	22	16	17	20	18	20	22	19	22	21	23	22	23	24	21	19	23	20	20	21	23	20	21	20	17	24			
F2	15	14	16	20	16	17	20	18	18	20	17	18	19	21	20	19	20	21	19	21	20	18	17	19	18	19	18	17	22			
G2	21	16	20	18	18	15	22	18	20	22	21	20	19	21	22	23	24	21	19	23	22	24	21	23	24	25	22	19	22			
H3	19	18	22	22	20	19	22	20	20	22	19	22	19	23	24	21	22	21	19	23	22	22	23	25	22	23	22	19	24			
I2	20	19	23	21	19	18	21	19	21	23	20	23	18	22	23	22	23	22	20	24	23	23	24	26	23	24	23	20	25			
J2	21	20	24	24	22	21	24	20	22	24	21	22	17	21	22	21	20	21	19	23	20	22	21	23	20	21	20	19	24			
K2	21	18	22	20	20	19	22	20	22	24	23	24	17	19	20	21	20	21	19	21	18	22	19	21	20	21	18	19	20			
L2	22	19	23	21	21	20	21	19	23	23	22	23	18	18	21	22	21	22	21	22	20	22	19	23	20	22	21	20	19	20		
M2	19	16	20	20	20	17	22	22	20	22	19	20	19	21	22	21	19	21	22	22	21	22	22	21	23	22	20	17	24			
N2	19	14	18	18	18	17	22	20	20	22	21	20	17	19	20	19	20	21	19	21	22	22	19	21	22	23	20	17	22			
O2	22	21	25	19	19	18	21	15	19	21	24	21	14	18	19	18	17	24	22	24	21	23	20	20	21	22	21	20	21			
P2	17	18	20	20	20	19	22	18	20	22	21	20	17	21	20	19	18	21	21	23	18	22	19	19	20	21	20	19	18			
Q2	20	17	21	19	21	18	21	17	19	19	20	17	20	20	23	20	21	22	20	24	23	25	22	22	25	24	23	18	21			
R2	18	17	19	21	19	16	21	17	19	19	20	17	22	22	21	20	21	22	20	24	21	23	20	20	23	22	21	16	21			
S2	22	17	21	21	21	18	23	19	21	21	20	19	20	20	23	22	23	22	20	24	23	25	22	24	25	24	23	20	23			
T2	22	17	23	17	19	18	23	19	17	19	24	19	18	20	21	18	19	24	22	22	23	23	18	18	21	22	19	18	21			
U2	22	21	21	21	19	16	21	17	19	21	24	21	22	24	19	20	21	22	22	22	19	23	22	22	25	26	23	20	19			
V2	19	18	18	20	18	15	20	16	18	18	21	16	21	16	17	18	21	19	19	18	18	18	19	17	20	21	20	17	20			
W2	19	18	18	22	18	19	18	14	20	18	21	18	25	21	18	17	18	19	19	19	16	20	21	19	22	21	22	19	16			
X2	19	16	18	18	18	17	18	14	16	18	21	18	19	21	20	17	18	19	17	19	18	20	19	19	22	23	20	17	16			
Y2	20	17	19	19	19	18	17	13	17	17	20	17	20	20	21	18	19	20	18	20	19	21	20	20	23	22	21	18	17			

<b>GMI</b>	<b>E2</b>	<b>F2</b>	<b>G2</b>	<b>H3</b>	<b>I2</b>	<b>J2</b>	<b>K2</b>	<b>L2</b>	<b>M2</b>	<b>N2</b>	<b>O2</b>	<b>P2</b>	<b>Q2</b>	<b>R2</b>	<b>S2</b>	<b>T2</b>	<b>U2</b>	<b>V2</b>	<b>W2</b>	<b>X2</b>	
<b>D2</b>																					
<b>E2</b>																					
<b>F2</b>		26																			
<b>G2</b>		26	24																		
<b>H3</b>		26	24	26																	
<b>I2</b>		27	23	27	29																
<b>J2</b>		24	22	24	28	27															
<b>K2</b>		22	20	24	26	25	26														
<b>L2</b>		21	19	23	25	24	25	29													
<b>M2</b>		24	24	26	28	27	26	26	25												
<b>N2</b>		22	24	26	26	25	24	26	25	28											
<b>O2</b>		21	19	23	23	24	25	23	22	21	21										
<b>P2</b>		20	22	20	22	21	22	20	19	20	20	23									
<b>Q2</b>		21	21	25	25	24	23	23	24	25	25	24	23								
<b>R2</b>		21	21	23	23	22	21	21	22	23	23	22	23	28							
<b>S2</b>		23	23	27	27	26	25	25	26	27	27	22	21	28	26						
<b>T2</b>		19	21	23	23	22	23	23	22	25	25	24	19	24	22	24					
<b>U2</b>		21	19	23	21	22	19	21	20	21	21	22	21	22	24	22	22				
<b>V2</b>		18	20	20	20	19	20	20	19	22	22	21	18	21	23	21	25	25			
<b>W2</b>		18	18	18	18	17	16	20	21	18	20	17	18	21	23	21	19	25	24		
<b>X2</b>		18	18	22	22	21	20	24	23	22	24	21	18	23	23	23	23	25	24	24	
<b>Y2</b>		17	17	21	21	20	19	23	24	21	23	20	17	24	24	24	22	24	23	25	29

# San Bernardo

GML	A3	B3	C3	D3	E3	F3	G3	H3	I3	J3	K3	L3	M3	N3	O3	P3	Q3	R3	S3	T3	U3	V3	W3	X3	Y3	Z3	A4	B4	C4	D4	
A3																															
B3	24																														
C3	25	29																													
D3	24	20	21																												
E3	21	25	24	17																											
F3	21	25	24	21	26																										
G3	22	20	21	22	19	21																									
H3	24	22	21	22	21	21	26																								
I3	23	23	22	21	22	22	25	29																							
J3	22	22	21	20	23	23	24	28	29																						
K3	18	20	21	16	21	21	24	20	21	20																					
L3	23	19	20	23	18	22	23	21	20	19	21																				
M3	22	18	19	22	17	21	24	22	21	20	22	29																			
N3	16	16	17	18	15	19	22	18	17	16	22	23	24																		
O3	20	20	21	20	19	21	24	22	21	20	24	25	26	26																	
P3	20	20	21	20	19	21	24	20	19	18	24	25	24	26	28																
Q3	22	22	23	18	21	21	22	22	21	20	22	23	22	22	26	26															
R3	21	21	22	19	20	22	23	21	20	19	23	24	23	23	27	27	29														
S3	22	20	21	20	17	19	22	20	19	18	20	23	22	20	24	24	26	27													
T3	21	21	22	21	18	22	21	19	18	17	21	24	23	23	25	25	27	28	27												
U3	21	19	20	19	18	22	19	17	16	17	19	24	23	21	23	23	25	26	25	28											
V3	19	17	18	15	16	18	15	15	16	15	15	20	19	15	15	19	18	19	18	18											
W3	20	18	19	16	17	19	16	16	17	16	16	21	20	16	16	16	20	19	20	19	19	29									
X3	18	18	19	16	17	21	18	16	17	16	20	21	22	20	20	18	18	19	18	19	19	25	26								
Y3	20	22	23	20	17	21	20	18	19	18	22	21	20	20	20	22	22	23	22	25	23	17	18	18							
Z3	20	20	21	20	15	19	20	18	19	18	20	21	20	20	18	20	20	21	22	23	21	19	20	18	28						
A4	17	19	20	17	16	20	19	17	18	17	21	20	19	21	19	21	21	22	19	22	20	20	21	21	27	27					
B4	17	19	20	15	18	18	21	17	16	15	23	20	19	21	21	23	23	24	23	22	20	18	19	19	23	23	24				
C4	22	18	19	20	15	19	20	18	17	16	18	23	22	18	18	20	20	21	22	21	21	21	21	22	20	24	24	23	23		
D4	19	21	22	15	18	18	17	19	20	19	19	18	17	17	19	19	23	22	21	20	18	20	21	19	23	23	24	24	21		
E4	18	22	23	14	21	19	18	18	19	18	22	19	18	18	20	20	24	23	20	21	19	19	20	18	22	22	23	23	18	25	
F4	19	23	24	15	22	20	17	17	18	17	21	18	17	17	19	19	21	20	17	18	16	20	21	21	19	19	22	20	17	22	
G4	20	20	21	18	19	21	20	20	21	20	22	21	20	22	22	24	26	25	22	25	23	19	20	18	26	24	25	21	22	23	
H4	19	19	20	17	18	20	23	19	20	19	23	22	21	23	23	25	25	26	25	24	22	20	21	19	23	25	24	24	21	22	
I4	19	17	18	19	16	18	23	21	22	21	21	20	19	19	19	21	21	22	21	20	18	18	19	17	23	25	24	22	21	24	
J4	17	19	20	17	20	24	21	17	18	19	23	22	21	23	21	23	23	24	21	24	24	20	21	21	25	25	26	24	21	22	
K4	18	18	19	18	19	23	22	18	19	20	22	23	22	22	20	22	22	23	22	23	23	21	22	20	24	26	25	23	22	21	
L4	18	18	19	20	19	23	24	20	21	22	22	23	22	20	22	22	23	22	23	23	19	20	18	24	24	23	21	22	19		
M4	20	18	19	18	19	21	24	20	19	20	22	23	22	22	22	24	24	25	24	23	23	19	20	18	22	24	23	25	22	21	
N4	18	20	21	18	21	23	20	16	17	16	24	21	20	22	20	22	22	23	20	23	21	21	22	22	24	24	25	25	22	21	
O4	19	23	22	19	22	26	21	19	20	19	23	22	21	21	21	23	23	24	21	24	22	20	21	21	25	23	24	22	23	20	
P4	18	18	19	18	19	21	22	18	19	18	24	23	22	22	20	22	22	23	22	23	21	21	22	20	24	26	25	25	22	21	
Q4	15	17	18	17	16	20	19	15	14	15	17	20	19	21	19	21	19	20	17	20	20	16	17	17	21	21	24	22	19	18	
R4	17	15	16	17	14	18	21	19	18	19	17	18	19	21	17	17	17	18	17	18	18	16	17	17	21	23	24	20	21	18	
S4	19	17	16	17	16	20	17	17	18	19	17	20	19	17	15	17	17	18	19	20	22	20	19	17	23	25	22	18	21	18	
T4	20	18	19	20	19	23	22	22	23	24	22	23	24	22	22	20	20	21	20	21	21	19	20	22	22	24	23	19	20	21	
U4	19	17	18	19	18	22	23	21	22	23	23	22	23	23	21	21	19	20	19	20	20	18	19	21	23	25	24	20	21	20	
V4	21	17	18	19	18	22	21	21	22	23	19	22	23	21	21	19	19	20	19	20	22	18	19	21	19	21	20	16	19	18	
W4	20	16	17	18	19	21	20	20	21	22	20	21	22	20	20	18	18	19	18	19	21	17	18	20	18	20	19	17	18	17	
X4	20	18	19	20	19	23	22	22	23	24	20	21	22	22	22	20	20	21	20	21	21	17	18	20	20	22	21	17	18	19	
Y4	21	19	20	21	18	22	23	23	24	23	21	22	23	23	23	21	21	22	21	22	20	18	19	21	21	23	22	18	19	20	
Z4	20	20	21	18	19	21	26	22	23	22	24	21	22	24	24	24	22	23	22	21	19	17	18	20	20	22	21	21	18	19	
A5	19	19	20	19	18	20	27	23	24	23	23	20	21	23	23	23	21	22	21	20	18	16	17	19	19	21	20	20	17	18	
B5	20	18	19	20	17	19	26	24	25	24	22	19	20	22	22	22	20	21	20	19	17	15	16	18	20	22	21	19	18	19	
C5	21	19	20	15	20	18	17	19	20	19	17	16	17	19	19	17	19	18	17	16	16	18	19	21	15	15	16	16	17	20	
D5	23	19	20	19	20	20	21	21	20	19	19	20	21	21	23	21	21	22	19	20	20	16	17	21	17	17	18	18	19	18	
E5	21	19	20	19	22	20	23	23	24	23	23	20	21	19	23	21	21	22	21	20	18	14	15	17	19	19	18	18	17	18	
F5	23	19	20	17	20	18	19	21	22	23	21	18	19	15	19	17	19	18	19	18	20	14	15	15	17	17	14	14	15	16	
G5	21	19	20	19	18	20	23	23	24	23	21	20	21	23	23	21	21	22	21	20	18	16	17	19	19	21	20	18	17	19	

<b>GML</b>	<b>D4</b>	<b>E4</b>	<b>F4</b>	<b>G4</b>	<b>H4</b>	<b>I4</b>	<b>J4</b>	<b>K4</b>	<b>L4</b>	<b>M4</b>	<b>N4</b>	<b>O4</b>	<b>P4</b>	<b>Q4</b>	<b>R4</b>	<b>S4</b>	<b>T4</b>	<b>U4</b>	<b>V4</b>	<b>W4</b>	<b>X4</b>	<b>Y4</b>	<b>Z4</b>	<b>A5</b>	<b>B5</b>	<b>C5</b>	<b>D5</b>	<b>E5</b>	<b>F5</b>	
<b>D4</b>																														
<b>E4</b>	25																													
<b>F4</b>	22	20																												
<b>G4</b>	23	27	19																											
<b>H4</b>	22	22	20	25																										
<b>I4</b>	24	23	18	23	26																									
<b>J4</b>	22	21	20	25	26	24																								
<b>K4</b>	21	23	19	24	27	25	29																							
<b>L4</b>	19	22	17	24	25	25	27	28																						
<b>M4</b>	21	20	19	22	27	25	27	28	26																					
<b>N4</b>	21	22	21	24	25	23	27	26	24	24																				
<b>O4</b>	20	22	20	25	24	22	26	25	25	23	27																			
<b>P4</b>	21	21	19	24	27	25	27	28	26	26	28	25																		
<b>Q4</b>	18	22	18	19	20	18	24	23	21	23	21	20	21																	
<b>R4</b>	18	19	16	19	20	20	22	23	21	23	19	18	21	24																
<b>S4</b>	18	17	14	21	22	22	24	25	23	23	21	22	23	18	20															
<b>T4</b>	21	17	19	22	23	23	25	26	24	24	22	21	24	19	23	23														
<b>U4</b>	20	20	18	23	24	24	26	27	25	25	23	22	25	20	24	24	29													
<b>V4</b>	18	19	16	21	22	20	22	23	21	21	19	18	21	18	22	22	27	26												
<b>W4</b>	17	17	15	20	21	19	21	22	20	20	20	17	22	17	21	21	26	25	29											
<b>X4</b>	19	16	17	22	23	21	23	24	22	22	20	19	22	19	23	21	28	27	29	28										
<b>Y4</b>	20	18	18	23	24	22	22	23	21	21	21	20	23	18	22	20	27	26	28	27	29									
<b>Z4</b>	19	19	19	22	27	23	23	24	22	24	22	21	24	19	21	19	24	25	25	24	26	27								
<b>A5</b>	18	20	18	21	26	24	22	23	23	23	21	20	23	18	20	18	23	24	24	23	25	26	29							
<b>B5</b>	19	19	17	22	25	25	21	22	22	22	20	19	22	17	21	19	24	25	25	24	26	27	28	29						
<b>C5</b>	20	18	20	19	18	16	16	15	13	15	17	16	15	12	16	14	19	18	22	21	21	22	21	20	21					
<b>D5</b>	18	19	20	19	20	18	18	17	15	19	19	18	17	16	18	16	21	20	24	23	23	24	23	22	23	26				
<b>E5</b>	18	19	18	21	22	20	18	19	19	19	19	18	21	14	18	16	23	22	24	25	25	26	25	24	25	22	24			
<b>F5</b>	16	19	16	19	18	16	16	17	17	15	14	17	12	16	18	21	20	24	25	23	22	21	20	21	20	20	24			
<b>G5</b>	19	17	18	21	24	22	20	21	19	21	19	18	21	16	22	18	25	24	26	25	27	28	27	26	27	24	24	26	22	

Apéndice X Variación genética en el género *Agave* (modificado de Scheinvar, 2008)

Especie	Marcador	N	Diversidad			Estructuración		Distancia genética			Fuente
			$H_E$	$Var(H_E)$	%P	$F_{ST}$	$N_m$	Max	Min	Prom	
<i>A. celsii</i>	ISSR	156	0.248	0.011	89.40	0.13	1.8	0.089	0.23	0.051	Rocha, 2006
<i>A. difformis</i>	ISSR	158	0.202	0.018	62.70	0.113	2.36	0.062	0.013	0.033	Rocha, 2006
<i>A. garcia-mendozae</i>	ISSR	133	0.240	0.030	72.40	0.098	1.3	0.046	0.022	0.036	González, 2005
<i>A. hidalgensis</i>	ISSR	276	0.205	0.038	71.50	0.064	4.71	0.021	0.021	0.021	Rocha, 2006
<i>A. xylonacantha</i>	ISSR	132	0.183	–	67.69	0.063	6.1	0.019	0.009	0.014	Colín, 2006
<i>A. xylonacantha</i>	ISSR	155	0.199	0.012	75.40	0.059	4.67	0.027	0.006	0.016	Rocha, 2006
<i>A. angustifolia</i> (silvestre)	ISSR	228	0.322	0.029	87.93	0.17	–	–	–	–	Vargas, 2007
<i>A. angustifolia</i> (cultivar)	ISSR	960	0.270	0.061	69.28	0.36	–	–	–	–	Vargas, 2007
<i>A. tequilana</i> var. Azul	ISSR	45	0.080	0.000	20.20	–	–	–	–	–	Vargas, 2007
<i>A. cupreata</i>	ISSR	153	0.257	0.030	88.80	0.145	1.49	0.093	0.035	0.067	Aguirre, 2004
<i>A. cupreata</i> (vivero)	ISSR	100	0.313	0.001	84.44	0.0952	17.82	0.06	0.03	0.046	Scheinvar, 2008
<i>A. cupreata</i> (silvestre)	ISSR	134	0.357	0.001	94.44	0.1049	11.02	0.1	0.03	0.06	Scheinvar, 2008
<i>A. potatorum</i>	ISSR	179	0.246	0.025	83.30	0.084	2.99	0.055	0.023	0.036	Aguirre, 2004
<i>A. potatorum</i>	ISSR	311	0.312	0.001	93.33	0.791	14.05	0.07	0.03	0.038	Scheinvar, 2008
<i>A. cenulata</i>	RAPD	199	0.181	0.009	77.62	0.098	4.38	0.028	0.002	0.018	Navarro <i>et al.</i> , 2003
<i>A. desertii</i>	RAPD	289	0.210	0.044	68.23	0.14	2.2	0.02	0.08	0.04	González, 2001
<i>A. karwinskyi</i>	RAPD	41	0.210	0.086	49.00	0.49	0.47	0.4	0.15	0.275	Lopez, 2004
<i>A. subsimplex</i>	RAPD	102	0.143	0.009	78.56	0.084	6.142	0.024	0.004	0.014	Navarro <i>et al.</i> , 2003
<i>A. lechuguilla</i>	ISO	36	0.394	0.048	96.00	0.083	2.28	0.17	0.007	0.07	Silva, 2003
<i>A. victoria-reginae</i>	ISO	35	0.334	0.068	83.00	0.236	–	0.25	0.025	0.182	Martínez <i>et al.</i> , 1999
<i>A. striata</i>	ISSR	150	0.237	0.028	76.70	0.103	2.7	0.051	0.012	0.036	Rocha, 2006
<i>A. striata striata</i>	ISSR	231	0.191	0.023	70.27	0.192	1.05	0.138	0.041	0.099	Trejo, 2006
<i>A. striata falcata</i>	ISSR	310	0.265	0.024	80.85	0.279	0.64	0.076	0.021	0.039	Trejo, 2006
<i>A. striata</i> (micro-escala)	ISSR	226	0.407	0.000	93.30	0.999	2.275	–	–	–	este estudio
<i>A. striata</i> (venados)	ISSR	98	0.388	0.000	80.00	0.612	0.158	–	–	–	este estudio
<i>A. striata</i> (San Bernardo)	ISSR	128	0.395	0.000	83.30	0.67	0.123	–	–	–	este estudio

## LITERATURA CONSULTADA

- Aguirre X (2004) Genética de poblaciones de *A. cupreata* y *A. potatorum*: aportaciones para el manejo y conservación de dos especies mezcaleras. Tesis de licenciatura, Fac. Ciencias. UNAM. México
- Arnaud-Haond S, Albert F, Teixeira S, Procaccini G, Serrão EA (2005) Assessing genetic diversity in clonal organisms: low diversity or low resolution? Combining power and cost efficiency in selecting markers. *Journal of Heredity* **96**:334-440.
- Arnaud-Haond S, Belkhir (2007) GENCLONE: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organization. *Molecular Ecology Notes* **7**(1):15-17.
- Arnaud-Haond S, Duarte CM, Alberto F, Serrão EA (2007) Standardizing methods to address clonality in population studies. *Molecular Ecology* **15**:1115-1139.
- Axelrod DI (1983) Paleobotanical history of the western deserts. En Wells SG, Haragan DR [eds] *Origin and evolution of deserts*. 113-129. University of New Mexico Press. Albuquerque NM.
- Awise JC (2004) *Molecular markers, natural history, and evolution*. 2<sup>a</sup> ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland MA.
- Balloux F, Lehmann L, de Meeûs T (2003) The population genetics of clonal and partially clonal diploids. *Genetics* **164**:1635-1644.
- Balloux F (2004) Heterozygote excess in small populations and the heterozygote-excess effective population size. *Evolution* **58**:1891-1900.
- Barbujani G (1987) Autocorrelation of Gene Frequencies Under Isolation by distance. *Genetics* **117**:777-782.
- Begon M, Townsend CR, Harper JL (2006) *Ecology: from individual to ecosystems*. 4<sup>a</sup> ed. Wiley-Blackwell. 738 pp.
- Carrillo P, Vega RA, Delgado RR (2003) *Agave rzedowskiana*, a new species in subgenus *Littaea* (Agavaceae) from western Mexico. *Brittonia* **55**:240-244.
- Carillo IG (2006) Distribución especial de clones de *Ferocactus robustus*: consecuencias sobre la reproducción sexual. Tesis de Maestría. Instituto de Ecología. UNAM. México.

- Chakravorty S (1995) Identifying Crime Clusters: The Spatial Principles. *Middle States Geographer* **28**:53-58.
- Chung MY, Nason JD, Chung MG (2004) Implications of clonal structure for effective population size and genetic drift in a rare terrestrial orchid, *Cremastra appendiculata*. *Conservation Biology* **18**:1515-1524.
- Chung MY, Suh Y, López-Pujol J, Nason JD, Chung MG (2005) Clonal and fine-scale genetic structure in populations of a restricted Korean endemic, *Hosta jonesii* (Liliaceae) and the implications for conservation. *Annals of Botany* **96**:279-288.
- Chung MG, Epperson BK (1999) Spatial genetic structure of clonal and sexual reproduction in populations of *Adenophora grandiflora* (Campanulaceae). *Evolution* **53**:1068-1078.
- Chung JM, Lee BL, Kim JS, Park CW, Chung MY, Chung MG (2006) Fine-scale genetic structure among Genetic Individuals of the clone-forming monotypic genus *Echinosophora koreensis* (Fabaceae). *Annals of Botany* **98**:165-173.
- Clark-Tapia R, Alfonso-Corrado C, Eguiarte LE, Molina-Frenae F (2005) Clonal diversity and distribution in *Stenocereus eruca* (Cactaceae), a narrow endemic cactus of the Sonoran desert. *American Journal of Botany* **92**:272-278.
- Colín R (2006) Análisis de la diversidad genética y estructura poblacional de *A. xylonacantha* (Agavaceae) utilizando ISSR como marcador molecular, Tesis de licenciatura, Fac. Ciencias, UNAM, México.
- Colunga-García P, Eguiarte LE, Zizumbo-Villareal D (2007) *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves*. CICY-CONACYT-CONABIO-INE. México, DF.
- De Kroon H, Stuefer JF, Dong, M (1994) On plastic and nonplastic variation in clonal plant morphology and its ecological significance. *Folia Geobotanica Phytotaxonomica* **29**:123-138.
- Degen B, Scholz F (1998) Spatial genetic differentiation among populations of European beech (*Fagus sylvatica* L) in western Germany as identified by geostatistical analysis. *Forest Genetics* **5**:191-199.
- Dobzhansky T (1937) *Genetics and the origin of species*. Columbia University Press. Morningside Heights NY.

- Degen B, Caron H, Bandou E, Magias L, Chevallier MH, Leveau A, Kremer A (2001) Fine-scale spatial genetic structure of eight tropical tree species as analysed by RAPDs. *Heredity* **87**:497-597.
- Double MC, Peakall R, Beck NR, Cockburn A (2005) Dispersal, Philopatry, and infidelity: Dissecting local genetic structure in superb fairy-wrens (*Malurus cyaneus*). *Evolution* **59**:625-635.
- Eckert CG (1999) Clonal plant research: proliferation, integration, but not too much evolution. *American Journal of Botany* **86**:1649-1654.
- Eckert CG (2001) The loss of sex in clonal plants. *Evolutionary Ecology* **15**:501-520.
- Eckert CG, Lui K, Bronson K, Corradini P, Bruneau A (2003) Population genetic consequences of extreme variation in sexual and clonal reproduction in an aquatic plant. *Molecular Ecology* **12**:331-344.
- Eguiarte L (1990) Genética de poblaciones de *Astrocaryum mexicanum* Liebm. en Los Tuxtlas, Veracruz. Tesis doctorado (Doctorado en Ecología)-UNAM, Colegio de Ciencias y Humanidades. Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado. México
- Eguiarte L, Souza V, Silva-Montellano A (2000) Evolución de la Familia Agavaceae: Filogenia, Biología Reproductiva y Genética de Poblaciones, *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. **66**:131-150.
- Ellstrand NC, Roose ML (1987) Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *American Journal of Botany* **74**:123-131.
- Epperson BK (1990) Spatial autocorrelation of genotypes under directional selection. *Genetics* **124**:757-771.
- Epperson BK (2005) Estimating dispersal from short distance spatial autocorrelation. *Heredity* **95**:7-15.
- Eriksson O (1993) Dynamics of genets in clonal plants. *Trends in Ecology and Evolution* **8**:313-316.
- Escudero A, Iriondo JM, Torres ME (2003) Spatial Analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biological Conservation* **113**:351-365.

- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**:479-491.
- Fager EW (1972) Diversity: a sampling study. *American Naturalist* **106**:293-310.
- Flores NI (2007) Coevolución entre *Agave sensu lato* y sus murciélagos polinizadores (Phyllostomidae). Tesis de Maestría. Instituto de Ecología. UNAM. México.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe JA (2002) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.
- Franks SJ, Richards CL, Gonzales E, Cousins JE, Hamrick JL (2004) Multi-scale Genetic Analysis of *Uniola paniculata* (Poaceae). *American Journal of Botany* **91**:1345-1351.
- García-Mendoza A, Galván R (1995) Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. **56**:7-24.
- Gaudeul M, Stenøien HK, Ågren J (2007) Landscape structure, clonal propagation, and genetic diversity in Scandinavian populations of *Arabidopsis lyrata* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **94**:1144-1155.
- Gentry G S (1982) *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press. Tucson AR. (670p)
- González R (2001) Análisis de variación genética de *Agave desertii* en el desierto sonorense por medio de marcadores moleculares (RAPDs). Tesis de licenciatura. Facultad de ciencias. UNAM. México.
- González A (2005) Biología Reproductiva y Genética de Poblaciones de *Agave garciae-mendozae*. Tesis de Licenciatura, Fac. Ciencias, UNAM, México. Asesor: Dr. Eguiarte L.
- Good-Ávila S, Souza V, Gaut B, Eguiarte LE(2006) Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *PNAS* **103**:9124-9129.
- Halkett F, Simon J-C, Balloux F (2005) Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms. *TRENDS in Ecology and Evolution* **20**:194-201.
- Hamrick JL, Godt JW (1989) Allozyme diversity in plant species en Brown HD, Clegg MT, Kaher AL, Weir BS. *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sinauer Associates. Sunderland MA. pp:43-63.

- Hamrick JL, Godt JW (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* **351**:1291-1298.
- Hamrick JL, Nason JD (1996) Consequences of dispersal in plants. En: Rhodes Jr OE, Chesser RK, Smith MH, eds. *Population dynamics in ecological space and time*. Chicago, IL; University of Chicago Press. pp.203-236.
- Hangelbroek HH, Ouborg NJ, Santamaría L, Schwenk K (2002) Clonal diversity and structure within population of the pondweed *Potamogeton pectinatus* foraged by Bewick's swans. *Molecular Ecology* **11**:2137-2150.
- Hartl DL, Clark AG (1997) *Principles of population genetics*. 2<sup>a</sup> ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland MA.
- Hardy OJ (2003) Estimation of pairwise relatedness between individual and characterization of isolation-by-distance processes using dominant genetic markers. *Molecular Ecology* **12**:1577-1588.
- Hedrick P (2005) *Genetics of populations*. 3<sup>a</sup> ed. Jones and Barlett Publishers. Sudbury MA.
- Heywood SH (1991) Spatial analysis of genetic variation in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* **22**:35-355.
- Hill MO (1973) Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology* **54**:427-432.
- Holsinger KE, Lewis PO, Dey DK (2002) A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. *Molecular Ecology* **11**:1157-1164.
- Holsinger KE, Lewis PO (2001-2007) Hickory 1.1 en <http://darwin.eeb.uconn.edu/hickory/hickory.html>
- Honnay O, Jacquemyn H (2008) A meta-analysis if the relation between mating system, growth form and genotypic diversity in clonal plant species. *Evolutionary Ecology* **22**:299-312.
- Hurlbert SH (1971) The non-concept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology* **52**:574-586.
- Kuhdo H, Shibaike H, Takasu H, Whigham DF, Kawano S (1999) Genet structure and determinants of clonal structure in a temperate deciduous woodland herb, *Uvularia perfoliata*. *Journal of Ecology* **87**:244-257.

- Kitada S, Kitakado T, Kishino H (2007) Empirical bayes inference of pairwise  $F_{ST}$  and its distribution in the genome. *Genetics* **177**:861-873.
- Legendre P, Fortin MJ (1989) Spatial patterns and ecological analysis. *Plant Ecology* **80**:107-138.
- Legendre P (1993) Spatial autocorrelation: trouble or new paradigm. *Ecology* **74**:1659-1673.
- Lewontin RC, Hubby JL (1966) A molecular approach to the study of the genetic heterozygosity in natural populations II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoscura*. *Genetics* **54**:595-609.
- Li J, Dong M (2008) Fine-scale clonal structure and diversity of invasive plant *Mikania micrantha* H.B.K. And its plant parasite *Cuscuta campestris* Yunker. *Biological Invasions* (en línea).
- Loveless MD, Hamrick JL (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* **15**:60-90.
- López ER (2004) Diversidad genética de la población de *Agave karwinskii* Zucc. en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. Tesis de licenciatura. FES Iztacala. UNAM
- Lovett-Doust L (1981) Population dynamics and local specialization in a clonal perennial (*Ranunculus repens*). *Journal of Ecology* **69**:743-755.
- Lynch M, Milligan BG (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* **3**:91-99.
- Lynch M, Walsh B (1998) *Genetic Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland MA.
- Mandujano MC (2007) La clonalidad y sus efectos en la biología de poblaciones. En Eguiarte LE, Souza V, Aguirre X. *Ecología Molecular*. SEMARNAT-INECONABIO-UNAM. pp. 215-250.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Research* **27**:209-220.
- Martínez-Palacios A, Eguiarte LE, Furnier GR (1999) Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoria-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. *American Journal of Botany* **86**:1093-1098.

- McLellan AJ, Prati D, Kaltz O, Schmid B (1997) Structure and analysis of phenotypic and genetic variation in clonal plants. Eds. *The Ecology and Evolution of Clonal Plants*. Leiden, the Netherlands: Backhuys.
- Miller MP (1997) Tools for Population Genetic Analyses TFPGA 1.3. A Windows program for the analyses of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.
- Molina-Freaner F, Eguiarte LE (2003) The pollination biology of two paniculate agaves (Agavaceae) from Northwestern Mexico: contrasting roles of bats as pollinators. *American Journal of Botany* **90**:1016-1024.
- Morris AB, Small RL, Cruzan MB (2004) Variation in Frequency of Clonal Reproduction Among Populations of *Fagus grandifolia* Ehrh. in Response to Disturbance. *Castanea* **69**:38-51.
- Navarro Q, González R, Molina FF, Eguiarte LE (2003) Genetic differentiation in the *Agave desertii* (Agavaceae) complex of the Sonoran desert. *Heredity* **90**:220-227.
- Nei M (1972) Genetic distance between populations. *The American Naturalist* **106**:283-292.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *PNAS* **7**(12):3321-3323.
- Nei M (1977) *F*-statistics and analyses of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Hum. Genet* **41**:225-234.
- Noble P (1988) *Environmental biology of agaves and cacti*. Cambridge University Press New York NY.
- Parker PG, Snow AA, Booton G, Schung M, Fuerst P (1998) What molecules can tell us about populations: Choosing and using a molecular marker. *Ecology*, **79**:361-382.
- Peakall R, Smouse PE, Huff DR (1995) Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of Buffalograss (*Buchloë dactyloides* Nutt. Engelm.) *Molecular ecology* **4**:135-147.
- Peakall R, Ruibal M, Lindenmayer DB (2003) Spatial autocorrelation analysis offers new insights into gene flow in the Australian bush rat, *Rattus fuscipes*. *Evolution* **57**:1182-1195.
- Peakall R, Smouse PE (2005) Appendix 2- Spatial Autocorrelation in GenAlEx.

- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**:288-295.
- Pielou EC (1969) *An introduction to the mathematical ecology*. Wiley. NY, USA.
- Pradeep Reddy M, Sarla N, Siddiq EA (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* **128**:9-17.
- Raymond M, Rousset F (1995) An exact test for population differentiation. *Evolution* **49**:1280-1283.
- Reisch C, Kellermeier J (2007) Microscale variation in alpine grasslands: AFLPs reveal a high level of genotypic diversity in *Primula minima* (Primulaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **155**:549-556.
- Reisch C, Schurm S, Poschold P. (2007) Spatial Genetic Structure and Clonal Diversity in an Alpine population of *Salix herbaceae* (Salicaceae). *Annals of Botany* **99**:647-651.
- Ren MX, Zhang QG (2007) Clonal diversity and structure of invasive aquatic plant *Eichornia crassipes* in China. *Aquatic Botany* **87**:242-246.
- Richards AJ (1986) *Plant Breeding Systems*. George Allen & Unwin. London.
- Rocha, M., Valera, A., Eguiarte, L. 2005. Reproductive Ecology of Five Sympatric *Agave Littaea* (Agavaceae) Species in Central Mexico. *American Journal of Botany*. **92**:1330-1341.
- Rocha M (2006) Ecología Evolutiva comparada de 5 especies de *Agave*. Tesis de Doctorado. Instituto de Ecología. UNAM. México. Asesor Dr. Luis Eguiarte.
- Rocha M, Good-Ávila SV, Molina-Freaner F, Arita HT, Castillo A, García-Mendoza A, Silva-Montellano A, Gaut B, Souza V, Eguiarte LE (2006) Pollination biology and adaptative radiation of Agavaceae, with special emphasis on *Agave* genus. *Aliso* **22**:329-344.
- Sánchez-Mejorada H (1978) *Manual de campo de las cactáceas y suculentas de la Barranca de Metztitlán*. Sociedad Mexicana de Cactología. México.
- Scheinvar GE (2008) Genética de poblaciones silvestres y cultivadas de dos especies mezcaleras: *Agave cupreata* y *Agave potatorum*. Tesis de Maestría. Instituto de Ecología. UNAM. México. Director Luis Eguiarte.
- Schlüter PM, Harris SA (2006) Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular Ecology Notes* **6**: 569-572.

- Schmid B (1985) Clonal growth in grassland perennials III. Genetic variation and plasticity between and within populations of *Bellis perennis* and *Prunella vulgaris*. *Journal of Ecology* **73**:1819-1830.
- Schmid B, Bazzaz FA (1987) Clonal integration and population structure in perennials: effects of severing rhizome connections. *Ecology* **68**:2016-2022.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) Arlequin ver 2.0 A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva. Switzerland.
- Silva A, Eaguiarte LE (2003) Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the chihuahuan desert. II. Genetic Variation, differentiation and inbreeding estimates. *American Journal of Botany* **90**:700-706.
- Silander JA (1985) Microevolution in clonal plants. En: *Population Biology and Evolution of Clonal Organisms* (eds Jackson JBC, Buss LW, Cook RE), pp. 107-152. Yale University Press, London.
- Simpson EH (1949) Measurements of diversity. *Nature* **163**:688.
- Slatkin M (1987) Gene flow and geographic structure of natural populations. *Science* **236**:787-792.
- Smouse PE, Peakall R (1999) Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity* **82**:561-573.
- Sokal RR, Oden NL (1978) Spatial autocorrelation in biology. I Methodology. *Biological Journal of the Linnean Society* **10**:199-228.
- Sokal RR, Jacquez GM (1991) Testing inferences about microevolutionary processes by means of spatial autocorrelation. *Evolution* **45**:152-168.
- Sokal RR, Oden NL, Thompson BA (1998) Local spatial autocorrelation in biological variables. *Biological Journal of the Linnean Society* **65**:41-62.
- Stehlik I, Holderegger R (2000) Spatial genetic structure and clonal diversity of *Anemone nemerosa* in late successional deciduous woodlands of Central Europe. *Journal of Ecology* **88**:424-435.
- Stoner KE, Salazar KA, Fernández RC, Quesada M (2003) Population dynamics, reproduction and diet of the lesser long-nosed bat (*Leptonycteris curasoae*) in Jalisco, México; Implications for conservation. *Biodiversity and conservation* **12**:357-373.

- Sturges H (1926) The choice of a class-interval. *Journal of the American Statistical Society* **21**:65-66.
- Suvanto LI, Latva-Karjanmaa TB (2005) Clone identification and clonal structure of the European aspen (*Populus tremula*) *Molecular Ecology* **14**: 2851-2860.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software versión 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**:1596-1599.
- Torimaru T, Tomaru N (2005) Fine-scale clonal structure and diversity within patches of a clone-forming dioecious shrub, *Ilex leucoclada* (Aquifoliaceae). *Annals of Botany* **95**:295-304.
- Trame AM, Coddington AJ, Paige KN (1995) Field and genetic studies testing optimal outcrossing in *Agave schottii*, a long-lived clonal plant. *Oecologia* **104**:93-100.
- Trejo L (2006) Genética de poblaciones de *Agave striata* Zucc. Tesis de Maestría. Inst. Ecología. UNAM. México. Asesor: Eguiarte LE
- Trejo RE (2007) Dinámica de la polinización de *Agave difformis*, *Agave garcia-mendozae* y *Agave striata* (Agavaceae) en la Barranca de Metztitlán, Hidalgo. Tesis de Licenciatura. Fac. Ciencias. UNAM. México. Asesor: Rocha MG.
- Valera A, Falcón L (2007) Extracción de ácidos nucleicos. En Eguiarte LE, Souza V, Aguirre X [comps] *Ecología molecular*. SEMARNAT-INE-UNAM-CONABIO. México
- Van Loo M, Joseph JA, Heinze B, Fay MF, Lexer C (2008) Clonality and spatial genetic structure in *Populus x canescens* and its sympatric backcross parent *P. alba* in a Central European hybrid zone. *New phytologist* **177**:506-516.
- Vargas O (2007) Diversidad y relaciones genéticas del complejo *Agave angustifolia* Haw. y los agaves mezcaleros del occidente de México. Tesis doctoral. Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. México.
- Vaughan SP, Cottrell JE, Moodley DJ, Connolly T, Russell K (2007) Distribution and fine-scale spatial-genetic structure in british wild cherry (*Prunus avium* L.) *Heredity* **98**: 274-283.

- Vázquez-Lobo A (1996) Filogenia de hongos endófitos del género *Pinus* L.: Implementación de técnicas moleculares y resultados preliminares. Tesis de licenciatura, Fac. Ciencias, UNAM, México.
- Vekemans X, Hardy OJ (2004) New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular ecology* **13**:921-935.
- Vidondo B, Prairie YT, Blanco JM, Duarte CM (1997) Some aspects of the analysis of size spectra in aquatic ecology. *Limnology and Oceanography* **42**:184-192.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**(6):1358-1380.
- White J (1979) The plant as a metapopulation. *Annual Review of Ecology and Systematics* **10**:109-145.
- Wolfe AD, Xiang QY, Kephart SR (1998) Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable sequence repeat (ISSR) bands. *Molecular Ecology* **7**:1107-1125.
- Wright S (1951) The genetic structure of populations. *Annals of Eugenetics* **15**:323-334
- Wright S (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* **19**:395-420.
- Zamudio SR (1995) Una nueva especie de *Agave* del subgénero *Littaea* (Agavaceae) de la Sierra Madre Oriental, México. *Acta Botánica Mexicana* **32**:47-52.
- Zietkewics E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction. *Genomics* **20**: 176-183.
- Zong M, Liu HL, Qiu YX, Yang SZ, Zhao MS, Fu CX (2008) Genetic diversity and geographic differentiation in the threatened species *Dysosma pleiantha* in China as revealed by ISSR analysis. *Biochemical Genetics* **46**:180-196.