



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

GENÉTICA DE POBLACIONES DE *Furcraea*
parmentieri (AGAVACEAE): ESTIMACIONES DE
VARIACIÓN Y ESTRUCTURA GENÉTICA USANDO
ISSR'S

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ALICIA BARCEINAS CRUZ



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ERIKA AGUIRRE PLANTER

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La presente tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Erika Aguirre Planter en el Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México con el apoyo del proyecto *Genética de poblaciones molecular y filogeografía de plantas mexicanas* PAPIIT IN224309-3.

Resumen

Furcraea parmentieri es una especie perteneciente al género *Furcraea* de la familia Agavaceae que produce una impresionante cantidad de bulbilos en la inflorescencia. Se distribuye a lo largo de la Faja Volcánica Transmexicana en los picos de las montañas más altas (a partir de los 2300 m s.n.m.). En este trabajo se describe la genética de poblaciones determinando los patrones y niveles de variación genética, la estructura genética dentro y entre poblaciones y el grado de clonalidad en tres poblaciones. Se utilizaron ISSRs como marcador molecular. Se encontró que los niveles de variación genética son relativamente altos ($H_E=0.332$, $\%P=93$) y que las poblaciones se encuentran altamente estructuradas ($\theta=0.37$) con flujo génico moderado ($Nm=0.34$). Asimismo, se encontró una alta diversidad genotípica ($G/N=0.98$). Por otro lado, se construyó un modelo de distribución potencial en el presente que se proyectó al Pleistoceno, durante el Último Máximo Glacial (UMG; ~22,000-18000 años antes del presente) encontrando que la especie presentaba una distribución continua a lo largo de la Faja Volcánica Transmexicana en el pasado, la cual se ha ido reduciendo hasta quedar únicamente en los picos de las montañas en el presente. Los resultados sugieren que el reclutamiento sexual es un mecanismo importante de regeneración poblacional siempre y cuando la población sea saludable demográficamente y que el grado de estructuración entre las poblaciones se debe al patrón de distribución insular.

Índice

1. Introducción.....	4
1.1. Genética de Poblaciones.....	4
1.2. La variación genética y sus estimadores.....	7
1.3. Estructura genética.....	9
1.4. Distancias genéticas.....	12
1.5. Marcadores moleculares e Inter Simple Sequence Repeat (ISSR's).....	13
1.6. Modelos de distribución de especies.....	17
1.7. Clonalidad.....	19
1.8. El género <i>Furcraea</i>	21
1.8.1. Biología Reproductiva.....	24
1.9. <i>Furcraea parmentieri</i>	26
2. Justificación.....	29
3. Objetivos.....	30
4. Hipótesis.....	30
5. Material y Métodos.....	31
5.1. Colecta de campo.....	31
5.2. Extracción de ADN.....	33
5.3. Amplificación de ADN por medio de Inter Simple Sequence Repeats.....	34
5.4. Lectura de Geles.....	36
5.5. Análisis de datos.....	37
5.5.1. Obtención de frecuencias alélicas.....	37
5.5.2. Variación genética.....	38
5.5.3. Estructura genética.....	39
5.5.4. Flujo génico.....	40
5.6. Estimación bayesiana del número de poblaciones.....	41
5.7. Modelo de distribución potencial.....	42
5.8. Diversidad clonal.....	43

6. Resultados.....	44
6.1. Extracción de ADN y loci polimórficos.....	44
6.2. Variación genética	46
6.3. Estructura genética.....	47
6.4. Distancias genéticas.....	49
6.5. Estimación bayesiana del número de poblaciones.....	52
6.6. Simulaciones de modelos de distribución potencial.....	53
6.7. Diversidad clonal.....	55
7. Discusión.....	57
7.1. Variación genética.....	57
7.2. Estructura genética y flujo génico.....	61
7.3. Distancias genéticas.....	63
7.4. Modelo de distribución potencial.....	66
7.5. Diversidad clonal.....	67
7.6. Algunas consideraciones para su conservación.....	69
8. Conclusiones.....	70
10. Literatura citada.....	77

The thing about evolution is that if it hasn't turned your brain inside out, you haven't understood it. –Douglas Noel Adams-

1. Introducción

1.1. Genética de Poblaciones

La genética de poblaciones es la ciencia encargada de estudiar las bases genéticas de la evolución. Surge en los años 1920's y 30's a partir de las contribuciones de Ronald A. Fisher, J. B. S. Haldane y Sewall Wright como una síntesis de las leyes de Mendel sobre la herencia y la teoría de la evolución de Darwin (Eguiarte, 1999).

Entendiendo a la evolución como el cambio en las frecuencias alélicas a través del tiempo, la genética de poblaciones tiene por objetivo explicar los procesos y mecanismos mediante los cuales ocurre la evolución en las poblaciones naturales, tomando en cuenta los fenómenos genéticos y ecológicos que actúan sobre ellas (Hartl y Clark, 1989).

Para describir el cambio en las frecuencias alélicas, la genética de poblaciones se basa en un modelo nulo fundamental: el principio del equilibrio de Hardy-Weinberg. Este principio sostiene que en una población ideal, a partir de cualquier frecuencia genotípica inicial, después de una generación las frecuencias genotípicas de un locus con dos alelos pueden ser representadas como una función binomial de las frecuencias alélicas (Hedrick, 2005). Esta relación se mantiene durante todas las generaciones si se cumplen cuatro supuestos: que el tamaño poblacional sea muy grande, que todos los apareamientos sean al azar, que los alelos sean igualmente competentes para dejar descendencia y que no lleguen alelos externos (Eguiarte, 1999).

Este modelo no es interesante por sí mismo, ya que si se cumple, no hay cambio en las frecuencias alélicas de una generación a otra y no hay evolución. Pero basta con que uno de los supuestos no se cumpla para que cambien las frecuencias alélicas. Así, lo interesante de la Ley del equilibrio de Hardy-Weinberg es encontrar las formas de violar cualquiera de los supuestos y observar el resultado. En este contexto las fuerzas evolutivas pueden ser vistas como transgresiones a los supuestos del equilibrio de Hardy-Weinberg (Eguiarte, 1999):

- Deriva génica

Es el cambio de manera azarosa en las frecuencias alélicas como resultado del muestreo de gametos de una generación a otra en una población finita (Hedrick, 2005). Ocurre cuando los tamaños poblacionales son pequeños, ya que al haber pocos individuos en la población se presentan errores de muestreo, es decir, algunos individuos dejan más descendientes que otros sin la intervención de la selección. Sus efectos serán más importantes entre más pequeña sea la población, cambiando rápidamente las frecuencias alélicas y promoviendo eventualmente la fijación de alguno de los alelos. (Eguiarte, 1999; González, 2005).

- Endogamia

Ocurre cuando los apareamientos no son al azar, sino que los individuos que se cruzan tienen mayor grado de consanguinidad que aquellos individuos que se tomarían al azar de la población (Hedrick, 2005). Como consecuencia, las frecuencias alélicas no cambian, pero sí las genotípicas, aumentando la frecuencia de individuos homocigos y reduciendo la de los heterocigos (Eguiarte, 1999, González, 2005). Cuanto más consanguíneos sean los apareamientos, más rápidamente se perderá la heterocigosis (Eguiarte, 1999).

- Selección natural

Es la sobrevivencia y reproducción diferencial de organismos, esta diferencia ocurre porque no todos los alelos son igualmente eficientes para dejar descendientes (Eguiarte, 1999). La adecuación (w) es una medida de esta eficiencia e indica cuántos hijos en promedio deja el portador de un genotipo dado en una población. Es la fuerza evolutiva más importante ya que es el mecanismo principal para generar evolución adaptativa (Hedrick, 2005).

- Migración o flujo génico

Es el movimiento entre poblaciones que tiene como resultado intercambio genético (Hedrick, 2005). Depende de la tasa de migración, definida como la proporción de

individuos nuevos que llegan a la población, y de las frecuencias alélicas de los individuos migrantes. Tiene fuertes efectos en la estructura genética de las poblaciones ya que puede homogenizar las frecuencias alélicas y si continúa por mucho tiempo, eventualmente las dos poblaciones quedan idénticas (Eguiarte, 1999).

- Mutación

Es una fuerza muy importante, porque toda novedad y variación genética se origina a partir de ella. Es la fuente primaria del material de la evolución. Sin embargo es un mecanismo muy lento y se requieren de miles de generaciones para obtener un cambio en las frecuencias alélicas (Eguiarte, 1999).

En las poblaciones naturales pueden estar actuando al mismo tiempo varias fuerzas evolutivas. Su interacción y la intensidad de cada una tendrá fuertes repercusiones en la variación y estructura genética presente en las poblaciones. En términos generales la mutación es la principal fuente de aumento de variación; la deriva génica y la endogamia disminuyen la variación y aumentan la diferenciación entre poblaciones; y la selección y el flujo génico pueden aumentar o disminuir los niveles de variación y estructura genética dependiendo de cada situación en particular.

El efecto de estas fuerzas evolutivas en términos del proceso adaptativo puede visualizarse por medio de la topografía adaptativa, propuesta inicialmente por Sewall Wright. La topografía puede tener varios picos y valles. Los picos adaptativos son los lugares con mayor adecuación promedio y la selección natural lleva a las poblaciones a uno de ellos. La mutación generalmente sacará a la población del pico adaptativo un poco en cada generación. La migración puede ayudar a la población a llegar a un pico si aumenta la variabilidad genética por la llegada de nuevos alelos que sean seleccionados positivamente, o bien bajar a la población de su pico adaptativo. También puede hacer que llegue a los pies de otro pico si los individuos que llegan tienen genes adaptados a otras condiciones. La deriva génica y la endogamia moverán al azar a la población en esta topografía y con mayor violencia cuánto más pequeña sea la población (Hartl y Clark, 1989; Eguiarte, 1999; González, 2005).

1.2. La variación genética y sus estimadores

Para entender cómo influyen las fuerzas evolutivas en las poblaciones naturales es necesario primero describir y cuantificar la cantidad de variación genética en una población y el patrón de variación genética entre poblaciones (Hedrick, 2005).

Aunque Fisher, Haldane y Wright sentaron las bases de la genética de poblaciones y formaron gran parte del paradigma usado actualmente, sus aportaciones fueron fundamentalmente teóricas. Fue hasta finales de los 1960's que Lewontin y Hubby (1966) y Harris (1966) publicaron los primeros resultados experimentales para medir la variación genética usando la técnica de electroforesis de proteínas, iniciando así una intensa investigación de la variación en las poblaciones (Hedrick, 2005).

Posteriormente la obtención de los primeros datos moleculares de las secuencias de alozimas y aminoácidos en los 1970's y la secuenciación de ADN en los 1980's permitieron documentar extensa información acerca de la variación genética "escondida" en las poblaciones. La secuenciación y el desarrollo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) permitieron el diseño y mejoramiento de los marcadores moleculares que actualmente se utilizan en todo estudio de genética de poblaciones.

Existen varias medidas para cuantificar la variación genética en una población. La medida más usada es la heterocigosis esperada, también llamada diversidad genética, y es particularmente útil porque puede ser aplicada a genes con diferentes ploidías y a organismos con diferentes sistemas reproductivos (Nei, 1987).

La heterocigosis esperada para un locus dado con n alelos en una población en equilibrio de Hardy-Weinberg puede ser calculada como

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

Donde p es la frecuencia del alelo i

La heterocigosis esperada es el inverso de los homócigos esperados en Hardy-Weinberg, es decir son todos los heterócigos esperados.

Otra manera de medir la variación genética es estimar la proporción de loci polimórficos (P), la cual es la proporción de loci en los que el alelo más común se encuentra en una frecuencia menor o igual a 0.99 ó 0.95:

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

Donde x es el número de loci polimórficos en una muestra de m loci (Hedrick, 2005).

1.3. Estructura genética

Una población puede presentar subestructura, es decir diferencias en la variación genética entre las partes que la constituyen, por diferentes razones evolutivas y por factores geográficos, ecológicos o conductuales (Hedrick, 2005). Conocer la distribución de la variación genética dentro y entre las poblaciones nos permite medir las fuerzas evolutivas y reconstruir la historia de las especies.

Cuando una población está subdividida, la cantidad de conectividad genética entre sus partes puede ser diferente. Esta conexión genética depende principalmente de la cantidad de flujo génico efectivo que se establezca entre las subpoblaciones o subgrupos. Cuando la cantidad de flujo génico entre grupos es alta tendrá un efecto homogenizador sobre la variación genética en los grupos. Por otro lado, si el flujo génico es bajo, la deriva génica, la selección e incluso la mutación pueden conducir a una diferenciación genética entre los grupos (Hedrick, 2005).

Trabajando independientemente en los años 1940's y 1950's, Sewall Wright y Gustave Malécot, desarrollaron los estadísticos F como una herramienta para describir la partición de la variación genética dentro y entre poblaciones. Wright mostró que la cantidad de diferenciación genética entre poblaciones tiene una relación predecible con la intensidad con que actúan las fuerzas evolutivas en las poblaciones (Holsinger y Weir, 2009).

La diferenciación genética de las poblaciones puede ocurrir en diferentes escalas espaciales o geográficas. Su representación jerárquica es útil para describir la totalidad de las relaciones entre las poblaciones y para documentar el patrón espacial de la variación genética (Hedrick, 2005). Debido a que la subdivisión poblacional implica un resultado parecido al de la endogamia en términos de exceso de homocigosis, es conveniente medir sus efectos a partir de la proporción de heterocigosis en tres niveles de complejidad: individuos (H_I), subpoblaciones (H_S) y la población total (H_T) (Hartl y Clark, 1989).

Los estadísticos F de Wright son tres parámetros interrelacionados para describir la estructura genética de poblaciones diploides en los tres niveles. Estos tres parámetros

son: F_{ST} , el cual es una medida de la diferenciación genética en las subpoblaciones y siempre es positivo; F_{IS} , que mide la desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg dentro de las subpoblaciones; y F_{IT} , que mide esa misma desviación pero en la población total. Cuando los valores de F_{IS} y F_{IT} son positivos indican una deficiencia de heterocigos, y cuando son negativos un exceso de heterocigos (Hedrick, 2005).

F_{IS} también es llamado coeficiente de endogamia y mide la reducción de la heterocigosis en un individuo debido al apareamiento no azaroso dentro de su subpoblación (Hartl y Clark, 1989):

$$F_{IS} = \frac{(\bar{H}_S - \bar{H}_I)}{\bar{H}_S}$$

F_{IT} mide la reducción de la heterocigosis en un individuo con respecto a la población total (Hartl y Clark, 1989):

$$F_{IT} = \frac{(\bar{H}_T - \bar{H}_I)}{\bar{H}_T}$$

F_{ST} también es llamado índice de fijación y mide los efectos de la subdivisión poblacional, es decir, la reducción de la heterocigosis de una subpoblación causado por deriva génica (Hartl y Clark, 1989):

$$F_{ST} = \frac{(\bar{H}_T - \bar{H}_S)}{\bar{H}_T}$$

Estos tres parámetros se relacionan de la siguiente manera

$$F_{ST} = \frac{(F_{IT} - F_{IS})}{(1 - F_{IS})}$$

F_{ST} está relacionado directamente con la varianza en las frecuencias alélicas entre las poblaciones y al grado de semejanza entre individuos dentro de las poblaciones. Cuando F_{ST} es pequeño, significa que las frecuencias alélicas dentro de cada población son similares; y cuando es grande, significa que las frecuencias alélicas son diferentes (Holsinger y Weir, 2009). Por ejemplo, si la selección natural favorece un alelo sobre los demás en un locus particular en alguna población, la F_{ST} en ese locus será más grande

que en los loci en los que las diferencias entre poblaciones se deban únicamente a la deriva génica (Holsinger y Weir, 2009).

Otros parámetros que se utilizan para medir la diferenciación genética entre poblaciones son G_{ST} , R_{ST} , Φ_{ST} y θ . De estos cuatro, G_{ST} está más relacionado con F_{ST} pero será apropiado únicamente cuando no interese la contribución de la deriva génica a las diferencias entre poblaciones (Holsinger y Weir, 2009). Por otro lado, R_{ST} (para datos de microsatélites) y Φ_{ST} (para datos de secuencias moleculares) serán útiles en contextos en los cuales sea importante tomar en cuenta las “distancias” mutacionales entre alelos (Holsinger y Weir, 2009).

Por último, θ es el coeficiente de coancestría de Cockerham (1969) y representa la probabilidad de que al tomar dos genes al azar provenientes de diferentes individuos, éstos sean idénticos por descendencia. El índice de coancestría puede ser interpretado como la proporción de diversidad genética que se debe a las diferencias en las frecuencias alélicas entre poblaciones, de manera que indica el grado de diferenciación (Holsinger y Weir, 2009).

1.4. Distancias genéticas

La distancia genética representa las diferencias en las frecuencias alélicas entre poblaciones. Nos permite analizar la cantidad y el patrón de variación compartida entre diferentes poblaciones. Cuando las distancias genéticas son pequeñas puede ser porque las poblaciones se separaron recientemente o porque el flujo génico es suficientemente alto para contrarrestar los efectos de la deriva génica. Por otro lado, cuando las distancias son grandes, es posible que las poblaciones se hayan separado hace mucho tiempo o que el flujo génico entre ellas sea limitado permitiendo que la deriva génica genere grandes diferencias entre las poblaciones (Hedrick, 2005).

El algoritmo más utilizado para calcular las distancias genéticas es la distancia genética estándar de Nei (1972, 1978). Cuando los loci son neutrales y aparecen mutaciones que generan nuevos alelos, la distancia genética calculada con este algoritmo aumenta linealmente con el tiempo (Hedrick, 2005).

Cuando la estructura genética está fuertemente influenciada por la distribución geográfica de las poblaciones, se espera que las poblaciones cercanas presenten menores distancias genéticas que las poblaciones alejadas geográficamente entre sí. A este principio se le llama aislamiento por distancia e indica que los individuos tienden a aparearse con aquellos más cercanos geográficamente de lo que se esperaría al azar.

1.5. Marcadores moleculares e Inter Simple Sequence Repeat (ISSR's)

Los marcadores moleculares son una herramienta muy útil en diversos campos de la biología. Son utilizados en estudios de evolución, ecología, conservación, agronomía, biomedicina, ciencias forenses, entre otros. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad para detectar polimorfismos en uno o varios loci y son de tipo dominante o codominante (Rentería, 2007).

La selección del marcador molecular debe ajustarse a la pregunta que se desea contestar en el estudio, porque dependiendo de la naturaleza del marcador podrán apreciarse aspectos particulares de los datos y de la historia de los organismos (Rentería, 2005). En estudios de genética de poblaciones es conveniente usar los marcadores moleculares no codificantes, ya que al no estar implicados en la codificación de caracteres “útiles” para los organismos, en ellos se puede acumular la variación genética (Eguiarte y Piñero, 1999; Conner y Hartl, 2004).

Existe un grupo de marcadores no codificantes que se basan en el uso de un *primer* aleatorio a partir del cual se amplifica una región completa de ADN. Estos marcadores presentan varias ventajas para el análisis de la variación genética: muestrean loci distribuidos aleatoriamente en el genoma, generan mucha información a partir de un bajo costo de realización, su naturaleza aleatoria permite obtener datos de regiones bajo selección, neutrales pero ligadas a regiones sujetas a selección o regiones estrictamente neutrales, y son aplicables a prácticamente todas las especies (Karl, 1996).

Entre los marcadores moleculares más usados en estudios de genética de poblaciones se encuentran los RAPD's, RFLP's, AFLP's, microsatélites, minisatélites, ISSR's e isoenzimas. En la Tabla 1 se muestra una breve descripción así como las ventajas y desventajas de cada marcador.

Tabla 1. Comparación de marcadores moleculares más usados en estudios de genética de poblaciones.

Marcador	Descripción	Ventajas	Desventajas
RAPD's Randomly Amplified Polymorphic DNA	Amplifican ADN aleatoriamente. Se basan en la probabilidad de que se presenten sitios complementarios al oligonucleótido de aproximadamente 10pb a lo largo del genoma.	-Amplifican regiones codificantes y no codificantes, revelando niveles de variación muy altos. -Son relativamente fáciles y no requieren conocimiento previo de la secuencia.	-Poca reproducibilidad y baja especificidad debido a bajas temperaturas de alineación. -Al ser dominantes las frecuencias alélicas se deben estimar indirectamente.
RFLP's Restriction Fragment Length Polymorphism	Son causados por rearrreglos en el ADN que generan una ganancia o pérdida en los sitios de restricción. Esto se detecta por diferencias en el peso molecular de los fragmentos homólogos de restricción.	-Son útiles para calcular valores de relaciones familiares. -No es necesario conocer la secuencia previamente.	-Requiere grandes cantidades de ADN de buena calidad. -Son necesarias muchas manipulaciones y detecta una fracción limitada de la variación de las secuencias en el genoma.
AFLP's Amplified Fragment Length Polymorphism	Combina la digestión de dos enzimas de restricción con la unión de secuencias específicas al nucleótido ligado a los extremos de los fragmentos de restricción y dos amplificaciones de PCR usando <i>primers</i> marcados basados en las secuencias ligadas.	-Detecta múltiples loci y es útil para generar huellas genéticas y mapeo. -No requieren conocimiento previo de la secuencia. -Son altamente reproducibles y existen kits estandarizados.	-Requieren de muchos pasos para producir resultados.

Microsatélites SSR's o Simple Sequence Repeats	Son secuencias de ADN nuclear o de organelos formadas de di, tri, tetra o pentanucleótidos. El polimorfismo probablemente se genera por eventos de rompimiento.	-Son útiles en estudios de variación genética intra e interespecífica, análisis de linajes y de sistemas reproductivos. -Tienen altos niveles de polimorfismo. -Son codominantes	-Es necesario conocer la secuencia de la región a analizar para diseñar los <i>primers</i> . -Puede ser complicado diferenciar los tamaños exactos de los productos.
ISSR's (Inter Simple Sequence Repeats)	Son amplificados por PCR a partir de la presencia de un <i>primer</i> complementario a un microsatélite, diseñado para unirse a los motivos repetidos de di o trinucleótidos.	-Se obtiene gran número de bandas polimórficas. -Son relativamente fáciles de montar. -Son altamente repetibles. -Existen <i>primers</i> universales para plantas.	-Son dominantes. -La homología de bandas es incierta.
Isoenzimas	Fue el primer método en desarrollarse. Son las distintas formas moleculares de las enzimas que tienen funciones idénticas o similares y están presentes en el mismo individuo. Las variantes son separadas mediante electroforesis.	-Al ser codominantes pueden distinguirse los genotipos homocigos y heterocigos con mucha precisión. -La mayoría son selectivamente neutras. -La técnica es relativamente barata.	-Revelan poca variación. -La técnica requiere de mucho tiempo y experiencia. -Poco reproducibles entre laboratorios.

Los marcadores empleados en este estudio fueron los Inter Simple Sequence Repeat, o ISSR's, los cuales consisten en la amplificación mediante PCR de secuencias de ADN delimitadas por dos microsatélites invertidos (Zietkiewicz et al., 1994). En contraste con los microsatélites, los ISSR's son marcadores semiarbitrarios que son sencillos y rápidos de desarrollar y usar (Bornet y Branchard, 2001).

Los *primers* de ISSR's (Figura 1) consisten en un motivo repetido de di o trinucleótidos complementarios a la secuencia del microsatélite con un par de nucleótidos extras arbitrarios en el extremo 3' o en el 5'. Los nucleótidos extras sirven

como anclas asegurando que la amplificación inicie en el extremo 5' o en el 3' del microsatélite, respectivamente (González y Aguirre, 2007).

Cuando dos secuencias repetidas se presentan a una distancia amplificable y con una orientación invertida, el *primer* complementario a ellas puede inducir la amplificación del segmento de ADN intermedio, dando como resultado una molécula con un peso molecular particular, considerada como un locus (González y Aguirre, 2007). La presencia o ausencia del elemento genómico reconocido por el *primer* y la longitud de la secuencia intermedia amplificada dan como resultado un polimorfismo detectable entre individuos de la misma población (Zietkiewicz et al., 1994).

Los productos de PCR finales pueden ser visualizados en geles de agarosa como un patrón variable de bandas que representan las regiones amplificadas. Este patrón característico se considera la “huella genética” de cada uno de los individuos. La presencia de la banda representa el genotipo dominante, ya sea homócigo o heterócigo, y su ausencia representa al genotipo homócigo recesivo (González y Aguirre, 2007). Debido a los ISSRs son marcadores dominantes, no se puede distinguir el homócigo dominante del heterócigo, y deber usarse la frecuencia del homócigo recesivo para determinar las frecuencias alélicas a partir de las proporciones de Hardy-Weinberg.



Figura 1. Representación de la amplificación con ISSR's. Los *primers* de ISSR (en gris claro) se anclan a la secuencia de microsatélite en ambas cadenas de ADN y durante la PCR se extiende la región que se encuentra entre los microsatélites.

1.6. Modelos de distribución de especies

Los modelos de distribución de especies son modelos empíricos que relacionan las observaciones de campo con variables ambientales predictoras, a partir de superficies de respuesta derivadas estadística o empíricamente (Guisan y Thuiller, 2005). Son una herramienta para resolver cuestiones en muy diversos campos de la biología, como ecología, evolución, epidemiología, problemas de conservación de especies, planeación de reservas ecológicas y manejo de especies invasoras (Phillips et al., 2006).

Los datos de las especies pueden ser de presencia, presencia-ausencia u observaciones de abundancia. Estos datos se pueden obtener en muestreos de campo, ya sean aleatorios o estratificados, o en colecciones de historia natural (Guisan y Thuiller, 2005).

Cuando se dispone de datos de presencia y ausencia para desarrollar el modelo, pueden usarse métodos estadísticos generales. No obstante, los datos de ausencia generalmente son difíciles de conseguir y, aún cuando se tienen, son de calidad cuestionable (es probable que al momento de hacer el muestreo de la especie no se encuentren ejemplares pero realmente la especie sí se encuentre en el área). Por lo anterior, las técnicas de modelación que requieren únicamente datos de presencia son muy valiosos (Phillips et al., 2006).

Los modelos de distribución de especies son la proyección en el espacio geográfico de los modelos de nicho ecológico (Phillips et al., 2006). Los modelos de nicho, a su vez, se derivan de datos de presencia y representan una aproximación al nicho ecológico de una especie en ciertas dimensiones ambientales (Phillips et al., 2006). El nicho fundamental de una especie es el conjunto de todas las condiciones que permiten su supervivencia a largo plazo, mientras que el nicho efectivo es aquel subconjunto del nicho fundamental que realmente ocupa la especie (Hutchinson, 1957).

El nicho efectivo de una especie puede ser más pequeño que su nicho fundamental, debido a la influencia humana, interacciones bióticas, o barreras geográficas que obstaculizan su dispersión y colonización; dichos factores pueden

impedir que las especies habiten las condiciones que abarca todo su potencial ecológico (Anderson y Martinez-Meyer, 2004).

Por definición, las condiciones ambientales en las localidades de ocurrencia de una especie son muestras del nicho efectivo (Phillips et al., 2006). Entonces un modelo de nicho representa una aproximación del nicho efectivo de una especie, en el área de estudio y dimensiones ambientales estudiadas (Phillips et al., 2006).

Aunque los modelos de nicho describen la concordancia en el espacio ecológico, generalmente son proyectados en el espacio geográfico, obteniéndose como resultado un área geográfica con la presencia predicha para la especie (Phillips et al., 2006). Las áreas que satisfacen las condiciones del nicho fundamental de una especie representan su distribución potencial, mientras que las áreas geográficas que de hecho habita la especie constituyen su distribución real (Phillips et al., 2006).

Debido a que las especies presentan conservacionismo de nicho durante largos periodos de tiempo (en algunas especies cercanas más del doble de tiempo desde su especiación) es posible predecir su distribución, aún antes y después de eventos de cambio climático fuertes (Martínez- Meyer y Peterson, 2006). Entonces, los modelos de distribución potencial pueden ser proyectados al futuro o al pasado si se cuenta con suficientes datos de las variables ambientales y de ocurrencia de la especie. Los modelos de distribución potencial proyectados al pasado nos ayudan a reconstruir la historia de las especies en tiempo evolutivo.

1.7. Clonalidad

La reproducción es una de las características que podría considerarse como definitoria de la vida, y durante millones de años han evolucionado diferentes estrategias para asegurar la reproducción de los seres vivos, ya sea de manera sexual o asexual. Las razones por las que los organismos presentan una u otra estrategia es muy interesante porque éstas son uno de los principales motores de la evolución de las especies.

Muchas plantas combinan la reproducción sexual y asexual y el balance entre las dos varía ampliamente inter e intraespecíficamente por factores ecológicos y genéticos que limitan alguno de los mecanismos de regeneración. La propagación vegetativa permite la supervivencia de la especie por el establecimiento del mismo genotipo, mientras que la reproducción sexual aún a bajos niveles permite la radiación adaptativa dentro de ambientes heterogéneos y contribuye a su evolución ya que proporciona a las especies nuevas combinaciones genéticas para explorar nuevos ambientes y tener “cartas para jugar” en la evolución (Arizaga y Ezcurra, 1995; 2002).

Se ha propuesto que la reproducción vegetativa ayuda a la planta a establecerse en gran número y colonizar algún ambiente. De hecho, se ha estimado que aproximadamente el 70% de las angiospermas presentan crecimiento clonal (Mandujano, 2007).

Algunos autores consideran que la clonalidad es una forma de crecimiento mientras que otros la ven como una forma de producir progenie (Mandujano, 2007). Según Arizaga y Ezcurra (1995) la clonalidad es una estrategia que utilizan las especies para evitar un colapso demográfico cuando no existen las condiciones propicias para la reproducción sexual o cuando se encuentran en depresión por endogamia y la mayoría de los frutos resultantes de la reproducción sexual son abortados.

Existen diferentes mecanismos para producir clones. Por ejemplo en el género *Agave* puede llevarse a cabo mediante la formación de brotes en diferentes partes de la planta como: bulbilos aéreos producidos en el escapo floral, brotes laterales producidos en las partes axilares de las hojas, pequeños brotes basales producidos debajo de la roseta o grandes brotes producidos por estolones que emergen del suelo alejados de la planta parental (Arizaga y Ezcurra, 1995; 2002). La efectividad de cada uno de estos

mecanismos para la propagación clonal es diferente; por ejemplo, en *Agave macroacantha* la formación de brotes basales a través de estolones es mucho más efectivo que la formación de bulbilos (Arizaga y Ezcurra, 2002).

Los bulbilos son pequeñas rosetas aéreas que presentan las inflorescencias de las plantas semélparas del género *Agave* y algunos géneros relacionados. Son capaces de actuar como clones de la planta parental (Arizaga y Ezcurra, 1995). Estas rosetas se desprenden frecuentemente mientras la inflorescencia se seca, o caen al suelo con la muerte del escapo si éste está dañado mecánicamente. En muchas especies de *Agave* se observan individuos con las inflorescencias cubiertas de bulbilos y muy pocas o ninguna cápsula, así como individuos con un alto número de cápsulas y muy pocos o ningún bulbito (Arizaga y Ezcurra, 1995). Estos autores sugieren que la formación de bulbilos está inversamente relacionada con el éxito en la fructificación, actuando como un mecanismo de seguridad porque recupera los recursos metabólicos que se movilizaron para el evento reproductivo e incrementa la probabilidad del éxito reproductivo del genet.

Las especies clonales pueden presentar niveles altos de heterocigosis y se ha sugerido que la diversidad genética no difiere entre las especies que presentan reproducción sexual con respecto a las que presentan tanto sexual como clonal (Ellstrand y Roose, 1987; Hamrick y Godt, 1989). Sin embargo, en la mayoría de los estudios de genética de poblaciones los índices de variación y diversidad genética suelen estimarse con métodos que evitan muestrear individuos del mismo genet.

Ellstrand y Roose (1987) propusieron un índice de diversidad genética particular para las plantas clonales conocido como la “proporción de descubrimiento de nuevos genotipos”. Este índice se aboca a contestar cuál es la cantidad de genotipos que encontramos en una población.

1.8. El género *Furcraea*

El género *Furcraea* pertenece a la familia Agavaceae. Está formado por 25 especies distribuidas en las regiones tropicales y templadas de América (Eguiarte et al., 2000). Este género presenta la distribución más sureña de la familia. Se ha calculado que surgió hace 7.74 millones de años (Flores- Abreu, 2007) y se cree que su morfología floral representa el carácter ancestral de síndrome de polinización de la familia Agavaceae (Eguiarte et al., 2000).

Se distingue por sus flores campaniformes con tépalos elípticos u ovados, ovario ínfero, y estambres y estilo engrosados. Comparte con *Beschorneria* (su género hermano) los tépalos libres, las flores péndulas, fasciculadas y la dispersión del polen agrupado en forma de tétradas (García-Mendoza, 2001).

Las especies del género se consideran rosetas perennes, monocárpicas, con un tallo subterráneo o aéreo, en el ápice del cual se agrupan las hojas formando una roseta. Es monocaule y monoaxial (con un tronco simple y con un solo eje derivado de un meristemo primario único); las especies que tienen estas características nunca se ramifican (excepto algunos ejemplares de *F. parmentieri* y *F. quicheensis*, que pueden llegar a hacerlo cuando sufren daños físicos) y el meristemo vegetativo terminal se diferencia completamente en una inflorescencia, la cual siempre excede la longitud del tallo (García- Mendoza, 2001).

El género *Furcraea* se divide en dos subgéneros: *Flexiles* y *Furcraea*. El subgénero *Flexiles*, con cuatro especies, es endémico de México y Guatemala, mientras que el subgénero *Furcraea*, con 21 especies, se distribuye de México a Bolivia. México es el país con mayor riqueza y se considera el posible centro de origen ya que aquí se encuentran 13 especies, el 52% del total, y 9 especies (36%) son endémicas del país (Eguiarte et al., 2000; García-Mendoza, 2001; Rocha et al., 2006).

Las cuatro especies del subgénero *Flexiles* crecen en las montañas con clima templado, relativamente húmedo y con rocas volcánicas. El área de distribución de *Furcraea parmentieri* es discontinua a lo largo de la Faja Volcánica Transmexicana. En contraste, *F. longaeva*, *F. quicheensis* y *F. martinezi* muestran áreas únicas de

crecimiento. La distribución de las cuatro especies no se sobrelapa, sino que son especies alopátricas y muestran un patrón de distribución disyunto, pues se hallan separadas por una distancia que excede su capacidad normal de dispersión (García-Mendoza, 2001). Esta disyunción es manifiesta por barreras geográficas que impiden su dispersión, en este caso producidas por las tierras bajas cálidas y secas. *F. quicheensis* se encuentra aislada de las otras especies por el Istmo de Tehuantepec, barrera que impide la dispersión hacia el norte de muchos taxa Centro y Sudamericanos. *F. longaeva* está separada de *F. parmentieri* por el Valle de Tehuacán-Cuicatlán y por la cuenca del río Balsas, última barrera que también la separa de *F. martinezzi* y que a su vez separa esta última especie de *F. parmentieri* (Figura 2).

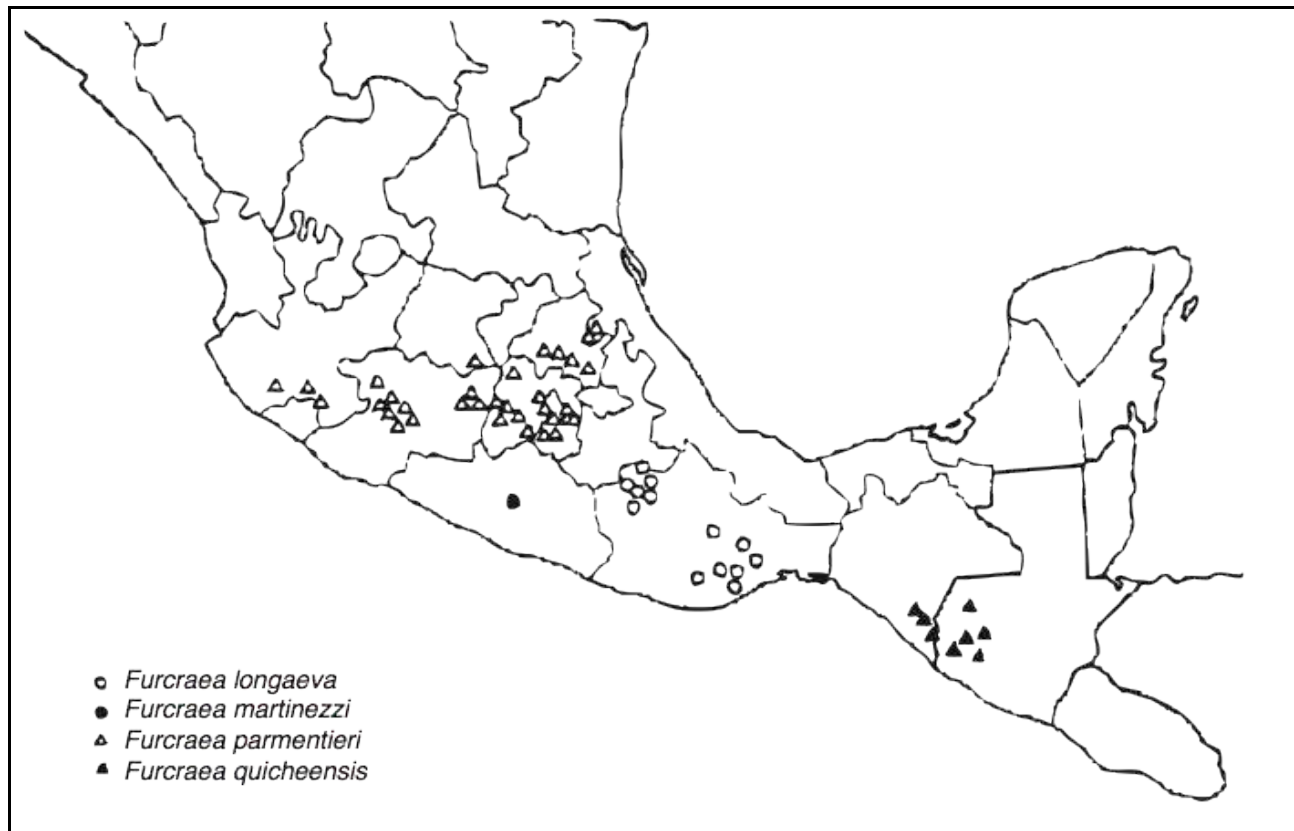


Figura 2. Especies *Furcraea* (subgénero *Flexiles*) de la Región Mesoamericana de Montaña, provincias de las Serranías Meridionales y Serranías Transísmicas (tomado de García-Mendoza, 2001).

Finalmente, García-Mendoza (2001) propone las siguientes tendencias evolutivas dentro del género:

1. Una progresión del hábito arborescente al acaule.
2. Reducción en la inflorescencia.
3. Pasar de bulbilos foliosos a bracteados.
4. Parece existir una tendencia de la reproducción sexual a la asexual, pasando por aquellas especies que tienen ambos tipos de reproducción

En este contexto, se considera que las especies del subgénero *Flexiles* presentan las características primitivas, mientras que las especies derivadas pertenecen al subgénero *Furcraea*.

1.8.1. Biología Reproductiva

Todas las especies del género son monocárpicas o semélparas, es decir, presentan un único evento de reproducción en su vida, después del cual mueren (Eguiarte et al., 2000). Presentan inflorescencias masivas con flores grandes, radialmente simétricas, campaniformes y de colores claros (de blancas a verde claro). Sus flores producen una fragancia dulce, abren y liberan el polen y el néctar al atardecer y durante la noche (Rocha et al., 2006).

Dadas estas características, se sospecha que las flores pueden ser polinizadas por esfíngidos (Eguiarte et al., 2000; Rocha et al., 2006). Albarrán-Hernández (2011) reporta que *Furcraea parmentieri* es visitada por esfíngidos, colibríes y abejas aunque no pudo determinar si estos visitantes actuaban como polinizadores o no.

Las especies de *Furcraea* producen muchas flores pero tienen una baja producción de frutos (entre 4 y 30 por planta) y presentan una gran cantidad de bulbilos que son dispersados alrededor de la planta madre, contribuyendo a la formación de poblaciones clonales (García-Mendoza, 2001; Rocha et al., 2006). De las 25 especies de *Furcraea*, 23 producen bulbilos y en 15 la reproducción se lleva a cabo exclusivamente de esta manera (Rocha et al., 2006). García-Mendoza (2001) propone que el establecimiento de nuevas plantas se logra preferentemente a través de bulbilos, más que a través de semillas, provocando que las poblaciones de una misma especie tengan poca variación genética. Cada planta puede producir miles de bulbilos: *F. macdougallii* produce más de 15,000 bulbilos que persisten en la inflorescencia aún después de que la planta ha muerto; *F. foetida* en cultivo presenta flores anormales, no produce frutos y únicamente se propaga por bulbilos (García-Mendoza, 2001). No obstante, Hernández-Pedrero (2009) encontró que en *F. parmentieri* aún con la alta producción de bulbilos el 99% del reclutamiento se da por la vía sexual.

Alvarez de Zayas y Köhler (1987) proponen que la formación de bulbilos en *F. foetida* está relacionada con formas poliploides que tienen aberraciones cromosómicas y que manifiestan esterilidad del polen. Sin embargo otros autores, basándose en la baja visita de polinizadores en observaciones de campo, creen que los polinizadores

desaparecieron de las áreas de distribución de las especies, o bien que las poblaciones están muy reducidas en número, y que por lo tanto, las plantas sólo tienen como estrategia para perpetuarse a la reproducción vegetativa a través de la formación de bulbilos (García-Mendoza, 2001; Rocha et al., 2006, Albarrán, 2011). A diferencia de otros modos de reproducción vegetativa, los bulbilos crecen en las inflorescencias una vez que la planta almacenó nutrientes y los movilizó hacia su estructura reproductiva (Arizaga y Ezcurra, 1995).

Aparentemente *Furcraea longaeva* es la única especie que se reproduce sólo de manera sexual, mientras que *F. quicheensis*, aunque no produce bulbilos, sí se reproduce por hijuelos que se originan sobre los tallos (García-Mendoza, 2001). Otras especies como *F. cahum* y *F. macdougalli* tienen una alta producción de cápsulas, mientras que *F. guerrerensis*, *F. martinezi*, *F. niquivilensis* y *F. guatemalensis*, forman pocas cápsulas y un gran número de bulbilos. *F. parmentieri*, *F. foetida* y *F. tuberosa* prácticamente no forman frutos y se reproducen casi exclusivamente por bulbilos (García-Mendoza, 2001). Las semillas fértiles de los pocos frutos que forman, germinan, pero producen plántulas débiles que mueren a los pocos días de emergidas (García-Mendoza, 2001).

1.9. *Furcraea parmentieri*

Furcraea parmentieri (Roezl ex Ortega) García-Mend. pertenece al subgénero *Flexiles*. Es una planta arborescente, monopodial, con un tronco simple que mide de 1.5 a 4 (-8) m de altura, y de 0.2 a 0.5 m de diámetro (Figura 3). Cada planta presenta una roseta en el ápice (aunque a veces puede tener más) con hasta 150 hojas y un diámetro de 2 a 2.5 m (García- Mendoza, 2001). Las hojas son lanceoladas, erectas, semicóncavas, coriáceas, glaucas, persistentes, y cubren parte del tallo cuando se secan; el margen de las hojas está finamente denticulado (García-Mendoza, 2001). La inflorescencia es paniculada y de estructura racemosa, la cual surge del meristemo apical a través de un escapo; mide de (2.5-) 4 a 6 (-9) m de altura (García- Mendoza, 2001). Las flores miden 4.5 a 5.5 cm de diámetro, son péndulas, campaniformes, amplias, de colores claros (blanco amarillento) y permanecen abiertas día y noche (García- Mendoza, 2001). Las cápsulas son ovoides y miden 4 a 4.5 × 3 a 3.5 cm (García- Mendoza, 2001). Cada cápsula contiene aproximadamente 200 semillas (Hernández- Pedrero, 2009). Las semillas son negras, brillantes, planas y miden 9 a 11 × 6 a 8 mm (García- Mendoza, 2001). Los bulbilos son foliosos, ovoides, con base de 1.5 a 2 (-3) cm de alto, (0.7-) 1 a 2 cm de ancho, y están cubiertos de brácteas deltoides, escariosas y caedizas (García-Mendoza, 2001).

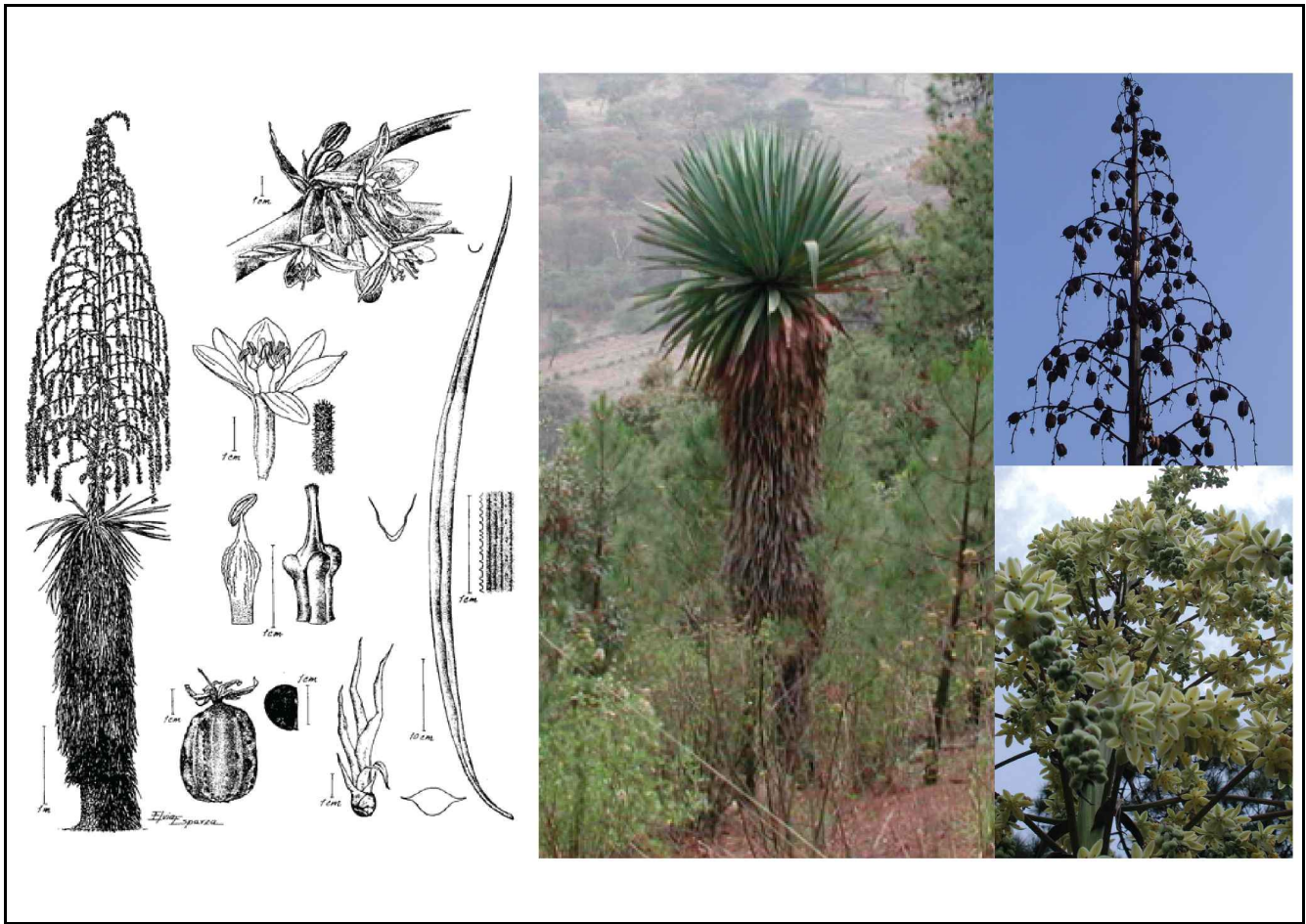


Figura 3. Ilustración de *Furcraea parmentieri* (tomado de García-Mendoza, 2000;2001) y fotografías de la planta, la inflorescencia y la infructescencia tomadas por María Albarrán.

Es una especie que se distribuye a lo largo de la Faja Volcánica Transmexicana (desde la Sierra de Manantlán, Jalisco, hasta las Sierras de Pachuca y Tulancingo, Hidalgo) en los picos de las montañas más altas (a partir de los 2300 m s.n.m.) sobre suelos volcánicos; por lo general, en sitios abiertos en laderas escarpadas y pedregosas de los bosques mesófilos de montaña, de *Quercus-Pinus* o *Pinus-Abies* (García-Mendoza, 2001). La gran altitud a la que se desarrollan permite que sus poblaciones adopten un patrón de distribución insular (García-Mendoza, 2001).

Furcraea parmentieri, como todas las especies del género *Furcraea*, es monocárpica (García-Mendoza, 2001). Los individuos se reproducen a una edad estimada de entre 50 y 90 años y es interesante que sus poblaciones parecen tener eventos de reproducción masiva, seguidos de varios años en los que no se observa una

sola inflorescencia (Hernández-Pedrero, 2009). Estos eventos reproductivos inician en el mes de enero con la producción de escapos; la floración se da de marzo a mayo; los frutos maduran entre junio y octubre, y los frutos dispersan sus semillas entre noviembre y febrero del año siguiente (Albarrán-Hernández, 2011). Por lo general se observa que durante los años reproductivos hay una alta producción de bulbilos en los individuos reproductivos (de junio en adelante), y éstos parecen predominar sobre la producción de cápsulas en los individuos en fructificación (García-Mendoza, 2001; Albarrán-Hernández, 2011).

Las flores de *F. parmentieri* producen muy poco néctar y son visitadas (en frecuencias bajas) por lepidópteros nocturnos de las familias Noctuidae, Geometridae y Sphingidae y en el día por dos especies de colibríes (*Hylocaris leucotis* y *Cynantus latirostris*), así como abejas (*Apis mellifera*), avispas y moscas. (Albarrán-Hernández, 2011). Su polinización requiere de un vector para garantizar la fecundación de las flores y la mayor producción de frutos se da cuando es cruzada aunque se pueden formar frutos por geitonogamia (polinización entre distintas flores de la misma planta). Resulta notable que una vez iniciados los frutos, la cantidad de semillas no varía según el tipo de polinización y que las semillas alcanzan una germinación del 98% (Albarrán-Hernández, 2011).

Según García-Mendoza (2001) parece haber una tendencia de la reproducción sexual a la asexual. Sin embargo, Hernández-Pedrero (2009) realizó un estudio demográfico de una población de *Furcraea parmentieri* en el volcán El Xitle y encontró que el 99% de los reclutas provienen de la reproducción sexual, mientras que sólo el 1% proviene de la propagación vegetativa (establecimiento de bulbilos). Este mismo estudio reportó que en el Xitle la población se encuentra en crecimiento ($\lambda = 1.03$) y que el establecimiento de nuevos reclutas ocurre preferentemente por la vía sexual. El balance demográfico entre el reclutamiento sexual y vegetativo parece tener consecuencias importantes en la diversidad clonal y en la estructura genética de las poblaciones (Clark-Tapia et al., 2005).

Furcraea parmentieri se considera una especie rara porque, a pesar de que llega a presentar altas densidades poblacionales en los manchones que ocupa, su distribución

se limita a la Faja Volcánica Transmexicana con poblaciones localizadas por la alta especificidad de hábitat. Estas poblaciones son grandes alrededor del D.F. pero relativamente escasas en el resto de su distribución (García-Mendoza, 2001). Por esta razón se ha enlistado en la NOM-ECOL-059 (2001) bajo la categoría de “amenazada” y se considera que el mayor riesgo para su permanencia es la transformación y degradación de su hábitat por efectos antropogénicos (Hernández-Pedrero, 2009).

2. Justificación

Furcraea parmentieri se encuentra dentro del subgénero *Flexiles*, el cual es considerado primitivo dentro del género. En estudios preliminares del estado genético de la especie se ha encontrado poca variación genética. Esto y la alta producción de bulbilos que se observa en las inflorescencias hacen suponer que la mayoría de las plantas podrían ser de origen clonal. Por otro lado, el patrón de distribución insular, con poblaciones densas pero en hábitats específicos (partes altas de las montañas) sugieren una alta diferenciación entre las poblaciones.

El estudio de los cambios evolutivos a microescala, como los que ocurren en *F. parmentieri*, y su relación con los factores ecológicos pueden ayudar a entender procesos evolutivos en todo el género, sobre todo la tendencia que existe de la reproducción sexual a la asexual. Por esta razón, es importante hacer estudios detallados sobre la diversidad y estructura genética de las poblaciones de *Furcraea* y relacionar los resultados con la información demográfica y reproductiva disponible.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Describir la genética de poblaciones de *Furcraea parmentieri* determinando los patrones, niveles y distribución de la variación genética y estimando el grado de clonalidad presente en las poblaciones, con el fin de contribuir al conocimiento del género y brindar elementos que ayuden a la conservación de la especie.

3.2. Objetivos particulares

- Obtener los patrones de variación genética mediante el uso del marcador molecular ISSR.
- Calcular los niveles de variación genética utilizando los estimadores de heterocigosis esperada (H_E) y porcentaje de loci polimórficos ($\%P$).
- Determinar la estructura genética y las distancias genéticas entre las poblaciones.
- Hacer un modelo de la distribución potencial de *Furcraea parmentieri* en el presente y en el Pleistoceno durante el Último Máximo Glacial.
- Estimar la diversidad clonal (G/N) y la distribución de las clonas dentro y entre las poblaciones.

4. Hipótesis

Se espera que *Furcraea parmentieri* presente una baja diversidad genética dentro de sus poblaciones debido a su alta producción de bulbillos, pero que éstas se encuentren muy estructuradas, aumentando la diversidad genética en promedio. Además se predice un alto grado de clonalidad.

5. Material y Métodos

5.1. Colecta de campo

La colecta se llevó a cabo en tres poblaciones (Tabla 2 y figura 4) a partir de los datos de colecta de ejemplares de *Furcraea parmentieri* depositados en el herbario nacional (MEXU). Se colectaron de 48 a 65 individuos por localidad procurando no colectar individuos cercanos físicamente para evitar que pertenecieran al mismo genet. Los individuos fueron colectados cortando la hoja más joven de cada roseta para obtener ADN de buena calidad. Las muestras fueron etiquetadas y, una vez en el laboratorio, se cortó un pedazo de aproximadamente 6 X 6 cm que fue almacenado a -80°C.

Tabla 2. Poblaciones colectadas

Población	N	Estado	Municipio	Altitud (m s.n.m.)	Coordenadas N	Coordenadas W
Volcán El Xitle (X)	48	Distrito Federal	Del. Tlalpan	3444	19° 11' 59.7"	99° 15' 0.02"
El Chico (CH)	65	Hidalgo	Mineral del Chico	2974	20° 11' 24"	98° 44' 24"
Cerro El Burro (CB)	50	Michoacán	San Gregorio	2768	19° 24' 21.9"	101° 31' 19.8"

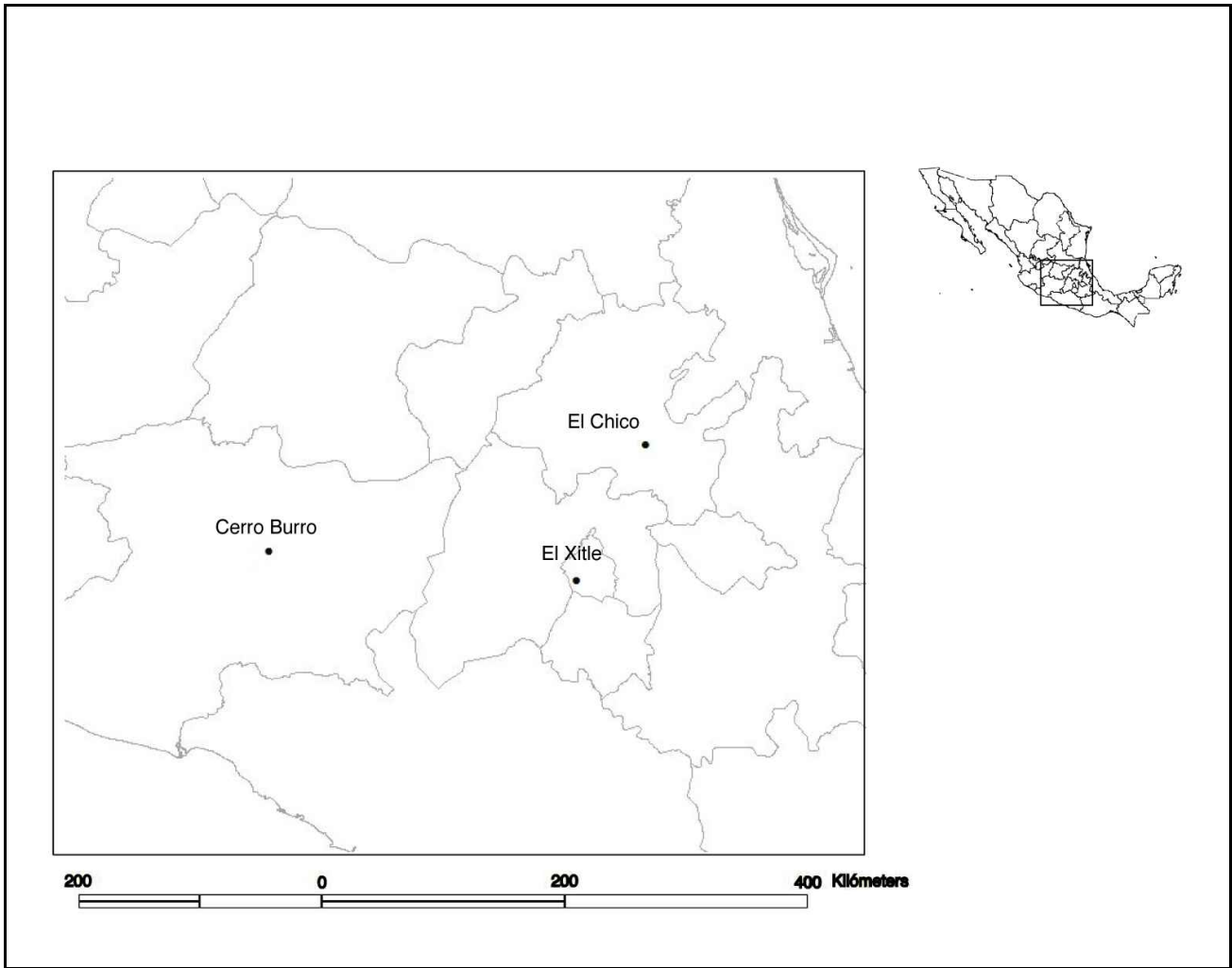


Figura 4. Localidades de colecta de *Furcraea parmentieri*.

5.2. Extracción de ADN

Debido a la gran cantidad de polisacáridos que contienen las hojas de *Furcraea parmentieri* fue necesario implementar un protocolo de extracción que eliminara los polisacáridos, ya que impiden la amplificación de los fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena la polimerasa (PCR) al inhibir la actividad de la Taq polimerasa. El protocolo ideal fue una modificación del protocolo de extracción CTAB (bromuro de cetiltrimetil amonio) de Doyle y Doyle reportado por Tel-Zur et al. (1999). En este protocolo se utiliza un detergente CTAB con alto contenido de sales que precipita los polisacáridos pero no el ADN. Básicamente el protocolo consiste en romper las paredes celulares al pulverizar el tejido con nitrógeno líquido y solubilizar las membranas celulares con detergentes catiónicos con alto contenido en sales. Después el ADN es purificado a través de una serie de pasos de centrifugación y extracción con solventes orgánicos. Por último se precipita el ADN con etanol y se rehidrata con agua ultrapura (ver Apéndice 1).

5.3. Amplificación de ADN por medio de Inter Simple Sequence Repeats

Fueron empleados tres primers u oligonucleótidos para la amplificación del ADN. Se probaron varios primers utilizados previamente en otros estudios de la familia Agavaceae realizados en el laboratorio (González, 2005; Trejo, 2006; Colín, 2006; Scheinvar, 2008; Rives, 2009) y se seleccionaron los *primers* con los que se obtuvo la mayor cantidad de polimorfismo y mejor resolución de bandas para la lectura de geles.

La secuencias de los *primers* empleados en este estudio fueron

811	GAG AGA GAG AGA GAG AC
827	ACA CAC ACA CAC ACA CG
848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG

R= A o G

Las amplificaciones se llevaron a cabo en termocicladores Applied Biosystems con las condiciones de reacción y los programas para cada primer que se muestran en las tablas 3 y 4.

Tabla 3. Condiciones de reacción para la amplificación de los *primers* de ISSR's.

Reactivos		811	827	848
	[inicial]		[final]	
Buffer	10 X		1 X	
MgCl ₂	30 mM	2.5 mM	1.5 mM	1.0 mM
dNTPs	25 mM c/u		0.2 mM	
<i>Primer</i>	10 µM		0.4 µM	
Taq polimerasa	5 U/µL		1 U	
ADN	-		30 ng/µL	

Para verificar que las amplificaciones estuvieran libres de contaminación por ADN, se empleó un control negativo en cada amplificación que consistía en sustituir el ADN por agua ultrapura en una mezcla de reacción.

Tabla 4. Programa de amplificación de PCR para los tres *primers* utilizados.

Paso	Temperatura (°C)			Tiempo
	811	827	848	
1. Desnaturalización inicial		94		4 min
2. Desnaturalización		94		1 min
3. Alineación	57	56	54	1 min
4. Extensión		72		1 min
				35 ciclos de paso 2 a 4
5. Extensión final		72		7 min
6. Final		4		-

Todos los productos de PCR resultantes fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% utilizando TAE 0.5X como buffer de corrida. A este último se le añadió bromuro de etidio a 1.0 mg/mL para teñir el gel durante la electroforesis y poder visualizarlo posteriormente con un transiluminador de luz ultravioleta (Bio-imaging Systems) en el cual se tomó una fotografía digital a cada gel usando una cámara Gel Logic 100 (Imaging Systems). Para aproximar el tamaño en pares de bases de cada banda, se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen), que corría al lado de las muestras.

5.4. Lectura de geles

Una vez determinado el peso molecular de cada banda, se observó la presencia o ausencia de las bandas en cada individuo (cada banda representa un locus) y fue registrado en una matriz de presencia/ausencia para su posterior análisis. Para el análisis se eliminaron los individuos con los que no fue posible amplificar los tres primers. En los individuos que se logró amplificar dos, el tercero se denotó como *missing data* en la matriz de presencia/ausencia y fueron incluidos en los análisis como datos ausentes.

Debido a que los ISSRs son marcadores dominantes, no fue posible determinar los individuos que eran heterócigos para un locus dado, sino que la presencia de la banda representa al alelo homócigo dominante o heterócigo y la ausencia representa al homócigo recesivo.

5.5. Análisis de datos

5.5.1. Obtención de frecuencias alélicas

Se utilizó el programa TFPGA (*Tools for Population Genetic Analysis*) para calcular las frecuencias alélicas a partir de la matriz de presencia/ausencia. Éstas se estimaron con la frecuencia de los alelos nulos (i.e. individuos sin banda), asumiendo que las poblaciones se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg. La frecuencia del alelo nulo (q) en un locus dado es igual a la raíz cuadrada de la frecuencia de los individuos sin banda $q = x^{1/2}$ y la frecuencia del alelo dominante (p) se calcula como $p = 1 - q$.

Se utilizó la corrección de Lynch y Milligan (1994) para marcadores dominantes en la que se recomienda restringir el análisis a bandas que tengan una frecuencia observada menor a $1 - (3/N)$, evitar los loci que se presenten en menos de 3 individuos homocigos nulos ($x < 3/N$) y usar tamaños de muestra grandes para evitar sesgos en la estimación de los parámetros genéticos. En esta corrección la frecuencia alélica de q se calcula como

$$\hat{q} = \hat{x}^{1/2} \left(1 - \frac{\text{Var}(\hat{x})}{8\hat{x}^2} \right)^{-1}$$

donde \hat{x} es la proporción de los N individuos muestreados que no presentan banda y $\text{Var}(\hat{x}) = \hat{x}(1 - \hat{x})/N$ es la varianza en la frecuencia de los homocigos nulos.

Se llevó a cabo una prueba exacta de diferenciación (Raymond y Rousset, 1995) con todos los loci para saber si existen diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre las poblaciones. Cuando los valores de probabilidad p son altos, es decir cercanos a 1, significa que las diferencias se deben al azar y cuando son de $p < 0.05$, las frecuencias alélicas entre las poblaciones difieren estadísticamente.

5.5.2. Variación genética

Para tener una idea de la cantidad de variación genética existente en las poblaciones, fueron estimados los valores de heterocigosis (H_E) y porcentaje de loci polimórficos ($\%P$). Ambos parámetros fueron calculados para cada locus, por población y para la especie.

La heterocigosis esperada para el locus i en la población j se calculó mediante la fórmula propuesta por Lynch y Milligan (1994) con la cual se obtiene un estimador no sesgado y más apropiado para marcadores dominantes, de la siguiente manera:

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

Donde $\hat{q}_j(i)$ es la frecuencia alélica del locus i en la población j y $\text{Var}[\hat{q}_j(i)] = \frac{1 - \hat{x}}{4N}$ es la varianza en la frecuencia alélica de q .

Promediando con todos los loci observados (L), la diversidad genética promedio observada en la población j es:

$$\hat{H}_j = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L [\hat{H}_j(i)]$$

Para obtener el porcentaje de loci polimórfico ($\%P$) se utilizó el criterio del 95%, esto es que un loci se considera polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común no exceda 0.95, y se calculó dividiendo el número de loci polimórficos x entre el número total de loci m , $\%P = x/m$.

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la diferencia entre los valores promedio de la heterocigosis esperada (H_E) entre poblaciones.

5.5.3. Estructura genética

Para estimar el grado de estructuración genética entre las poblaciones de *Furcraea parmentieri* se calculó el coeficiente de coancestría θ (Cockerham, 1969) como análogo a la F_{ST} de Wright. Este estimador se define como la probabilidad de que un par de genes situados en el mismo locus tomados al azar dentro de una población sean idénticos por descendencia. El estimador θ nos brinda una medida natural de la diferenciación entre las poblaciones ya que aumenta conforme se incrementa la divergencia (Reynolds et al., 1983). El estimador θ se calculó utilizando el programa TFPGA, el cual emplea el algoritmo de Weir y Cockerham (1984) que consiste en hacer análisis de varianza de las frecuencias alélicas esperadas y su posterior correlación dentro de las poblaciones con respecto al total de la especie.

Este programa realiza los cálculos de θ para cada locus y por medio de un remuestreo *jackknife* obtiene un valor promedio de θ , además estima un intervalo de confianza asimétrico mediante *bootstrap*. En este caso se le indicaron 10,000 réplicas con un intervalo de confianza del 95% y se obtuvieron los valores de estructuración para los tres pares posibles de poblaciones.

5.5.4. Flujo génico

El flujo génico se obtuvo indirectamente a partir del valor de θ estimado previamente. Según el modelo de islas (Wright, 1951) se puede calcular el número de migrantes por generación (Nm) mediante la siguiente fórmula con la corrección de Crow y Aoki (1984):

$$Nm = \frac{\left(\frac{1}{\theta}\right) - 1}{4}$$

5.5.5. Distancias genéticas

Se calcularon las distancias genéticas entre las poblaciones utilizando el programa TFPGA, éste calcula las distancias mediante el algoritmo de Nei (1972, 1978). Esta distancia, D , considera dos poblaciones diploides tomadas al azar, X y Y , que segregan alelos múltiples para un locus, y que x_i y y_i son las frecuencias del alelo i en X y Y , respectivamente. La probabilidad de identidad de dos genes tomados al azar en la población X es $j_x = \sum x_i^2$, en la población Y es $j_y = \sum y_i^2$ y la probabilidad de identidad para X y Y es $j_{xy} = \sum x_i y_i$. La identidad normalizada entre X y Y respecto de todos los loci se define como

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

donde J_x , J_y y J_{xy} son las medias aritméticas de j_x , j_y y j_{xy} respectivamente. La distancia genética entre las poblaciones X y Y se puede calcular como

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

D tiene un valor de 0 cuando las poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas y tiende a infinito cuando no comparten ningún alelo (Nei, 1972).

A partir de la matriz de distancias se reconstruyó un árbol con el método UPGMA (*Unweighted pair-group method with arithmetic means*) utilizando el programa TFPGA.

Para explorar si existe un patrón de aislamiento por distancia en las poblaciones, es decir, si existe una correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas, se llevó a cabo una prueba de Mantel con el programa TFPGA.

5.6. Estimación bayesiana del número de poblaciones

Se calculó el número de poblaciones genéticamente diferentes más probables utilizando el programa Structure V. 2.2 (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003, 2007). Este programa utiliza un método de agrupamiento bayesiano para identificar la estructura de una población y asignar probabilísticamente individuos a poblaciones a partir de sus genotipos (Pritchard et al., 2000).

El programa funciona bajo dos supuestos: equilibrio de ligamiento completo entre los loci dentro de las poblaciones y equilibrio de Hardy-Weinberg dentro de las poblaciones. De manera general, el algoritmo consiste en asumir un modelo en el que hay K poblaciones, cada una de las cuales está caracterizada por un juego de frecuencias alélicas en cada locus. Teniendo los genotipos observados de cada individuo, es posible asignarlos probabilísticamente a una población.

Para hacer el análisis se indicaron 35 000 corridas de “calentamiento” y 50 000 cadenas de Markov-Monte Carlo. Se utilizó un modelo de no mezcla entre poblaciones con frecuencias alélicas correlacionadas entre poblaciones para calcular la probabilidad posterior de 1 a 6 agrupamientos con 25 iteraciones cada uno. Posteriormente se calculó el número de poblaciones más probable mediante el método de Evano et al (2005).

5.7. Modelo de distribución potencial

Para aproximar la distribución histórica de *Furcraea parmentieri* se hizo un modelo de distribución potencial. Primero se creó una base de datos con las coordenadas de latitud y longitud de todos los registros de *F. parmentieri* disponibles. Estos registros se obtuvieron de los ejemplares del herbario nacional (MEXU) y de las bases de datos de la Red Mundial de Información sobre Biodiversidad (REMIB), Jardín Botánico de Missouri (www.tropicos.org) y Global Biodiversity Information Facility (GBIF).

Con la finalidad de obtener localidades únicas, se depuró esta base de datos eliminando los registros repetidos. Para verificar que no hubiera registros con sesgos geográficos, las localidades únicas se proyectaron en el espacio geográfico utilizando el programa ArcView 3.2 (ESRI). La base de datos final contó con 51 registros de *F. parmentieri* en la República Mexicana, los cuales son considerados como muestras del nicho efectivo de la especie.

Se utilizaron las capas climáticas actuales y en el Pleistoceno durante el Último Máximo Glacial (UMG; ~22,000-18000 años antes del presente) de la base de datos de WordClim (www.wordclim.org) para Norteamérica, las cuales cuentan con una resolución de un kilómetro cuadrado.

Para comparar la distribución potencial en el pasado y en el presente primero se creó un modelo de distribución potencial de *Furcraea parmentieri* con las capas climáticas actuales utilizando el programa Maxent (Maximum Entropy). Este modelo fue proyectado al pasado con las capas climáticas del Último Máximo Glacial usando el mismo programa.

El programa Maxent arroja como resultado un mapa con probabilidades de presencia de la especie que van de 0 a 1. Este mapa fue recortado con el programa ArcView 3.2 (ESRI) para obtener únicamente las localidades con una probabilidad de presencia mayor a 0.6, ya que estas son las áreas con el valor por arriba del que la tasa de omisión es menor que la predicha por el modelo. Debido a que el modelo predijo la distribución de todo el subgénero *Flexiles*, se hizo un segundo recorte utilizando un mapa de provincias biogeográficas de México (CONABIO, 1997).

5.8. Diversidad clonal

Para hacer una aproximación del grado de clonalidad existente en las poblaciones estudiadas, se calcularon las distancias genéticas entre individuos. Estas distancias se obtuvieron mediante el coeficiente de similitud de Jaccard utilizando el programa FAMD (Fingerprint Analysis with Missing Data) (Schlüter y Harris, 2006). Con la matriz de distancias obtenida, se graficó un árbol de distancias *Neighbour-Joining* con el programa FigTree v 1.3.1 y se identificaron los grupos en los que la distancia fuera de 0 (i.e. los grupos de individuos genéticamente iguales).

Una vez identificados estos grupos se calculó la proporción de descubrimiento de nuevos genotipos de Ellstrand y Roose (1987). La proporción de genotipos distinguibles se denota como G/N , donde G es el número de genotipos distinguibles y N es el tamaño de muestra total. Esta proporción toma valores de 0 a 1. Si todos los genotipos son distintos ($G=N$) el valor de G/N es de 1 y significa que la población no es clonal y si, por el contrario G/N tiende a 0 significa que la población es muy clonal (Mandujano, 2007).

6. Resultados

6.1. Extracción de ADN y loci polimórficos

Se extrajo ADN de un total de 163 individuos pertenecientes a tres poblaciones de *Furcraea parmentieri*.

Se optimizaron las condiciones de amplificación de tres *primers* de ISSR's: 811, 827 y 848. Estos *primers* presentaron bandas definidas, repetibles y polimórficas (Figura 5). Se obtuvo un total de 45 bandas, cada una de las cuales representa un locus (Tabla 5). Las frecuencias alélicas de los 45 loci en las tres poblaciones pueden consultarse en el apéndice 2.

Tabla 5. Número de loci obtenidos para cada *primer*

<i>primer</i>	No. de loci	Tamaño (pares de bases)
811	15	550- 1120
827	15	490- 1200
848	15	540- 1300
No. total de loci	45	490-1300

La prueba exacta de diferenciación (Raymond y Rousset, 1995) mostró que 34 de los 45 loci son significativamente diferentes entre las poblaciones (Apéndice 3).

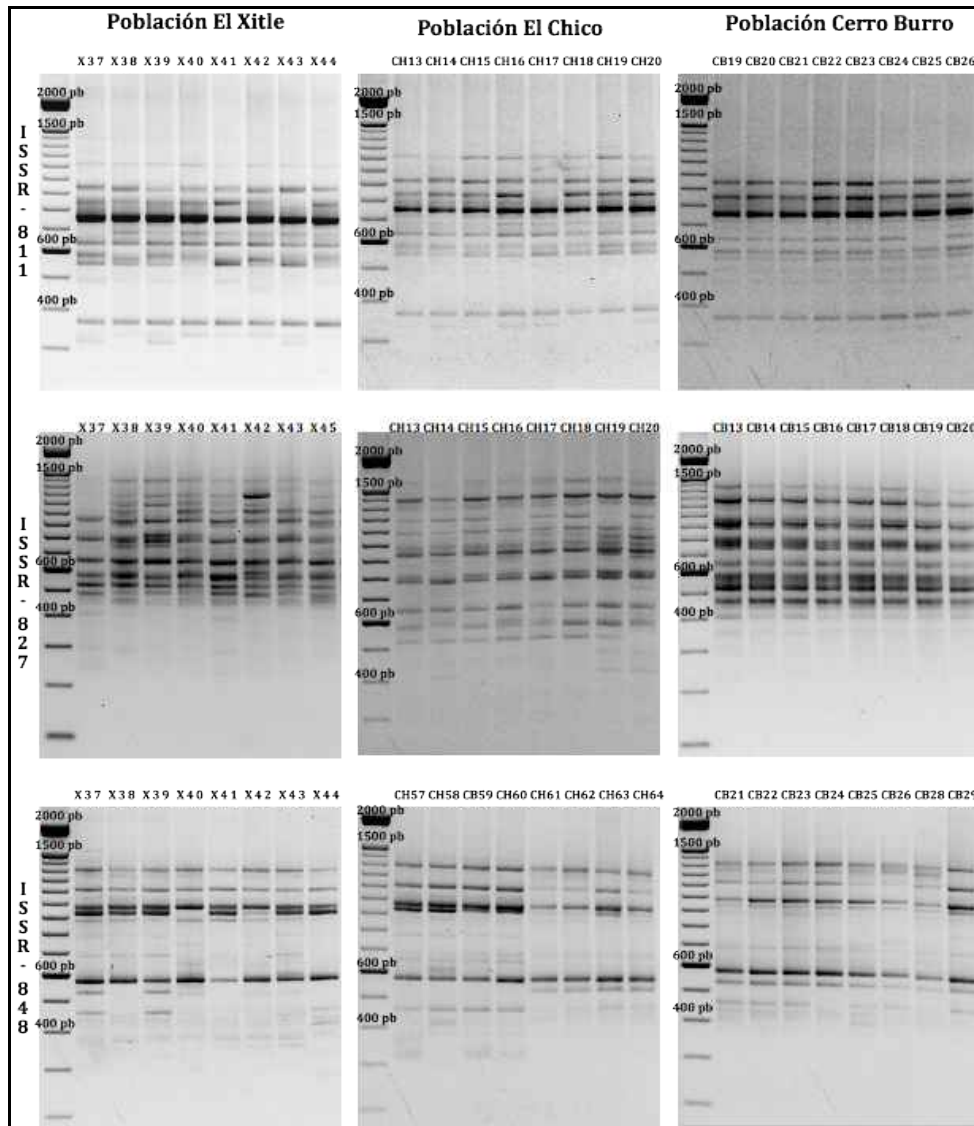


Figura 5. Geles de agarosa con los *primers* 811, 827 y 848

6.2. Variación genética

Contrario a las predicciones, los valores de heterocigosis esperada (H_E) y porcentaje de loci polimórficos ($\%P$) fueron relativamente altos para cada una de las poblaciones y para el total ($H_E=0.332$, $\%P=93$) (Tabla 6) si se compara con otras especies de Agavaceae.

Tabla 6. Resultados de heterocigosis esperada (H_E) y porcentaje de loci polimórficos ($\%P$) en cada población y para el total.

Población	H_E	$\%P_{(95\%)}$
Xitle (N=46)	0.3661	91
El Chico (N=65)	0.2156	60
Cerro El Burro (N=49)	0.1202	38
Total (N= 160)	0.3322	93

La población que tuvo los estimados más altos de variación genética fue la población del Xitle ($H_E=0.3661$, $\%P=91$), seguida de la población El Chico ($H_E=0.2156$, $\%P=60$) y finalmente, la población con menor variación genética fue Cerro El Burro ($H_E=0.1202$, $\%P=38$).

Mediante el análisis de varianza (ANOVA) se encontró que el promedio de las heterocigosis es significativamente distinto entre las poblaciones ($F= 20.349$, $P<0.05$).

6.3. Estructura genética

Los valores obtenidos con el coeficiente de coancestría de Cockerham (θ) indican que las poblaciones presentan un alto grado de diferenciación ($\theta=0.3698$) (Tabla 7).

Tabla 7. Valores pareados del coeficiente de coancestría de Cockerham (θ) entre poblaciones y para el total.

θ	Xitle	El Chico	Cerro El Burro
Xitle	-		
El Chico	0.2161	-	
Cerro El Burro	0.3610	0.5307	-
Total	0.3698		

Por otra parte, mediante el cálculo de los valores de θ pareados se encontró que las poblaciones de El Chico y Cerro El Burro son las que están más diferenciadas ($\theta=0.5307$) y que Xitle y El Chico las que presentan menor estructuración ($\theta=0.2161$) (Tabla 8), sin embargo este valor sigue siendo alto cuando se compara con otras especies de la familia (Tabla 13).

El número de migrantes por generación calculado a partir de θ para las tres poblaciones fue de $Nm= 0.3426$ (Tabla 8).

Tabla 8. Número de migrantes por generación (Nm) entre cada par de poblaciones.

Nm	Xitle	El Chico	Cerro El Burro
Xitle	-		
El Chico	0.9069	-	
Cerro El Burro	0.4425	0.2210	-
Total	0.3426		

Entre las poblaciones Xitle y El Chico existe la mayor cantidad de flujo génico ($Nm= 0.9096$) y la población de Cerro El Burro presenta un flujo génico relativamente bajo con las poblaciones de Xitle y El Chico ($Nm= 0.4425$ y $Nm= 0.2210$, respectivamente) (Tabla 9). Todos los valores son menores a 1, por lo que se considera que prácticamente no existe flujo génico entre las poblaciones.

6.4. Distancias genéticas

Como se esperaba a partir de la F_{ST} pareada, la distancia genética promedio de Nei para los tres pares posibles de poblaciones fue de $D= 0.1880 \pm 0.081$ D.E. Las poblaciones más cercanas genéticamente fueron Xitle y El Chico, mientras que las más lejanas fueron El Chico y Cerro El Burro (Tabla 9).

Tabla 9. Distancias genéticas entre poblaciones.

D	Xitle	El Chico	Cerro El Burro
Xitle	-		
El Chico	0.1076	-	
Cerro El Burro	0.1867	0.2696	-
Promedio	0.1880		

A partir de esta matriz de distancias se construyó un dendrograma con el método UPGMA (Figura 6).

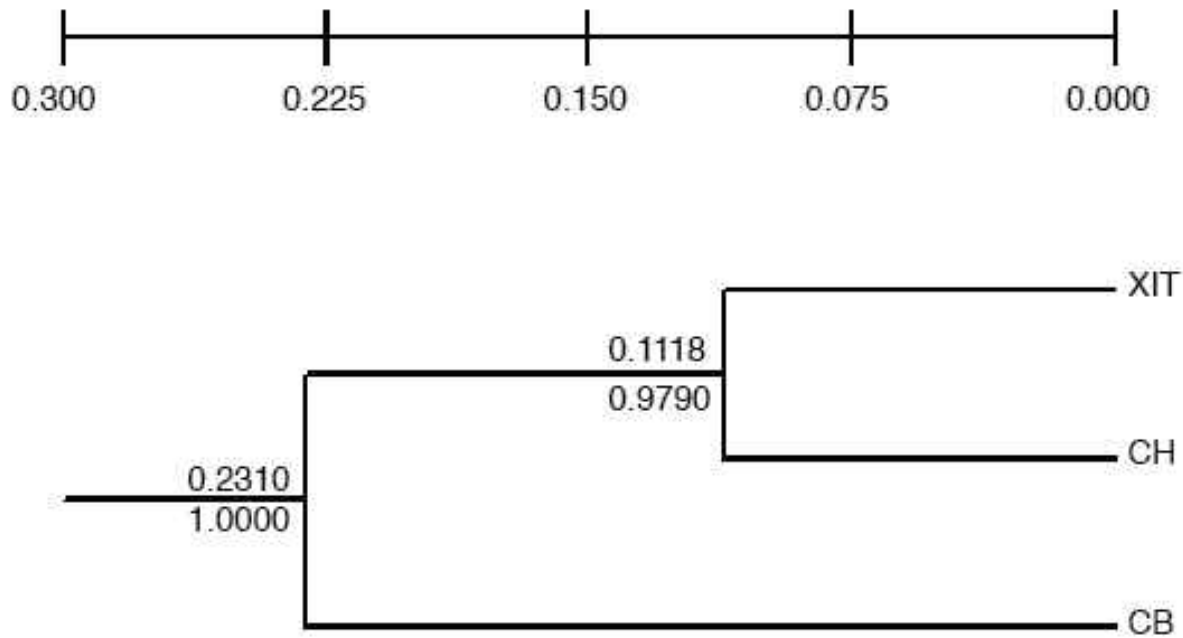


Figura 6. Dendrograma UPGMA de distancias genéticas de Nei entre las tres poblaciones. Arriba de cada nodo se muestran las distancias y abajo el valor de bootstrap que lo sostiene.

Mediante la prueba de Mantel se encontró que las poblaciones siguen un patrón de aislamiento por distancia ($r= 0.9889$), aunque este valor no fue significativo por sólo tener tres datos, se puede observar que la pendiente es grande, marcando una tendencia (Figura 7).

Tabla 10. Distancias genéticas (en negritas), distancias geográficas y entre paréntesis el valor de θ entre poblaciones.

Población	El Xitle		El Chico		Cerro El Burro
El Xitle	-				
El Chico	0.1076 122.58 (0.2161)	A	-		
Cerro El Burro	0.1867 239.61 (0.3610)	B	0.2696 307.25 (0.5307)	C	-

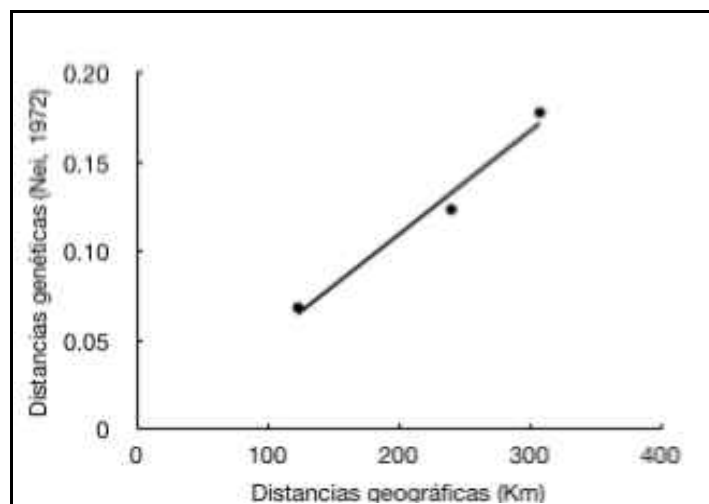


Figura 7. Correlación entre las distancias geográficas y genéticas (Nei, 1972) entre poblaciones.

6.5. Estimación bayesiana del número de poblaciones

El algoritmo bayesiano del programa Structure separó los genotipos de los individuos en tres poblaciones que, salvo por un par de individuos de la población el Chico (48=CB2 y 98=CB43), corresponden exactamente a las poblaciones delimitadas previamente por la localidad de colecta. En la Figura 8 se muestran las barras que corresponden al porcentaje de pertenencia de los individuos a cada una de las tres agrupaciones más probables; las barras rojas representan el genotipo de los individuos del grupo 1 (población El Xitle) las verdes a los del grupo 2 (población El Chico) y las azules a los del grupo 3 (población Cerro El Burro). Algunos individuos de El Chico presentan un genotipo que es más parecido al grupo El Xitle que probablemente representen migrantes o bien ancestría común reciente. También se observa que un individuo de Cerro El Burro tiene un pequeño porcentaje de pertenencia al grupo 1 (Xitle).

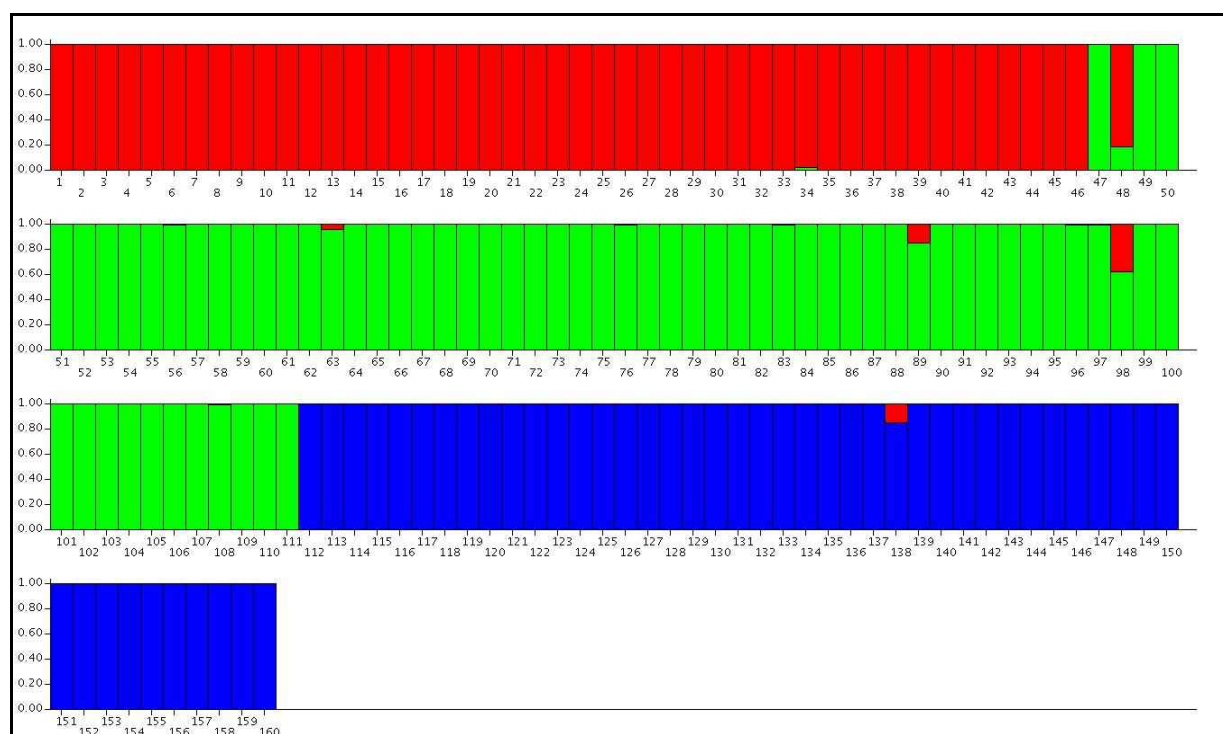


Figura 8. Porcentaje de pertenencia de los individuos a cada una de las tres agrupaciones más probables según el análisis mediante el programa Structure. En rojo el grupo 1, en verde el grupo 2 y en azul el grupo 3.

6.6. Simulaciones de modelos de distribución potencial

Mediante la creación de modelos de distribución potencial con el algoritmo de Máxima entropía (Maxent) se encontró que *Furcraea parmentieri* solía presentar una distribución continua a lo largo de la Faja Volcánica Transmexicana, así como algunos manchones en el Altiplano Sur (Zacatecano-Potosino) y la Sierra Madre Oriental en el Pleistoceno (Figura 9a). Esta distribución se ha ido reduciendo hasta quedar únicamente en las partes más altas de las montañas en la actualidad (Figura 9b). Este modelo, antes de ser recortado, no sólo predijo la distribución de *F. parmentieri*, sino de todo el subgénero *Flexiles* y es consistente con el modelo de especiación alopátrida que sugiere García-Mendoza (2001), en el cual las especies divergieron porque quedaron aisladas geográficamente (Figura 9c y 9d).

De acuerdo a este modelo, en el Pleistoceno, durante el Último Máximo Glacial (hace ~22 000- 18 000 años antes del presente), existían las poblaciones de Hidalgo, Michoacán y Estado de México, pero no las del Distrito Federal; y las poblaciones de Hidalgo se encontraban separadas del resto (Figura 9a). Las poblaciones del D.F. surgieron recientemente (Figura 9b) y las poblaciones de Hidalgo, Michoacán y Estado de México han sufrido una reducción en las áreas que ocupaban, así como una fragmentación.

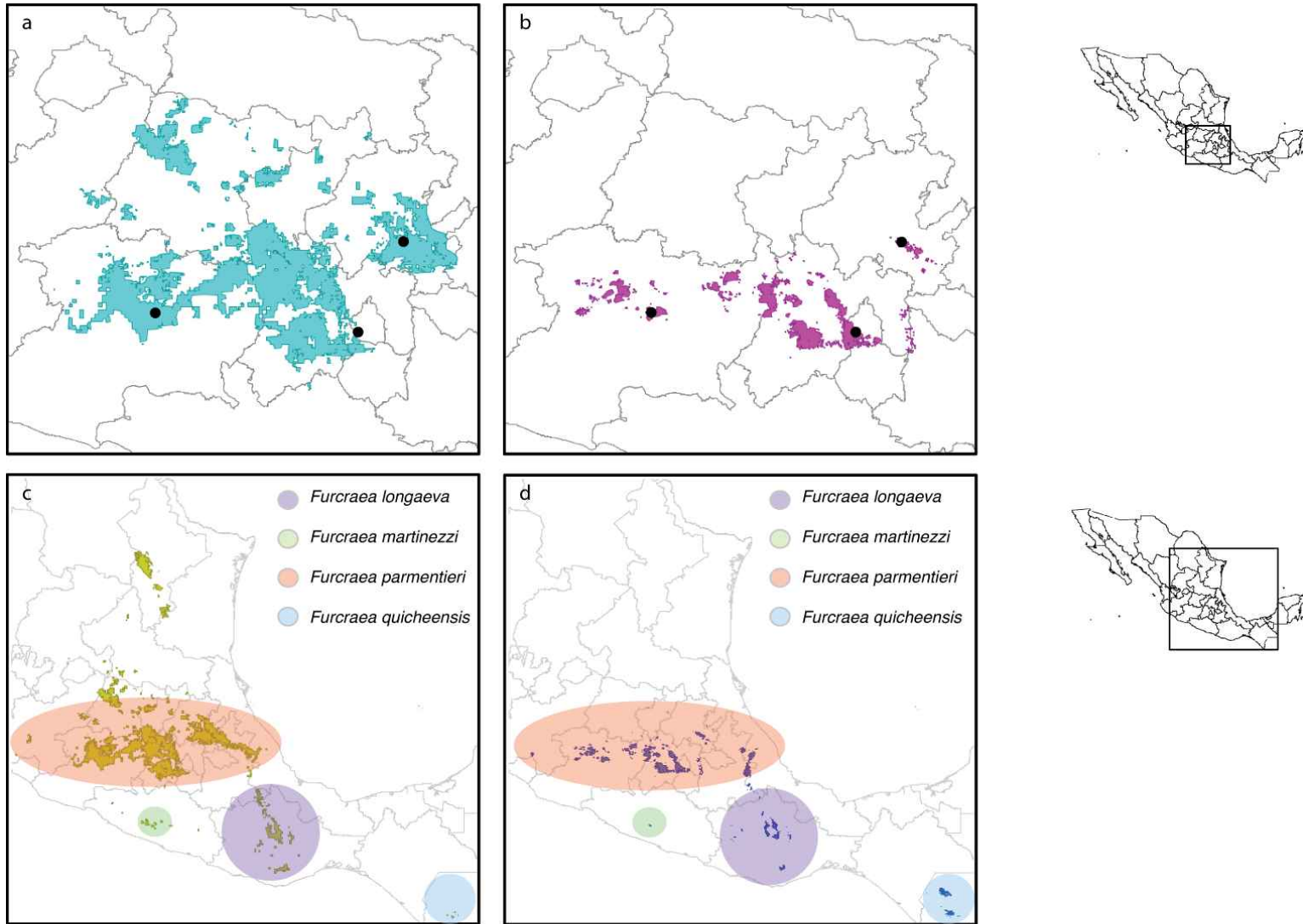


Figura 9. Modelo de distribución potencial en el Pleistoceno y en el presente.
a) *Furcraea parmentieri* en el Pleistoceno. b) *Furcraea parmentieri* en el presente.
c) Especies del subgénero *Flexiles* en el Pleistoceno. d) Especies del subgénero *Flexiles* en el presente.

6.7. Diversidad clonal

Mediante la construcción de un árbol de distancias genéticas entre individuos (índice de similitud de Jaccard) con el programa FAMD, se identificaron los grupos en los cuales la distancia genética fuera de 0 para conocer la proporción de descubrimiento de nuevos genotipos. Se encontró que la población del Cerro El Burro es la que presenta la proporción de descubrimiento de nuevos genotipos más baja de las tres poblaciones. Lo anterior indica que es en esta población en la que encontramos más individuos por genotipo (Tabla 11). Nuevamente estos resultados no eran los esperados según las observaciones en campo, se esperaba que dada la alta producción de bulbilos, las poblaciones presentaran varios individuos con el mismo genotipo.

Tabla 11. Proporción de descubrimiento de nuevos genotipos.

Población	No. genotipos	Individuos	G/N
El Xitle	46	46	1
El Chico	64	65	0.984
Cerro El Burro	46	49	0.938
Total	156	160	0.975

Con este mismo árbol de distancias (Figura 10) se encontró que los individuos forman tres agrupaciones claras. Estos grupos son congruentes tanto con los resultados de estructuración y distancias genéticas como con la asignación de los individuos con el programa Structure. Nuevamente, se encontraron dos individuos del Chico que se agrupan dentro del Xitle (los mismos que en el análisis con el programa Structure). Las poblaciones más cercanas son El Xitle y El Chico, mientras que las más lejanas son Cerro El Burro y El Chico, quedando El Xitle en medio.

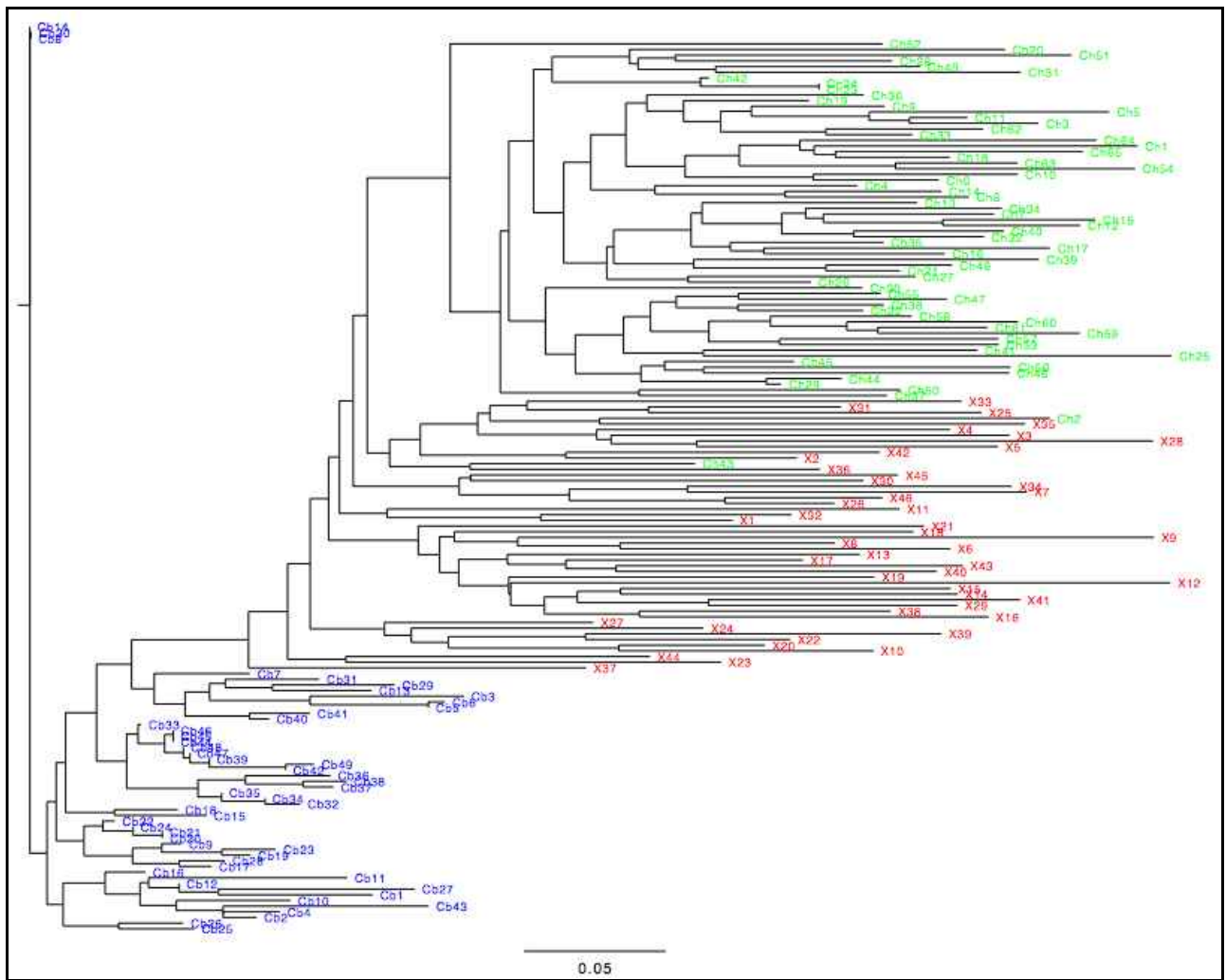


Figura 10. Árbol de distancias genéticas (índice de similitud de Jaccard) entre individuos construido mediante el algoritmo Neighbor-Joining. Las etiquetas azules son los individuos de Cerro Burro, las rojas del Xitle y las verdes del Chico.

7. Discusión

Se encontró que *Furcraea parmentieri* presenta altos niveles de variación genética, una alta estructuración entre las poblaciones, flujo génico prácticamente nulo y distancias genéticas grandes entre poblaciones, siguiendo, aparentemente un patrón de aislamiento por distancia. También se encontró que es muy posible que las poblaciones históricamente presentaran una distribución continua a lo largo de la Faja Volcánica Transmexicana y que actualmente se distribuyen de manera natural únicamente en los picos más altos de las montañas, como islas. Asimismo se observó una alta diversidad clonal o proporción de descubrimiento de nuevos genotipos.

7.1. Variación genética

La diversidad genética mantenida por una especie está influenciada por las características particulares de la especie así como por su historia evolutiva. Al parecer, principalmente cuatro factores afectan la cantidad de variación genética: forma de vida, distribución geográfica, status taxonómico y sistema reproductivo (Hamrick y Godt, 1989; Massey y Hamrick, 1998). Las monocotiledóneas longevas, perennes y de fecundación cruzada generalmente tienen mayor diversidad genética que especies con otras combinaciones de características (Hamrick y Godt, 1989).

Furcraea parmentieri presenta este juego de características (García-Mendoza, 2001; Hernández-Pedrero, 2009; Albarrán-Hernández, 2011), dando como resultado que las tres poblaciones estudiadas en esta tesis presentaran altos niveles de variación genética en promedio ($H_E = 0.3322$, $\%P = 93$) pero diferencias significativas entre cada una. Esta es la primera vez que se lleva a cabo un estudio de genética de poblaciones para el género *Furcraea*, sin embargo es posible comparar los niveles de variación genética con aquellos encontrados en especies de géneros cercanos, como *Agave*, que tengan formas de vida y biología reproductiva similares.

Tabla 12. Valores de diversidad y estructura genética en otras especies de la familia Agavaceae.

Espece	H _E	%P	F _{ST}	Nm	D	Marcador molecular	Referencia
<i>Furcraea parmentieri</i>	0.33	93	0.37	0.34	0.12-0.27	ISSR's	Presente estudio
<i>F. parmentieri</i> El Xitle	0.37	91				ISSR's	Presente estudio
<i>F. parmentieri</i> El Chico	0.21	60				ISSR's	Presente estudio
<i>F. parmentieri</i> Cerro El Burro	0.12	38				ISSR's	Presente estudio
<i>Agave garciae-mendozae</i>	0.27	85	0.10	1.30	0.02-0.04	ISSR's	González (2005)
<i>A. striata</i>	0.26	76	0.10		0.01-0.05	ISSR's	Rocha (2006)
<i>A. striata</i>	0.27	81	0.19	1.05	0.02-0.16	ISSR's	Trejo (2006)
<i>A. striata striata</i>	0.25	70	0.27	0.74	0.04-0.13	ISSR's	Trejo (2006)
<i>A. striata falcata</i>	0.28	81	0.10	1.89	0.02-0.07	ISSR's	Trejo (2006)
<i>A. xylonacantha</i>	0.19	68	0.06	6.61	0.01-0.02	ISSR's	Colin (2006)
<i>A. xylonacantha</i>	0.21	75	0.06	2.48-3.96	0.01-0.02	ISSR's	Rocha (2006)
<i>A. cupreata</i>	0.29	89	0.14	1.49	0.03-0.09	ISSR's	Aguirre (2004)
<i>A. cupreata</i>	0.34	93	0.07		0.03-0.1	ISSR's	Scheinvar (2008)

<i>A. potatorum</i>	0.27	83	0.08	2.99	0.02-0.05	ISSR's	Aguirre (2004)
<i>A. potatorum</i>	0.31	93	0.10		0.02-0.07	ISSR's	Scheinvar (2008)
<i>A. celsii albicans</i>	0.24	89	0.13	0.69-0.94	0.03-0.09	ISSR's	Rocha (2006)
<i>A. hidalguensis</i>	0.23	71	0.06		0.02	ISSR's	Rocha (2006)
<i>A. difformis</i>	0.20	62	0.11	1.81-2.29	0.01-0.06	ISSR's	Rocha (2006)
<i>A. subsimplex</i>	0.14	76	0.08	2.91	0.01-0.02	RAPD's	Navarro et al (2003)
<i>A. cerulata</i>	0.24	90	0.10		0.01-0.09	RAPD's	Navarro et al (2003)
<i>A. deserti</i>	0.19	78	0.14	2.91-6.14	0.006-0.02	RAPD's	Navarro et al (2003)
<i>A. lechuguilla</i>	0.39	96	0.08	2.23-12.2	0.03-0.12	Isoenzimas	Silva y Eguiarte (2003b)
<i>A. victoriae-reginae</i>	0.33	83	0.24	0.65	0.18	Isoenzimas	Martínez- Palacios et al (1999)
<i>Yucca filamentosa</i>	0.20	68	0.17			Isoenzimas	Massey y Hamrick (1998)
<i>Manfreda brachystachya</i>	0.48	100	0.03			Isoenzimas	Eguiarte et al (2000)

Furcraea parmentieri presenta, en promedio, uno de los valores más altos de heterocigosis esperada en comparación con otros reportados para especies de *Agave* con ISSR's como marcadores (Tabla 12), excepto los reportados por Scheinvar (2008) para *A. cupreata* ($H_E= 0.34$) la cual es alógama y autoincompatible, a diferencia de *F. parmentieri* que combina la reproducción sexual y vegetativa y se cree que no presenta autoincompatibilidad (Albarrán-Hernández, 2011.).

Si bien la diversidad genética para *F. parmentieri* en promedio es alta, existen diferencias entre los valores de heterocigosis esperada en cada población. Las poblaciones están sujetas a condiciones ambientales particulares y son distintas en su salud demográfica. Se esperaba que la diversidad genética dentro de las poblaciones fuera baja por la alta producción de bulbilos que presentan los individuos en floración, sin embargo este patrón no se presentó en ninguna población.

En El Xitle se encontraron valores de diversidad genética altos ($H_E= 0.37$ % $P= 91$), esta es una población grande, densa, bien establecida y en crecimiento ($\lambda=1.03$), donde, a pesar de la alta producción de bulbilos, se presume que el establecimiento de nuevos reclutas ocurre preferentemente por la vía sexual (Hernández-Pedrero, 2009). En esta población, aunque el mayor éxito de fructificación ocurre con la polinización cruzada, una vez que se formó el fruto, no existen diferencias en el porcentaje de semillas viables cuando hay geitonogamia; ni en su germinación dependiendo del tipo de polinización, ya sea polinización cruzada, geitonogamia o autopolinización (Albarrán-Hernández, 2011). El valor de heterocigosis encontrado en esta población, aunado a los resultados de los estudios demográficos y reproductivos, sugieren que se encuentra genéticamente sana pero deja preguntas abiertas sobre la alta producción de bulbilos, que se intentará explicar más adelante.

La población El Chico presentó valores de heterocigosis medios y una reducción en el porcentaje de loci polimórficos ($H_E= 0.21$, % $P= 60$). Los individuos colectados se encontraban dentro del Parque Nacional El Chico, en el cual se ha llevado a cabo en los últimos años un programa de manejo para recuperar la especie ya que estuvo cerca de extinguirse en esa zona (personal del parque, com. pers.). El programa consiste, de manera general, en extraer semillas de las plantas con frutos, sembrarlas en viveros y,

una vez emergidas las plántulas, resembrarlas en su hábitat natural (personal del parque, com. pers.). De esta información se infiere que los individuos colectados en esta población probablemente son de origen sexual pero que la población perdió variación genética por una reducción en el número de individuos (anterior al programa de manejo).

La población Cerro El Burro presentó una disminución significativa en la diversidad genética ($H_E = 0.12$, $\%P = 38$). Se cree que esta disminución se debe a la fragmentación ya que esta población se encontraba en manchones de pocos individuos a las orillas de potreros. Se ha documentado que la fragmentación del hábitat erosiona la variabilidad genética e incrementa la divergencia genética interpoblacional debido a un aumento en la deriva génica y endogamia y una reducción en el flujo genético (Zietsman et al., 2008). Como resultado, se reduce la variación genética de las poblaciones debido a cuellos de botella genéticos; específicamente, se espera que dentro de los fragmentos exista menor proporción de loci polimórficos y reducción en el número de alelos por locus (Aguilar et al., 2008).

Hernández-Pedrero (2009) señala que el mayor riesgo para la permanencia de *F. parmentieri* radica en la transformación y degradación acelerada de su hábitat por efectos antropogénicos. Esta especie no presenta problemas genéticos ni demográficos para su permanencia en El Xitle, sin embargo en El Chico y Cerro El Burro se observa una disminución significativa en la heterocigosis y proporción de loci polimórficos. La primera actualmente se encuentra bajo un programa de manejo y probablemente logre recuperarse porque su reintroducción se hace a base de individuos de origen sexual; sin embargo, la segunda tal vez no corra con la misma suerte.

7.2. Estructura genética y flujo génico

La estructura genética es el resultado de la acción conjunta de la mutación, migración, selección y deriva, que en cambio deben operar dentro del contexto histórico y biológico de cada especie (Loveless y Hamrick, 1984). La distribución de la diversidad genética dentro y entre poblaciones, es decir, la estructura genética es una función de la tasa de movimiento de genes entre poblaciones. La cantidad de movimiento de genes en una especie depende de la distribución del hábitat que ocupa, el tamaño y grado de aislamiento de sus poblaciones, y el movimiento de sus polinizadores y vectores de dispersión de semillas entre poblaciones (Massey y Hamrick, 1998)

Se encontró que *Furcraea parmentieri* presenta altos valores de diferenciación genética ($\theta = 0.37$). Esta diferenciación puede estar dada principalmente por dos factores: el patrón de distribución geográfica insular y el comportamiento de sus polinizadores. Las poblaciones están aisladas geográficamente, ya que se distribuyen únicamente en los picos más altos de las montañas, las cuales representan barreras geográficas claras. Además, presenta una tasa de visita de polinizadores relativamente baja (Albarrán-Hernández, 2011) y los pocos polinizadores que llegan a las plantas (esfíngidos, colibríes y abejas) no viajan distancias muy largas. La composición y estructura genética de especies polinizadas por insectos puede ser particularmente dependiente del comportamiento del polinizador (Massey y Hamrick, 1998) y en el caso de *F. parmentieri* parece que este comportamiento tiene como resultado que las poblaciones se encuentren altamente estructuradas.

Los valores de diferenciación obtenidos son bastante altos si se compara con especies del género *Agave* (Tabla 13). La especie que presenta los niveles más cercanos de estructuración es *A. striata spp striata* ($\theta = 0.27$) posiblemente porque presentan poblaciones separadas con una distribución geográfica amplia que van desde Hidalgo hasta Coahuila abarcando diversos tipos de vegetación que incluyen el desierto hasta el bosque de pino-encino (Trejo, 2006). Por el contrario las poblaciones de *F. parmentieri* ocupan localidades muy parecidas en vegetación, tipo de suelo, altitud y latitud, sugiriendo que la diferenciación genética está dada porque las poblaciones se separaron,

quedando aisladas y que han ido divergiendo por la acumulación de mutaciones y deriva génica.

Se ha propuesto que el sistema de cruce determina la distribución espacial de la variación genética dentro y entre poblaciones (Loveless y Hamrick, 1984). Las plantas de fecundación cruzada típicamente muestran mayor variación genética dentro de poblaciones, mientras que en las plantas de autofecundación la mayor parte de la variación genética se encuentra entre poblaciones (Loveless y Hamrick, 1984; Hamrick y Godt, 1989). *Furcraea parmentieri*, al ser de fecundación cruzada, presenta un aumento en la variación genética dentro de las poblaciones densas y bien establecidas (como El Xitle) pero el aislamiento geográfico impide el flujo génico, éste es prácticamente nulo entre las tres poblaciones ($Nm = 0.34$). Cuando Nm es menor a 1 se puede decir que la deriva génica actúa independientemente en cada una de las poblaciones (Slatkin, 1994). Estos dos factores permiten que la deriva génica propicie la diferenciación genética entre las poblaciones aumentando también la variación genética entre poblaciones. Este resultado refuerza la idea de que sus polinizadores o dispersores no pasan las barreras geográficas que se presentan entre las poblaciones y que las poblaciones se encuentran muy aisladas.

Mediante la asignación de genotipos individuales a poblaciones con algoritmo bayesiano del programa Structure se recuperaron exactamente las tres poblaciones. Este resultado fue consistente con el alto grado de diferenciación genética entre las poblaciones. Además, mediante este análisis se encontró que algunos individuos del Chico presenta cierta proporción de pertenencia a El Xitle. Debido a que el flujo génico entre estas poblaciones es menor a 1, es decir no hay ni un migrante por generación, se puede pensar que esta proporción de pertenencia del genotipo representa ancestría común.

7.3. Distancias genéticas

La prueba de Mantel indicó que las poblaciones siguen un patrón de aislamiento por distancia, es decir que existe una correlación positiva entre las distancias genéticas y las geográficas. Esto significa que mientras más cercanas se encuentren geográficamente las poblaciones, su distancia genética será menor. En el dendrograma UPGMA (Figura 5) se puede observar que las poblaciones más cercanas genéticamente son El Xitle y El Chico ($D= 0.11$) y que Cerro El Burro presenta distancias genéticas altas tanto con El Xitle ($D= 0.19$) como con El Chico ($D= 0.27$). Estas distancias genéticas se relacionan con su ubicación geográfica: El Xitle y El Chico se encuentran más cercanas geográficamente, y El Chico y Cerro El Burro más alejadas (Tabla 10).

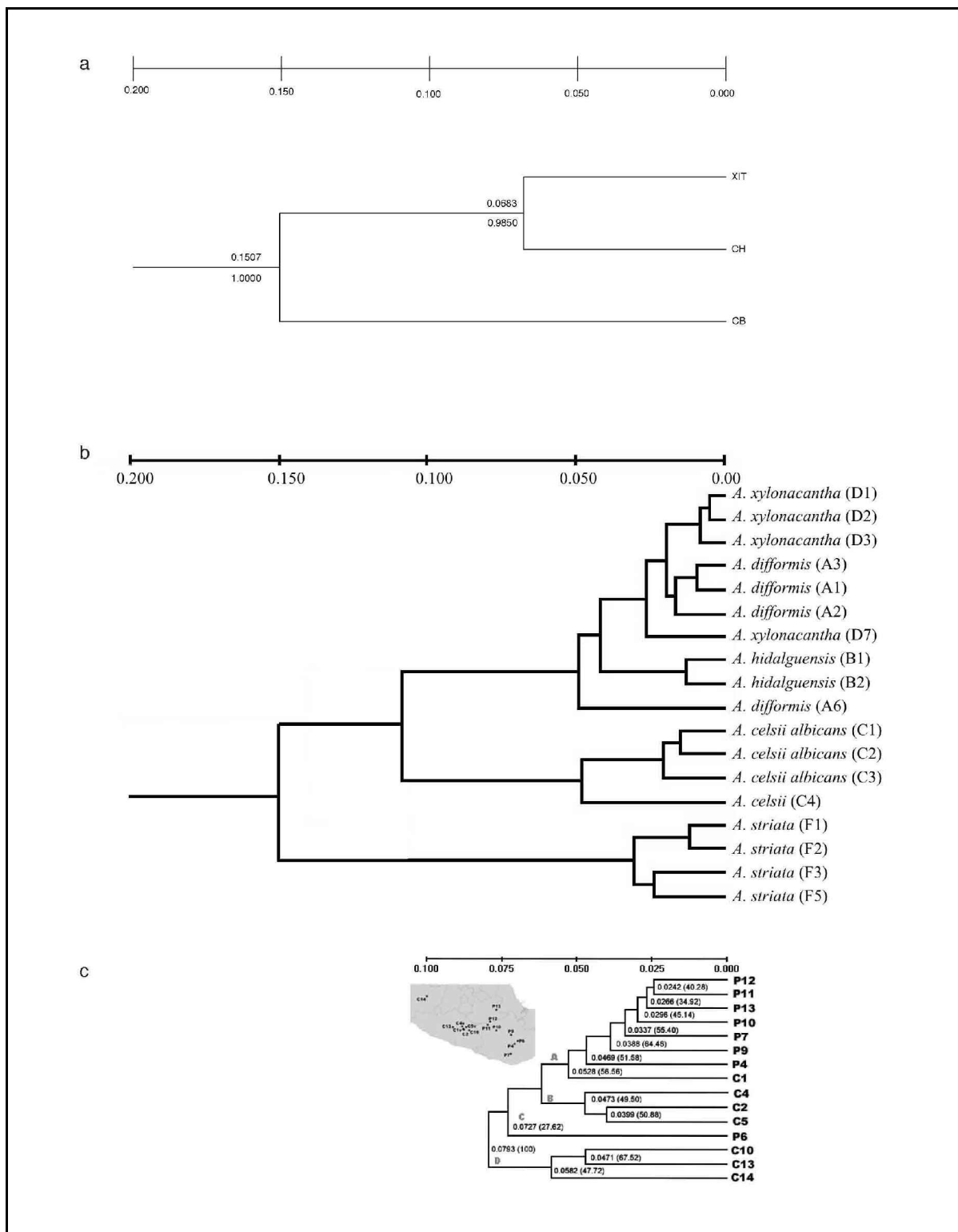


Figura 11. Comparación de las distancias genéticas de Nei. a) Dendrograma UPGMA entre tres poblaciones de *F. parmentieri*. b) Dendrograma UPGMA entre poblaciones de 6 especies de *Agave* (Rocha, 2006). c) Dendrograma UPGMA entre poblaciones de *A. cupreata* (C) y *A. potatorum* (P) (Scheinvar, 2008).

La distancia genética promedio entre las poblaciones ($D= 0.12$) es alta y puede indicar que cuando se separaron las poblaciones se quedaron aisladas. Este resultado, aunado a la alta estructuración y bajo flujo génico, sugiere que las poblaciones han divergido desde su separación por la fijación y pérdida de alelos por deriva génica. En *A. striata* y *A. lechuguilla* se encuentran valores similares de distancias. En estas especies se sugiere que, por ser de distribución amplia, los polinizadores cambian a lo largo de su distribución; sin embargo, estas especies presentan una distribución amplia latitudinalmente y *F. parmentieri* se distribuye longitudinalmente, casi a las mismas latitudes, en ambientes y tipos de vegetación muy similares. *A. victoria-reginae* presenta valores de distancia similares y una distribución restringida. Se cree que la deriva génica influye fuertemente en la alta estructuración de esta especie.

Las distancias genéticas encontradas entre poblaciones de *F. parmentieri* son similares a las reportadas por Rocha (2006) y Scheinvar (2008) entre especies cercanas del género *Agave*. En la figura 11 se pueden comparar tres dendrogramas UPGMA, el que se construyó en esta tesis, y los reportados en ambos estudios. Resulta interesante que las distancias genéticas entre las poblaciones de *F. parmentieri* sean aún más grandes que las distancias entre poblaciones de *A. cupreata* y *A. potatorum*; y que sean similares a las distancias entre *A. striata* y otras cinco especies de *Agave*: *A. celsii*, *A. celsii albicans*, *A. difformis*, *A. hidalguensis* y *A. xylonacantha*.

7.4. Modelo de distribución potencial

De acuerdo al modelo de distribución potencial, las poblaciones de *F. parmentieri* tenían una distribución continua a lo largo de la Faja Volcánica Transmexicana, así como algunos manchones en el Altiplano Sur (Zacatecano-Potosino) y la Sierra Madre Oriental en el Pleistoceno, durante el Último Máximo Glacial (hace ~22 000- 18 000 años antes del presente), ya que en ese momento existían las condiciones climáticas apropiadas para la especie. Con el cambio climático después de las glaciaciones, las poblaciones fueron moviéndose a los picos más altos de las montañas, quedando aisladas geográficamente.

Según este modelo, existían poblaciones grandes y continuas en donde actualmente se encuentran El Chico y Cerro El Burro pero estos grandes manchones se encontraban separados, el primero distribuido en el Altiplano Sur y la Sierra Madre Oriental, y el segundo en la Faja Volcánica Transmexicana. Sin embargo las poblaciones del DF, en donde está la población actual del Xitle, no existían.

Esto sugiere que en las poblaciones de Cerro El Burro y El Chico ha habido una pérdida de la diversidad genética por fragmentación y que la alta diversidad genética que se encontró en El Xitle está dada por su salud demográfica y por el entorno en el que se encuentra, en el que se dan las interacciones necesarias para mantener la diversidad genética. Por otro lado, los altos valores de estructuración son consistentes con este modelo, ya que las poblaciones de Cerro El Burro y El Chico han estado separadas en regiones biogeográficas distintas desde el Pleistoceno, y El Xitle es una población reciente.

Sumando los resultados del modelo a las grandes distancias genéticas encontradas entre Cerro El Burro y El Chico se puede decir que estas poblaciones llevan mucho tiempo separadas y que no existe intercambio genético entre ellas, propiciando la diferenciación genética por deriva génica.

7.5. Diversidad clonal

Eckert (1999) propone que la propagación clonal se asocia con bajas frecuencias de reclutamiento sexual. El valor que se obtuvo de proporción de descubrimiento de nuevos genotipos en *F. parmentieri* ($G/N=0.975$) indica que no es una especie clonal. Dicho valor concuerda con las estimaciones de reclutamiento sexual (99%) de Hernández-Pedrero (2009). Sin embargo, el valor de este índice está fuertemente influenciado por el tipo de colecta. En este estudio se procuró no muestrear individuos cercanos físicamente, sobreestimando el valor de G/N , por lo cual es necesario llevar a cabo un análisis de los genotipos en las poblaciones a una escala más fina para tener resultados concluyentes. No obstante, se pueden sugerir algunas ideas para evaluar en futuros estudios.

En *F. parmentieri*, así como en varias especies del género se observa una gran cantidad de bulbilos en las inflorescencias. Estas plantas son monocárpicas y presentan inflorescencias masivas, es decir, almacenan recursos toda su vida, para ocuparlos en la reproducción sexual y morir después. Es probable que cuando las poblaciones cuentan con las condiciones propicias para la reproducción sexual, como disponibilidad de polinizadores, lo hagan preferentemente de esta manera, pero que utilicen la producción de bulbilos (reproducción asexual) como un mecanismo de emergencia cuando la reproducción sexual falla (Arizaga y Ezcurra, 1995; García-Mendoza-2001).

En Cerro El Burro se encontraron algunos individuos idénticos genéticamente y como ya se mencionó, esta población se encuentra reducida y fragmentada. Al ser pocos individuos y encontrarse aislados en pequeños parches, cuentan con pocas oportunidades de apareamiento teniendo como único recurso para dejar descendencia a la reproducción vegetativa. En El Xitle, al ser una población demográficamente “más sana”, los individuos tienen suficientes oportunidades de cruce permitiendo que el reclutamiento sea primordialmente con individuos de origen sexual.

Al parecer *F. parmentieri* utiliza a la clonación para enfrentar una reducción en los tamaños poblacionales y una posible pérdida de polinizadores, pero mantiene una alta diversidad genética por características como un ciclo de vida largo, preferencia por

la fecundación cruzada y la alta viabilidad de sus semillas. Aunque produce pocos frutos, estos son suficientes, ya que bajas tasas de reclutamiento por semillas son suficientes para mantener niveles relativamente altos de variación genotípica dentro de las poblaciones (Clark-Tapia et al., 2005)

Sería interesante hacer estudios de biología reproductiva y genética de poblaciones en *F. longaeva* y comparar los resultados con los de esta tesis, ya que *F. longaeva* es alógama, es decir sólo se reproduce sexualmente (García-Mendoza, 2001). Esta comparación ayudaría a entender qué factores están disparando la producción de bulbilos en *F. parmentieri*

7.6. Algunas consideraciones para su conservación

La transformación de áreas naturales en paisajes antropogénicos tiene como consecuencia una fragmentación del hábitat que altera la estructura, distribución y funcionamiento de los ecosistemas naturales provocando una reducción en los tamaños poblacionales y un incremento del aislamiento de las poblaciones inmersas en la matriz antropogénica (Saunders et al., 1991; McGarigal y Cushman, 2002; Fahring, 2003).

Los rasgos particulares de historia de vida de las plantas pueden conferir diferente vulnerabilidad a los efectos de la fragmentación. En especies de fecundación cruzada, como es el caso de *F. parmentieri*, una reducción repentina en el tamaño efectivo poblacional causada por fragmentación del hábitat tendrá fuertes efectos negativos en la diversidad genética dentro de las poblaciones (Aguilar et al., 2008).

Furcraea parmentieri es considerada una especie rara porque, si bien puede alcanzar altas densidades poblacionales en los parches que ocupa, presenta áreas de distribución muy restringida y alta especificidad de hábitat (Hernández-Pedrero, 2009). Al perderse el hábitat por el cambio de uso de suelo las poblaciones se ven gravemente afectadas tanto demográfica como genéticamente: demográficamente porque si se urbaniza o se abren potreros en la localidad donde se encuentra, se pierden casi todos los individuos de la población; genéticamente porque, al estar altamente estructuradas, si se pierde una población, se pierde una parte de la diversidad genética de toda la especie.

Además, las poblaciones pequeñas y aisladas generalmente sufren de una disrupción de las interacciones biológicas (Luijten et al., 2000; Hooftman et al., 2003). Se espera que las plantas polinizadas y dispersadas por animales muestren una fuerte disminución en la conectividad genética por la fragmentación en comparación con las que se polinizan y dispersan por factores abióticos (Nathan y Muller-Landau, 2000; Honnay y Bossuyt, 2005; Aguilar et al., 2008). Esto hace particularmente vulnerable a *F. parmentieri*, ya que depende de sus polinizadores para mantener la diversidad genética, aunque puede amortiguar los efectos genéticos de la fragmentación a través de la reproducción vegetativa atrasando el tiempo entre generaciones.

8. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas en este trabajo son:

- La cantidad de variación genética encontrada en las poblaciones de *Furcraea parmentieri* resultó ser alta en promedio, pero existen diferencias significativas en la heterocigosis esperada entre las poblaciones. Cerro El Burro y El Chico presentaron una reducción significativa en la heterocigosis con respecto a El Xitle
- Las poblaciones de *Furcraea parmentieri* se encuentran altamente estructuradas debido a que presentan barreras geográficas claras y a los efectos de la deriva génica.
- El flujo génico entre las poblaciones es bajo debido a la alta estructuración genética y las poblaciones muestran un patrón de aislamiento por distancia.
- De acuerdo a los modelos de distribución potencial *Furcraea parmentieri* presentaba una distribución continua a lo largo de la Faja Volcánica Transmexicana en el Pleistoceno, durante el Último Máximo Glacial, y actualmente sólo se distribuye en los picos de las montañas más altas.
- Las poblaciones de *Furcraea parmentieri* presentan un alto índice de diversidad genotípica, es decir una baja clonalidad, a pesar de la gran producción de bulbilos.
- Las modificaciones al protocolo de extracción de ADN CTAB resultaron eficaces para obtener grandes cantidades de ADN limpio.
- La técnica de los ISSRs resultó sencilla y repetible, con la cual fue posible amplificar loci específicos y polimórficos.

9. Apéndices

APÉNDICE I. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN

Protocolo de extracción CTAB modificado para cactáceas (Tel-Zur et al., 1999)

1. Enjuagar el tejido con agua destilada
2. En un mortero moler aproximadamente 1 g de tejido con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Agregar 1 ml de buffer de extracción, moler y recuperar en un tubo de eppendorf de 1.5 ml
3. Centrifugar 10 minutos a 10,000 g a 4°C
4. Decantar el sobrenadante y disolver el pellet con 600 µl de buffer de extracción y volver a centrifugar como en el paso 3.
5. Repetir paso 4
6. Decantar el sobrenadante y resuspender el pellet en 200 µl de buffer de extracción. Agregar 100 µl de CTAB alto en sales y 10 µl de sarkosyl al 30%. Incubar de 60 a 90 minutos a 55°C
7. Extraer con un volumen igual (aprox. 300 µl) de cloroformo:alcohol isoamil (24:1). Centrifugar por 10 minutos a 10,000 g. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo
8. Agregar 2/3 del volumen final (aprox. 400 µl) de isopropanol (100%) frío mezclado con 60 µl de la solución de acetato de sodio (3M pH 5.2). Dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente
9. Centrifugar por 20 minutos a 10,000 g a 4°C
10. Decantar la solución y lavar el pellet con etanol al 75% frío. Dejar precipitar de 1 a 2 hrs a -20°C
11. Decantar el etanol, dejar secar las muestras y disolver el pellet en 200 µl de buffer TE
12. Agregar 10 µl de RNasa e incubar durante 40 minutos a 37°C
13. Extraer con un volumen igual de fenol:cloroformo (1:1)
14. Centrifugar por 10 minutos a velocidad máxima y a temperatura ambiente
15. Transferir la fase superior a un nuevo tubo nuevo y extraer con un volumen igual (aprox. 300 µl) de cloroformo frío
16. Centrifugar por 10 minutos a velocidad máxima y a temperatura ambiente.

17. Remover la fase acuosa superior y precipitar el DNA con 2 volúmenes (aprox. 400 µl) de etanol al 100% frío mezclado con 1/10 del volumen (aprox. 20 µl) de la solución de acetato de sodio. Dejar reposar 30 min a -20°C
18. Centrifugar por 15 minutos a velocidad máxima
19. Enjuagar el pellet con etanol al 75% frío y secar las muestras
20. Disolver el pellet con 50-100 µl de agua ultrapura

Buffer de extracción:	Buffer de extracción CTAB alto en sales:	Buffer TE:
Tris-HCl 100 mM pH 8	Tris-HCl 50 mM pH 8	Tris 10 mM pH 8
sorbitol 0.35 M	NaCl 4 M	EDTA 1 mM pH 8
EDTA 5 mM pH 8	CTAB 1.8%	
2-mercaptoetanol 1%	EDTA 25 mM pH 8	

APÉNDICE II. FRECUENCIAS ALÉLICAS

Frecuencias alélicas por loci en cada una de las poblaciones

ISSR	Locus (pb)	<i>q</i> Xitle (N=46)	<i>q</i> Chico (N=65)	<i>q</i> Cerro El Burro (N=48)	<i>q</i> totales
848	1300	0.1680	0.0000	0.0000	0.0920
	1200	0.7389	0.8299	0.4319	0.7077
	1150	1.0000	0.9684	1.0000	0.9869
	1100	0.1680	0.0000	0.0000	0.0920
	1050	0.8479	0.8576	0.9051	0.87
	950	0.8606	0.8576	1.0000	0.9011
	910	0.5353	0.5751	0.0000	0.4712
	870	0.4225	0.7716	0.1737	0.5553
	800	0.7554	0.6616	0.9175	0.7707
	750	0.7676	0.9673	0.9771	0.9142
	700	0.7090	0.2255	0.0000	0.4125
	640	0.7241	0.1882	1.0000	0.6749
	600	0.7012	0.8299	1.0000	0.8482
	560	0.8606	1.0000	1.0000	0.9603
	540	0.6282	1.0000	0.0000	0.7302
811	1120	0.3035	0.0000	1.0000	0.5783
	1050	0.9781	0.9522	0.0000	0.9746
	970	0.4473	0.5330	1.0000	0.4137
	950	0.6282	0.8577	0.7837	0.7815
	880	0.8730	0.9843	0.8339	0.9078
	870	0.4473	0.2575	0.0000	0.2885
	850	0.1698	0.9843	0.5241	0.6963
	800	0.3372	0.0000	0.1662	0.1995
	740	0.6452	0.6144	0.2575	0.5389
	680	0.5147	0.2575	0.2575	0.3477

	650	0.5353	0.7915	0.9371	0.7774
	630	0.0000	0.0000	0.1628	0.0906
	590	0.1698	0.0000	0.0000	0.0908
	570	0.7617	1.0000	1.0000	0.9380
	550	0.1680	0.0000	0.0000	0.0906
<hr/>					
827	1200	0.4760	0.7454	0.0000	0.5512
	1100	0.7168	0.2237	0.6923	0.5512
	1050	0.5412	0.7656	0.9134	0.7527
	990	0.6853	0.4333	0.0000	0.4673
	900	0.7168	0.7454	0.0000	0.6238
	820	0.5204	0.1867	0.4420	0.3823
	800	0.2686	0.0000	0.0000	0.1465
	780	0.4987	0.9846	0.0000	0.6983
	750	0.7321	0.9285	0.1757	0.7305
	700	0.7901	1.0000	1.0000	0.9425
	590	0.5412	0.1867	0.0000	0.3165
	570	0.2686	0.1882	0.0000	0.1865
	550	0.8700	0.8863	0.1757	0.7527
	530	0.0000	0.4153	0.0000	0.2719
	490	0.4004	0.7756	0.0000	0.5512
<hr/>					

APÉNDICE III. ESTRUCTURA GENÉTICA

Valores de θ y resultados de la prueba de diferenciación de Raymond y Rousset (en negritas los valores de $p < 0.05$)

Locus	θ	R y R
1	0.1692	0.5879
2	0.1774	0.0000
3	0.0186	0.0682
4	0.1692	0.5825
5	0.0025	0.5120
6	-	1.0000
7	0.0575	0.0002
8	0.3500	0.0000
9	0.3308	0.0000
10	0.0828	0.0003
11	0.1454	0.0000
12	0.4643	0.0000
13	0.5943	0.0000
14	0.1331	0.0000
15	-	1.0000
16	0.1391	0.0000
17	0.7853	0.0000
18	0.8136	0.0000
19	0.0150	0.0556
20	0.3162	0.0002
21	0.0785	0.0006

22	0.0670	0.0000
23	0.2288	0.0012
24	0.5827	0.0000
25	0.2094	0.0037
26	-	1.0000
27	0.1598	0.0000
28	0.0814	0.0028
29	0.1851	0.0000
30	0.1615	0.5989
31	0.1738	0.2821
32	0.2464	0.0000
33	0.1708	0.2926
34	0.4745	0.0000
35	0.3033	0.0000
36	0.1443	0.0000
37	0.3774	0.0000
38	-	1.0000
39	0.5342	0.0000
40	0.1329	0.0007
41	0.2764	0.0436
42	0.7556	0.0000
43	0.5358	0.0000
44	0.2147	0.0000

45	-	1.0000
46	0.3204	0.0000
47	0.1108	0.2771
48	0.5611	0.0000
49	0.3774	0.0005
50	0.5129	0.0000

10. Literatura citada

- Aguilar, R., M. Quesada, L. Ashworth, Y. Herrerias-Diego y J. Lobo. 2008. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Molecular Ecology* 17: 5177-5188.
- Aguirre, X. 2004. Genética de poblaciones de *Agave cupreata* y *Agave potatorum*: aportaciones para el manejo y conservación de dos especies mezcaleras. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F.
- Allen-Wardell, G., P. Bernhardt, R. Bitner, A. Burquez, S. Buchmann, J. Cane, P. Allen-Cox, V. Dalton, P. Feinsinger, M. Ingram, D. Inouye, C.E. Jones, K. Kennedy, P. Kevan, H. Koopowitz, R. Medellín, S. Medellín-Morales y G.P. Nabhan. 1998. The potential consequences of pollinator declines on the conservation of biodiversity and stability of food crop yields. *Conservation Biology* 12: 8-17.
- Anderson, R.P y E. Martínez-Meyer. 2004. Modeling species' geographic distributions for preliminary conservation assessments: an implementation with the spiny pocket mice (*Heteromys*) of Ecuador. *Biological Conservation* 116 (2): 167-179.
- Arizaga, S. y E. Ezcurra. 1995. Insurance against reproductive failure in a semelparous plant: bulbil formation in *Agave macroacantha* flowering stalks. *Oecologia* 101: 329-334.
- Arizaga, S. y E. Ezcurra. 2002. Propagation mechanisms in *Agave macroacantha* (Agavaceae), a tropical arid-land succulent rosette. *American Journal of Botany* 89: 632-641.
- Bornet, B. y M. Branchard. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 209-215.
- Clark-Tapia, R., C. Alfonso-Corrado, L.E. Eguiarte y F. Molina-Freaner. 2005. Clonal diversity and distribution in *Stenocercus eruca* (Cactaceae), a narrow endemic cactus of the Sonoran Desert. *American Journal of Botany* 92 (2): 272-278.
- Cockerham, C. C. 1969. Variance of gene frequencies. *Evolution* 23: 72-83.
- Colin, R. 2006. Análisis de la diversidad genética y estructura poblacional de *Agave xylonacantha* (Agavaceae) utilizando Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) como marcador molecular. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), (1997). "Provincias biogeográficas de México". Escala 1:4000000. México.
- Conner, K.J. y D.L. Hartl. 2004. A primer of ecological genetics. Sinauer Assoc. Inc., Sunderland, Mass., 304 pp.
- Crow, J. F. y K. Aoki. 1984. Group selection for a polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81: 6073-6077.

- Eckert, C.G. 1999. Clonal plant research: proliferation, integration, but not too much evolution. *American Journal of Botany* 86: 1649-1654.
- Eguiarte, L. E. 1999. Una guía para principiantes a la genética de poblaciones. En: Núñez Farfán, J. y L. E. Eguiarte (eds.). *La evolución biológica*. México, D. F. UNAM. pp: 35-50.
- Eguiarte, L. E., V. Souza y A. Silva-Montellano. 2000. Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 66: 131-150.
- Eguiarte, L.E. y D. Piñero. 1999. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. En: Nuñez-Farfán, J. y L.E. Eguiarte (eds.). *La evolución biológica*. Ciencias, UNAM, México, 457 pp.
- Ellstrand, N.C. y M. L. Roose. 1987. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *American Journal of Botany* 74: 123-131.
- Evano, G., S. Regnaut y J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Fahrig, L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 34: 487-515.
- Falush, D., M. Stephens y J.K. Pritchard. 2003. Inference of population structure using multi-locus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1582.
- Falush, D., M. Stephens y J.K. Pritchard. 2007. Inference of population structure using multi-locus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*.
- Flores- Abreu, I.N. 2007. Coevolución entre género *Agave sensu lato* y sus murciélagos polinizadores (Phyllostomidae). Tesis de maestría, Instituto de Ecología, UNAM, México, D.F.
- García- Mendoza, A. 2001. Revisión del género *Furcraea* (Agavaceae). Tesis doctoral, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F.
- González, A. 2005. Biología reproductiva y genética de poblaciones de *Agave garcimendozae*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F.
- González, A. y X. Aguirre. 2007. Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs). En: Eguiarte, L.E., V. Souza y X. Aguirre (eds.). *Ecología molecular*. SEMARNAT, INE, UNAM, CONABIO, México, pp. 567-571.
- Guisan, A. y W. Thuiller. 2005. Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. *Ecology Letters* 8: 993-1009.
- Hamrick, J.L. y M.J. Godt. 1989. Allozyme diversity in plant species. En: Brown, A.H.D., M.T. Clegg, A.L. Kahler y B.S. Weir (eds.). *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sinauer Assoc. Inc., Sunderland, Mass., 449 pp.
- Harris, H. 1966. Enzyme polymorphisms in man. *Proceedings of The Royal Society of London B*. 164: 298-310

- Hartl, D. L. y A. G. Clark, 1989. Principles of Population Genetics. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts, USA,
- Hedrick, W., 2005. Genetics of Populations. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Mass., 737 pp.
- Hernández- Pedrero, R. 2009. Estudio poblacional de *Furcraea parmentieri* (Agavaceae) en bosques templados del suroeste del Distrito Federal, México. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F.
- Holsinger, K.E. y B. Weir. 2009. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST. Nature Reviews 10: 639-650.
- Honnay, O. y B. Bossuyt. 2005. Prolonged clonal growth: escape route or route to extinction?. Oikos 108: 427-432.
- Hooftman, D.A.P., M. Van Kleunen y M. Diemer. 2003. Effects of habitat fragmentation on the fitness of two common wetland species, *Carex davalliana* and *Succisa pratensis*. Oecologia 134: 350- 359.
- Hutchinson, G. E. 1957. Concluding Remarks. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 22: 415-42.
- Karl, S.A. 1996. Application of anonymous nuclear loci to conservation biology. En: Smith, T.B. y R.K. Wayne (eds.). Molecular genetic approaches in conservation. Oxford University Press, New York, pp 38- 53.
- Lewontin, R. C. y J. L. Hubby. 1966. A molecular approach to the study of the genetic heterozygosity in natural populations II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. Genetics 54: 595-609.
- Loveless, M.D. y J.L. Hamrick. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. Annual Review of Ecology and Systematics 15: 237-240
- Luijten, S.H., A. Dierick, J. Gerard, B. Oostermeijer, L.E.L. Raijmann y H.C.M. Den Nijs. 2000. Population size, genetic variation, and reproductive success in a rapidly declining, self-incompatible perennial (*Arnica montana*) in the Netherlands. Conservation Biology 14: 1776-1787.
- Lynch, M. y B. G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. Molecular Ecology 3: 91-99
- Mandujano, M.C. 2007. La clonalidad y sus efectos en la biología de poblaciones. En: Eguiarte, L.E., V. Souza y X. Aguirre (eds.). Ecología molecular. SEMARNAT, INE, UNAM, CONABIO, México, pp. 215-250
- Martínez- Palacios, A., L.E. Eguiarte y G. Furnier. 1999. Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. American Journal of Botany 86 (6): 1093- 1098.

- Martínez-Meyer, E. y A.T. Peterson. 2006. Conservatism of ecological niche characteristics in North American plant species over the Pleistocene-to-Recent transition. *Journal of Biogeography* 33: 1779-1789.
- Massey, L.K. y J.L. Hamrick. 1998. Genetic diversity and population structure of *Yucca filamentosa* (Agavaceae). *American Journal of Botany* 85 (3): 340-345.
- McGarigal, K. y S.A. Cushman. 2002. Comparative evaluation of experimental approaches to the study of habitat fragmentation effects. *Ecological Applications* 12: 335-345
- Miller, M. P. 1997. Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.
- Nathan, R. y H.C. Muller-Landau. 2000. Spatial patterns of seed dispersal, their determinants and consequences for recruitment. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 278-285.
- Navarro, A., R. González, F. Molina- Frenaner y L.E. Eguiarte. 2003. Genetic differentiation in the *Agave deserti* (Agavaceae) complex of the Sonoran desert. *Heredity* 90: 220- 227.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, 512 pp.
- Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106(84,284): 238-292.
- Nei, M., 1978. The theory of genetic distance and evolution of human races. *Japanese Journal of Human Genetics* 23: 341-369.
- Phillips, S.J., R.P. Anderson y R.E. Schapire. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190: 231–259.
- Portal de datos de GBIF- Global Biodiversity Information Facility
<<http://www.gbif.org>>
- Pritchard, J.K., M. Stephens y P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945- 959.
- Raymond, M. y F. Rousset. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49 (6): 1280- 1283.
- Rentería, M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. En: Eguiarte, L.E., V. Souza y X. Aguirre (eds.). *Ecología molecular*. SEMARNAT, INE, UNAM, CONABIO, México, pp. 541-562.
- Reynolds, J., B.S. Weir y C.C. Cockerham. 1983. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105: 767- 779.
- Rives, R.C. 2009. Diversidad clonal y estructura genética espacial en escala fina de *Agave striata* Zucc. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F.
- Rocha, M. 2006. *Ecología evolutiva comparada de 5 especies de Agave*. Tesis doctoral, Instituto de Ecología, UNAM, México, D.F.

- Rocha, M., S.V. Good- Ávila, F. Molina- Frenner, H.T. Arita, A. Castillo, A. García-Mendoza, A. Silva- Montellano, B.S. Gaut, V. Souza y L.E. Eguiarte. 2006. Pollination biology and adaptative radiation of Agavaceae, with special emphasis on the genus *Agave*. *Aliso* 22: 329- 344.
- Saunders, D.A., R.J. Hobbs y C.R. Margules. 1991. Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conservation Biology* 5: 18-32.
- Scheinvar, E. 2008. Genética de poblaciones silvestres y cultivadas de dos especies mezcaleras: *Agave cupreata* y *Agave potatorum*. Tesis de maestría, Instituto de Ecología, UNAM, México, D.F.
- Schlüter, P.M. y S.A. Harris. 2006. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Mol. Ecol. Notes* 6: 569-572.
- Silva, A. y L.E. Eguiarte. 2003b. Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert II: genetic variation, differentiation and inbreeding estimates. *American Journal of Botany* 90(5): 700-706.
- Slatkin, M. 1994. Gene flow and population structure. En L. Real (ed.). *Ecological genetics*. Princeton University Press, Princeton, NJ, pp. 3-17.
- Tel- Zur, N., S. Abbo, D. Myslabodski y Y. Mizrahi. 1999. Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). *Plant Mol. Biol. Rep.* 17: 249- 254.
- Tewksbury, J.J., D.J. Levey y N.M. Haddad. 2002. Corridors affect plants, animals, and their interactions in fragmented landscapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99: 12923- 12926.
- Tree Figure Drawing Tool. Version 1.3.1. A. Rambaut. 2006-2009. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk>
- Trejo, L. 2006. Genética de poblaciones de *Agave striata* Zucc. Tesis de maestría, Instituto de Ecología, UNAM, México, D.F.
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden <<http://www.tropicos.org> >
- Weir, S. 1996. *Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data*. Sinauer Assoc. Inc., Sunderland, Mass., 423 pp.
- Weir, S. y C. Cockerham. 1984. Estimating F- Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38 (6): 1358-1370.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenetics* 15: 323-354.
- Young, A.G., T. Boyle y T. Brown. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 413-418.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski y D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored polimerase chain reactions amplification. *Genomics* 20: 176-183.

Zietstman, J., L.L. Dreyer y K.J. Esler. 2008. Reproductive biology and ecology of selected rare and endangered *Oxalis* L. (Oxalidaceae) plant species. *Biological Conservation* 141: 1475-1483.