



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Variación genética y diferenciación en poblaciones de  
*Agave kerchovei* Lem. usando marcadores de cloroplasto.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**JOSÉ GILBERTO PARRA LEYVA**



**DIRECTORA DE TESIS:  
DRA. ERIKA AGUIRRE PLANTER**

**2015**

**Ciudad Univeritaria, D. F.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Hoja de datos del jurado

### 1. Datos del alumno

Parra

Leyva

José Gilberto

30 96 00 46

Universidad Nacional Autónoma de  
México

Facultad de Ciencias

Biología

305325680

### 2. Datos del Tutor

Dra.

Erika

Aguirre

Planter

### 3. Datos del sinodal 1

Dr.

Daniel Ignacio

Piñero

Dalmau

### 4. Datos del sinodal 2

Dr.

Luis Enrique

Eguiarte

Fruns

### 5. Datos del sinodal 3

Dr.

Rafael

Lira

Saade

### 6. Datos del sinodal 4

Dra.

Martha Graciela

Rocha

Munive

### 7. Datos del trabajo escrito

Variación genética y diferenciación en poblaciones de *Agave kerchovei* Lem. usando marcadores de cloroplasto.

78 p

2015

## Agradecimientos

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Departamento de Ecología Evolutiva del Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Erika Aguirre Planter y el Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns.

Se realizó con apoyo de los siguientes programas: Proyecto PAPIIT (Programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica), UNAM. Clave: IN202712 volu n mol ul r y ons rv n n l os r or s nt s y t : lo n filogeograf y n t pol on s otor o L

Proyecto CONACYT Investigación Científica Básica 2011.167826 (clave nt n o l 678 6 n m pol on s: stu os n l m z silvestre, el teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis* y *Zea mays* ssp. *mexicana*), otorgado a LEEF.

Este trabajo fue apoyado parcialmente por MGU, donante anónima radicada en España, a través del proyecto "MGU Useful Plants Project Mexico", administrado por los Jardines Botánicos Reales de Kew y a cargo del Dr. Rafael Lira Saade de la UBIPRO, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

Agradezco de manera especial al M. en C. Enrique Scheinvar y al Dr. Santiago Ramírez Barahona por su ayuda y apoyo en parte de los análisis y la colecta, a la Biól. Natalia Martínez Ainsowrth, a la M. en C. Paulina Brena y al Dr. Rafael Lira por las colectas realizadas de las distintas poblaciones de *Agave kerchovei*.

A los sinodales: Dra. Erika Aguirre, Dra. Martha Rocha, Dr. Rafael Lira, Dr. Daniel Piñero y Dr. Luis Eguiarte por sus revisiones y comentarios para mejorar este trabajo.

A todos los miembros del Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental por su apoyo durante la estancia y realización de la tesis en el laboratorio, entre ellos principalmente a Laura Espinosa, Doña Silvia, Natalia, Gabriela, Santiago, Ricardo, Jaime y Enrique.

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

*Le doy gracias a Dios, a mi familia y a mis amigos por este logro.*

## ÍNDICE

1	Lista de Figuras.....	1
2	Lista de Tablas.....	2
3	Resumen.....	4
4	Introducción.....	6
4.1	Genética de poblaciones.....	6
4.1.1	Variación genética.....	7
4.1.2	Estructura genética.....	8
4.2	Filogeografía.....	10
4.3	Marcadores moleculares.....	12
4.3.1	ADN de Cloroplasto.....	13
4.4	Modelos de distribución potencial de especies.....	13
4.5	Conservación.....	14
4.6	Familia Agavaceae: el género <i>Agave</i> .....	17
4.6.1	<i>Agave kerchovei</i> Lem.....	19
5	Justificación.....	22
6	Objetivos.....	23
7	Metodología.....	24
7.1	Sitio de Estudio.....	24
7.2	Elección de material para extracción de ADN.....	24
7.3	Extracción, amplificación y secuenciación.....	26
7.4	Análisis de las secuencias de ADN de cloroplasto.....	28
7.4.1	Polimorfismos, variación y estructura genética.....	28
7.5	Red de haplotipos.....	31
7.6	Modelo de distribución potencial.....	31
8	Resultados.....	34
8.1	Diversidad Genética.....	34
8.2	Red de Haplotipos.....	40
8.3	Estructura genética.....	42
8.4	Aislamiento por distancia.....	44
8.5	Modelo de distribución potencial.....	45
9	Discusión.....	49
9.1	Diversidad y estructura genética.....	49

9.2	Modelo de distribución potencial .....	52
9.3	Historia evolutiva .....	56
9.4	Conservación.....	59
10	Conclusiones .....	62
11	Literatura citada .....	64
12	ANEXOS .....	72



# 1 Lista de Figuras

**Figura 1.** Ejemplar de *Agave kerchovei* Lem. en el valle de Tehuacán-Cuicatlán

**Figura 2.** Distribución espacial de las poblaciones de *Agave kerchovei* en la región de Tehuacán-Cuicatlán, dentro de los estados de Puebla y Oaxaca, México. Cada población se codifica por la letra P y el número de la población que corresponde. P1=corresponde a la población 1, P2 a la población 2, así sucesivamente (Modificado de Google Maps, 2013).

**Figura 3.** Distribución espacial de los haplotipos de Taberletf - ShawNab - ShawVcd en las poblaciones de *Agave kerchovei*. Los polígonos están coloreados con un "P" y el número que les corresponde. P1 = P1, P2 = P2. Los polígonos están coloreados por "H p" y un número H p. H p. Los cuales se asocia un color distinto. Junto a cada gráfico se colocó el número de individuos empleados por población. Cada gráfico representa el porcentaje de aparición de los distintos haplotipos para las distintas poblaciones (modificado de Google Maps, 2013).

**Figura 4.** Red de haplotipos obtenida con el programa TCS 1.21, de fragmentos del cloroplasto utilizando los marcadores Taberlet c-f, ShawNa-b y ShawVc-d (concatenados) para *Agave kerchovei*. Cada haplotipo fue designado con un color diferente. Los nodos representan los haplotipos hipotéticos que no se han encontrado en los muestreos. La red incluye tres haplotipos de *A. stricta* (elipses color café) y un haplotipo de *A. lechuguilla* (elipse color negro). Se incluye además la distribución espacial de los haplotipos en las distintas poblaciones. (Mapa modificado de Google Maps, 2013).

**Figura 5.** Superposición del árbol de distancia de Nei (1987) sobre el mapa de distribución de las poblaciones de *Agave kerchovei*. Las líneas punteadas en color azul son referencia para ubicar cada población con su nodo en el árbol. Los grupos de poblaciones designados son: Grupo A con el subgrupo A1 (poblaciones 1, 7 y 8) y A2 (poblaciones 3, 4 y 5). Grupo B (Poblaciones 2 y 6).

**Figura 6.** Prueba de Mantel. Se muestra la correlación entre la matriz de distancias geográficas (km) y el grado de diferenciación genética ( $F_{st}$ ). Valores obtenidos de la correlación de matrices:  $r = 0.374$  y  $P = 0.0798$ . La prueba resulta en un valor no significativo.

**Figura 7.** Distribución potencial de nicho elaborados con MaxEnt para *Agave kerchovei* en el tiempo presente (A), así como una proyección al Pleistoceno durante el último máximo glacial, hace 21 mil años aproximadamente (B). La escala de pixeles corresponde a una mayor probabilidad para los colores cálidos y menor para los colores fríos. Los números en color negro corresponden a las ocho poblaciones estudiadas en este trabajo.

**Figura 8.** Mapa de superposición de la distribución potencial presente para *Agave kerchovei*, y su proyección al último máximo glacial (21, 000 años). Los números negros corresponden a las ocho poblaciones estudiadas en este trabajo.

**Figura 9.** Mapa de superposición de la distribución potencial presente (color naranja) para *Agave kerchovei*, y su proyección al último máximo glacial (color azul) sobre la vegetación potencial para México de Rzedowski (1990). Las letras en el mapa indican a qué tipo de vegetación corresponden las distintas zonas de la distribución potencial para la especie. Los números en color rojo corresponden a las ocho poblaciones estudiadas en este trabajo.

**Figura 10.** Mapa orográfico de la región del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Modificado de Google Maps 2013). Las flechas negras representan una posible ruta de dispersión de las poblaciones. Las gráficas de pastel representan la proporción de los haplotipos en cada población. Los números dentro de las gráficas de pastel corresponden al número de población. Los haplotipos están representados por colores tanto en mapa como en la red de haplotipos. El patrón general de dispersión de las poblaciones es de norte a sur. Las zonas propuestas de la distribución son: *zona noreste* que incluye las poblaciones 1, 7 y 8 correspondientes al subgrupo *A1* designado del árbol de distancias genéticas de Nei; *zona centro*, que incluye las poblaciones del subgrupo *A2* (3, 4 y 5) y la población 2 (grupo *B*) y la *zona sureste* que comprende la población 6 (grupo *B*). El área de la cual posiblemente partirían las rutas sería cercana a la zona norte hacia el sur de la población 1 (denotado por un asterisco), dicha área pudo haber sido más extensa, no necesariamente puntal, su representación es solo gráfica para denotar la posible zona ancestral. Se incluye la red de haplotipos.

## 2 Lista de Tablas

**Tabla 1.** Poblaciones de *Agave kerchovei* Lem. Ubicación e individuos observados en cada población (N).

**Tabla 2.** Marcadores amplificados del cloroplasto para *Agave kerchovei*.

**Tabla 3.** Condiciones de las reacciones del PCR para cada marcador amplificado, La reacción fue de 30  $\mu$ L total. (Izquierda). Programa utilizado en la amplificación en el termociclador (Derecha).

**Tabla 4.** Tamaño final (pares de bases, pb) de los marcadores de cloroplasto en *Agave kerchovei*.

**Tabla 5.** Variación encontrada en los marcadores de cloroplasto Taberlet c-f, ShawNa-b, ShawVc-d., en *Agave kerchovei*. Sitio indica el lugar en la secuencia donde se encuentra la variación, dentro de cada uno de los marcadores por separado.

**Tabla 6.** Cantidad de individuos utilizados en el análisis para cada población (n).

**Tabla 7. A)** Haplotipos obtenidos de los sitios polimórficos en las secuencias de tres regiones de espaciadores de cloroplasto: Taberlet c-f (trnL-trnF), ShawNa-b (petA-psbJ) y ShawVc-d (rpl32-trnL). Los números representan la posición en la secuencia donde está la variación, sobre los sitios se encuentra delimitado a que secuencia corresponde la variación. **B)** Se muestran además el tipo de variación que presenta cada sitio en el concatenado. (Bases Nitrogenadas.- A: Adenina; T: Timina; G: Guanina; C: Citosina; GAP: —).

**Tabla 8.** Estimadores de diversidad genética para cada una de las poblaciones de *Agave kerchovei*.

**Tabla 9.** Frecuencia total (%) de los haplotipos encontrados para *Agave kerchovei*.

**Tabla 10.** Resultados de AMOVA, considerando dos grupos de poblaciones de *A. kerchovei*. Los grupos elegidos para la prueba son: A (subgrupo A1: poblaciones 1, 7 y 8; subgrupo A2: poblaciones 3,4 y 5) y B (poblaciones 2 y 6).

**Tabla 11.** Resultado del análisis de SAMOVA para las tres regiones amplificadas en *Agave kerchovei*, considerando los 6 sitios variables en los AP's y 8 sitios en los AP's

**Tabla 12.** Porcentajes de contribución de las capas bioclimáticas y topográficas empleadas para el modelo de los modelos de distribución potencial presente y su proyección al pasado (último máximo glacial) elaborados con MaxEnt para *Agave kerchovei*

**Tabla 13.** Sumario de los valores promedio de estructura genética ( $F_{st}$  o  $G_{st}$ ) para distintas especies del género *Agave*, utilizando distintos marcadores reportados en las compilaciones elaboradas por Piñero *et al.* (2008a) y Eguiarte *et al.* (2013). Se muestra además un promedio de cada marcador para varios estudios con otras plantas incluido en la recopilación elaborada por Piñero *et al.* (2008a)

**Tabla 14.** Comparación de valores de diversidad genética a nivel de cloroplasto entre *Agave kerchovei* y otras especies de plantas.

**Tabla 15.** Distribución altitudinal de las poblaciones de *Agave kerchovei* y la correspondencia de tipos de vegetación, designados a partir de la vegetación para el valle de Tehuacán-Cuicatlán: matorral de *Echinocactus platyacanthus* (1600-1800 m); matorral crassi-rosulifolio (1700-1900 m); chaparral (1900-2400m (Valiente-Banuet *et al.*, 2000 y 2009). \*tipo de vegetación descrito en Brena-Bustamente (2012).

### 3 Resumen

El género *Agave* es uno de los más diversos de la flora Mexicana, en el existen especies clave o dominantes por su importancia ecológica, además de que varias especies tienen numerosos usos tradicionales y modernos. Aunque existen varios estudios sobre la genética de poblaciones del género usando marcadores nucleares, no hay muchos estudios sobre la variación genética en el cloroplasto. Este es un genoma que se hereda por vía materna y ha demostrado ser muy útil en estudios filogeográficos, donde se analiza la historia evolutiva reciente. Este es el primer estudio de este tipo para esta especie. En este trabajo se estudiaron ocho poblaciones de *Agave kerchovei* Lem., dentro de la distribución conocida para la especie situada en los Estados de Puebla y Oaxaca, principalmente del Valle de Tehuacán-Cuicatlán y zonas aledañas intentando abarcar todo el rango conocido. Se analizaron tres marcadores de cloroplasto (Taberlet c-f (*trnL-trnF*); Shaw Na-b (*petA-psbJ*) y Shaw Vc-d (*rpl32-trnL*), con un total de 2188 pb. entre los tres marcadores. Se encontraron diez haplotipos con un total de 16 sitios de ADN polimórficos, que dan una diversidad haplotípica de  $Hd = 0.71801$ , y una diversidad nucleotídica  $\pi = 0.00078$ . La diferenciación genética entre las poblaciones es muy alta,  $F_{st} = 0.929$ , especialmente considerando que es una especie con una distribución restringida. Se obtuvo un modelo de distribución potencial y una proyección para el último máximo glacial (21,000 años) para la especie, en el que se observa que la mitad de la variación genética encontrada está representada en la zona noreste de la distribución potencial predicha, la cual podría corresponder a un refugio pleistocénico. Los resultados son de importancia para el uso y conservación de esta especie, ya que pueden ayudar a definir programas óptimos de manejo y reforestación. Además, son relevantes para empezar a entender la evolución del género, en particular los patrones contrastantes de flujo entre genes nucleares, que generalmente muestran muy poca diferenciación, y los del cloroplasto que tienen muy alta diferenciación entre poblaciones, sugiriendo patrones muy diferentes de dispersión y un esquema interesante para su adaptación local.

## ABSTRACT

The genus *Agave* is one of the most diverse of the Mexican flora, it includes key or dominant species for their ecological importance, besides several species have numerous traditional and modern uses. Although several studies on population genetics of the genus using nuclear markers have been conducted, there are few studies on genetic variation in the chloroplast. This is a maternally inherited genome and it has proved to be very useful in phylogeographic studies, where recent evolutionary history is analyzed. This is the first study of its kind for this specie. In this work, eight populations of *Agave kerchovei* Lem. were studied in order to cover the entire known range. These populations are located in the states of Puebla and Oaxaca, mainly in the Tehuacán-Cuicatlán Valley and surrounding areas. Three chloroplast markers were analyzed: Taberlet c-f (trnL-trnF), Shaw Na-b (petA-PSBJ) and Shaw Vc-d (rpl32-trnL). A total of 2188 bp were obtained between the three markers; ten haplotypes were found with 16 polymorphic DNA sites, which give a haplotype diversity of  $Hd = 0.71801$ , and a nucleotide diversity  $\pi = 0.00078$ . The genetic differentiation among populations was very high,  $F_{st} = 0.929$ , especially considering it is a species with a restricted distribution. A potential distribution model and its projection for the last glacial maximum (21.000 years) were obtained for the species, in which it is observed that most of the genetic variation found is located in the northeast area of the predicted potential distribution which could be a Plesistocenic refuge. These results are of importance when considering the use and conservation of this species, as they can help to define optimal management programs and reforestation. This study is also relevant to begin to understand the evolution of the genus, particularly the contrasting patterns of genetic flow between nuclear genes, which generally show little differentiation, whereas in chloroplast there is very high differentiation between populations, suggesting very different scattering patterns and interesting for a local adaptation scheme.

## 4 Introducción

La variación genética es la materia prima para la evolución. Los cambios en la composición genética de las poblaciones y las especies son el mecanismo principal de los procesos evolutivos. La variación genética representa una de las tres formas de biodiversidad reconocidas por la IUCN, siendo las otras dos la diversidad de especies y la ecosistémica (Allendorf y Lukiart, 2007). La medición y conservación de la diversidad puede darse a diversos niveles: genes, individuos, poblaciones, especies o comunidades.

Los seres vivos se desarrollan en ambientes cambiantes debido a fenómenos como las condiciones climáticas, parásitos, enfermedades, competidores y actividades humanas. Estos cambios obligan a los organismos a adaptarse a las nuevas condiciones; si no se adaptan, la especie se extingue. El grado de diversidad genética de cada especie en sus individuos y poblaciones les permitirá adaptarse. El estudio de la diversidad genética a nivel poblacional es el principal campo de estudio de la genética de poblaciones (Frankham *et al.*, 2002).

### 4.1 Genética de poblaciones

La genética de poblaciones durante el siglo XX se concentró en la caracterización y descripción de la variación genética dentro de las poblaciones naturales, inicialmente por medio de las cruces en laboratorio de organismos como *Drosophila* y el mapeo de cromosomas, pasando por la electroforesis de proteínas (aloenzimas) en los años 1970, posteriormente con el uso de ADN mitocondrial en animales (1980), ADN nuclear y de cloroplasto en plantas (1990) y más recientemente el uso de la genómica (Frankham *et al.* 2002).

Toda esta búsqueda de la variación genética en las poblaciones naturales y su comportamiento puede entenderse desde un modelo matemático básico desarrollado por el matemático Godfrey Hardy y el médico alemán Wilhelm Weinberg. Este modelo propone que después de una generación de apareamientos al azar en una población, las frecuencias de un genotipo en un locus dado pueden ser representadas por una función binomial de las frecuencias alélicas  $p^2 + 2pq + q^2$  (para dos alelos) o multinomial (con múltiples alelos). En la ausencia de factores que afecten las frecuencias alélicas (i.e., ausencia de fuerzas evolutivas), estas proporciones se mantendrán a lo largo del tiempo.

A este modelo se le denomina el Equilibrio o Principio de Hardy-Weinberg y se basa en varios supuestos para que la proporción de las frecuencias puedan mantenerse (Frankham *et al.*, 2002; Allendorf y Lukiart, 2007; Beebe y Rowe 2008):

- 1.- Apareamientos al azar, donde todos los individuos tienen la misma probabilidad de aparearse. El supuesto se rompe cuando los apareamientos no son al azar, es decir, cuando existe endogamia.
- 2.- Las poblaciones son infinitas, lo que ocasiona que el efecto del azar sobre la población sea menor o casi despreciable. Conforme la población disminuye en tamaño el efecto del azar se intensifica, y entonces actúa la deriva génica.
- 3.- Que no haya flujo genético entre las poblaciones. En otras palabras, no debe haber migración ni mutación en las poblaciones, respectivamente.
- 4.- Los individuos tienen igual oportunidad de dejar descendencia y de sobrevivir. Lo anterior significa que todos los individuos tienen la misma probabilidad de reproducirse y de que su descendencia sobreviva. Cuando este supuesto se rompe, se habla de selección natural.

Según el Principio de Hardy-Weinberg, se requiere de una sola generación con apareamientos al azar para establecer las frecuencias genotípicas esperadas.

Gracias a que este principio simplifica el comportamiento de la variación dentro de las poblaciones, las desviaciones que se observen permiten comenzar a inferir las fuerzas evolutivas (i.e., endogamia, deriva génica, migración, mutación y selección natural) que han actuado sobre la variación de la población. Por tanto es un principio fundamental en la genética de poblaciones (Frankham *et al.*, 2002).

#### **4.1.1 Variación genética**

Un aspecto fundamental de la biodiversidad es la variación genética en las poblaciones y las especies. Esta variación puede ser clasificada en cuatro tipos en función de sus consecuencias en la adecuación: variación de alelos letales, deletéreos, o neutros y la asociada con alelos que aumentan la adecuación de sus portadores. Asimismo, se pueden

dividir los tipos de variación genética en aquellos que estudian rasgos cualitativos (determinados por un locus) y los que son cuantitativos (Piñero *et al.*, 2008a).

La forma más común de medir la variación en las poblaciones y compararla entre ellas es la heterocigosis esperada ( $H$ ), que en un locus simple se define como la proporción de individuos que serían heterocigos dadas las frecuencias alélicas encontradas en la población si se cumpliera el equilibrio de H.-W. Suele emplearse también el polimorfismo o la proporción de loci que son genéticamente variables ( $P$ ), pero tiene el problema de que puede aumentar entre más individuos sean muestreados. Esta dependencia en el tamaño de muestra es parcialmente evitada definiendo un límite arbitrario limitado por la frecuencia del alelo más común, la frecuencia usualmente es de 0.99 o menos (Allendorf y Lukiart, 2007).

Otra medida usada es  $\pi$  (pi), que es la diversidad nucleotídica, definida como el número de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias tomadas al azar (Castillo, 2007), aunque también puede ser definida como la heterocigosis por sitio nucleotídico (Calonga *et al.*, 2014). También se emplea el parámetro  $\theta$  (theta) de Watterson (1975), estimado del número total de sitios segregantes en un grupo de secuencias (sitio segregante es un sitio en donde las secuencias difieren),  $\theta = K/a$ , donde  $K$  es igual al número total de sitios segregantes en una muestra de secuencias dada y  $a = 1 + 1/2 + \dots + 1/n - 1$  ( $n$  = número de secuencias en la muestra (Castillo, 2007). Cuando existe equilibrio entre mutación y deriva,  $\theta = \pi = N_e \mu$  (Kimura, 1968), donde  $N_e$  es el tamaño efectivo poblacional y  $\mu$  la tasa de mutación.

#### **4.1.2 Estructura genética**

El tipo y cantidad de variación genética que poseen las poblaciones de distintos organismos depende principalmente de su historia de vida, ecología, procesos demográficos y genéticos que ocurren al interior de las poblaciones y que pueden hacer que estas sean iguales entre sí, o completamente diferentes, pasando por un rango de posibilidades muy amplio en el comportamiento y distribución de la variación genética (Hedrick, 2005).

Sewall Wright (1931, 1951) desarrolló un marco conceptual y matemático para describir la distribución de la variación genética en las especies que utiliza una serie de

coeficientes de endogamia:  $F_{is}$ ,  $F_{st}$  y  $F_{it}$ . El primero de ellos es una medida de la desviación de las proporciones equilibrio Hardy-Weinberg dentro de la subpoblaciones;  $F_{it}$  representa la medida de la desviación total del equilibrio en la toda la población (o especie) debido a los apareamientos no aleatorios dentro de la subpoblación ( $F_{is}$ ) y  $F_{st}$  se refiere a la diferencia de las frecuencias alélicas entre las subpoblaciones.

Estos parámetros fueron inicialmente definidos por Wright para un locus y dos alelos, y miden básicamente la deficiencia de heterócigos relativos a lo esperado por las proporciones Hardy-Weinberg (Allendorf y Lukiart, 2007). Simplificando el total de la variación genética dentro de una especie ( $H_t$ ) puede ser desglosada en las diferencias genéticas entre los individuos de una población dada ( $H_s$ ) y la diferencia genética entre las diferentes poblaciones. La proporción de la variación genética total dentro de las especies que es debida a las diferencias entre las poblaciones es generalmente representada por el estadístico  $F_{st}$  de Wright:

$$F_{st} = 1 - \frac{H_s}{H_t},$$

el cual es uno de los más empleados para estimar la diferenciación genética entre las poblaciones. Posee valores de 0 a 1, cuando todas las poblaciones son iguales y cuando todas las poblaciones son diferentes entre sí, respectivamente.

En 1977 Nei, definió los parámetros  $G_{st}$ , como el coeficiente de diferenciación genética, siendo una extensión de los parámetros  $F$ , para tres o más alelos (Hedrick 2005).

Al existir una distribución distinta de la variación genética en las poblaciones de una especie, se habla de estructura genética, que puede reducirse debido al flujo genético que tiene como principal efecto el homogenizar a las poblaciones. Esto ocurre por medio del movimiento de genes de una población a otra, ya sea por el movimiento de gametos, semillas, o individuos, pero estos migrantes solo contribuyen al flujo si se logran reproducir en la población a la cual llegan (Aguirre, 2007).

Por otro lado, si el flujo génico entre las poblaciones no es constante, o se pierde por efecto de extinción de poblaciones contiguas, o por surgimiento de barreras que impidan el paso de genes entre poblaciones, al darse el aislamiento el efecto de la deriva génica se intensifica y esto puede llevar a la fijación de alelos en las poblaciones y por lo tanto a una diferenciación entre ellas (Allendorf y Lukiart, 2007).

Dado que la variación genética y su distribución dentro y entre las poblaciones son afectadas por eventos de tipo demográficos, se pueden usar varios métodos para medir el flujo génico entre las poblaciones, y con ello esbozar su historia evolutiva (Hedrick, 2005).

Dentro de los métodos directos de medición del flujo génico están la observación y experimentación del grado de dispersión de gametos o individuos, como la captura y marcaje de individuos, o pruebas de parentesco. Sin embargo, los resultados de estos métodos no pueden ser interpretados como el flujo neto entre las poblaciones, ya que se trata de la migración en un área determinada, y en un tiempo dado, por lo tanto no puede tener proyecciones evolutivas. Por otro lado, provee de un medición fina a un escala ecológica del comportamiento de las condiciones favorables para la dispersión a ese nivel (Aguirre, 2007).

Los métodos indirectos utilizan marcadores moleculares con los que es posible estimar el grado de flujo génico más detalladamente, pudiendo confirmar las observaciones directas o cuando éstas son imposibles de realizar (Hedrick, 2005). Estos métodos se basan principalmente en describir la distribución espacial de los alelos en las poblaciones. Casi todos los modelos teóricos surgen de la idea desarrollada por Wright en la cual los individuos forman poblaciones discretas (modelos de islas) que divergen por mutación y deriva génica, o que forman poblaciones de distribución continua (aislamiento por distancia), donde el grado de flujo génico es inverso a la distancia espacial, es decir, disminuye con la distancia. Este grado de flujo génico puede ser medido por los estadísticos  $F$ , propiamente  $F_{st}$  (mencionados anteriormente), que miden la variación de las frecuencias alélicas entre las poblaciones y por tanto la diferenciación genética entre ellas (Aguirre, 2007), es decir su estructura genética. Cuando la estructura genética tiene una correlación con la distribución geográfica, se habla del campo de estudio de la filogeografía.

## **4.2 Filogeografía**

Avise (2000) definió el termino filogeografía como el estudio de los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes de genes. La filogeografía busca explicar los patrones y procesos históricos, evolutivos y ecológicos que determinan la distribución de la biota en el planeta. Está relacionada con la ecología molecular, la cual utiliza el conocimiento y aplicación de marcadores genéticos moleculares para explorar

patrones y procesos ecológicos y evolutivos a una escala ecológica (Vázquez-Domínguez *et al.* 2009).

La filogeografía usa los componentes históricos (relaciones evolutivas) y de distribución espacial de los linajes usando como ejes el tiempo y espacio. Al comparar estos patrones es posible tener un mejor entendimiento de cuáles factores han influido en la distribución de la variación genética. La filogeografía utiliza la información contenida en las moléculas de ADN, enfatizando la distribución espacial de los linajes de genes en una escala ecológica, analizando el papel de las presiones o factores ambientales (ecológicos) contemporáneos que afectan la disposición espacial de los caracteres (Vázquez-Domínguez *et al.* 2009). Por lo tanto, si se puede observar y cuantificar evidencias del efecto de las fuerzas evolutivas, se puede avanzar en determinar cómo fueron los procesos demográficos que actuaron sobre la variación genética de los organismos. Es decir que se utilizan las secuencias de ADN para intentar rastrear los linajes por medio de los "códigos de barras" que sirven como volutas en la evolución de los linajes.

En filogeografía existe un interés creciente por usar polimorfismos de nucleótidos únicos (*single nucleotide polymorphisms*, SNPs) de múltiples loci para reconstruir historias poblacionales, dado que los SNPs representan la forma más prevalente de variación genética (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009).

Recientemente la teoría de la coalescencia ha probado ser una base conceptual exitosa para analizar datos filogenéticos. Dicha teoría trata de interpretar la distribución de tiempos a la ancestría común en un árbol de genes en términos de varias fuerzas evolutivas, como la deriva génica, la migración (flujo génico) o la selección. Es decir, que los linajes de cualquiera de dos haplotipos no-recombinantes muestreados de una población coalescen hacia su ancestro común más directo de la misma forma que los linajes de todos los haplotipos presentes en una población coalescerán, uniéndose por medio de varios nodos internos, para formar un árbol genealógico (Beebe y Rowe, 2008).

Cuando la coalescencia se define bajo neutralidad y sucede en una población de tamaño constante (lo que significa que existe un equilibrio entre la mutación (generadora de variantes alélicas) y la deriva génica (que fija o hace que se pierdan las variantes)), y dado que se supone que las mutaciones ocurren en un único punto en el tiempo y el espacio (modelo de sitios infinitos), es posible hacer inferencias sobre eventos pasados, ya que cada

nueva mutación está afectada por patrones de dispersión y tamaños poblacionales, los cuales pueden ser deducidos a partir de la distribución actual de las mutaciones.

Estos análisis de coalescencia pueden llevarse a cabo tanto con genes nucleares o con haplotipos de ADN de cloroplasto (cpDNA) o mitocondriales (mtDNA), y con la teoría de la coalescencia se puede describir la historia evolutiva de esas secuencias (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009).

### **4.3 Marcadores moleculares**

Los marcadores moleculares se pueden definir como fragmentos de ADN que revelan variación (mutaciones), los cuales pueden ser usados para detectar polimorfismos entre los distintos genotipos o alelos de un gen para una secuencia en particular de ADN en una población (Guo-Liang, 2013). Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y pueden ser de tipo dominante o co-dominante (Rentería, 2007).

Los tipos de marcadores moleculares existentes comprenden por un lado las proteínas (aloenzimas) y el ADN. Dentro de este último se encuentran secuencias específicas y aleatorias. Considerando a las secuencias de ADN específicas, puede tratarse con regiones codificantes (habitualmente conservadas) y no codificantes (generalmente variables). Las secuencias aleatorias de los marcadores pueden amplificarse por medio de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), u obtenerse utilizando enzimas de restricción, o en ambas (mixtas). Para su visualización es necesario el uso de técnicas como la electroforesis o secuenciación (Rentería, 2007; Beebe y Rowe, 2008).

El uso de los marcadores moleculares se ha extendido en la genética de poblaciones y en la filogeografía, porque son universales, ya que pueden ser analizados en cualquier tipo de organismo y son comparables entre sí. Permiten tener un mayor grado de resolución en el caso de linajes de divergencia temprana, cuyas relaciones no pueden esclarecerse con uso de marcadores morfológicos (Rentería, 2007). Además, actualmente se pueden obtener y analizar cientos o miles de caracteres, en contraste con los marcadores morfológicos cuyos análisis incluyen rara vez más de cien caracteres. Los marcadores moleculares tienen la ventaja adicional de que con ellos se puede trabajar con la base genética de la variación en los individuos, y se pueden definir más precisamente que regiones del genoma se analizarán. Los marcadores genéticos llevan un costo económico adicional por los métodos

y técnicas para su obtención (Rentería, 2007), pero estos disminuyen cada día, y debido a los alcances de interpretación evolutiva que tienen, vale la pena esta inversión.

#### **4.3.1 ADN de Cloroplasto**

El genoma del cloroplasto (*cpDNA*), es una molécula circular que alcanza tamaños de entre 120 y 220 kb (kilobases) en las plantas vasculares y que codifica aproximadamente para 100 funciones genéticas. Posee una región larga que está duplicada e invertida, que divide el genoma en una región denominada como copia simple larga (*large single copy*, LSC), en una copia simple pequeña (*small single copy*, SSC), y en una región invertida repetida (*inverted repeat region*, IR), que tiene un tamaño de unos 20-25 kb, pero la estructura repetida está ausente en coníferas y en algunas leguminosas (Clegg *et al.*, 1991).

Este genoma tiene una herencia uniparental, siendo heredada vía materna en las angiospermas (semillas) y predominantemente vía paterna en las gimnospermas (polen), no se presenta recombinación (Ennos *et al.*, 1999), así que se podría pensar en el como un locus, un solo gen gigante.

Los genomas de los cloroplastos completos secuenciados hasta el momento muestran que es un genoma evolutivamente estable, con una marcada conservación de contenido de genes y en su organización estructural (orden o sintenia de los mismos en el genoma) (Clegg *et al.*, 1995). Dado que la evolución (i.e., la tasa de substitución de los nucleótidos) del cloroplasto es baja, se ha empleado para analizar la historia evolutiva de las poblaciones de distintos grupos de plantas y sus relaciones filogenéticas (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009).

Adicionalmente, el *cpDNA* se ha usado como marcador molecular exitoso para desarrollar estudios filogeográficos con plantas, aunque cuando existen a veces reportes de herencia biparental en algunas especies, en general presentan bajas tasas de evolución molecular (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009).

#### **4.4 Modelos de distribución potencial de especies**

En particular el clima es una de las principales variables que afecta o determina la distribución de los organismos. Analizar las variables climáticas ayuda a entender por qué una especie crece en determinado sitio y no en otro. Así puede delimitarse el espacio en el



El interés por la genética de la conservación comienza alrededor de 1970 con Otto Frankel, quien empieza a preocuparse por la pérdida de las variedades originales, debido al reemplazamiento con cultivos genéticamente uniformes (Allendorf y Lukiart, 2007). A partir de esto, no es de sorprender que las consideraciones iniciales de la conservación hayan sido para organismos, en este caso plantas, de importancia para el hombre, como cultivos.

Frankel en 1974 decía que la conservación genética debía también considerar la estructura y dinámica de las poblaciones, y que conlleva una responsabilidad evolutiva. Indicaba que los genetistas debían ser considerados para la planeación de reservas, y que la conservación, junto con una perspectiva evolutiva y ecológica, crean un conjunto de conocimientos complejos. Pero es hasta 1980 que se plasman los fundamentos para la aplicación moderna de la genética para la conservación de la biodiversidad (Allendorf y Lukiart, 2007).

Actualmente, existen diversas publicaciones dentro de la biología de conservación, por ejemplo, cerca del 10% de las publicaciones realizadas en *Conservation Biology*, desde 1988 hasta 2007, incluyen la palabra genética en su título; además de que el 15% de los artículos publicados en la misma revista tienen la genética como tema principal (Allendorf y Lukiart, 2007). Estos trabajos pueden ser agrupados en cinco categorías temáticas: 1) Manejo y reintroducción de poblaciones en cautiverio y la restauración de comunidades biológicas; 2) Descripción e identificación de individuos, estructura genética poblacional, relaciones de parentesco y relaciones taxonómicas; 3) Detección y predicción de los efectos de la pérdida de hábitat, fragmentación y aislamiento; 4) Detección y predicción de los efectos de hibridación y la introgresión y 5) Entendimiento de las relaciones entre adaptación o adecuación y los caracteres genéticos de los individuos o poblaciones (Allendorf y Lukiart, 2007).

De este modo, el desarrollo de nuevas técnicas moleculares para conocer la variabilidad génica, el uso de organismos modelo para el mejor entendimiento de la misma y el estudio del efecto de las distintas fuerzas evolutivas que actúan sobre las poblaciones naturales ha cambiado la forma en la que se estudia la diversidad genética, así como también los factores y procesos que se contemplan actualmente para la conservación.

Se ha discutido si lo que es importante es conservar a las especies, individuos o poblaciones, o más bien a los procesos evolutivos que dieron origen a la diversidad. Así que se han realizado acercamientos para definir prioridades de conservación basadas en relaciones filogenéticas y divergencia genética entre taxones y dentro de las especies. Por un lado algunos autores proponen distinguir los linajes evolutivos y conservar las especies, y otros conservar los procesos. Pero el problema va más allá de sólo identificar a las especies, porque también se debe de considerar la protección del hábitat y ambiente donde se realizaran los esfuerzos conservacionistas, ya sea de especies o de procesos evolutivos (Allendorf y Lukiart, 2007). Al incluir el factor geográfico, el cual puede ser determinante en el reconocimiento de centros de diversificación, se busca mantener el potencial evolutivo para la biodiversidad, identificando ciertos grupos taxonómicos (unidades evolutivamente significativas) que pudiesen ser candidatos para proporcionar futura diversidad, es decir, que se conservaría con ello los procesos evolutivos que mantienen la diversidad biológica. Esto es similar al efecto generado con la conservación de las llamadas *sp* *s* *—som r ll* *” o — n r* *”* y resguardo implica el cuidado de extensas regiones y con ello las especies que se distribuyen en dichas zonas resultan también beneficiadas (Allendorf y Lukiart, 2007; Rocha y Gasca, 2007).

Existen conflictos en relación a cual debería de ser el nivel al que se le debe de dedicar la mayor parte de los esfuerzos de conservación. Sin embargo, es inútil estar tratando de dar más importancia a uno u a otro, ya que los tres niveles de diversidad (genética, de especies y de ecosistemas) son parte de la biodiversidad total (Allendorf y Lukiart, 2007).

Aunque todos los niveles de la biodiversidad son importantes, la distinción de las poblaciones locales es un aspecto de la diversidad genética, en el cual se podrían centrar los esfuerzos de conservación (Allendorf y Lukiart, 2007), para lo cual se requiere un balance en el cuidado del ecosistema, que conlleve a su supervivencia, considerando la historia natural de las poblaciones y las especies, con lo cual se podrían integrar los tres niveles desde un perspectiva más puntual.

En conclusión el estudio de la diversidad genética permitiría en cierto modo la conservación tanto de los patrones de diversidad existentes, así como de los procesos que generan la biodiversidad. Pero para esto es esencial cuantificar, monitorear y mantener los patrones naturales de subdivisiones dentro de las poblaciones, así como de la conectividad

entre las mismas (Allendorf y Lukiart, 2007). En este nivel es donde se ven involucrados otros conceptos, como el de metapoblaciones.

Para conservar la variación genética dentro y entre poblaciones se requiere mantener un medio saludable y poblaciones grandes, porque en poblaciones pequeñas la deriva génica puede hacer que se pierda la diversidad. Además de conservar poblaciones diferentes, sobre las cuales actuará la selección natural, la idea es mantener la posibilidad de adaptación siempre presente en las poblaciones (Allendorf y Lukiart, 2007).

El reto mayor al que se enfrenta el estudio de la diversidad genética en plantas y animales, desde el punto de vista de las capacidades en personal de investigación y de enfoques e infraestructura reside, por un lado, en la gran cantidad de especies por estudiar y, por otro, en generar datos relevantes para poder hacer inferencias estadísticamente significativas acerca de los procesos poblacionales pasados, del impacto de los eventos recientes en la variación genética y para la prospección hacia el futuro de estos procesos, en particular considerando diferentes escenarios climáticos (Piñero *et al.*, 2008a).

La genética de la conservación es un campo dinámico de investigación, pero México cuenta con un muy limitado grupo de investigadores, especialmente considerando su elevada biodiversidad, por lo que es necesario reforzar con la formación de recursos humanos en éste y otros campos íntimamente relacionados (Piñero *et al.*, 2008a).

#### **4.6 Familia Agavaceae: el género *Agave***

La familia Agavaceae *sensu stricto* de la taxonomía tradicional —aunque APG III (2009) la considera solo un clado de la familia Asparagaceae— comprende nueve géneros *Agave* (166 especies), *Beschorneria* (7), *Furcraea* (25), *Hesperaloe* (5), *Hesperoyucca* (1), *Manfreda* (28), *Polianthes* (13), *Prochnyanthes* (1) y *Yucca* (49), de los cuales todos se encuentran representados en México (Rocha *et al.*, 2006). México es el país con mayor número de especies de esta familia, endémica al continente americano, y es el centro de origen de la mayoría los géneros, principalmente del género *Agave* (Álvarez de Zayas, 1989).

El género *Agave* está conformado por dos subgéneros, el subgénero *Agave* con inflorescencia en panícula y *Littea* con inflorescencia en espiga (Gentry 1982). Sin embargo, estudios filogenéticos sugieren que no son grupos naturales (Good-Ávila *et al.*, 2006; Flores, 2007).

Estas plantas se encuentran adaptadas a regiones semiáridas de México. Dentro de la familia las especies tienen una forma arosetada característica, que varía en tamaño, forma y textura lo que da como resultado una familia muy diversa en cuanto a formas de vida, desde plantas de hábito arbóreo, como las pertenecientes al género *Yucca*, rosetas acaules como la mayor parte de *Agave*, y plantas de tipo herbáceo, como *Manfreda* y *Polianthes*.

También presentan una polinización diversa, desde polinización obligada por insectos mutualistas, como las polillas de la *Yucca* y otros sistemas generalizados, desde insectos diurnos como abejas, nocturnos, entre ellos esfingidos, y otros animales como colibríes y murciélagos. Estos últimos resultan de gran importancia y se han propuesto modelos de coevolución con los miembros de género *Agave* (Eguiarte *et al.*, 2000).

Los agaves, como otras plantas de la familia presentan adaptaciones a la vida en regiones semiáridas. En el caso del género *Agave* algunas de estas adaptaciones son muy evidentes, como la succulencia de las hojas, su cutícula gruesa y espinas en el borde las hojas y en la punta, que sirven en parte como protección contra herbívoros grandes.

Otras adaptaciones son menos conspicuas pero igualmente importantes, como su metabolismo CAM, lo que permite una maximización del agua, al realizar la fotosíntesis, siendo *Agave* el género más tolerante de la familia a las condiciones áridas. Supuestamente, la forma de las rosetas les permite sobrevivir en las mañanas, y la forma protege de las variaciones extremas de temperatura, al darse sombra una hoja a otras en el transcurso del día, de este modo no están expuestas en su totalidad al sol (Rocha *et al.*, 2006).

Las raíces de los agaves son superficiales y extensas, poseen una adaptación microecológica, ya que diferentes especies están adaptadas a condiciones contrastantes de pedregosidad del suelo y humedad, y algunas especies son capaces de tener propagación vegetativa que permite la sobrevivencia de la roseta en caso de que la reproducción sexual —llamada "roseta" (Rocha *et al.*, 2006). Además, son una fuente de recursos durante su época de floración, principalmente caracterizada por una única floración (semélparo, monocárpico) masiva, con la que después de fructificar la roseta muere. Pueden pasar más de 30 años para lograr la madurez reproductiva (Rocha *et al.*, 2006).

Las agaváceas tienen una gran importancia en la vida cultural y económica de los pobladores de las distintas regiones en México, y muchas de ellas se han registrado con

usos que datan desde épocas prehispánicas. Diferentes estructuras de las plantas son aprovechadas como alimento, bebida (fermentada y destilada), medicina, fibras, construcción, forraje, ornato, uso ceremonial, combustible, sustituto de jabón, cercas vivas, etc. (García-Mendoza, 2011).

El uso por parte del humano de estas plantas abarca desde la recolección y el aprovechamiento de los ejemplares silvestres, hasta el cultivo extensivo de varias especies domesticadas. Incluso, muchas especies de la familia, principalmente de los géneros *Agave*, *Yucca* y *Furcraea* se cultivan con fines ornamentales en varias partes del mundo o se han naturalizado, llegando a ser importantes plantas invasoras (García-Mendoza, 2011).

#### **4.6.1 *Agave kerchovei* Lem.**

*Agave kerchovei* Lem. (Fig. 1) se caracteriza por sus hojas largamente triangulares, 9-13 veces más largas que anchas, dientes grandes, remotamente espaciados y la pérdida de ellos en una buena parte del ápice (García-Mendoza, 2011) Está considerado entre las plantas más robustas de las especies del grupo *Marginatea* del subgénero *Littea* (Gentry, 1982). Los filamentos son más cortos que en *Agave ghiesbreghtii* Lem. ex Jacobi (García-Mendoza, 2011) considerado por Gentry (1982) como la especie más cercana morfológicamente a *Agave kerchovei* Lem. Dentro de las poblaciones de esta especie existe una variación considerable, incluyendo el hábito, desde simples a cespitosas, como en numerosas diferencias de tamaño, forma y dentado de las hojas.

Aunque inicialmente se ha sugerido que la especie tiene una distribución desde el centro de Hidalgo al sur de Oaxaca (Gentry, 1982; García-Mendoza y Galván, 1995; Arias *et al.*, 2000), actualmente se reconoce que sólo se distribuye en porciones de los estados de Puebla y de Oaxaca, principalmente en región del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (García-Mendoza, 2011; Brena-Bustamante, 2012).

Por otra parte, en la región del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, los patrones de distribución espacial fina de la especie son complejos. Los habitantes de la región mencionan que conocen pocas poblaciones, y que éstas son de difícil acceso, además de que las condiciones en cada una de esas poblaciones son muy distintas (Brena-Bustamante, 2012).



**Figura 1.** Ejemplar de *Agave kerchovei* Lem. en el valle de Tehuacán-Cuicatlán<sup>1</sup>

*Agave kerchovei* se distribuye en matorral xerófilo, principalmente sobre suelos de origen calizo, en elevaciones de 975-1600 msnm (García-Mendoza, 2011), en comunidades semiabiertas de árboles bajos con alta riqueza de otras plantas suculentas pertenecientes a familias como Cactaceae, Bromeliaceae, además de otras especies de la familia Agavaceae (Gentry, 1982). Su período de floración es de enero a mayo y de fructificación de abril a octubre (García-Mendoza, 2011), aunque por otro lado Arias *et al.* (2000), reportan que el periodo de floración es de octubre a enero, y que sus flores son polinizadas por murciélagos.

Según Brena-Bustamante (2012), algunos nombres con los que se conoce esta especie en su lugar de origen son cacaya, rabo de león, maguey pichomel y maguey ixtle, siendo el primero referente a las flores (botones florales) y los otros a la planta en su totalidad. Brena-Bustamante (2012) menciona que el principal uso de la planta es para alimento, siendo importante para los pobladores de San Rafael, Puebla y San Gabriel Casa Blanca, Oaxaca, pero hasta ahora se carece de un estudio etnobotánico específico de la especie. Se consumen los botones florales, de modo que el escapo es cortado antes de que se desarrollen las flores, lo que sobra del escapo lo usan para fabricar palos de escoba, y a veces los restos del mismo se usan como forraje. El uso de la inflorescencia varía, ya que no siempre se corta la inflorescencia completa, sino que sólo lo que se necesita, la parte

---

<sup>1</sup> Fotografía proporcionada por la Biol. Natalia Martínez. Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Instituto de Ecología, UNAM.

por los posos de la parte más joven de la zona. Este tipo de aprovechamiento se realiza en forma de recolección, llevada a cabo entre los meses de octubre a diciembre, y estos productos no tienen ningún valor comercial, sólo es de autoconsumo. Sin embargo, se estima que la demanda de estos botones puede llegar a ser considerable, pues también es recolectada para compartir con familiares. Otro uso que se le ha dado es como fibra (ixtle), pero ya va en desuso (Brena-Bustamente *et al.*, 2013).

## 5 Justificación

La familia Agavaceae o subfamilia Agavoideae (APG III, 2009) es de un origen evolutivo reciente y tuvo una radiación adaptativa, es decir, que se formaron muchos linajes nuevos en poco tiempo, cuando las condiciones en el centro de México se volvieron más áridas, hace unos 8 a 6 millones de años (Good-Ávila *et al.*, 2006). Hace unos 3 a 2.5 millones de años el género *Agave* sufrió otra radiación. Estas especies pudieron ocupar nuevos nichos que aparecieron tras estos cambios del ambiente, por lo cual existen un gran número de especies que resultan endémicas y de ellas algunas son microendémicas (distribución menor a 30,000 km<sup>2</sup>). Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo en el valle de Zapotitlán, que forma parte de la Región Fitogeográfica del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, se menciona que hay 24 especies diferentes y 8 taxas microendémicos a ese valle (García, 2011), lo que habla de un alto grado de endemismo local.

Sin embargo, aunque el género *Agave* tiene una importancia económica y cultural, se sabe poco sobre los recursos genéticos y como el manejo humano puede afectar la diversidad de las poblaciones tanto silvestres como domesticadas (Piñero *et al.*, 2008b). Por ello, es necesario realizar estudios a nivel poblacional de estas especies que son endémicas para conocer los niveles y estructura de variación genética. Estos resultados servirán de apoyo para realizar los programas de manejo adecuados con el objetivo de preservar sus recursos genéticos y de esta manera seguir aprovechando a las especies sin comprometer su futuro evolutivo, como es el caso de *A. kerchovei* en la región del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, ya que presenta un alto grado de uso e importancia en la región (Brena-Bustamante, 2012).

Por otro lado, para esbozar una repuesta más clara de porque el Valle de Tehuacán-Cuicatlán sea tal vez la región árida más diversa en Norteamérica (Canul, 2008), es necesario poder determinar si existen patrones ecológicos y procesos evolutivos comunes para este tipo de especies en regiones de gran diversidad de ambientes.

## 6 Objetivos

### **Objetivo general:**

Realizar un estudio a nivel cloroplasto de la genética de poblaciones y filogeografía de *Agave kerchovei* Lem. para avanzar en comprender los procesos que han modelado esta especie y proponer medidas preliminares para su conservación genética.

### **Objetivos particulares**

- 1.- Describir la variación genética al interior de las poblaciones, con marcadores de cloroplasto.
- 2.- Determinar el grado de diferenciación (estructura) genética entre las distintas poblaciones.
- 3.- Analizar si existe un patrón filogeográfico, para posteriormente entender los procesos históricos demográficos que han ocurrido en las poblaciones.
- 4.- Obtener un mapa de distribución potencial de la especie para el presente, así como una proyección al pasado (último máximo glacial)
- 5.- Identificar qué sitios podrían ser centros para la conservación *in situ* de la variación genética a nivel cloroplasto de la especie.

## 7 Metodología

### 7.1 Sitio de Estudio

La provincia Florística del valle de Tehuacán-Cuicatlán es considerada como parte de la región xerófila de México (Rzedowski, 2006) Está localizada en la parte sur del estado de Puebla y el Norte O x ntr los 7° 39' y 8° 53' N y ntr 96° 55' W y 97° 44' W El Valle cubre un área de casi 10 000 km<sup>2</sup>. Está conformado por un mosaico complejo fisiográfico con valles internos, separados por cadenas montañosas. Está considerada como una región semiárida, con una temperatura promedio anual de 21°C y 400 mm de precipitación anual promedio. Las condiciones áridas en el valle son principalmente consecuencia del efecto de "sombrero" que produce el S r r M r Or nt l (Dávila *et al.*, 2002).

El valle de Tehuacán-Cuicatlán posee una gran riqueza de formas de vida de especies vegetales en donde sobresale la alta concentración de especies endémicas. Predomina en el valle la vegetación de selva baja caducifolia, y bosque de encino en las partes altas. Al norte del mismo se presenta una gran diversidad de vegetación, predominando el matorral desértico rosetófilo rodeado de fragmentos de agricultura de riego y de temporal, y algunas porciones de matorral crasicaule. La CONABIO propuso, dentro del desarrollo del proyecto de las Regiones Terrestres Prioritarias de México, el área RTP-121, la que incluye parcialmente el Área Natural Protegida de Tehuacán-Cuicatlán y la región de los Pápalos (Arriaga *et al.*, 2000).

### 7.2 Elección de material para extracción de ADN

Las colectas del material fueron realizadas por el M. en C. Enrique Scheinvar, la Biól. Natalia Martínez y el Dr. Santiago Ramírez, realizadas en 2010, con el apoyo del Dr. Rafael Lira Saade (Facultad de Estudios Superiores Iztacala, U.N.A.M.).<sup>2</sup>

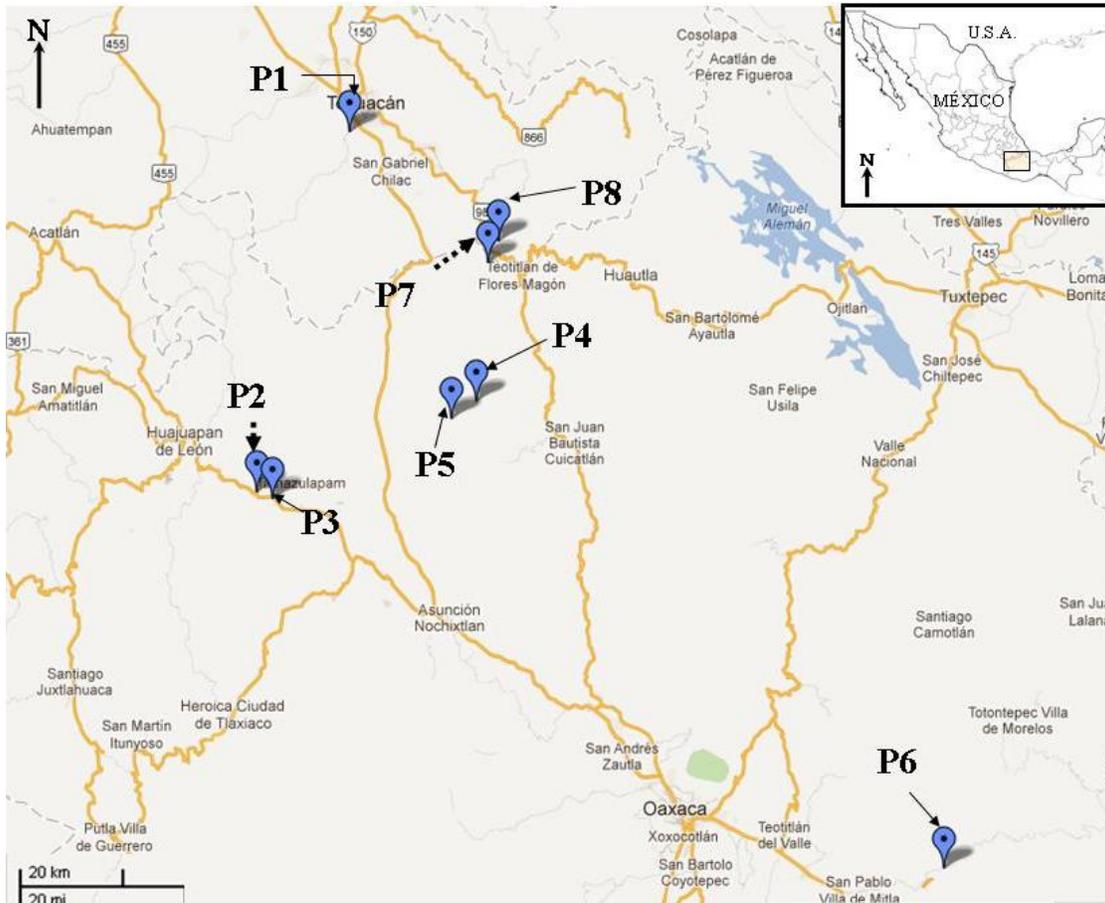
El material colectado fue guardado en bolsas de plástico a una temperatura de -70°C en un ultra-congelador. La selección de los individuos en los casos en los que había más de 20 individuos en una población fue hecha al azar. En la Tabla 1 y Fig. 2 se indican las poblaciones utilizadas en este estudio.

---

<sup>2</sup> Las poblaciones fueron colectadas por el M. en C. Enrique Scheinvar y la Biól. Natalia Martínez, a excepción de la población 6, que fue colectada por el Dr. Santiago Ramírez. Los sitios de colecta de las Poblaciones 7 y 8 fueron sugeridas por el Dr. Rafael Lira Saade (Facultad de Estudios Superiores Iztacala, U.N.A.M.).

**Tabla 1.** Poblaciones de *Agave kerchovei* Lem. Ubicación e individuos observados en cada población (N).

Población	Localidad	Coordenadas Geografías	Altitud (msnm)	N
1	4.47 km en L.R. al SW de Santa María Coapan, Puebla	8° 4' 34.8'' N 97° 6' 8'' W	1817	35
2	6.94 km en L.R. al NW de Villa de Tamazulapam del Progreso, Oaxaca	7° 4' 7'' N 97° 37' 47'' W	1927	4
3	3 km en L.R. al NW de Villa de Tamazulapam del Progreso, Oaxaca	7° 4' 4'' N 97° 35' 45'' W	1900	8
4	4.19 km en L.R. al NE de Santa María Ixcatlán, Oaxaca	7° 5' 58'' N 97° 5' 5'' W	2091	25
5	3.2 km en L.R. al W de Santa María Ixcatlán, Oaxaca	7° 5' 5'' N 97° 3' 9'' W	2113	43
6	±km 33 de la carretera Ayutla-Oaxaca a 400 m por la carretera al W de Santa María Albarradas, Oaxaca	6° 57' 49.5'' N 96° 9' 6'' W	1682	27
7	Finca "San Ral" Oax	8° 9' 46'' N 97° 8' 38'' W	946	66
8	Finca "San Ral" Oaxatlán Puebla.	8° 4' 86'' N 97° 7' 568'' W	989	31



**Figura 2.** Distribución espacial de las poblaciones de *Agave kerchovei* Lem. en la región de Tehuacán-Cuicatlán, dentro de los estados de Puebla y Oaxaca, México. Cada población se codifica por la letra P y el número de la población que corresponde. P1=corresponde a la población 1, P2 a la población 2, así sucesivamente (Modificado de Google Maps, 2013).

### 7.3 Extracción, amplificación y secuenciación

Se extrajo el ADN de las hojas utilizando el método Mini-Prep CTAB2x (Vázquez-Lobo, 1996; Anexo 1) de 136 individuos de *Agave kerchovei*, distribuidos en ocho poblaciones que cubren de manera adecuada la distribución de la especie. Sin embargo para todos los análisis, con excepción de la red de haplotipos, se usaron 128 individuos (ver sección 7.4.1 para la explicación de dicha resolución).

El ADN extraído se utilizó para realizar una amplificación por PCR de tres regiones de espaciadores de cloroplasto. Se utilizaron tres primers universales: intergénico Taberlet c-f (*trnL-trnF*) que comprende el intron del gen *trnL*, el gen *trnL* y el fragmento intergénico *trnL-trnF* (Taberlet *et al.* 1991) y los fragmentos intergénicos ShawNa-b (*petA-psbJ*) y ShawVc-d (*rpl32-trnL*) (Shaw *et al.*, 2007). En la Tabla 2 se muestra la información de

estos marcadores, que incluye la secuencia de cada primer, la región del genoma del cloroplasto en que se encuentra cada uno, y el tamaño reportado en pares de bases.

**Tabla 2.** Marcadores amplificados del cloroplasto para *Agave kerchovei*.

Marcador	Secuencia	Ubicación en el cloroplasto	Tamaño marcador(pb)
Taberlet cf trnL (c) – trnF (f)	trnL: GAAATCGGTAGACGCTACG trnF: ATTTGAACTGGTGACACGAG	LSC (large single copy)	938
ShawNab petA (Nb) - psbJ (Na)	psbJ: ATAGGTACTGTARCYGGTATT petA: AACARTTYGARAAGGTTCAATT	LSC (large single copy)	1269
ShawVcd rpl32 (Vd)- trnL (Vc)	trnL : CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT rpl32f: CAGTTCCAAAAAACGTA CTTC	SSC (small single copy)	649

Las condiciones usadas para la reacción de PCR y el programa de amplificación del termociclador fueron prácticamente iguales para los tres marcadores, excepto por la concentración de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>), siendo de 1mM (Taberlet cf), 1.5 mM (Shaw Vcd) y 2 mM (Shaw Nab); y en la etapa de alineación en el termociclador se emplearon 30 segundos para Taberlet cf y Shaw Vcd, y 50 segundos para Shaw Nab. Los valores de las condiciones se muestran en la Tabla 3. Los productos fueron visualizados en geles de agarosa al 1% a 110 Volts por 15 -20 minutos, para verificar la correcta amplificación y el tamaño.

Posteriormente los productos de PCR se mandaron a secuenciar al Centro de Servicio de secuenciación de la Universidad de Washington (High Throughput Sequencing Unit). Para cada individuo se enviaron dos muestras del producto de PCR, uno para el primer *forward* y otro para el primer *reverse*, a fin de tener todo el fragmento completo de la mejor calidad posible.

**Tabla 3.** Condiciones de las reacciones del PCR para cada marcador amplificado, La reacción fue de 30  $\mu$ L total. (Izquierda). Programa utilizado en la amplificación en el termociclador (Derecha).

<b>Contracción inicial del reactivo</b>	<b>Concentración final de en cada reacción</b>
BSA	5%
Tritón	0.1-0.15%
Buffer (10x)	1X
MgCl <sub>2</sub> 30 mM	1 mM (Taberletcf); 1.5mM (ShawVcd); 2mM (ShawNab)
NT P's	0.2 mM c/u
primer Forward	0.3 $\mu$ M
primer Reverse	0.3 $\mu$ M
Taq Polimerasa	1 U/ $\mu$ L
DNA	40 ng/ $\mu$ L (2 $\mu$ L)

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura y tiempo</b>
<b>Iniciación (1 ciclo)</b>	94°C / 5 min.
<b>(35 ciclos)</b>	
<b>Desnaturalización</b>	94°C / 30 seg.
<b>Alineación</b>	55°C / 30 seg. (Taberlet cf y Shaw Vcd) 55°C / 50 seg. (Shaw Nab)
<b>Extensión</b>	72°C / 1 min.
<b>Finalización (1 ciclo)</b>	72°C / 8 min.
<b>Reposo</b>	4°C

## 7.4 Análisis de las secuencias de ADN de cloroplasto

Las secuencias fueron revisadas en pares con los programas Phred (Ewing *et al.*, 1998) y Pharp y Consed (Gordon *et al.*, 1998) para tener una sola secuencia de los dos primers (*forward* y *reverse*) obtenidos de la secuenciación. Se analizaron cada uno de los cromatogramas de todos los individuos a fin de tener las secuencias lo más completas y corroborar la calidad de la señal de cada una.

Posteriormente con el programa BioEdit Versión 7.1.3.0 (Hall, 1999) se realizó la alineación utilizando el algoritmo Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), contenido en la misma paquetería de BioEdit. El alineamiento fue realizado para cada marcador por separado, se verificó posteriormente la alineación obtenida de forma manual, y empleando la visualización de los cromatogramas simultáneamente cuando fue necesario.

### 7.4.1 Polimorfismos, variación y estructura genética.

Posterior al alineamiento se hizo un archivo concatenado de las tres regiones amplificadas con el programa DnaSP 5.10. (Librado y Rozas, 2009). Esta base de datos se utilizó para el resto de los análisis empleados en este trabajo. Con este mismo programa se

estimaron los sitios variables (sitios polimórficos) en las secuencias de los distintos haplotipos (i.e., secuencias de ADN que difieren en una o más bases).

Igualmente con DNAsp 5.10 se obtuvieron los siguientes parámetros de diversidad genética:  $h$  = número de haplotipos;  $H_d$  = diversidad haplotípica (Nei, 1987);  $\pi$  = diversidad nucleotídica (Nei, 1987),  $\theta$  de Watterson (Nei, 1987). Así como los valores de estructura génica y flujo génico, como la  $F_{st}$  (Hudson *et al.*, 1992),  $G_{st}$  (Nei, 1973),  $N_{st}$  (Lynch y Crease, 1990) y  $Nm$  (Hudson *et al.*, 1992).

Como se había mencionado anteriormente, para estos análisis se utilizaron 128 individuos en total, en los cuales se pudieron amplificar los tres marcadores. En ocho de los individuos no fue posible obtener la secuencia del marcador ShawNab y debido a que algunos programas excluyen automáticamente los sitios nombrados como “missing data” se optó por retirar estos individuos.

Se utilizó el programa DNAsp 5.10 para obtener las distancias genéticas de Nei (1987),  $D_{xy}$ , entre las poblaciones, las cuales son calculadas por sitio en vez de por las frecuencias haplotípicas. Con dichos valores se elaboró un árbol de distancias *Neighbor-Joining* (Saitou y Nei, 1987) usando el programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011).

A partir de la relación estadística que existe entre la diversidad nucleotídica  $\pi$  y  $\theta$  de Watterson, se pueden detectar eventos selectivos o demográficos mediante el uso de pruebas del modelo Wright-Fisher con mutación usada como hipótesis nula. Cuando no hay selección y ambos parámetros son iguales, indica que es posible que la población se haya mantenido constante; uno  $\pi$  es mayor que  $\theta$  indica que la población ha crecido y uno  $\pi$  es menor que  $\theta$  indica que la población ha disminuido o incrementado (Holsinger, 2012) (ver por ejemplo Garrigan *et al.*, 2002). Se realizó una prueba  $D'$  (Tajima, 1989) con el programa DnSP5 (Liu y Rozas, 2002) a fin de conocer qué relación existe entre dichos parámetros. Dicha relación se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$D' = \frac{\pi - \theta}{\sqrt{V(\pi - \theta)}}$$

donde  $V$  es la varianza entre ambos valores (Castillo, 2007).

Asimismo, se realizó una prueba con el programa PERMUT (Pons y Petit, 1996), con 1000 permutaciones para comprobar si existe una estructura filogeográfica. Dicho análisis se obtiene a partir de la comparación de los valores de  $N_{st}$  y  $G_{st}$ , es decir una prueba de alelos ordenados vs alelos no ordenados. Cuando los valores de  $N_{st}$  son significativamente mayores a  $G_{st}$  sugieren que la diferencia entre los haplotipos dentro de las poblaciones es menor a lo que se esperaría por azar, lo cual significa que existe estructura filogeográfica, es decir cuando los haplotipos similares genealógicamente se comparten entre las poblaciones similares (geográficamente más cercanas) (Pons y Petit, 1996).

Se realizó una prueba de AMOVA (Analysis of Molecular Variance), para determinar la variación dada por la diferenciación interpoblacional e intrapoblacional (Excoffier *et al.*, 1992). El análisis fue hecho con el programa Arlequin ver. 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) considerando dos grupos *a priori* a partir del árbol de distancias genéticas de Nei. Posteriormente se usó el programa SAMOVA (Dupanloup *et al.*, 2002), para definir a grupos geográficamente homogéneos que maximizaran la varianza genética, para dilucidar mejor la estructura genética. Dos pruebas de SAMOVA fueron realizadas, primero considerando los sitios con indels<sup>3</sup> (ocho sitios), con un total de 2,188 sitios del concatenado de los tres marcadores, y posteriormente otra prueba sin considerar estos 8 indels (2,180 sitios en total), y se probaron varios valores de  $K$ , para determinar con cuál de ellos es mayor la varianza.

Se realizó una prueba de Mantel, utilizando el paquete Stats de R (R. Core Team, 2012), para determinar si existe un patrón de aislamiento por distancia, utilizando una matriz de diferenciación genética  $F_{st}$  (obtenida con DNAsp 5.10) y una de distancias geográficas en kilómetros entre las poblaciones. El valor de la prueba de Mantel indica el grado de correlación entre las dos matrices, e indica que tanto puede predecir una de las matrices a la otra, siendo el valor de la regresión lineal.

---

<sup>3</sup> Un indel es un tipo de mutación que puede ser tanto una inserción como una delección (Hedrick, 2005), nombrado así por la combinación de los dos tipos de mutación que puede representar y se refiere a la diferencias de longitud de dos secuencias donde no es posible saber si esa diferencia es originalmente por una inserción en la secuencia o por una delección en ella (NCBI, 2014).

## 7.5 Red de haplotipos

Se construyó una red de haplotipos con el programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000). En ella, se describen las relaciones intraespecíficas de los haplotipos en forma de red, permite hacer relaciones reticuladas entre haplotipos, los une por medio de líneas y permite visualizar las formas faltantes entre los haplotipos y proporciona grados de jerarquía (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009). En estas redes se puede establecer cierto grado de —n str ” ntr los plot pos qu p n rán l r u n los plot pos y su posición en la red (Pfenninger y Posada, 2002). Adicionalmente se incluyeron en la red secuencias de haplotipos de *A. lechuguilla*<sup>4</sup> y *A. stricta*<sup>5</sup>, a fin de dar mayor certeza sobre cual podría ser el haplotipo ancestral para *A. kerchovei*.

Para la red se emplearon los indels como un quinto estado de carácter, puesto que estos caracteres sí resultan informativos en el análisis de las secuencias para *A. kerchovei*, así como para las especies empleadas como grupos externos. Se utilizó además el criterio de conexión entre haplotipos del 95% (Clement *et al.*, 2000).

## 7.6 Modelo de distribución potencial

Para la realización del modelo de distribución potencial de la especie se empleó el programa MaxEnt (Phillips *et al.*, 2006). La predicción obtenida con MaxEnt es una aproximación al nicho real de la especie (Eliosa *et al.*, 2010). Es un programa que utiliza un algoritmo de máxima entropía, con el cual logra resultados robustos en términos de la proyección espacial de la distribución, especialmente cuando se cuenta con pocos datos de presencias usado incluso en un enfoque de modelación de ecosistemas (Pliscoff y Fuentes-Castillo, 2011).

MaxEnt utiliza la información de presencia de la especie y la información de capas ambientales como temperatura y precipitación, a lo largo de un área geográfica designada que se divide en píxeles; mientras más pequeña sea el área seleccionada mayor será la resolución de las capas (Merow, 2013). Con estos datos hace un aproximación de en qué píxeles del área geográfica designada se pueden encontrar las condiciones ambientales similares a las que tienen las regiones de presencia de la especie maximizando la entropía

---

<sup>4</sup> Proporcionadas por la Biol. Natalia Martínez (Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Instituto de Ecología. UNAM.)

<sup>5</sup> Proporcionada por el M. en C. Enrique Scheinvar (Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Instituto de Ecología. UNAM.)

de ocurrencia de esas condiciones. De este modo, los píxeles en el mapa donde se encuentren las condiciones similares de los puntos de presencia se considerarán como una posible presencia para la especie en ese píxel. Así se va reconstruyendo el modelo de nicho ecológico para la especie. Estos valores son asignados en el mapa píxel por píxel, por una probabilidad denotada con una serie de colores (Phillips *et al.*, 2006). En este caso se estaría modelando el nicho fundamental, entendido como el conjunto de condiciones abióticas que la especie requiere para existir, por tanto las interacciones con otras especies no son consideradas (nicho realizado) (Begon *et al.*, 2006).

Los datos de presencia de la especie fueron obtenidos de puntos de colecta reportados para la especie. Una primera revisión de estos puntos fue realizando una búsqueda en la GBIF (*Global Biodiversity Information Facility*)<sup>6</sup>. Con esta información se elaboró una primera base de datos de puntos de colecta, pero al hacer la búsqueda en otras fuentes (las listadas en el siguiente párrafo) algunos de los ejemplares reportados en GBIF aparecían bajo otro nombre en publicaciones más recientes, por tanto se decidió no usar esos puntos debido a la nueva determinación. Así que finalmente sólo un registro se empleó de esta primera base, cuya referencia se encuentra en el portal de Jardín Botánico de Missouri (MO) (Tropicos, 2014)<sup>7</sup>.

La base de puntos de colecta se completó usando los ejemplares reportados en los *Marginatae Exsiccatae* de Gentry (1982), los ejemplares usados en la revisión de la Flora de Valle de Tehuacán-Cuicatlán (García-Mendoza, 2011) y ejemplares en la Red Mundial de Información Sobre Biodiversidad (REMIB), los cuales pertenecen a la Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México, FES-I UNAM (Dávalos, 2000). Se emplearon también registros procedentes del Herbario Nacional de México (MEXU), consultadas en línea (IBUNAM:MEXU:AGA1020301; IBUNAM:MEXU:AGA947976; IBUNAM:MEXU:AGA936719), para completar la base de datos.

Las georeferencias de cada uno de los registros se ingresaron en el programa Google Earth para confirmar su ubicación dentro del área de distribución reportada para *A. kerchovei*. Asimismo se utilizó dicho programa para georeferenciar las localidades que no

---

<sup>6</sup> Consultado en línea en el portal <http://www.gbif.org/>

<sup>7</sup> Ejemplar consultado del sitio Tropicos del Missouri Botanical Garden Herbarium (MO) fue C.A. Purpus – 3476. La referencia aparece en Literatura Citada según el formato sugerido por el portal.

contaban con coordenadas, realizando una búsqueda minuciosa de esas localidades, reuniendo un total de 39 registros de localidades georeferenciadas (Anexo 2).

Para la información ambiental, se tomaron en cuenta las 19 capas bioclimáticas (BIOCLIM) procedentes de World Clim, las cuales son un set de capas climáticas con resolución espacial aproximada de 1 km<sup>2</sup>, que contienen información sobre variables climáticas derivadas de los valores mensuales de temperatura y precipitación a fin de generar variables con mayor significado biológico. Estas representan tendencias anuales, estacionales, y factores ambientales extremos o limitantes (Hijmans *et al.*, 2005). Se incluyeron además cinco capas topográficas procedentes de Hydro 1k North America desarrolladas por el United States Geological Survey, (USGS, 2011)<sup>8</sup>.

Con MaxEnt se modeló la distribución potencial presente para *A. kerchovei*, así como una proyección al pasado para el Pleistoceno durante el último máximo glacial (hace entre 21 a 18 mil años, aproximadamente). La elección del conjunto de capas mencionadas anteriormente para la elaboración del modelo se realizó a partir de un análisis de componentes principales a fin de identificar variables correlacionadas (con información redundante), considerando los primeros cinco componentes que incluyen el 90.3% de la variación con coeficiente de correlación de Pearson de 0.7.

Para la elaboración final de los modelos en el programa se utilizaron las capas obtenidas del análisis de componentes principales con un recorte de las capas entre 14° - 21° y 100° - 95°, ya que la distribución descrita para la especie se restringe al Valle de Tehuacán-Cuicatlán (García-Mendoza, 2011). Además, se consideraron el 20 % de los puntos como porcentaje aleatorio de pruebas, realizando 30 réplicas por cada uno de los modelos (con bootstrap), sin extrapolar y con la obtención de pruebas de Jackknife para las variables.

---

<sup>8</sup> Las capas topográficas utilizadas fueron Aspect, Flow accumulation, Compound topographic index, Slope, Flow direction.

## 8 Resultados

Los tamaños finales en pares de bases obtenidas para cada marcador después del proceso de limpieza y alineación se muestran en la Tabla 4. La suma de los fragmentos obtenidos da como resultado un total de 2,246 pares de bases.

**Tabla 4.** Tamaño final (pares de bases, pb) de los marcadores de cloroplasto en *Agave kerchovei*.

Marcador	Tamaño marcador (pb), en literatura	Tamaño obtenido en la alineación (pb)
Taberlet cf <sup>9</sup> trnL (c) – trnF (f)	938	640
ShawNab petA (Nb) - psbJ (Na)	1269	1016
ShawVcd rpl32 (Vd)- trnL (Vc)	649	590

### 8.1 Diversidad Genética

En los archivos de alineación de las secuencias se revisó en que sitios existía variación. En la Tabla 5 se observan las regiones, el tipo de variación y en que poblaciones se encuentran. Estos corresponden a los sitios polimórficos, siendo ocho sitios con un cambio de base (SNPs), y ocho sitios considerados como indels. De los 136 individuos empleados en el análisis, en 128 se logró obtener los tres marcadores, de los ocho faltantes se obtuvieron solo dos marcadores (Taberlet cf y ShawVcd). En la Tabla 6 se indica cual es el número total de individuos utilizados en cada población para el análisis.

---

<sup>9</sup> La secuencia obtenida de este marcador contiene entre la posición 277-305 la secuencia del gen trnL (UAA) 3' exón (AGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCACCCCA), que se localiza entre los marcadores Taberlet d y e. Esto ocurre debido a que se amplificó desde Taberlet c hasta f, que es la suma de Tabc-d+trnL+Tabe-f.

**Tabla 5.** Variación encontrada en los marcadores de cloroplasto Taberlet c-f, ShawNa-b, ShawVc-d., en *Agave kerchovei*. El sitio indica el lugar en la secuencia donde se encuentra la variación, dentro de cada uno de los marcadores por separado.

Taberlet cf			
Sitio	Tipo	Cambio	Individuos y/o poblaciones
57-58	Microsatélite con repeticiones de dinucleótidos	A ; T	Poblaciones: 4,6
		(-) ; (-)	Poblaciones: 1,2,3,5,7,8; individuos: 4 5, 4 13, 4 19, 4 22,
Shaw Nab			
Sitio	Tipo	Cambio	Individuos y/o poblaciones
84	SNP	C	Individuos: 1 1, 1 19; Población 3
		T	Poblaciones: 1,2,4,5,6,7,8
291-331	Indel (Delección o Inserción)	Secuencia*	Individuos: 4 5, 4 13, 4 19, 4 22; Poblaciones: 1, 2, 3, 6, 7, 8
		Indel	Poblaciones: 4, 5
			*AAAGATTACTATTTCTCTTTTCCGGGTCTATCGAAATCC
361-369	Microsatélite	AAAAAAAAA (9)	Poblaciones: 1,2,3,4,5,7,8
		AAAAAAAAA (8)	Poblaciones: 6
451-456	Indel(Delección o Inserción)	AACTTA	Población: 6
		indel	Población: 1,2,3,4,5,7,8
797-605	Microsatélite	TTTTTTTT (9)	Poblaciones: 1,3,4,5,7,8
		TTTTTTTT (8)	Poblaciones: 2,6
774	SNP	C	Poblaciones 1,3,4,5,6,7,8
		T	Poblaciones 2
822	SNP	C	Individuos: 4 5, 4 13, 4 19, 4 22; Poblaciones: 1,2,3,6,7,8
		T	Poblaciones: 4,5
844	SNP	T	Individuo: 1 12
		A	Poblaciones: 1,2,3,4,5,6,7,8
Shaw Vcd			
Sitio	Tipo	Cambio	Individuos y/o poblaciones
79	SNP	C	Poblaciones: 1,2,3,4,5,7,8
		T	Población: 6
176	SNP	G	Poblaciones: 1,3,4,5,7,8
		A	Poblaciones: 2,6
296-309	Inversión	CTTTGTTTCATTCT	Individuos: 4 5, 4 13, 4 19, 4 22; Poblaciones: 1,2,6,7,8
		AGAATGAACAAAG	Individuo: 8 2; Poblaciones: 3,4,5
358-368	Microsatélite	AAAAAAAAA (9)	Poblaciones: 1,3,4,5,7,8
		AAAAAAAAA (10)	Población: 6
		AAAAAAAAA (11)	Población: 2
578	SNP	G	Poblaciones: 1,2,3,4,5,6,7,8
		T	Individuo: 1 6

**Tabla 6.** Total de individuos utilizados en el análisis para cada población (n).

Población	n	Ubicación
1	20	4.47 km en L.R. al SW de Santa María Coapan, Puebla
2	4	6.94 km en L.R. al NW de Villa de Tamazulapam del Progreso, Oaxaca
3	8	3 km en L.R. al NW de Villa de Tamazulapam del Progreso, Oaxaca
4	20	4.19 km en L.R. al NE de Santa María Ixcatlán, Oaxaca
5	23	3.2 km en L.R. al W de Santa María Ixcatlán, Oaxaca
6	20	±km 33 de la carretera Ayutla-Oaxaca a 400 m por la carretera al W de Santa María Albarradas, Oaxaca
7	20	"Tocolotiopa", San Gabriel Casa Blanca, Oaxaca
8	21*	"Cerro de las Compuertas", San Rafael, Coxcatlán, Puebla.

\* Para esta población se consideran sólo 13 individuos para los análisis de variación ya que solo con esos se lograron obtener los tres marcadores.

Los 16 sitios polimórficos (ocho sitios con SNP's y ocho con indels) generan los 10 haplotipos encontrados. Dado que los indels pueden ser considerados como una delección de bases o una inserción, es difícil determinar cuál de los dos eventos ocurrió, así que para analizar este tipo de variación se optó por considerarla como un solo evento para la región donde se localizó este tipo de variación en las secuencias (Tabla 5). Un tratamiento similar se empleó para la inversión encontrada en ShawVcd, sitios 296-309 (Tabla 5); en este caso se utilizó una de las bases de la inversión para delimitar la variación en esos sitios. Una inversión no es como un indel, porque existe todo el fragmento de pares de bases que se invierte por completo (fragmento de 14 bases) y no existen versiones intermedias, por lo que también se puede considerar como un solo evento de mutación, aunque sean varios los sitios que intervienen, por lo que se consideró como un solo evento mutacional. En la Tabla 7 se muestra cual fue la forma en que fueron analizados estos tipos de variación. Las consideraciones anteriores son útiles para la construcción de la red de haplotipos, debido a que el programa une los haplotipos con un porcentaje de límite de conexión, que se refiere al número máximo de conexiones mutacionales entre dos pares de secuencias justificadas por el criterio de parsimonia (Clement *et al.*, 2000), es decir se ser mayor a este porcentaje los considera como dos secuencias completamente distintas sin conexión alguna.

**Tabla 7. A)** Haplotipos obtenidos de los sitios polimórficos en las secuencias de tres regiones de espaciadores de cloroplasto: Taberlet c-f (trnL-trnF), ShawNa-b (petA-psbJ) y ShawVc-d (rpl32-trnL). Los números representan la posición en la secuencia donde está la variación, sobre los sitios se encuentra delimitado a que secuencia corresponde la variación. **B)** Se muestran además el tipo de variación que presenta cada sitio en el concatenado. (Bases Nitrogenadas.- A: Adenina; T: Timina; G: Guanina; C: Citosina; GAP: —).

**A)**

Haplotipos/Sitios	Taberlet cf		Shaw Nab								ShawVcd					
	57	58	724	931	969	1051	1200	1369	1417	1439	1690	1787	1097	1965	1966	2176
Hap 1	A	T	C	A	A	-	T	C	C	A	C	G	T	-	-	G
Hap 2	A	T	T	A	A	-	T	C	C	A	C	G	T	-	-	G
Hap 3	A	T	T	A	A	-	T	C	C	T	C	G	T	-	-	G
Hap 4	A	T	T	A	A	-	T	C	C	A	C	G	T	-	-	T
Hap 5	A	T	T	A	A	-	-	T	C	A	C	A	T	T	T	G
Hap 6	A	T	C	A	A	-	T	C	C	A	C	G	G	-	-	G
Hap 7	-	-	T	-	A	-	T	C	T	A	C	G	G	-	-	G
Hap 8	A	T	T	-	A	-	T	C	T	A	C	G	G	-	-	G
Hap 9	-	-	T	A	-	A	-	C	C	A	T	A	T	T	-	G
Hap 10	A	T	T	A	A	-	T	C	C	A	C	G	G	-	-	G

**B)**

Sitio	Tipo de variación
57, 58	Microsatélite con repeticiones de dinucleótidos, considerado como un solo evento
724	SNP
931	Indel considerado como un solo evento (A, —)
969	Microsatélite
1051	Indel considerado como un solo evento (A, —)
1200	Microsatélite
1369	SNP
1417	SNP
1439	SNP
1690	SNP
1787	SNP
1907	Inversión considerada como SNP (T, G)
1965, 1966	Microsatélite (tres formas)
2176	SNP

El archivo concatenado final de las tres regiones amplificadas resultó en 2,188 pb, (Tabla 7). El número de sitios variables totales (sitios segregantes, *S*), es de 16, sin embargo ocho de ellos corresponden a indels, y en varios análisis que realizan los programas son excluidos de forma automática. Con los SNPs se obtienen nueve haplotipos (*h*), a diferencia de cuando se consideran los ocho sitios variables con indels (incluidos los microsatélites), se obtienen diez haplotipos.

La diversidad haplotípica ( $Hd$ ) es alta, de 0.718, con una varianza de 0.00054 y una desviación estándar de 0.023 (Tabla 8). Sin embargo, el valor de la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) es de 0.00078; y el parámetro  $\theta$  de Watterson tiene un valor de 0.00068, lo que indica una diversidad nucleotídica muy baja (Tabla 8).

**Tabla 8.** Estimadores de diversidad genética para cada una de las poblaciones de *Agave kerchovei*.

Población	N	S	h	Hd	$\pi$
1	20	3	4	0.36316	0.00018
2	4	0	1	0	0
3	8	0	1	0	0
4	20	2	2	0.33684	0.00031
5	23	0	1	0	0
6	20	0	1	0	0
7	20	0	1	0	0
8	13	1	2	0.15385	0.00007
<b>Total</b>	<b>128</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>0.71801</b>	<b>0.00078</b>

N= número de muestras; h= número de haplotipos; Hd= diversidad haplotípica;  $\pi$ = diversidad nucleotídica; S= sitios segregantes

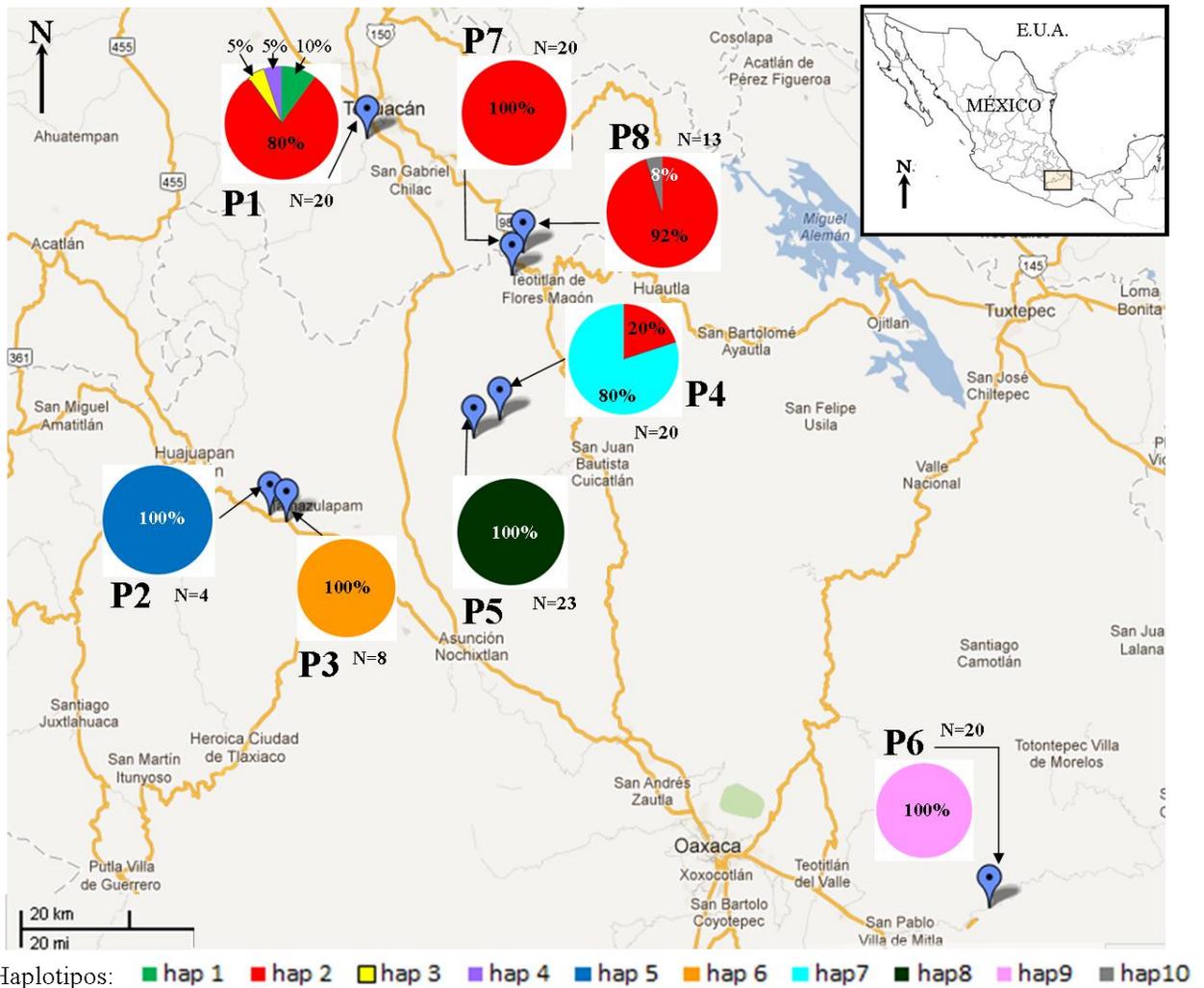
En la Figura 3 se observa cuáles son los haplotipos que se encuentran presentes en cada una de las poblaciones y la cantidad de individuos que poseen cada haplotipo (mostrados en porcentajes). Se encontró que la mayoría de las poblaciones son monomórficas, es decir presentan sólo un haplotipo, siendo el haplotipo 2 el único compartido (en 4 poblaciones: 1, 4, 7, 8) y el más frecuente (41%). Los haplotipos más comunes en la especie después del haplotipo 2 son el haplotipo 8 (18 %), haplotipo 9 (16%) y el haplotipo 7 (12%); mientras que el resto de los haplotipos poseen una frecuencia menor al 10%. Las frecuencias totales de cada uno de los haplotipos se muestran en la Tabla 9, ordenados de mayor a menor frecuencia.

**Tabla 9.** Frecuencia total (%) de los haplotipos encontrados para *Agave kerchovei*.

Haplotipo	Frecuencia (%)
Hap2	41
Hap8	18
Hap9	16
Hap7	12
Hap6	6
Hap5	3
Hap1	1
Hap3	1
Hap4	1
Hap10	1

La población 1, la más norteña, es la población que posee más haplotipos (3 únicos) además del compartido, siendo la población con más variación intrapoblacional. Le siguen las poblaciones 4 y 8 con un haplotipo único cada una, más el compartido; mientras que la población 7 posee sólo el haplotipo compartido y finalmente las poblaciones 2, 3, 5 y 6 poseen sólo un haplotipo propio. De este modo se observa que existe una alta diferenciación entre las poblaciones, y una baja variación genética dentro de ellas.

La prueba de Tajima ( $D'$ ) se realizó para la totalidad de las secuencias (128) de *A. kerchovei*, el valor obtenido en la prueba fue positivo, sugiriendo una contracción poblacional de 0.37320, sin embargo el valor de la prueba no fue significativo ( $p= 0.704$ )



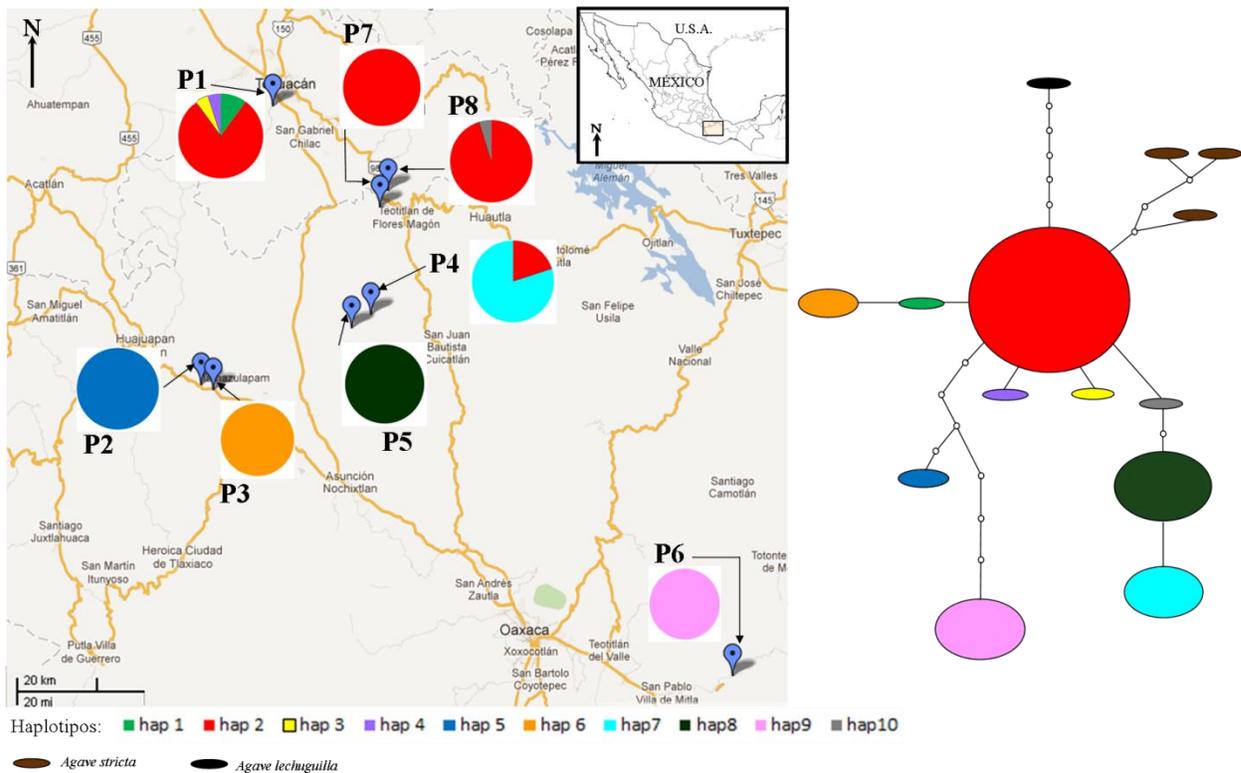
**Figura 3.** Distribución espacial de los haplotipos de Taberletcf - ShawNab - ShawVcd en las poblaciones de *Agave kerchovae* L s p o l o n s t á n o s s o n u n “P” y l n ú m r o q u e l s o r r o n P o l n = P P o l n = P t L o s p l o t p o s t á n n o t o s p o r “H p” y u n n ú m r o H a p 1, H a p 2, e t c., a l o s c u a l e s s e a s o c i a u n c o l o r d i s t i n t o. J u n t o a c a d a g r á f i c o s e c o l o c ó e l n ú m e r o d e i n d i v i d u o s e m p l e a d o s p o r p o b l a c i ó n. C a d a g r á f i c o r e p r e s e n t a e l p o r c e n t a j e d e a p a r i c i ó n d e l o s d i s t i n t o s h a p l o t i p o s p a r a l a s d i s t i n t a s p o b l a c i o n e s (m o d i f i c a d o d e G o o g l e M a p s, 2 0 1 3).

## 8.2 Red de Haplotipos

La red de haplotipos se muestra en la Figura 4. Cada uno de los haplotipos se marcó con un color, y el tamaño de la figura representa la proporción de organismos que poseen dicho haplotipo. Los círculos sin color representan pasos mutacionales que no se han encontrado en los muestreos, de los cuales se infirieron los cambios mutacionales que debería de tener ese haplotipo hipotético para conectar con los haplotipos encontrados. En el caso de los sitios 57 y 58 (Tabla 7), se consideró como un solo cambio mutacional, a

pesar de que son dos bases las que cambian, ya que estos sitios corresponden a un microsatélite con repeticiones de dinucleótidos que sigue un modelo de paso a paso.

La red sugiere que el haplotipo 2 (presente en poblaciones 1, 4, 7 y 8) es el haplotipo ancestral, siendo el que tiene más conexiones con otros haplotipos. Además de los diez haplotipos encontrados para *A. kerchovei* la red incluye tres haplotipos de *A. stricta* y un haplotipo de *A. lechuguilla*, en la cual se observa que los haplotipos de las especies mencionadas se unen de forma directa al haplotipo 2, apoyando su condición ancestral.



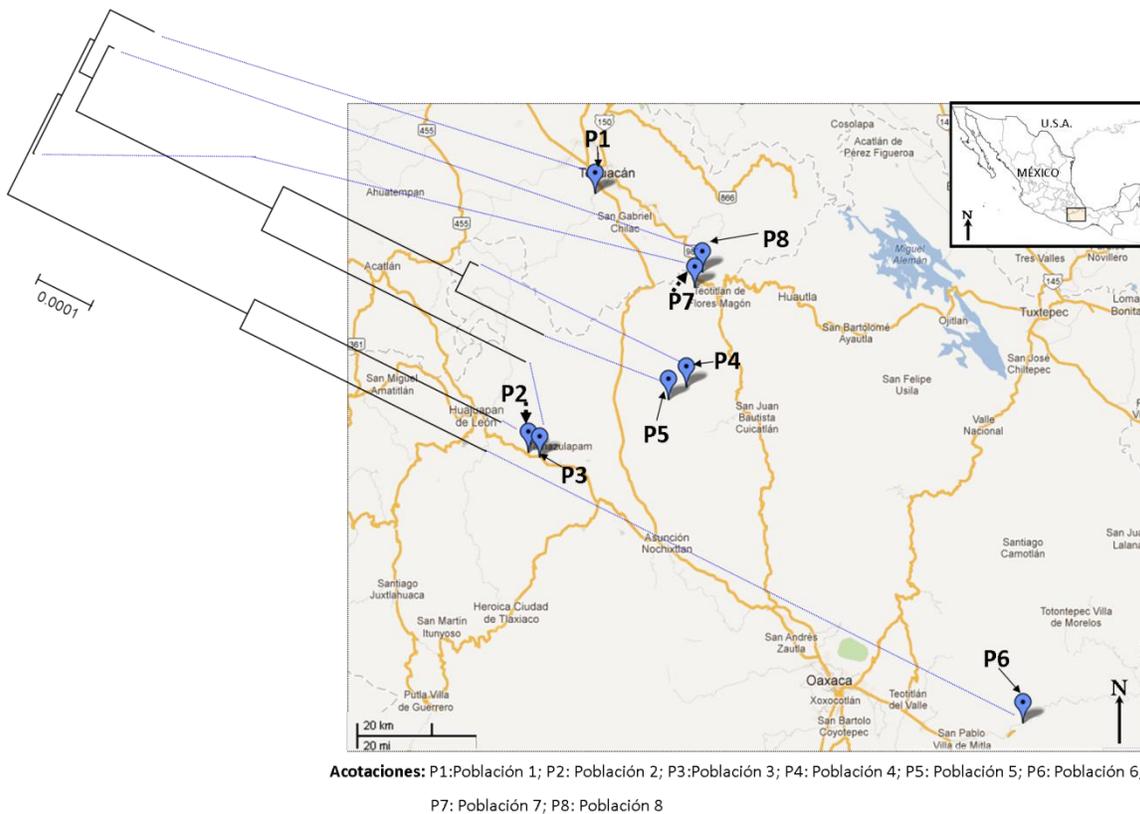
**Figura 4.** Red de haplotipos obtenida con el programa TCS 1.21, de fragmentos del cloroplasto utilizando los marcadores Taberlet c-f, ShawNa-b y ShawVc-d (concatenados) para *Agave kerchovei*. Cada haplotipo fue designado con un color diferente. Los nodos representan los haplotipos hipotéticos que no se han encontrado en los muestreos. La red incluye tres haplotipos de *A. stricta* (elipses color café) y un haplotipo de *A. lechuguilla* (elipse color negro). Se incluye además la distribución espacial de los haplotipos en las distintas poblaciones. (Mapa modificado de Google Maps, 2013).

### 8.3 Estructura genética

Los estimadores de estructura genética son altos, reflejo de que muchos haplotipos son únicos:  $F_{st}$  (Hudson *et al.*, 1992) = 0.92866 ( $Nm=0.04$ );  $N_{st}$  (Lynch y Crease, 1990) = 0.92869 ( $Nm=0.04$ ) y  $G_{st}$  (Nei, 1973) = 0.82487 ( $Nm=0.11$ ), todos obtenidos con DNAsp.

Al comparar los valores de  $N_{st}$  y  $G_{st}$ , con el programa PERMUT se obtuvo que el valor de  $N_{st}$  (0.943) que no fue significativamente mayor al de  $G_{st}$  (0.880) ( $p=0.057$ ), lo que sugiere que no existe un patrón filogeográfico que explique la estructura observada.

La diferenciación entre poblaciones se puede visualizar con el árbol de distancias genéticas de Nei ( $D_{xy}$ ), donde se forman dos grupos, uno conformado por las poblaciones 1, 3, 4, 5, 7 y 8; y otro grupo donde están las poblaciones 2 y 6 (Figura 5). Voy a denominar a estos grupos como A y B respectivamente. Dentro del grupo A existen dos subgrupos: A1 (poblaciones 1, 7 y 8) y A2 (poblaciones 3, 4 y 5), donde el subgrupo A2 es el más diversificado. En Anexo 3 se muestran los valores de las distancias genéticas obtenidas con las cuales se construyó el árbol.



**Figura 5.** Superposición del árbol de distancia de Nei (1987) sobre el mapa de distribución de las poblaciones de *Agave kerchovei*. Las líneas punteadas en color azul son referencia para ubicar cada población con su nodo en el árbol. Los grupos de poblaciones designados son: Grupo A con el subgrupo A1 (poblaciones 1, 7 y 8) y A2 (poblaciones 3, 4 y 5). Grupo B (Poblaciones 2 y 6).

Los grupos A y B se usaron en el AMOVA (Tabla 10). De este análisis se obtuvo que el mayor grado de estructura esté dado por la varianza entre los grupos propuestos de poblaciones (65%). Por lo tanto, la mayor parte de la variación dentro de la especie se explica por las diferencias que hay entre los grupos obtenidos, dentro del rango de distribución de la especie, más que en la diferencia dentro de las poblaciones.

**Tabla 10.** Resultados de AMOVA, considerando dos grupos de poblaciones de *A. kerchovi*. Los grupos elegidos para la prueba son: A (subgrupo A1: poblaciones 1, 7 y 8; subgrupo A2: poblaciones 3, 4 y 5) y B (poblaciones 2 y 6).

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Varianza de los componentes	Porcentaje de variación
Entre grupos	1	128.037	2.71570 Va	65.70
Entre poblaciones dentro de los grupos	6	115.403	1.2586 Vb	30.14
Dentro de las poblaciones	120	20.623	0.17186 Vc	4.16
Total	127	264.062	4.13342	
Índices de Fijación				
Fsc:	0.87878			
Fst:	0.95842			
Fct:	0.65701			

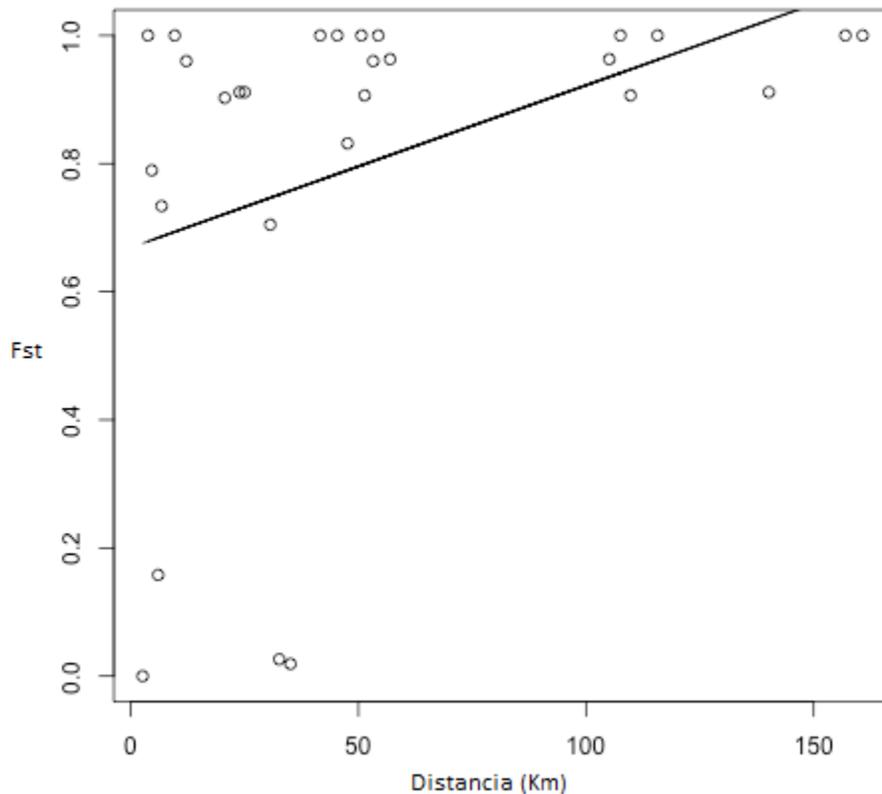
Con el programa SAMOVA (Tabla 11), se analizó con más detalle la distribución de la variación en la especie y sus poblaciones. Se observa que sin importar si consideramos los sitios notados como AP's o no el mayor porcentaje de la variación (K=6 con un valor  $t = 9.5$ ) se encuentra en los AP's y 937 sitios no notados. Los grupos formados en los sitios no notados AP's solamente por los análisis, y corresponde a las poblaciones donde el haplotipo 2 es común y las otras que no lo tienen o donde el haplotipo 2 es raro.

**Tabla 11.** Resultado del análisis de SAMOVA para las tres regiones amplificadas en *Agave kerchovei*, considerando los 6 sitios de las 8 AP's y los 8 sitios de las 8 AP's

K	Sin GAP's		GAP's como 5to estado	
	Grupos (poblaciones)	Fct	Grupos (poblaciones)	Fct
2	(2,6) y (1,3,4,5,7,8)	<b>0.51959</b>	(6), (1,2,3,4,5,7,8)	<b>0.68596</b>
3	(2,6), (3,4,5) y (1,7,8)	<b>0.69653</b>	(6), (4,5) y (1,2,3,7,8)	<b>0.72485</b>
4	(3), (2,6), (4,5), (1,7,8)	<b>0.82221</b>	(6), (4,5), (2) y (1,3,7,8)	<b>0.80231</b>
5	(3), (4,5), (2), (6), (1,7,8)	<b>0.91054</b>	(6), (4,5), (2), (3) y (1,7,8)	<b>0.84852</b>
6	(3), (4), (5), (2), (6), (1,7,8)	<b>0.91574</b>	(6), (4), (5), (2), (3) y (1,7,8)	<b>0.93788</b>
7	(3), (4), (5), (2), (6), (1), (7,8)	<b>0.91204</b>	(6), (4), (5), (2), (3) y (1) (7,8)	<b>0.93367</b>

#### 8.4 Aislamiento por distancia

El valor de la prueba de Mantel indica el grado de correlación entre las dos matrices, e indica que tanto puede predecir una de las matrices a la otra, siendo el valor de la regresión lineal. En este caso hay cierto grado de correlación pero es bajo, porque hay poblaciones muy cercanas y completamente diferentes y otras igualmente cercanas pero similares genéticamente (Fig. 6,  $r=0.374$  y  $P=0.0798$ ;  $\text{lim.2.5\%}= 0.2384$ ,  $\text{lim.97.5\%}= 0.5198$ , con 10000 permutaciones), que resulta no significativo. Por tanto no existe un aislamiento por distancia para *A. kerchovei*.



**Figura 6.** Prueba de Mantel. Se muestra la correlación entre la matriz de distancias geográficas (km) y el grado de diferenciación genética ( $F_{st}$ ). Valores obtenidos de la correlación de matrices:  $r = 0.374$  y  $P = 0.0798$ . La prueba resulta en un valor no significativo.

### 8.5 Modelo de distribución potencial

El modelo de distribución potencial obtenido con MaxEnt corresponde a la media de las 30 réplicas elaboradas para el modelo presente y la proyección al pasado (último máximo glacial, 21 mil años aproximadamente).

Para construir los modelos se emplearon finalmente 12 capas (nueve climáticas y tres topográficas), resultado del análisis de componentes principales. Los valores de las curvas de omisión y ROC (*Receiver Operating Characteristics*) que evalúan el ajuste del modelo muestran que se trata de un buen modelo y por tanto de una buena proyección (Anexo 4).

En el modelo el aporte de cada una de las variables se muestra en la Tabla 12. Las capas con el mayor porcentaje de contribución son la precipitación del trimestre más

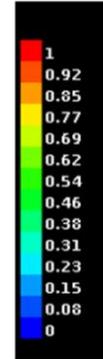
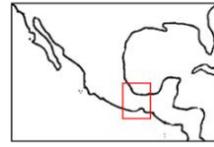
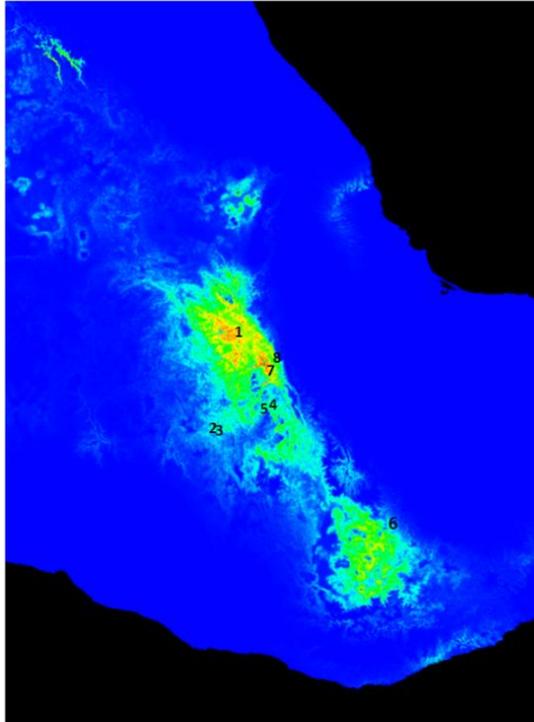
húmedo con un 60.9 % y la precipitación estacional (coeficiente de variación), con 16.3 % de contribución al modelo. Mientras que las demás capas tienen un porcentaje de contribución menor a 7%. Se observa que la primera capa (precipitación del trimestre más húmedo), contribuye con casi el total de la información al modelo.

**Tabla 12.** Porcentajes de contribución de las capas bioclimáticas y topográficas empleadas para el modelo de los modelos de distribución potencial presente y su proyección al pasado (último máximo glacial) elaborados con MaxEnt para *Agave kerchovei*.

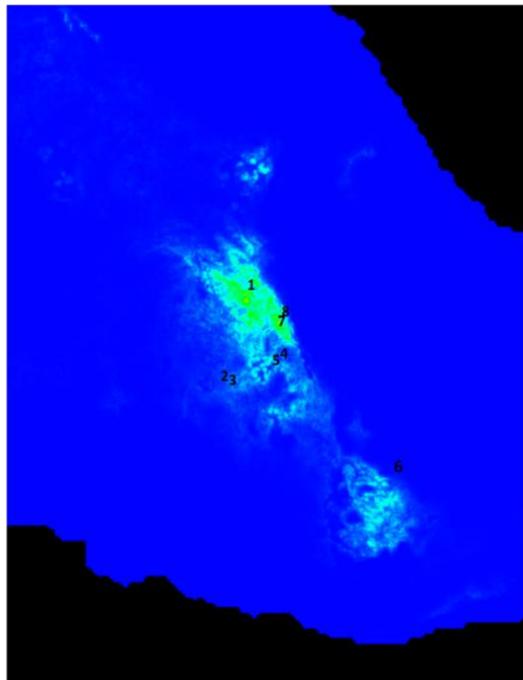
Variable	Porcentaje de contribución
Precipitación del trimestre más húmedo	60.9
Precipitación estacional (coeficiente de variación)	19
Pendiente	6.8
Rango anual de Temperatura	2.7
Precipitación anual	2.6
Estacionalidad de la Temperatura (desviación estándar *100)	2.3
Temperatura media del trimestre más seco	2
Acumulación de flujo	1.7
Precipitación del mes más húmedo	0.7
Índice de componente topográfico	0.6
Temperatura media del trimestre más húmedo	0.4
Isotermalidad (*100)	0.2

En la Figura 7 se muestra un comparativo del modelo al presente y su proyección al pasado. El modelo de distribución potencial presente está acotado a la región del Valle de Tehuacán-Cuicatlán y ligeramente extendido hacia la costa de Oaxaca, el sur, principalmente la zona cercana a Mitla. La zona mayormente representada es el área cercana a Tehuacán, donde se localizan las poblaciones 1,7 y 8. Las poblaciones 2, 3 ,4 y 5 se sitúan más al sur donde el valor de rango de color es menor, siendo áreas cerca de los límites de la distribución potencial. Además la distribución está ligeramente disyunta en la zona de los valles centrales de Oaxaca, donde se aprecia otra zona ligeramente más propensa para el desarrollo de *A. kerchovei*, muy cercano a la población 6.

A) Presente



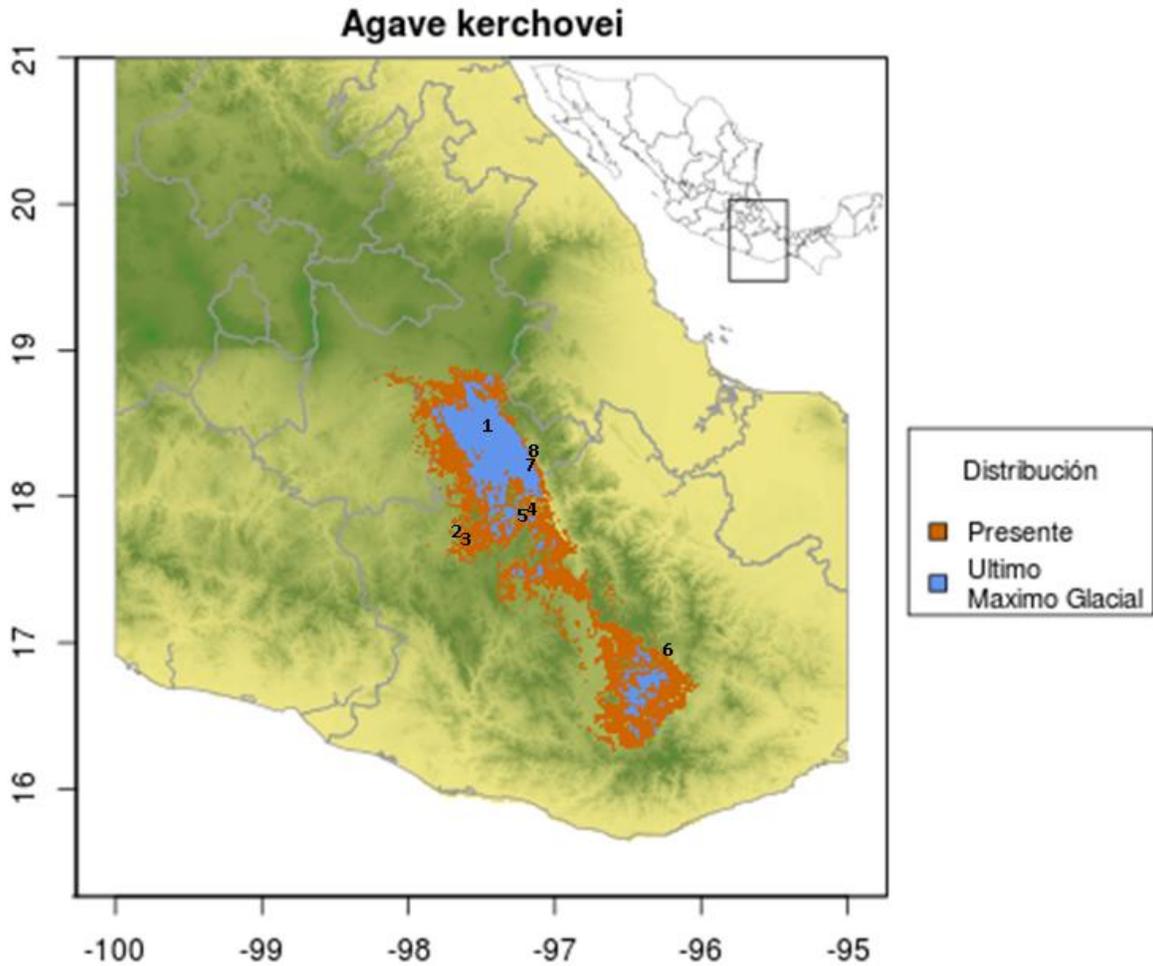
B) Último Máximo Glacial



**Figura 7.** Distribución potencial de nicho elaborados con MaxEnt para *Agave kerchovei* en el tiempo presente (A), así como una proyección al Pleistoceno durante el último máximo glacial, hace 21 mil años aproximadamente (B). La escala de pixeles corresponde a una mayor probabilidad para los colores cálidos y menor para los colores fríos. Los números en color negro corresponden a las ocho poblaciones estudiadas en este trabajo.

Para la proyección del último máximo glacial, el área representada es considerablemente menor que a la del presente, sin embargo se puede apreciar una forma similar de distribución: más concentrada en la parte norte, cerca de Tehuacán, Pue. con una disyunción más marcada en la zona de los valles centrales de Oaxaca, y una parte representada por las zonas cercanas a Mitla, Oax. Sin embargo la escala de colores nos indica que para ese momento los lugares idóneos para el desarrollo de la especie tal y como es su ambiente actualmente estaban muy reducidos. De modo que la localización actual de las poblaciones 2, 3, 4, 5 y 6 se encuentran fuera de los lugares en los que pudo desarrollarse en aquel tiempo, lo cual significaría que dichas poblaciones podrían ser de recién colonización.

En la Figura 8 se muestra una superposición del área de modelación de distribución potencial del presente con la proyección al último máximo glacial. En ésta puede notarse más claramente las zonas en las cuales pudo estar restringida la distribución de la especie hace 21,000 mil años aproximadamente, de tal manera que después de que el clima cambiara nuevamente inició un proceso de expansión del área potencial de distribución para la especie, principalmente de las zonas cercanas a Tehuacán, Puebla con dirección hacia el sur; así como de la zona cercana a Mitla, Oaxaca. Desde estas áreas comenzaría una colonización de ambientes, para tener la distribución que se conoce actualmente.



**Figura 8.** Mapa de superposición de la distribución potencial presente para *Agave kerchovei*, y su proyección al último máximo glacial (21, 000 años). Los números negros corresponden a las ocho poblaciones estudiadas en este trabajo.

## 9 Discusión

### 9.1 Diversidad y estructura genética

Los valores de diversidad haplotípica total en el cloroplasto encontrados para *A. kerchovei* resultan altos especialmente considerando que es una especie con distribución restringida. En total se encontraron 16 sitios polimórficos (ocho SNP's más o o indels), por lo que la diversidad haplotípica ( $Hd$ ) es de 0.718. Sin embargo, al analizar a las poblaciones por separado la diversidad haplotípica es baja, inclusive de cero para algunas poblaciones. La diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) total es de 0.00078 y el parámetro  $\theta$  de Watterson presentó un valor de 0.00068.

Los valores de estructura genética encontrados para *A. kerchovei* ( $F_{st} = 0.92866$ ,  $G_{st} = 0.82487$ ), son más altos que los reportados para marcadores nucleares en Piñero *et al.* (2008a) y Eguiarte *et al.* (2013) (Tabla 13). Por otro lado, los valores de diversidad genética obtenida no pueden compararse entre distintos tipos de marcador, ya que se comportan muy diferente, debido a su naturaleza, el tipo de herencia que presentan y su tamaño efectivo (Astorga, 2008; Eguiarte *et al.*, 2013).

**Tabla 13.** Sumario de los valores promedio de estructura genética ( $F_{st}$  o  $G_{st}$ ) para distintas especies del género *Agave*, utilizando distintos marcadores reportados en las compilaciones elaboradas por Piñero *et al.* (2008a) y Eguiarte *et al.* (2013). Se muestra además un promedio de cada marcador para varios estudios con otras plantas incluido en la recopilación elaborada por Piñero *et al.* (2008a)<sup>10</sup>

Marcador	$F_{st}$ o $G_{st}$ (promedio)	Promedio Plantas
A LP's	0.175	-----
Isoenzimas	0.170	-----
RAPD's	0.317	0.34 ± 0.12
ISSR's	0.140	0.35 ± 0.25
Microsatélites	0.454	-----

Al comparar los resultados de este estudio con otros de otras zonas áridas de México (Tabla 14), en donde se utilizó el cloroplasto como marcador, se confirma que los valores de diversidad para *A. kerchovei* son similares a nivel de especie, a pesar de que la mayoría de las poblaciones de la especie resultaron monomórficas. Algunos de los trabajos en los que se han empleado marcadores de cloroplasto corresponden a plantas de zonas semiáridas, como en Martínez (2012), donde se presentan *A. striata* y *A. stricta*, ésta última localizada también en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Además del estudio realizado por Aguirre (2012), donde se trabajó con *Fouquieria shrevei* una especie endémica de Coahuila, México.

<sup>10</sup> El valor de los promedios para algunos de los marcadores son citados por Piñero *et al.* (2008a) de Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13: 1143-1155. Donde se hizo una comparación de diversidad genética entre y dentro de poblaciones silvestres de varias angiospermas y gimnospermas.

**Tabla 14.** Comparación de valores de diversidad genética a nivel de cloroplasto entre *Agave kerchovei* y otras especies de plantas.

Especie	Marcador	n	pb	S	h	Hd	$\pi$	$\theta$ de Watterson	$F_{st}$	$G_{st}$	Referencia
<i>Agave striata</i>	trnF-trnL petA-psbJ rpl32-trnL	54	2100	16	5	0.713	0.00166	0.00084	0.938	0.697	Martínez 2012
<i>Agave stricta</i>	trnF-trnL petA-psbJ rpl32-trnL	57	2100	6	3	0.524	0.00047	0.00021	0.944	0.898	Martínez 2012
<i>Fouquieria shrevei</i>	trnF-trnL ndhF-rpl32 rpl32-trnL	92	2769	16	9	0.743	0.00077	0.00078	0.651	0.705	Aguirre 2012
<i>Agave kerchovei</i>	trnL-trnF petA-psbJ rpl32-trnL	128	2188	16*	10*	0.71801	0.00078	0.00068	0.929	0.825	Presente trabajo

n= número de individuos empleados; pb=pares de bases; S=sitios polimórficos; h= número de haplotipos; Hd= diversidad haplotípica;  $\pi$ = diversidad nucleotídica. \*Considerando sólo ocho sitios polimórficos, resultan diez haplotipos considerando los 16 sitios polimórficos, los ochos restantes son Indels.

En el caso de las otras especies de *Agave*, *A. kerchovei*, resulta tener una alta diversidad haplotípica mayor a la que se ha encontrado en *A. stricta*, pero casi igual que en *A. striata*. Mientras que la diversidad nucleotídica para *A. kerchovei* (0.00078) es mayor que *A. stricta* (0.00047), es casi igual a *F. shrevei* (0.00077), y mucho menor que *A. striata* (0.00166). Por tanto las cifras de diversidad genética para *A. kerchovei* indican una alta diversidad haplotípica para la especie y bajos valores de diversidad nucleotídica.

Al comparar los parámetros de diferenciación ( $F_{st}$  y  $G_{st}$ ) se puede observar que *A. kerchovei* tiene un grado de estructura genética muy alto ( $F_{st}$ =0.929), que es similar a las dos especies de *Agave* con las que se compara: menor que *A. striata*<sup>11</sup> ( $F_{st}$  =0.938) y *A. stricta*<sup>12</sup> ( $F_{st}$  =0.944), pero mayor a *F. shrevei* ( $F_{st}$  =0.651); mientras que para el valor de  $G_{st}$  de *A. kerchovei* ( $G_{st}$  = 0.825) es mayor *F. shrevei* ( $G_{st}$ =0.705) y a *A. striata* ( $G_{st}$ =0.697), pero menor a *A. stricta* ( $G_{st}$ =0.898).

<sup>11</sup> Especie con amplia distribución: zonas áridas de los estados de Hidalgo, Querétaro, San Luis Potosí, Nuevo León, Tamaulipas y Coahuila.

<sup>12</sup> Endémica del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

## 9.2 Modelo de distribución potencial

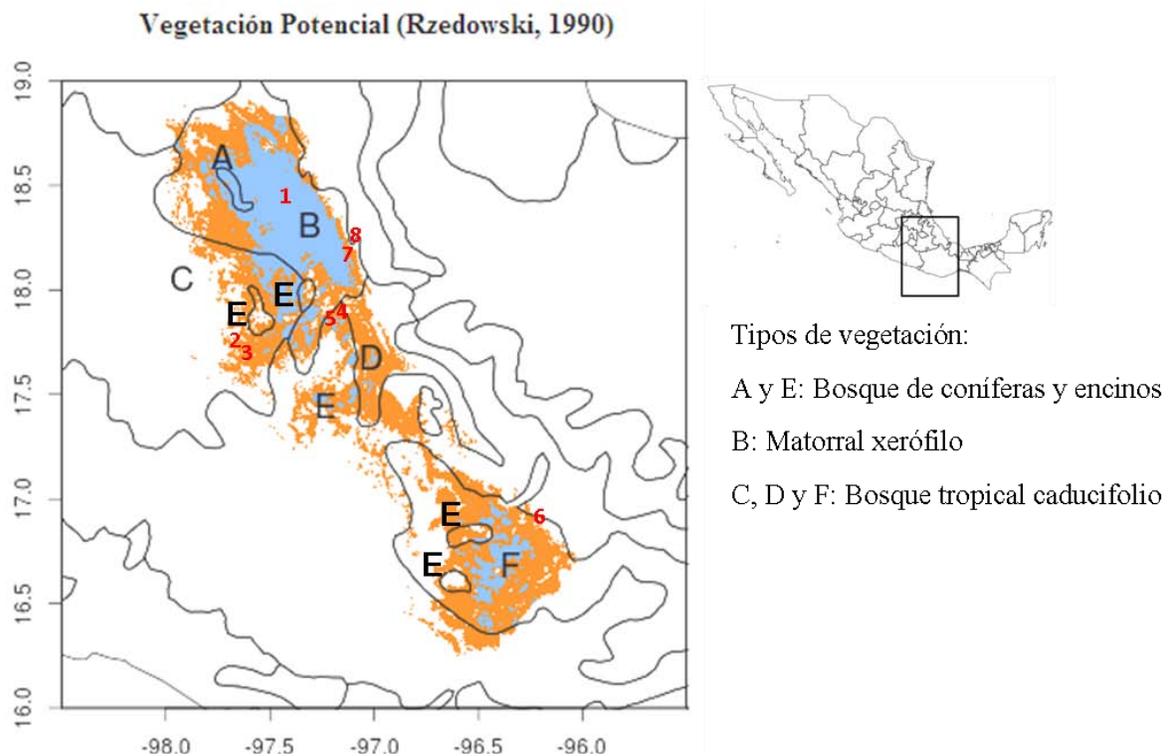
El modelo del presente indica que la distribución potencial del nicho ecológico se encuentra casi restringida a la región del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, ya que ésta se extiende ligeramente hacia el sur de San Pablo Villa de Mitla y San Lorenzo Albarradas ambas localidades del estado de Oaxaca, cerca de la población 6. Se observa además que existe una región extensa entre estas dos zonas de distribución potencial, que corresponden a los valles centrales de Oaxaca.

Al comparar el patrón de distribución potencial, respecto de la distribución la variación genética, se puede observar que las zonas consideradas por el modelo de MaxEnt como los sitios con el nicho ideal en el presente corresponden con el área noreste de la distribución de *A. kerchovei*, donde se distribuye principalmente el haplotipo ancestral (hap 2). También están presentes los haplotipos 1, 3, 4 y 10, centrales en la red de haplotipos, con lo cual se tienen la mitad de los haplotipos encontrados para la especie en esta zona (aunque no necesariamente son los más abundantes, salvo por el haplotipo 2). Además, la población más diversa (Población 1, haplotipos: 1, 2, 3 y 4) se localiza justo en el centro del área más grande de nicho ideal. Con esto se podría considerar a esta zona como una región ancestral para la especie.

Por otro lado, los haplotipos más derivados (5, 6, 7, 8 y 9) se localizan en zonas periféricas de la distribución potencial. Esto indicaría que la zona propuesta como ancestral para la especie es la que presenta mayor diversidad genética y ya que en la proyección al pasado el área de distribución potencial es mucho menor a la encontrada en el presente podría considerarse a la zona noreste de la distribución de *A. kerchovei* podría como un refugio Pleistocénico. A partir de esta zona se comienza a extender nuevamente la distribución de la especie; y considerando la escala de colores de la proyección al pasado estos refugios debieron ser muy restringidos. Sin embargo, en el caso de la zona sur de la distribución (Mitla, Oax), cercana a la población 6, podría considerarse a esta zona como un segundo posible refugio, pero si se observa la superposición del modelo de distribución presente y la proyección al pasado, en el presente esta zona asemeja una de reciente colonización, donde las condiciones ideales para la existencia del nicho están desarrollándose, lo cual se ve apoyado por el hecho de que se vislumbra una especie de corredor entre esta zona y el área noreste, y que el haplotipo 9, presente en esta zona sur,

sur es el más derivado en la red de haplotipos y está ligado por más de cuatro pasos mutacionales al haplotipo ancestral, lo cual indicaría que es una zona de colonización, más que un refugio.

A fin de entender de mejor manera como las variables empleadas en el modelo pueden influir en la distribución de la variación genética, se realizó una superposición de la distribución potencial así como de su proyección al pasado, en comparación con la vegetación potencial para México de Rzedowski (1990) (Fig. 9). Esta comparación se realizó debido a que la vegetación resulta un aspecto importante para el establecimiento de las condiciones ideales para el nicho de la especie. En este estudio la capa con mayor aportación para el modelo resultó ser la precipitación del trimestre más húmedo (60.9%), y los tipos de vegetación responden principalmente a los climas, y éstos están determinados por la temperatura y la precipitación en su mayoría (Trejo, 2004).



**Figura 9.** Mapa de superposición de la distribución potencial presente (color naranja) para *Agave kerchovei*, y su proyección al último máximo glacial (color azul) sobre la vegetación potencial para México de Rzedowski (1990). Las letras en el mapa indican a qué tipo de vegetación corresponden las distintas zonas de la distribución potencial para la especie. Los números en color rojo corresponden a las ocho poblaciones estudiadas en este trabajo.

En la Figura 9 se puede observar que la mayor parte de la distribución potencial en el presente se localiza en la vegetación del matorral xerófilo o chaparral (Torres, 2004). Estas zonas corresponden a las áreas de mayor probabilidad en el modelo presente elaborado con MaxEnt (áreas marcadas colores rojo-naranja), sin embargo existen otros dos tipos de vegetación en los cuales la distribución potencial se ve representada en menor proporción, primeramente en el Bosque tropical caducifolio y en menor grado en el Bosque de coníferas y encinos.

La mayor presencia de las poblaciones dentro del chaparral también corresponden con la clasificación tipos de vegetación para el Valle de Tehuacán-Cuicatlán elaborada por Valiente-Banuet *et al.* (2000 y 2009)<sup>13</sup>, En la Tabla 15 se encuentran los tipos de vegetación que corresponden a las poblaciones de *A. kerchovei*, según el grado altitudinal en el cual se encuentran, según la vegetación para el valle de Tehuacán-Cuicatlán (Valiente-Banuet *et al.*, 2000 y 2009) donde se aprecia que la mayor parte de las poblaciones se encuentran en el chaparral u otro tipo de matorral.

**Tabla 15.** Distribución altitudinal de las poblaciones de *Agave kerchovei* y la correspondencia de tipos de vegetación, designados a partir de la vegetación para el valle de Tehuacán-Cuicatlán: matorral de *Echinocactus platyacanthus* (1600-1800 m); matorral crassi-rosulifolio (1700-1900 m); chaparral (1900-2400m (Valiente-Banuet *et al.*, 2000 y 2009). \*tipo de vegetación descrito en Brena-Bustamente (2012).

Población	Altitud (m)	Tipo de vegetación
1	1817	Matorral crassi-rosulifolio, posible ecotonía con matorral de <i>Echinocactus platyacanthus</i>
2	1927	Chaparral
3	1900	Chaparral
4	2091	Chaparral
5	2113	Chaparral
6	1682	Matorral de <i>Echinocactus platyacanthus</i> , posible ecotonía con Matorral crassi-rosulifolio
7	946	Bosque tropical caducifolio *
8	989	Bosque tropical caducifolio *

De este modo la especie podría invadir nuevos tipos de vegetación gracias a una continuidad de climas y requerimientos, como lo indica el mapa de distribución potencial de nicho y la superposición de la vegetación potencial (Fig. 9).

<sup>13</sup> El establecimiento de los tipos de vegetación es, principalmente, partiendo sobre asociaciones vegetales en base a criterios estructurales, fisonómicos y de composición de especies.

Además del clima, vegetación y tipo de suelo, para la presencia de *A. kerchovei*, deben considerarse también la historia y competencia con otros agaves con requerimientos similares.

Por ejemplo, Fonseca y Palacios (2006) elaboraron los perfiles climáticos característicos de 15 especies del género *Agave* para agruparlos según la semejanza climática de los sitios donde habitan; uno de los grupos formados incluye a *A. kerchovei* junto con *A. salminana* (endémica a México), *A. triangularis* (endémica al Valle de Tehuacán-Cuicatlán) y *A. potatorum* (distribución restringida a Puebla y Oaxaca). Estos comparten la temperatura promedio del cuatrimestre más seco (15.7°C), temperatura máxima promedio del periodo más cálido (28.9°) y una isotermalidad<sup>14</sup> de 0.67%.

Además de las especies que se distribuyen dentro del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Anexo 5), varias presentan rangos de hábitat similares a los de *A. kerchovei*, como *A. ghiesbreghtii*, en especial dentro del área propuesta como ancestral para *A. kerchovei*: zona noreste (Fig. 10), y Gentry (1982) la menciona como una especie muy emparentada. Asimismo *A. marmorata* y *A. karwinski* son especies simpátricas a *A. kerchovei* presentes en Zapotitlán, Puebla (Cuautle, 1998), ambas especies son endémicas a México conocidas sólo de los estados de Oaxaca y Puebla (García-Mendoza, 2011). Estas especies también se encuentran presentes dentro del área noreste de la distribución de *A. kerchovei*.

Son muy complejas las formas en la que las distintas variables climáticas y la interacción con otros organismos pueden influir sobre la distribución de la especie. Esto puede ser comprobado con lo reportado por Brena-Bustamante (2012) para el tipo de distribución que poseen los individuos dentro de las poblaciones, siendo agregada para San Gabriel, Oaxaca (Población 7 en este trabajo), en la cual influyen el gradiente altitudinal, la pendiente<sup>15</sup> y las especies acompañantes (protección). Mientras que para San Rafael, Puebla (Población 8 en este trabajo) la distribución es conglomerada, principalmente por la alta exposición de densidades de luz, confinándose la distribución a los lugares

---

<sup>14</sup> La Isotermalidad es una de las capas usadas para el modelo distribución potencial de *Agave kerchovei*, aunque posee un 0.2% de contribución al modelo.

<sup>15</sup> La Pendiente fue la tercer capa más informativa (6.8 %), para el modelo de distribución potencial elaborado con MaxEnt para *Agave kerchovei*.

resguardados, lo cual influye sobre cómo es la distribución de la variación genética dentro de un contexto geográfico.

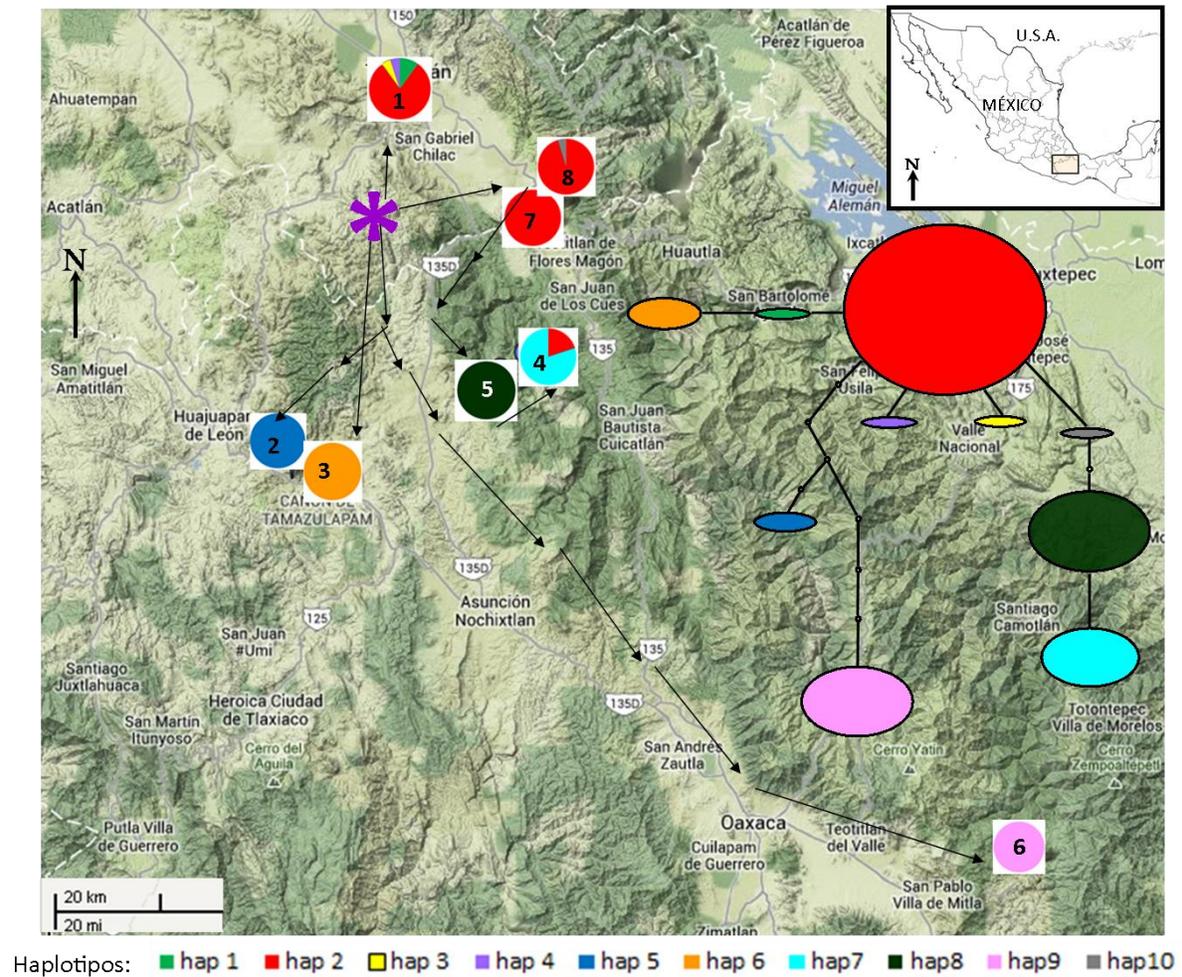
### 9.3 Historia evolutiva

Con los análisis obtenidos podríamos decir que tenemos diferentes zonas según la distribución de la variación en *A. kerchovei*: noreste, centro y sureste. Sin embargo, dentro de cada zona la estructura genética es alta como lo muestran los análisis de AMOVA y SAMOVA, en éste último se designa casi a cada población como un grupo independiente. Esto podría deberse a que existen condiciones microambientales distintas dentro de cada zona (Canseco y Gutiérrez, 2010).

Dentro de la zona noreste se distribuyen las poblaciones 1, 7 y 8. En dicho grupo se distribuye principalmente el haplotipo 2, considerado como ancestral según la red de haplotipos. La frecuencia de este haplotipo en estas poblaciones y la región en la que se distribuyen las mismas, sugiere considerar a esta zona como una región ancestral donde posiblemente pudo originarse la especie. Esto se ve apoyado por la red haplotipos y por la proyección al último máximo glacial, ya que según la superposición de distribución potencial, es a partir de esta zona desde donde se ha venido extendiendo la distribución de la especie. Debido a que en modelo de proyección al pasado la probabilidad de encontrar los sitios en los que actualmente se puede distribuir la especie es menor, según la escala de colores, podría decirse que la especie puede haberse refugiado en los pocos sitios que pudieron ser viables para su establecimiento.

Estudios palinológicos realizados en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán sugieren que el ambiente durante el pleistoceno fue ideal para la presencia de bosque de *Pinus* (entre 25,000-12, 000 años) y de bosque mesófilo durante el deshielo, en la cual se marcó mucho más el aumento de la humedad (entre 14,000 a 7,000 años) (Canul, 2008). Después del último periodo glacial la vegetación volvió a ser más árida, estos últimos cambios climáticos del Pleistoceno son los que más marcaron la conformación actual de la composición de la vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Valiente-Banuet *et al*, 2009) y se sugiere que por lo tanto la vegetación actual del valle es de reciente formación (Cruz *et al.*, 2009).

Las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno pudieron generar cambios en los tamaños poblacionales en los que tanto la deriva génica, como la expansión posterior de la distribución fueron probablemente factores importantes en generar la estructura genética observada actualmente.



**Figura 10.** Mapa orográfico de la región del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Modificado de Google Maps 2013). Las flechas negras representan una posible ruta de dispersión de las poblaciones. Las gráficas de pastel representan la proporción de los haplotipos en cada población. Los números dentro de las gráficas de pastel corresponden al número de población. Los haplotipos están representados por colores tanto en mapa como en la red de haplotipos. El patrón general de dispersión de las poblaciones es de norte a sur. Las zonas propuestas de la distribución son: *zona noreste* que incluye las poblaciones 1, 7 y 8 correspondientes al subgrupo A1 designado del árbol de distancias genéticas de Nei; *zona centro*, que incluye las poblaciones del subgrupo A2 (3, 4 y 5) y la población 2 (grupo B) y la *zona sureste* que comprende la población 6 (grupo B). El área de la cual posiblemente partirían las rutas sería cercana a la zona norte hacia el sur de la población 1 (denotado por un asterisco), dicha área pudo haber sido más extensa, no necesariamente puntal, su representación es solo gráfica para denotar la posible zona ancestral. Se incluye la red de haplotipos.

Si consideramos al haplotipo 2 como ancestral, entonces desde la zona noreste (Fig. 10) pudieron haberse originado varias rutas de dispersión. Una hacia el sureste que comunica a las poblaciones 8 con la 5 y luego la 4, ya que el haplotipo 7 (único para la población 4) resulta en el final de la línea de conexión de esta parte de la red de haplotipos y además esto explicaría porque en la población 4 está presente el haplotipo ancestral; otra ruta comunicaría directamente a la población 3, y finalmente una ruta que conectara la población 2 con la 6. A pesar de que la zona cercana a la población 6, está justo en los límites del valle de Tehuacán-Cuicatlán, considerando los modelos distribución potencial, se sugiere que se apoyan las rutas de dispersión propuestas de norte-sur desde el origen (zona cerca de Tehuacán, Puebla).

Finalmente de la Figura 10, puede notarse que las poblaciones 2 y 3 a pesar de ser cercanas (3.77 km) son muy diferentes genéticamente (sus haplotipos no tienen una relación directa en la red), mientras que las poblaciones 7 y 8 tienen una separación de 2.6 km y sus haplotipos tienen mayor similitud, ya que el haplotipo 10 (Población 8) procede directamente del haplotipo 2 (común a ambas poblaciones). Al observar a estos grupos de poblaciones se puede decir que a partir de aproximadamente 2.60 km de distancia entre las poblaciones comienza una diferenciación genética. Esta podría deberse a una combinación entre una restricción a los tipos de vegetación dentro de los rangos altitudinales en los valles (éstos están fuertemente influenciados por los microclimas debido a la compleja orografía (Canseco y Gutiérrez, 2010)) y al proceso de deriva génica, como lo sugiere la falta de un aislamiento por distancia (la prueba resultó no significativa), así como también a niveles bajos de flujo génico ( $Nm=0.04$ ).

Por lo tanto, se puede hablar de que cada grupo de poblaciones e incluso cada población dentro de los grupos podrían estar evolucionando de forma local. En el trabajo realizado por Brena-Bustamante (2012) se sugiere algo similar, debido a que en las pruebas de germinación en campo los porcentajes son distintos para cada una de las poblaciones estudiadas (que corresponden a las poblaciones 7 y 8 de este estudio), además de que la cobertura vegetal y la composición florística de las poblaciones es muy diferente a pesar de pertenecer a un mismo tipo de vegetación (bosque tropical caducifolio).

#### 9.4 Conservación

La estructura genética a nivel cloroplasto encontrada en esta especie podría hacerla vulnerable a una pérdida de diversidad genética, ya que aunque existe alto grado de diversidad dentro de la especie, la variación genética se encuentra distribuida en distintas poblaciones, sólo uno de los haplotipos es compartido en más de una población (haplotipo 2 encontrado en las poblaciones 1, 4, 7 y 8), mientras que todos los demás haplotipos son exclusivos de la población que los contiene. Sin embargo, es importante recordar que los resultados obtenidos en este estudio con marcadores de cloroplasto no necesariamente reflejan la dinámica del resto del genoma.

Con este estudio podemos sugerir que, en caso de perderse una de las poblaciones se reduciría drásticamente la variación total de la especie. Esta planta tiene un uso como alimento (consumo de botones florales), para lo cual se corta parte o toda la inflorescencia y la elaboración de fibras (ixtle) en menor grado (Brena-Bustamante, 2012). En el caso de que esta actividad reduzca significativamente la reproducción de la planta, se podría ocasionar una disminución en la diversidad de la especie, lo cual puede agravarse, ya que la estimación de migrantes en el equilibrio es baja ( $Nm=0.04$ ). Lo anterior indica que el flujo génico es muy bajo entre las poblaciones, seguramente debido a que las semillas no se dispersan muy lejos de la planta madre.

Algunos estudios de estructura de tamaños para la especie en distintas regiones del valle de Zapotitlán y zonas adyacentes indican que hay pocos individuos de talla pequeña, lo que puede indicar que no está existiendo reclutamiento de nuevas plantas (Cuautle, 1998; García, 2011), aunque esas estructuras también se pueden obtener debido a que los tamaños intermedios acumulan muchas edades y que el reclutamiento es por pulsos en *Agave* (Eguiarte, comp. pers., 2014). Brena-Bustamante (2012) reporta que la población de San Gabriel Casa Blanca (población 7 de *A. kerchovei*) tiene una madurez y renovación, por vía sexual y asexual (vástagos rizomatosos), por lo que la colecta de inflorescencias, podría no tener un efecto tan importante, de forma inmediata, aunque esto dependerá de que tantas se colecten. Considerando el grado de estructura poblacional encontrada, el flujo génico muy bajo y que el tamaño de las poblaciones es pequeño (a pesar de que exista reproducción asexual, que no es tan alta como en otras especies) (Lira, comp.pers., 2014), el efecto de la deriva génica podría intensificarse en un futuro, reduciendo la variación de la especie. Esto

resulta muy importante porque la planta es semélpara (se reproduce sólo una vez en su vida y luego muere) (Brena-Bustamante *et al.*, 2013).

Por otro lado, la población de San Rafael (población 8 de *A. kerchovei*) presenta un estructura sesgada hacia individuos pequeños y nula presencia de agaves en estado reproductivo, así que en esta podría existir un mayor reclutamiento. Estas observaciones complican aún más la conservación de la especie ya que sugieren que la estructura poblacional estaría respondiendo a condiciones locales, y no regionales.

Otros estados del proceso de regeneración natural de las poblaciones, como germinación y sobrevivencia de las plántulas podrían estarse viendo afectados por depredación, como lo describe Brena-Bustamante (2012) en los estudios de germinación *in-situ* realizados en los que todas las plántulas fueron consumidas por un ortóptero, que no fue identificado.

Otro factor que podría afectar el éxito reproductivo (inflorescencias) es la presencia de un insecto (coleóptero), que nunca antes se había repostado en la zona, el cual está afectando el vigor de las rosetas y el desarrollo de las inflorescencias (Brena-Bustamante 2012). Este insecto fue identificado como *Peltophorus polymitus* Boheman 1845, llamado comúnmente "puro" (Brena-Bustamante 2012), perteneciente a la Familia Curculionidae, Subfamilia Conoderinae, Tribu Zygopini. Los sitios donde se observó la presencia de este coleóptero reportados Brena-Bustamante (2012) corresponden a las poblaciones 7 y 8 de *A. kerchovei* en el presente trabajo. En la revisión de las especies mexicanas de Curculionidae, asociadas a los magueyes elaborada por Romo y Morrone (2012) se reporta la presencia de este escarabajo en *Agave palmeri* y en otras especies de agaves, con una amplia distribución en el centro de México (Distrito Federal, Hidalgo, Tlaxcala, Querétaro) y en el sur de los Estados Unidos.

A nivel cloroplasto, los resultados de este estudio sugieren que es importante la conservación de todas sus poblaciones, por ser tan diferentes entre sí. También es importante para su conservación debido a su uso milenario, datado desde hace 7000 años según Brena-Bustamante (2012).

Eguiarte *et al.* (2013) sitúan en un plano contenido por medidas de variación ( $H_s$ , heterocigosis) y estructura genética ( $F_{st}$  o  $G_{st}$ ), tras una revisión exhaustiva, toda la

información de genética de poblaciones de especies del género *Agave sensu stricto*, disponibles para datos nucleares. El cuadro fue dividido en 4 cuadrantes, dependiendo de los esfuerzos que se necesitan para la conservación. El primer cuadrante corresponde al más sencillo, ya que son especies que presentan bajo promedio de diversidad genética y baja diferenciación entre poblaciones, por lo que se requiere de conservar pocos individuos y un bajo número de poblaciones. El segundo cuadrante incluye especies con altos niveles de variación pero poca diferenciación poblacional, por lo que no es necesario conservar tantas poblaciones. Estos dos cuadrantes se encuentran bien representados con varias especies y tipos de marcadores. Los cuadrantes tercero y cuarto, están menos representados, especialmente el tercer cuadrante. El tercer cuadrante, corresponde a especies que tienen baja variación genética dentro de sus poblaciones y al mismo tiempo cada una de sus poblaciones es muy diferente. Finalmente el cuarto cuadrante resulta ser el más difícil de conservar ya que poseen altos niveles de variación dentro de la especie y cada población es muy distinta. El caso de *A. kerchovei*, aunque no tenemos datos nucleares, parecería coincidir con el tercer cuadrante según los datos de cloroplasto, ya que de forma general ninguna de sus poblaciones es idéntica completamente a otra, y dentro de ellas existe poco o nula variación, como lo demuestran las pruebas de AMOVA y SAMOVA realizadas con la especie. Por tanto el presente trabajo resulta en el aporte de un nuevo registro con otro tipo de marcador genético (ADN de cloroplasto), al estudio y conocimiento de la genética de poblaciones del género *Agave*.

La inclusión de *A. kerchovei* en este cuadrante resulta importante, ya que para éste sólo se tienen registradas dos especies, *A. parryi* y *A. murpheyi*, especies cultivadas o por lo menos con algún grado de manejo (Eguiarte *et al.*, 2013) y consideradas en riesgo en los Estados Unidos. Por su lado, *A. kerchovei* presenta un alto grado de manejo, a pesar de no ser comercial (Brena-Bustamante *et al.*, 2013), con lo cual la diversidad en total de la especie podría estarse viendo afectada. *Agave kerchovei*, sería la primera especie mexicana reportada para ser incluida en este cuadrante, sin embargo es necesario hacer estudios con marcadores nucleares para esta especie, para poder hacer una comparación real.

## 10 Conclusiones

1) A nivel cloroplasto, *A. kerchovei* como especie tiene relativamente altos niveles de variación genética, aunque existe además una alta diferenciación genética entre las poblaciones y entre grupos de poblaciones. La variación encontrada es similar a la reportada para otras especies de zonas áridas, con marcadores de cloroplasto.

2) Las poblaciones en la parte noreste de la distribución (1, 7 y 8) presentan el haplotipo ancestral (2), las poblaciones de la zona central y sur presentan en su mayoría haplotipos únicos.

3) La distribución potencial actual ha venido aumentando desde el último máximo glacial (21, 000 años), según lo marcan los modelos de máxima entropía (MaxEnt.) De igual forma su distribución actual parecería estar invadiendo nuevos ambientes en rangos altitudinales colindantes con su principal ambiente de crecimiento (vegetación de matorral xerófilo o chaparral). Igualmente en el área noreste se encuentra representada la mitad de la variación genética para la especie.

4) Una explicación de la alta diferenciación entre las poblaciones es que el cloroplasto tiene una herencia materna, por lo cual es dispersado solamente por las semillas. La dispersión de las semillas en los agaves es generalmente muy limitada, germinando cerca de la planta madre, así que esto podría explicar porque las poblaciones son tan diferentes entre sí, aunque también podría explicarse en parte por la deriva génica.

5) La diferenciación parece ser congruente con la compleja topografía de Oaxaca y su evolución, lo cual conlleva a las diferencias que existen entre los distintos valles de la región, y por lo tanto podría existir una alta adaptación local a cada sitio. Estos procesos también ayudarían a explicar la gran diversidad que tiene el género. Sin embargo es necesario realizar otro tipo de estudios genómicos, de nicho ecológico, trasplantes recíprocos, estudios fisiológicos, etc. para comprobar la hipótesis de adaptación y diferenciación local.

6) El uso etnobotánico reportado para *A. kerchovei* es importante, debido a que se interfiere en el proceso de reproducción sexual al cortar las inflorescencias, y este podría estar

modificando a futuro los patrones de variación genética dentro y entre las poblaciones, dadas las condiciones de aislamiento en general entre las mismas.

7) Este estudio podría servir de modelo para el estudio de otras especies del género dentro del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, ya que varias especies presentan patrones de distribución espacial similar a *A. kerchovei*, así como requerimientos ambientales y en general rangos altitudinales y tipo de vegetación parecida.

8) *Agave kerchovei*, a nivel cloroplasto tiene al mismo tiempo baja variación genética dentro de sus poblaciones y una alta diferenciación entre ellas, por lo que para su conservación genética se deben de conservar la mayoría de sus poblaciones. Se debe tener especial cuidado dado que es una planta con uso tradicional.

## 11 Literatura citada

- Aguirre E. 2007. Flujo génico: métodos para estimarlo y marcadores moleculares. Cap. 2 pp 49-61. En: Ecología Molecular. Eguiarte L., Souza V., Aguirre X. (comp.) SEMARNAT-UNAM-CONABIO. México. 592 p.
- Aguirre J.A. 2012. Genética de Poblaciones y filogeografía de *Fouquieria shrevei* (Familia Fouquieriaceae), especie gipsófila endémica de Coahuila. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 123 p.
- Allendorf F.W., Luikart G. 2007. Conservation and the Genetics of the Populations. Blackwell Publishing. Sigapore. 642p.
- Álvarez de Zayas A. 1989. Distribución geográfica y posible origen de las Agavaceas. Revista del Jardín Botánico Nacional. Vol. X. No. 1: 25-36
- APGIII. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical Journal of the Linnean Society. 161: 105–121.
- Arias A.A., Valverde M.T., Reyes J. 2000. Las plantas de la región de Zapotitlán Salinas, Puebla. INE-Red para el Desarrollo Sostenible-UNAM. México. 80 p.
- Arriaga L., J.M. Espinoza, C. Aguilar, E. Martínez, L. Gómez, E. Loa (coordinadores). 2000. Regiones terrestres prioritarias de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. México.
- Astorga M.P. 2008. Estado actual del uso de marcadores moleculares en moluscos bivalvos de importancia para la acuicultura. pp 277-287. En: A. Lovatelli, A. Farías e I. Uriarte (eds). Estado actual del cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Taller Técnico Regional de la FAO. 20–24 de agosto de 2007, Puerto Montt, Chile. FAO Actas de Pesca y Acuicultura. No. 12. 359 p.
- Avise J.C. 2000. Phylogeography. The history and formations of species. Harvard University Press. U.S.A. 447p.
- Beebe T., Rowe G. 2008. An Introduction to molecular ecology. Oxford University Press. U.S.A. 400p.
- Begon M., Townsend C.R., Harper J.L. 2006. Ecology From Individuals to Ecosystems. Blackwell Publishing. UK. 738 p.

- Brena-Bustamante P. 2012. El aprovechamiento y la estructura poblacional de *Agave kerchovei* Lem. en Tehuacán-Cuicatlán, México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México. 84 pp.
- Brena-Bustamante P., Lira-Saade R., García Moya E., Romero-Manzanares A., Cervantes.-Maya H., López Correa M., Chávez-Herrera S. 2013. Aprovechamiento del escapo y los botones florales de *Agave kerchovei* en el Valle De Tehuacán-Cuicatlán, México. *Botanical Sciences* 91 (2): 181-186
- Calonga V., Barranteguy M.E., García M.V. 2014. Divergencia histórica en *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Leguminosae) analizando una región intrónica del ADN cloroplástico. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 49 (4): 547-557
- Canseco L., Gutiérrez M.G. 2010 Anfibios y Reptiles Del Valle De Tehuacán-Cuicatlán. CONABIO-Fundación para la Reserva de la Biosfera Cuicatlán A.C.-Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. México. 118 p.
- Canul M.E. 2008. Reconstrucción paleoclimática (Cuaternario tardío) de la porción occidental del Valle de Tehuacán, Puebla, México: Estudio palinológico. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas, Instituto de Biología. UNAM. México. 79p.
- Castillo A. 2007. La selección natural a nivel molecular. Cap. 1 pp 11-48. En: *Ecología Molecular*. Eguiarte L., Souza V., Aguirre X. (comp.) SEMARNAT-UNAM-CONABIO. México. 592 p.
- Clegg M.T., Gaut B.S., Learn G.H., Morton B.R. 1995. Rates and Patterns of Chloroplast DNA Evolution. Cap. 11. 215-234. En: *Tempo and Mode in Evolution: Genetics and Paleontology 50 Years After Simpson*. Fitch W.M., Ayala F.J. (eds.). National Academy Press. U.S.A. 335 p.
- Clegg M.T., Learn G.H., Golenberg, E.M. 1991. Molecular Evolution of Chloroplast DNA. Cap. 7 135- 149 pp. En: Selander R.K., Clark A.G., Whittam T.S. (eds.) *Evolution at the molecular level*. Sinauer Editorial. U.S.A. 350p
- Clement M., Posada D., Crandall K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9 (10): 1657-1660.
- Cruz J.A., Arroyo-Cabrales J., Viñas-Vallverdú. 2009. Tortugas fósiles del Pleistoceno tardío de Santiago Chazumba, Oaxaca. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* 61:2. p. 225-232
- Cuautle M., García-Franco J.G., Rico Garay V. 1998. Estructura poblacional y características foliares de *Agave kerchovei*, relación con la presencia de homópteros y hongos en el Valle de Zapotitlán, Puebla. *Cact. Suc. Mex.* 48: 75 -80

- Dávalos P. 2000. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México. Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO) División de Investigación y Posgrado. Facultad de Estudios Superiores, Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. Base de datos REMIB-CONABIO. Tlalnepantla. México. México.
- Dávila P., Del Coro M., Valiente-Banuet A., Villaselor J.L., Casas A., Lira R. 2002. Biological diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. *Biodiversity and Conservation*. 11: 421-442
- Dupanloup I., Schneider S., Excoffier L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11(12):2571-81.
- Eguiarte L.E., Aguirre-Planter E., Aguirre X., Colín R., González A., Rocha M., Scheinvar, E., Trejo L., Souza V. 2013. From Isozymes to Genomics: Population Genetics and Conservation of Agave in México. *The Botanical Review*. 79(4): 483-506
- Eguiarte L.E., Souza V., Silva-Montellano A. 2000. Evolución de la Familia Agaveceae: Filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Bol. Soc. Bot. México* 66: 131-150.
- Elosa H.R., Nieto A., Navarro M.C. 2010. Conservadurismo filogenético del nicho ecológico, un enfoque integral de la evolución. *Ciencias* 98: 64
- Ennos R.A., Sinclair W.T., Hu X-S., Langdon A. 1999. Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plants populations. 1-19 pp. En: *Molecular Systematic and Plant Evolution*. Hollingsworth P.M., Bateman R.M., Gornall R.J. (eds.) Taylor & Francis. UK. 485 p.
- Ewing B., Hillier L., Wendl M., Green P. 1998. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research* 8:175-185.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Excoffier L., Smouse P., Quattro J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Flores I.N. 2007. Coevolución entre género *Agave sensu lato* y sus murciélagos polinizadores (Phyllostomidae). Tesis de Maestría. Instituto de Ecología. Universidad Autónoma de México. México. 79 p.
- Fonseca U., Palacios P. 2006. Fitogeografía, Conservación y usos de las especies del género *Agave* en la Reserva de la Biósfera Tehuacán-Cuicatlán, México. Tesis de Licenciatura.

Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 106 p.

- Frankham R., Ballou J.D., Brisco D.A. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press. UK. 617p.
- García M.A. 2011. Etnoecología de los Agaves (Agavaceae) en la comunidad Ngiwa (Popoloca) de los Reyes Metzontla, Puebla, México. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. Campus Puebla. Puebla. 163 p.
- García-Mendoza A., Galván R. 1995. Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. Bol. Soc. Bot. México 56: 7-24.
- García-Mendoza A.J. 2010. Revisión taxonómica del complejo *Agave potatorum* Zucc. (Agavaceae): nuevos taxa y neotipificación. Acta Botánica Mexicana 91: 71-93.
- García-Mendoza A.J. 2011. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 88. Agavaceae. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. Departamento de Botánica. México. 95p.
- Garrigan D., Marsh P.C., Dowling T.E. 2002. Long-term effective population size of three endangered Colorado River fishes. Animal Conservation 5: 95-102.
- Gentry H.S. 1982. Agaves of Continental North America. The University of Arizona Press. U.S.A. 670 p.
- Good-Ávila S.V., Souza V., Gaut B.S., and Luis E. Eguiarte. 2006 Timing and rate of speciation in Agave (Agavaceae). PNAS: 103, 24 9125
- Gordon D., Abajian C., Green P. 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. Genome Research 8:195-202
- Guo-Liang J. 2013. Molecular Markers and Marker-Assisted Breeding in Plants, Plant Breeding from Laboratories to Fields, Prof. Sven Bode Andersen (Ed.), ISBN: 978-953-51-1090-3, InTech, DOI: 10.5772/52583. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/plant-breeding-from-laboratories-to-fields/molecular-markers-and-marker-assisted-breeding-in-plants>
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.
- Hedrick P.W. 2005. Genetics of Populations. Jones and Bartlett Publishers. U.S.A. 737p.
- Hijmans R.J., Cameron S.E., Parra J.L., Jones P.G., Jarvis A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. International Journal of Climatology 25: 1965-1978.

- Holsinger K.E. 2012. Lecture Notes in Population Genetics. Department of Ecology & Evolutionary Biology, U-3043 University of Connecticut. 325p. Consultado en línea: 29/junio/2014. <http://darwin.eeb.uconn.edu/eeb348/lecture-notes/book.pdf>
- Hudson R.R., Slatkin M., Maddison W.P. 1992. Estimation of Levels of Gene Flow from DNA Sequence Data. *Genetics*. 132:583-589.
- Instituto de Biología. "Agave kerchovei Lem. - IBUNAM: MEXU: AGA1020301". UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2010-02-14. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en: 2014-5-25. Disponible en: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:AGA1020301>
- Instituto de Biología. "Agave kerchovei Lem. - IBUNAM: MEXU: AGA936719". UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2010-02-14. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en: 2014-5-25. Disponible en: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:AGA936719>
- Instituto de Biología. "Agave kerchovei Lem. - IBUNAM: MEXU: AGA947976". UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2010-02-14. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en: 2014-5-25. Disponible en: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:AGA947976>
- Kimura M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature*. 217(129):624-626.
- Librado P., Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Lynch M., Crease T.J. 1990. The Analysis of Population Survey Data on DNA sequence Variation. *Mol. Biol. Evol.* 7: 377-394.
- Martínez N.E. 2012. Genética de Poblaciones de *Agave stricta* Salm-Dyck, especie endémica del valle de Tehuacán Cuicatlán, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 112 p.
- Mateo R.G., Felicísimo A.M., Muñoz J. 2011. Modelos de distribución de especies: una revisión sintética. *Revista Chilena de Historia Natural* 84: 217-240.
- Merow C., Smith M.J., Silander J.A. jr. 2013. A practical guide to MaxEnt for modeling species' distributions: what it does, and why inputs and settings matter. *Ecography* 36: 1058–1069.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). INDEL Mutation. Consultado el 23/ mayo/2014. En <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh?Db=mesh&term=INDEL+Mutation>
- Nei M. 1973. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 70: 3321-3323

- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Univ. Press. New York. U.S.A. 512 p.
- Pfenninger M., Posada D. 2002. Phylogeographic History of the land snail *Candida unifasciata* (Helicellinae, stylommatophora): Fragmentation, corridor, migration and secondary Contact. *Evolution*. 56(9): 1176-1788
- Phillips S.T., Anderson R.P., Schapire R.E. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190: 231–259.
- Piñero D. *et al.* 2008a. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, en *Capital natural de México*, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO. México. pp. 415-435
- Piñero D. *et al.* 2008b. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, en *Capital natural de México*, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. CONABIO. México. pp. 437-494.
- Pliscoff P., Fuentes-Castillo T. 2011. Modelación de la distribución de especies y ecosistemas en el tiempo y en el espacio: una revisión de las nuevas herramientas y enfoques disponibles. *Revista de Geografía Norte Grande*, 48: 61-79.
- Pons O., Petit R.J. 1996. Measuring and Testing Genetic differentiation with Ordered versus unordered alleles. *Genetics*. 144:1237-1245.
- R. Core Team. 2012. R: A language an environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Viena. Austria. ISBN 3-90051-07-0 URL: <http://www.R-project.org/>
- Rentería M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares Cap. 18 pp 541-568. En: *Ecología Molecular*. Eguiarte L., Souza V., Aguirre X. (comp.) SEMARNAT-UNAM-CONABIO. México. 592 p.
- Rocha M., Gasca, J. 2007. *Ecología molecular de la conservación*. Cap 8. pp 251-278. En: Eguiarte, L.E., Souza, V., Aguirre X. (comp). *Ecología molecular*. SEMARNAT-UNAM-CONABIO México. 592p
- Rocha M., Good-Ávila S.V., Molina-Freaner F., Arita H.T., Castillo A., García-Mendoza A., Silva-Montellano A., Gaut B.S., Souza V., Eguiarte L.E. 2006. Pollination biology and adaptative radiation of Agavaceae, with special emphasis on the Genus *Agave*. *Aliso*. 22: 329-344.
- Romo A., Morrone, J.J. 2012. Especies mexicanas de Curculionidae (Insecta: Coleoptera) asociadas con agaves (Asparagaceae: Agavoideae). *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83: 1025-1035.

- Rzedowski J. 1990. Vegetación Potencial. IV.8.2. Atlas Nacional de México. Vol II. Escala 1:4000000. Instituto de Geografía, UNAM. México.
- Rzedowski J. 2006. Vegetación de México. 1ra. Edición digital. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 504 pp.
- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987. 4:406-25.
- Shaw J., Lickey E.B., Schilling E.E., Small R.L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94 (3): 275-288
- Taberlet P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of Chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology.* 17: 1105-1109.
- Tajima F. 1989. Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics.* 123: 585-595
- Tambutti M.I. 2002. Diversidad del Género *Agave* en México: una síntesis para su conservación. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 53p.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution.* 28:2731-2739.
- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. 1994. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research.* 22: 4673-4680.
- Torres R. 2004. Tipos de Vegetación. En: A.J. García-Mendoza, M.J. Ordóñez y M. Briones-Salas (eds.) Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fund, México, pp. 105-117.
- Trejo I. 2004. Clima. En: A.J. García-Mendoza, M.J. Ordóñez y M. Briones-Salas (eds.), Biodiversidad de Oaxaca. Instituto de Biología, UNAM-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fund. México. pp 67-85.
- Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 23 May 2014, <http://www.tropicos.org/Specimen/3180526>.
- USGS. 2011. Hidro 1K North America. U.S. Department of the Interior U.S. Geological Survey. <https://lta.cr.usgs.gov/HYDRO1K>

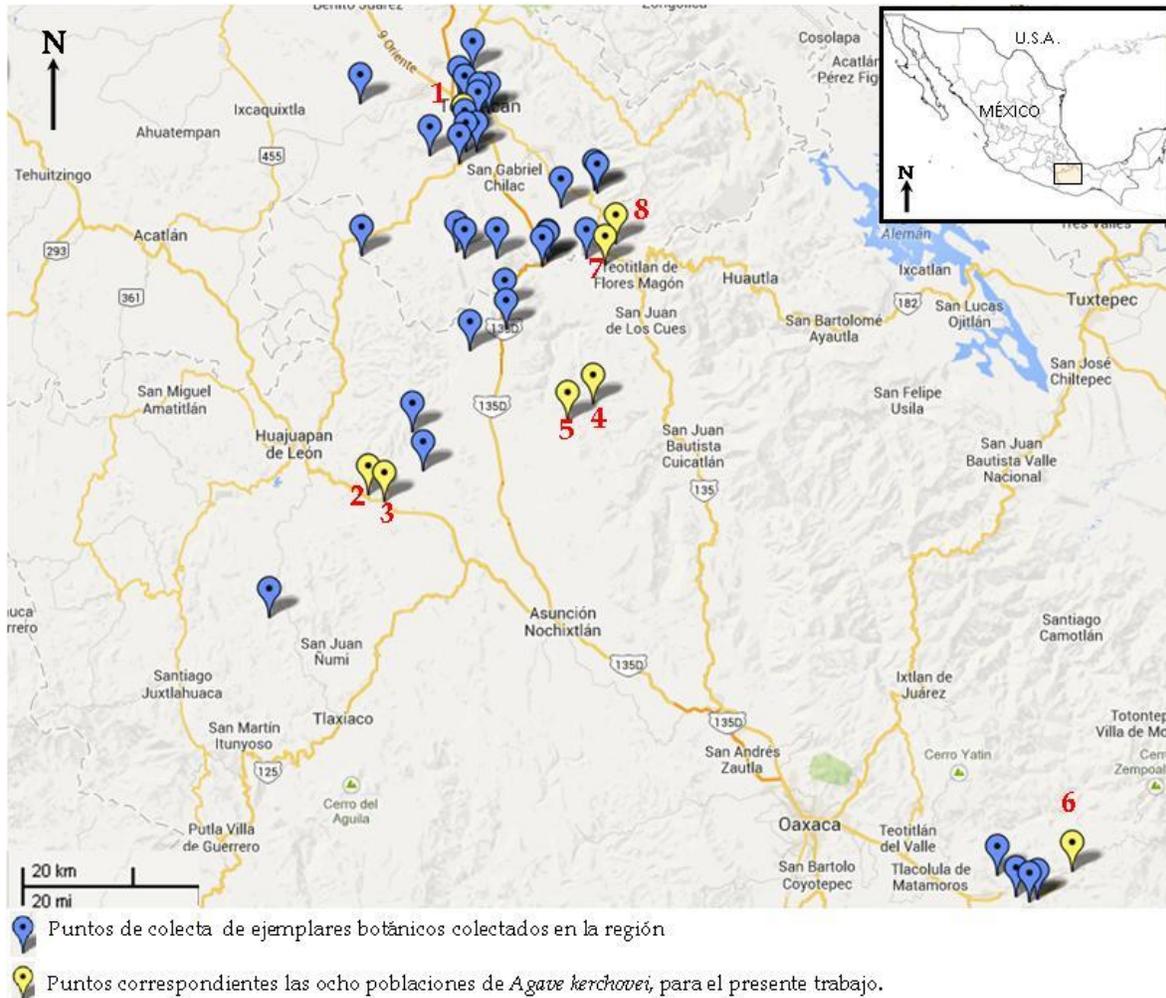
- Valiente-Banuet A., Casas A., Alcántara A., Dávila P., Flores-Hernández N., Arizmendi M., Villaseñor J.L., Ortega J. 2000. La Vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Bol. Soc. Bot. México. 67:24-74.
- Valiente-Banuet A., Solís L., Dávila P., del Coro M., Silva C., Ortega-Ramírez J., Treviño J., Rangel-Landa S., Casas A. 2009. Guía de la vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. UNAM, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México 206 p.
- Vázquez Lobo A. 1996. Filogenia de Hongos Endófitos del Género *Pinus* L.: Implementación de técnicas moleculares y resultados preliminares. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Vázquez-Domínguez E., Castañeda-Rico S., Garrido-Garduño T., Gutiérrez-García T.A. 2009. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. Revista Chilena de Historia Natural. 82: 277-297
- Villaseñor J.L., Téllez-Valdés O. 2004. Distribución potencial de las especies del género *Jefea* (Asteraceae) en México. Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica 75(2): 205-220.
- Watterson G.A. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. Theoretical Population Biology. 7: 256-276.

## 12 ANEXOS

**ANEXO 1.** Protocolo de Extracción de ADN. Método Mini-Prep modificado de Vázquez-Lobo (1996).

- 1.- Moler 1 g de tejido con nitrógeno líquido.
- 2.- Moler completamente todo el tejido macerado en nitrógeno con 1500 µl de CTAB2x (con β-mercaptoetanol al 0.3 %) y recuperar todo en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
- 3.- Centrifugar a 10000 g por 8 minutos a 4°C, eliminar el sobrenadante.
- 4.- Resuspender con 600 µl de CTAB2x.
- 5.- Incubar a 65°C durante 15 minutos, voltear las muestras cada 5 minutos.
- 6.- Agregar 600 µl de cloroformo-octanol (24:1), y agitar hasta homogenizar.
- 7.- Centrifugar a 7000g durante 12 minutos a 4°C. Recuperar 250 µl del sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml.
- 8.- Agregar 600 µl de Isopropanol frío (-20°C), voltear para mezclar.
- 9.- Dejar reposar durante 2 horas a -20°C.
- 10.- Centrifugar a 9000g durante 8 minutos a 4°C, después eliminar sobrenadante.
- 11.- Agregar 1000 µl de etanol al 70% frío (-20°C).
- 12.- Dejar reposar los tubos durante 5 min a temperatura ambiente.
- 13.- Centrifugar a 7000g durante 8 minutos, y eliminar sobrenadante.
- 14.- Secar en centrifuga de vacío, a 45°C durante 20-25 minutos, hasta que la muestra este completamente seca.
- 15.- Rehidratar con 60 µl de agua químicamente pura.
- 16.- Dejar pasar un día a partir de la rehidratación para comenzar con las amplificaciones.

ANEXO 2. Mapa de distribución y lista de puntos de colecta de ejemplares botánicos de *Agave kerchovei* Lem. que se usaron para la elaboración del modelo de distribución potencial.



Mapa de la distribución de los puntos de colecta para *Agave kerchovei* Lem, empleadas para el modelo de distribución potencial (modificado de Google-Maps, 2014).

**ANEXO 2.** (Continuación). Lista de puntos de colecta de ejemplares botánicos, se incluyen las poblaciones estudiadas en este trabajo. (ND= sin información disponible)

Colector	No.	fecha colecta (dd/mm/aaaa)	Latitud (N)	Longitud (W)	Altitud (m)	Estado	localidad
Calzada, Juan Ismael	s.n.	16/03/1998	17° 27' 49.16"	97° 50' 1.16"	1775	Oaxaca	Santos Reyes Tepejillo, a 3 km de.. senda para Corral de Piedras y Las Cuevas
Delgadillo	206	06/02/1996	16.95599	-96.33806	ND	Oaxaca	4 km NE de Mitla
Ernst	2438	03/02/1966	16° 54' 37.30"	96° 15' 27.52"	ND	Oaxaca	En el camino de San Lorenzo cerca de Mitla
García-Mendoza	s.n.	04/05/1996	17.8259	-97.53849	ND	Puebla	Nop 1 km lNO ...J r n otán o H l r vo L r Nort l rro
García-Mendoza	3316	28/06/1987	18° 16'	97° 14'	ND	Puebla	Cerro Tepetroja, 6 Km SW de San José Axusco
García-Mendoza	5432	ND	18.36743	-97.50444	ND	Puebla	5 km noroeste de Zapotitlán Salinas
García-Mendoza	6218	ND	18.46845	-97.64767	ND	Puebla	2 km noroeste de Santiago Nopala
García-Mendoza	6588	24/02/1998	18° 21' 10.93"	97° 26' 39.33"	ND	Puebla	La Virgen, entre San Antonio Texcala y Zapotitlán
García-Mendoza & F. Martínez	6047	29/04/1995	18° 01' 44.55"	97° 20' 47.82"	2059	Oaxaca	Cerro Santa Lucía, puente Los Otates, carr. Tehuacán-Oaxaca, 15 km al N de Tepelmeme
García-Mendoza, et al.	6750	ND	18° 09' 52.27"	97° 15' 42.19"	ND	Oaxaca	Cerca del puente del río Calapa, carretera Tehuacán-Oaxaca
García-Mendoza, et al.	6199	ND	17° 59' 11.76"	97° 25' 19.47"	1720	Oaxaca	15 km noroeste de Tepelmeme Villa de Morelos, carretera Cuacnopalan-Oaxaca (Corunda Oaxaca)
Gentry et al.	20223	00/08/1963	18° 22' 31.87"	97° 24' 25.17"	ND	Puebla	1-10 millas al SW de Tehuacán, a lo largo de la carretera a Zapotitlán
Gentry, Howard Scott	20223	00/08/1963	18° 24'	97° 26'	ND	Puebla	4-10 millas al SW de Tehuacán, a lo largo de la carretera a Zapotitlán Salinas
Gentry, Howard Scott	22355	20/10/1967	16.913889	-96.300278	1676	Oaxaca	Mitla
Gentry, Howard Scott	22418	12/11/1967	18° 26' 04.61"	97° 24' 22"W	ND	Puebla	6 millas al SW de Tehuacán
Gentry, Howard Scott	22521	07/12/1967	16.905	-96.272222	1829	Oaxaca	2 millas al E de Mitla
Guízar	4782	ND	18.17299	-97.64496	ND	Puebla	1 km de Sabino Farol
Leuenberger & Schiers	2553	ND	18° 22' 27.96"	97° 25' 44.28"	ND	Puebla	Sobre la carretera 125 entre Tehuacán y Zapotitlán, 2 km al SW de San Antonio Texcala
Matuda, Eizi	32293	ND	18° 17' 44.60"	97° 09' 34.27"	ND	Puebla	Calipan
Matuda, Eizi	32294	30/10/1955	18.4833333	-97.4419444	ND	Puebla	San Lorenzo
Matuda, Eizi	s.n.	30/10/1955	18° 28'	97° 26'	ND	Puebla	Meseta de San Lorenzo, 1 Km E de Las Minas
Matuda, Eizi	s.n.	01/11/1955	18° 18'	97° 10'	ND	Puebla	Calipan, NW de Coxcatlán
Ogden & Gilly	51107	18/04/1952	17° 45'	97° 31'	ND	Oaxaca	A largo de la autopista entre la Cd. De Oaxaca y Acatlán, 9.5 millas al N de Tamazulapán
Ogden, E.C.	5175	04/02/1951	18° 32'	97° 25'	ND	Puebla	A lo largo de camino al E de autopista a Córdoba, 4 millas al NE de la carretera a Tehuacán
Pedro Tenorio L.	15382	28/12/1988	<b>18.167</b>	<b>-97.367</b>	ND	Puebla	Cerro el Castillo, al SE de Caltepec
Purpus, C.A.	3476	00/07/1908	18.18	-97.45	ND	Puebla	En las cercanías de San Luis Tultitlanapa, Puebla, cerca de Oaxaca
Ramírez Laguna, Antonio	s.n.	ND	18.45	-97.4022222	ND	Puebla	Tehuacán
Salinas Tovar, Antonio	s.n.	05/05/1994	18° 09' 45.36"	97° 15' 39.48"	ND	Oaxaca	Puente Calapa
Salinas Tovar, Antonio	7757	21/05/1994	18° 4'	97° 21'	1810	Oaxaca	Cerro Pluma, La Joya del Mezquite, Km 102.5 carretera Cuacnopalan-Oaxaca
Smith, Claude Earle	3679	12/07/1961	18° 10'	97° 11'	ND	Puebla	Al W del Río Salado, en las cercanías del Cerro Petlanco
Tenorio Lezama, Pedro	s.n.	28/12/1988	18° 10'	97° 26'	ND	Puebla	Cerro El Castillo, SE de Santiago Coatepec
Población 1 <i>Agave kerchovei</i>	—	00/00/2010	8° 4' 34.8"	97° 6' 8.7"	1817	Puebla	4.47 km en L.R. al SW de Santa María Coapan.
Población 2 <i>Agave kerchovei</i>	—	00/00/2010	7° 4' 7.7"	97° 37' 47.7"	1927	Oaxaca	6.94 km en L.R. al NW de Villa de Tamazulapam del Progreso.
Población 3 <i>Agave kerchovei</i>	—	00/00/2010	7° 4' 4.7"	97° 35' 45.7"	1900	Oaxaca	3 km en L.R. al NW de Villa de Tamazulapam del Progreso.
Población 4 <i>Agave kerchovei</i>	—	00/00/2010	7° 5' 58.7"	97° 3' 5.7"	2091	Oaxaca	4.19 km en L.R. al NE de Santa María Ixcatlán.
Población 5 <i>Agave kerchovei</i>	—	00/00/2010	7° 5' 5.7"	97° 3' 9.7"	2113	Oaxaca	3.2 km en L.R. al W de Santa María Ixcatlán.
Población 6 <i>Agave kerchovei</i>	—	00/00/2010	6° 57' 49.5"	96° 3' 9.6"	1682	Oaxaca	km ± 33 de la carretera Ayutla-Oaxaca a 400 m por la carretera al W de Santa María Albarradas.
Población 7 <i>Agave kerchovei</i>	—	00/00/2010	8° 9' 4.6"	97° 8' 38.7"	946	Oaxaca	— ot op " S n r l s l n
Población 8 <i>Agave kerchovei</i>	—	00/00/2010	8° 3' 4.8"	97° 7' 5.6"	989	Puebla	— rro l s ompu rt s" S n R l ox tlán

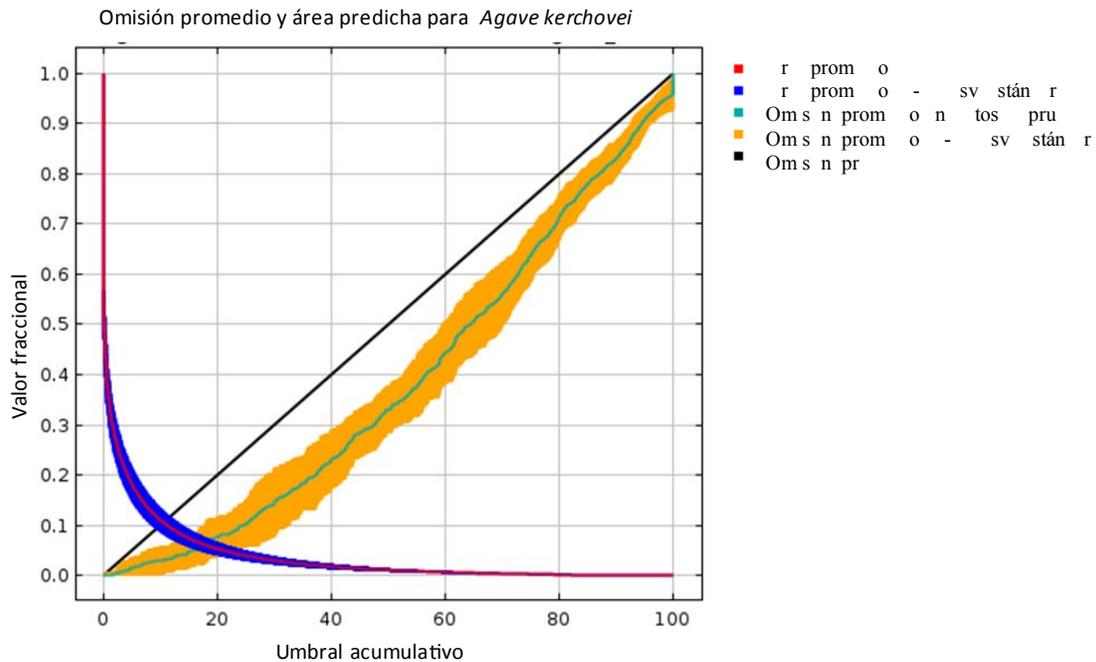
### ANEXO 3

Valores de las distancias genéticas de Nei (1987),  $D_{xy}$ , obtenidas con el programa DNAsp 5.10

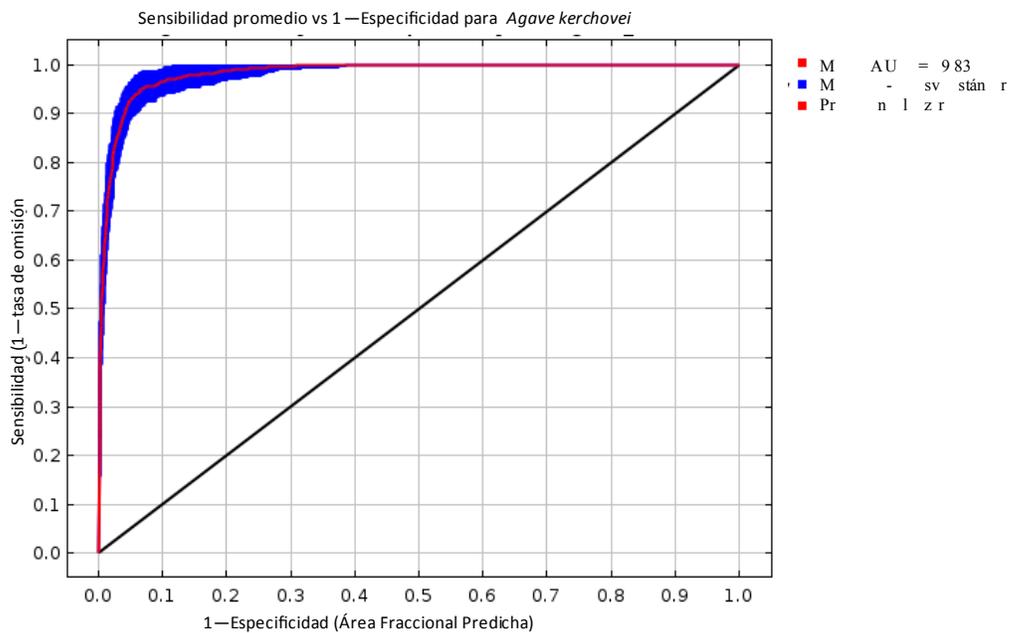
	Población 1	Población 2	Población 3	Población 4	Población 5	Población 6	Población 7	Población 8
Población 1	0							
Población 2	0.00101	0						
Población 3	0.00092	0.00183	0					
Población 4	0.00083	0.00165	0.00092	0				
Población 5	0.00101	0.00183	0.00092	0.00018	0			
Población 6	0.00101	0.00092	0.00183	0.00165	0.00183	0		
Población 7	0.00009	0.00092	0.00092	0.00073	0.00092	0.00092	0	
Población 8	0.00013	0.00095	0.00088	0.00071	0.00088	0.00095	0.00004	0

**ANEXO 4.** Curvas de omisión y Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) para el modelo de distribución de nicho ecológico presente y su proyección al último máximo glacial (21,000 años aproximadamente) para *Agave kerchovei* elaborado con MaxEnt.

**Análisis de omisión**



**Curvas ROC**



**ANEXO 5.** Cuadro comparativo de las especies del género *Agave* reportadas en la Flora de Valle de Tehuacán-Cuicatlán (García-Mendoza, 2011).

Especie	Infraespecie	Subgénero (●)	Grupo (●)	Distribución	Endémica (México)	Endémica VTC	Rango Alt. (m)
<i>A. americana</i>	var. <i>americana</i>	Agave	Americanae	EUA y MEX	No	No	1500-2300
	" <i>marginata</i> "	Agave	Americanae	Amplia en el mundo	No	No	ND
	var. <i>oaxacensis</i>	Agave	Americanae	México (Oaxaca)	Si	No	1500-1800
<i>A. angustiarum</i>		Littaea	Marginatae	México (Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla)	Si	No	1200-2640
<i>A. angustifolia</i>	var. <i>angustifolia</i>	Agave	Rigidae	México hasta Panamá	No	No	1000-1950
	var. <i>rubescens</i>	Agave	Rigidae	México (Guerrero, Jalisco, Oaxaca)	Si	No	900-1500
<i>A. aplanata</i>		Agave	Diepaliae	México (Chihuahua, Durango, Hidalgo, México, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Veracruz, Zacatecas)	Si	No	2000-2150
<i>A. atrovirens</i>	var. <i>atrovirens</i>	Agave	Hiemiflorae	México (Oaxaca, Puebla, Veracruz)	Si	No	2400-3100
	var. <i>mirabilis</i>	Agave	Hiemiflorae	México (Oaxaca, Puebla, Veracruz)	Si	No	(2000) 2500-2630
<i>A. chiapensis</i>		Littaea	Polycephalae	México (Chiapas y Oaxaca) y Guatemala	No	No	1800-2400
<i>A. convalis</i>		Littaea	Marginatae	México (Oaxaca)	Si	No	1800-2640
<i>A. ghiesbreghtii</i>		Littaea	Marginatae	México (Chiapas, Guerrero, Oaxaca, Puebla) y Guatemala	No	No	2200-2400
<i>A. karwinskii</i>		Agave	Rigidae	México (Puebla y Oaxaca)	Si	No	900-1500
<i>A. kerchovei</i>		Littaea	Marginatae	México (Puebla y Oaxaca)	Si	No	975-1600
<i>A. lurida</i>		Agave	Americanae	México (Oaxaca)	Si	No	1850
<i>A. macroacantha</i>		Agave	Rigidae	México (Sólo VTC)	Si	Si	700-1600
<i>A. mapisaga</i>		Agave	Salmianae	Centro de México	Si	No	1900-2700
<i>A. marmorata</i>		Agave	Marmoratae	México (Oaxaca y Puebla)	Si	No	680-1800
<i>A. nuusaviorum</i>	subsp. <i>nuusaviorum</i>	Littaea	*Marginatae	México (solo de la montaña, en la parte alta de Oaxaca)	Si	Si	1700-2500
	subsp. <i>deltoides</i>	Littaea	*Marginatae	México (sólo se conoce del distrito de Teposcolula en Oaxaca.)	Si	Si	2400-2600
<i>A. peacockii</i>		Littaea	Marginatae	México (Oaxaca y Puebla)	Si	No	1150-2200
<i>A. petrophila</i>		Littaea	Striatae	México (Guerrero, Puebla, Oaxaca)	Si	No	900-2100
<i>A. potatorum</i>		Agave	Hiemiflorae	México (Puebla y Oaxaca)	Si	No	1300-2400
<i>A. rhodacantha</i>		Agave	Rigidae	México (De Sonora a Oaxaca)	Si	No	1750-2080
<i>A. salmiana</i>	subsp. <i>salmiana</i>	Agave	Salmianae	México (Durango, Coahuila, Oaxaca)	Si	No	1500-2600
	subsp. <i>tehuacanensis</i>	Agave	Salmianae	México, se conoce del Noroeste de Oaxaca, suroeste de Puebla y este de Veracruz	Si	No	1500-2500
<i>A. scaposa</i>		Agave	Americanae	Endémica de México, se conoce del Noroeste de Oaxaca y suroeste de Puebla.	Si	No	2100-2550
<i>A. seemanniana</i>		Agave	Hiemiflorae	México (Oaxaca y Chiapas) a Nicaragua	No	No	700-1700
<i>A. stricta</i>		Littaea	Striatae	México (Sólo VTC)	Si	Si	1500-2060
<i>A. titanota</i>		Littaea	Marginatae	México (Sólo VTC)	Si	Si	500-1050
<i>A. triangularis</i>		Littaea	Marginatae	México (Sólo VTC)	Si	Si	1700-1930

**ANEXO 5.** (Continuación). ●: s n n e los grupos taxonómicos y subgéneros de *Agave*, tomados de Tambutti (2002). VTC = Valle de Tehuacán-Cuicatlán. ND= sin información disponible. \* procedentes del complejo de *Agave potatorum* (*Agave*; Hiemiflorae), pero el tipo de inflorescencia descrito en García-Mendoza (2011) las agrupa en el subgénero *Littaea*; en Tambutti (2002) aparecen dentro del grupo *Marginatae* dos especies descritas como nuevas que son endémicas, las cuales podrían corresponder a éstas descritas en García-Mendoza (2010) como nuevas especies.

Especie	Infraespecie	Habitat	Suelo	Floración	Fructificación	USO
<i>A. americana</i>	var. <i>americana</i>	Cultivada		Junio-Agosto	Septiembre-Diciembre	pulque, cerca viva
	" <i>marginata</i> "	Cultivada		Julio-Agosto	ND	ornamental
	var. <i>oaxacensis</i>	Cultivada		Junio-Agosto	Septiembre-Noviembre	mezcal, frutos comestibles
<i>A. angustiarum</i>		Matorral xerófilo y bosque tropical caducifolio	Calizo	Diciembre-Febrero	Febrero-Abril	fibras, botones comestibles, forraje
<i>A. angustifolia</i>	var. <i>angustifolia</i>	Bosque tropical caducifolio, matorral xerófilo, palmar y transición de los mismos con bosque de Quercus	lizo o volcánico	Junio-Agosto	Septiembre-Noviembre	forraje
	var. <i>rubescens</i>	Bosque tropical caducifolio, matorral xerófilo, palmar y transición de los mismos con bosque de Quercus		Junio-Agosto	Agosto-Septiembre	
<i>A. aplanata</i>		Matorral xerófilo y cultivada		Mayo-Julio	Septiembre-Octubre	fibras
<i>A. atrovirens</i>	var. <i>atrovirens</i>	Bosque de Quercus con rosetófilos	Roca volcánica	Noviembre-Marzo	Abril-Agosto	flores comestibles, construcción
	var. <i>mirabilis</i>	Bosque de Pinus-Quercus y cultivada	Ceniza volcánica	Noviembre-Marzo	Después de Marzo	forraje, peduculos para la construcción
<i>A. chiapensis</i>		Matorral xerófilo en ecotonia con bosque de Quercus	Calizo	Febrero-Mayo	Junio-Septiembre	flores comestibles
<i>A. convalis</i>		Bosque de Quercus y matorral xerófilo	Origen igneo	Agosto-Enero	Septiembre-Febrero	extracción de fibras
<i>A. ghesbreghtii</i>		Matorral xerófilo y la ecotonia hacia bosque de Quercus-Pinus	Origen calizo	Junio-Septiembre	Septiembre-Febrero	cerca viva, hojas para hacer amarres
<i>A. karvinskii</i>		Matorral xerófilo, bosque tropical caducifolio y cultivada	Calizo o sedimentario arenoso	Septiembre y octubre	Noviembre-Enero	cerca viva, medicinal
<i>A. kerchovei</i>		Matorral xerófilo	Calizo o sedimentario arenoso	Enero-Mayo	Abril-Octubre	Extracción de fibras, los botones florales son comestibles
<i>A. lurida</i>		Matorral xerófilo	Volcánico o calizo	Julio-Agosto	Octubre-Diciembre	
<i>A. macroacantha</i>		Matorral xerófilo	Calizos, salinos o yesosos	Mayo-Julio	Julio-Octubre	Cerca viva, la inflorescencia completa se utiliza como forraje, y los botones florales son comestibles.
<i>A. mapisaga</i>		Cultivado en sitios con pendiente suave o terrenos planos		Abril-Agosto	Después de Septiembre	Producción de aguamiel para la elaboración de pulque; las flores comestibles, construcción
<i>A. marmorata</i>		Bosque tropical caducifolio, matorral xerófilo y zona de transición entre ellas y el bosque de Quercus	Calizos o igneos.	Marzo y Abril	Mayo-Julio	Elaboración de mezcal, aguamiel, comestible (flores), medicinal, ornamental, forraje.
<i>A. musaviorium</i>	subsp. <i>musaviorium</i>	Bosque de Quercus-Pinus, bosque de Pinus y matorral xerófilo	Derivados de rocas calizas	Fines de Agosto-Diciembre	Noviembre-Marzo	Alimenticia y medicinal
	subsp. <i>deltoides</i>	Matorral rosetófilo	Rocas igneas.	Septiembre-Octubre	Diciembre-Abril	
<i>A. peacockii</i>		Matorral xerófilo	Calizos	Diciembre-Enero	Mayo-Julio	Extracción fibras
<i>A. petrophila</i>		Bosque tropical caducifolio, matorral xerófilo y ecotonia con bosque de Quercus	Calizo	Octubre-Noviembre	Diciembre-Marzo	
<i>A. potatorum</i>		Bosque tropical caducifolio, matorral xerófilo y transición de ellos con el bosque de Quercus	Roca caliza	Agosto-Noviembre	Noviembre-Marzo	Alimenticia (flores), medicinal
<i>A. rhodacantha</i>		Bosque tropical caducifolio y matorral xerófilo		Probablemente en Junio-Julio	Septiembre-Noviembre	
<i>A. salmiana</i>	subsp. <i>salmiana</i>	Cultivada en bordes del bosque de Quercus-Pinus, bosque tropical caducifolio y matorral xerófilo	Sobre suelos diversos	Abril-Septiembre	A partir de Noviembre.	Producción de pulque, cerca viva
	subsp. <i>tehuacanensis</i>	Matorral xerófilo	Rocas calizas	Marzo-Mayo (en cultivadas hasta agosto)	Después de Julio	Producción de pulque, construcción, alimenticia
<i>A. scaposa</i>		Matorral xerófilo y bosque de Quercus	Rocas igneas	Junio-Agosto	Septiembre-Diciembre	Alimenticia, medicinal
<i>A. seemanniana</i>		Bosque tropical caducifolio y ecotonia con bosque de Quercus-Pinus	Sustratos arenosos derivados de rocas calizas	Septiembre-Diciembre	Diciembre-Abril	Elaboración de mezcal y pulque
<i>A. stricta</i>		Matorral xerófilo	Calizo	Agosto-Octubre	Diciembre-Febrero	Flores comestibles, combustible (plantas secas)
<i>A. titanota</i>		matorral xerófilo	Suelos pardos de origen calizo	Finales de Noviembre-Enero	Entre Marzo y Mayo.	
<i>A. triangularis</i>		matorral xerófilo	calizo	Junio-Agosto	Septiembre-Diciembre	Cercas vivas.