



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

GENÉTICA DE POBLACIONES DE *Agave cupreata* y
Agave potatorum: APORTACIONES PARA EL MANEJO
Y CONSERVACION DE DOS ESPECIES MEZCALERAS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

PRESENTA:

XITLALI AGUIRRE DUGUA



DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS





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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES Y ENSEÑANZA DE QUÍMICA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Genética de poblaciones de Agave cupreata y Agave potatorum:
aportaciones para el manejo y conservación de dos especies
mezcaleras"

realizado por Xitlali Aguirre Dugua

con número de cuenta 9951531-9 , quien cubrió los créditos de la carrera de: **Biología**

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns

Propietario

Dr. Daniel Piñero Dalmau

Propietario

Dr. Eduardo Morales Guillaumin

Suplente

Dr. Alexander de Luna Fors

Suplente

M. en C. Martha Graciela Rocha Munive

Consejo Departamental de Biología FACULTAD DE CIENCIAS

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Agradecimientos

El presente estudio se hizo dentro del proyecto de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad CONABIO V038 “Diversidad genética de dos especies mezcaleras”. Quiero agradecer al Biol. Jorge Larson por su apoyo a lo largo de todo el proyecto y a la CONABIO por los recursos financieros que lo hicieron posible. Al Grupo de Estudios Ambientales A.C. y a la Biol. Cathy Illsley por los mapas de la región de Chilapa Gro., y los contactos proporcionados con la organización Sanzekan Tinemi, que nos permitieron conocer las poblaciones de *A. cupreata* y los viveros que han establecido para la propagación de la especie. Al Dr. Abisaí García Mendoza por los datos de colecta. Al Dr. Alejandro Martínez Palacios y al Biol. José Reséndiz por su ayuda en el trabajo de campo en Michoacán. A la Biol. Gabriela Guerrero por los mapas de las poblaciones utilizadas en el estudio. A la Dirección General de Evaluación Educativa de la UNAM por la beca Probetel que me otorgó de enero a junio de 2003.

El proyecto se desarrolló en el laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Departamento de Ecología Evolutiva, en el Instituto de Ecología, UNAM. Gracias a los Drs. Jordan Golubov y Salvador Montes por la literatura sobre ISSRs y los oligonucleótidos utilizados en el estudio. A Laura Espinosa por su ayuda en el montaje de las técnicas de PCR; a Arturo Silva y Christian Torres por su ayuda en el campo y en el laboratorio; a Ricardo Colín por su ayuda en la extracción de DNA; a Aldo Valera, Martha Rocha y Andrea González por sus aportaciones y ayuda permanente. A la Dra. Valeria Souza por sus comentarios al estudio y sus metodologías. Al Dr. Luis Eguiarte quien dirigió y enriqueció el proyecto en todo momento.

Eso es en cuanto a la tesis en sí, y en relación con todo lo demás que hubo antes de ella y luego de manera paralela, siempre es difícil tratar de incluir a todos los que, de una u otra forma, me acompañaron a lo largo de la carrera en la Facultad de Ciencias, y también en estos últimos meses. Espero no olvidar a nadie, y si llego a omitir a algún personaje, pido disculpas que no habrá sido a propósito.

A mis maestros de la Facultad; a los que fueron excelentes y me enseñaron a ver la Biología desde su perspectiva, compartida o no, y me dieron los pedacitos de los que construí mi propia versión de tan maravillosa ciencia. Y a los que fueron no tan excelentes, que me mostraron lo que no hay que hacer y me ayudaron a definir el camino a seguir.

A los miembros del laboratorio 301 Oriente del IFC que me recibieron con los brazos abiertos y me permitieron aprender a combinar la academia y el trabajo con la amistad y la pachanga. A Alicia González, por su pasión y por compartirla. A Alex, por su alegría y sonrisa permanente, por que siempre hay tiempo de tomar unas chelas y cantar boleros. A Luis, que desde la Facultad, me honró con su amistad y cariño. Gracias a los dos por compartir su sapiencia.

A todos mis amigos de este grande y vasto universo llamado Facultad de Ciencias. Andrea, gracias por todos los momentos compartidos, el apoyo y los consejos; por los viajes y las experiencias; nunca te quedes quieta. Mariana, por saber escuchar y mostrarme que el mundo puede verse de muchas maneras. Pablo, por la filosofía y el cariño. Esteban, por las locuras y la irreverencia. Vania, Sandra, Etzel, Amparo, Kim, Fernando, Emma, Checo, Suzette, Eva, Ivonne, Fernanda, Vanessa, por las horas compartidas y enriquecidas con la plática, la risa y el desvelo. Gracias a todos por la construcción de ideas, por compartir y dividir opiniones, pero también por aguantarme en esas horas de biblioteca y trabajo escolar. Que nuestros caminos compartan puentes a pesar de la distancia y el tiempo.

A Lev, Enrique, Niza, Willis, Nacho, Carlos, Iván, que no recuerdo cómo me invitaron a ser parte de sus megambréicas conversaciones y experiencias. Mil gracias por extender mis horizontes en la ciencia, la filosofía y la democracia. Por mostrarme a construir el debate, la crítica y la lucha, con el indispensable ingrediente de la fiesta, la cocina y el alegre espíritu de la amistad.

A los que hacen del laboratorio de Evolución Molecular y Experimental un nicho de maravillosas conversaciones, ideas y estudios. A Luis, por mostrarme que aunque la vida es muy complicada, siempre puede hacerse algo para tratar de entenderla. Por saber hacer las cosas bien y disfrutar de la academia. A Valeria, por su ánimo y hospitalidad imperecederos. A Martha y Aldo, que me enseñaron a disfrutar y sufrir el trabajo de campo en todas sus dimensiones; a apreciar la naturaleza en la sencillez del campo y sus habitantes. Gracias por su incondicional apoyo, honestidad y confianza. A Jaime y Ricardo por las horas bajo el sol y bajo la luna en Metztitlán, y bajo las lámparas de neón en el Instituto. A Laura, René y Amanda, por la ayuda moral y material en los baches de este camino. A todos por la amistad, los chismes y las discusiones que nunca faltan.

A mi familia, que siempre me impulsó a dar cada paso y compartió mis decisiones. A mi mamá, por su inagotable pasión por este país y su gente, por sus cuestionamientos de la visión del mundo y su interminable transformación. A mi hermana por su complicidad y apoyo; por las críticas y las porras; por ayudarme a comprenderme y comprender a los demás. A Ricardo, por ser ejemplo de tolerancia, cariño y apoyo incondicional.

A los buzos del Jack, Fausto, Olyver, Poeta, por la diversión y por conocer otras formas de ver la vida. Al equipo de montañismo de Manuel Casanova, Angel, Daniel, Irene, Sofía, Rodrigo, por los paisajes, los amaneceres y las caminatas.

A todos ustedes y a todos los que faltan ser mencionados, gracias por haberme ayudado a construir esta historia, con los momentos agradables y con los que lo fueron menos. Por haber sido parte de mi vida en estos años, esperando que sigan siéndolo por muchos más.

ÍNDICE

Resumen

Abstract

1. Introducción

| | |
|---|----|
| 1.1. Evolución y genética de poblaciones | 1 |
| 1.2. Bases de la genética de poblaciones | 4 |
| 1.3. Variación y estructura genética de las poblaciones naturales | 9 |
| 1.4. Genética de poblaciones, conservación y manejo | 11 |
| 1.5. Marcadores moleculares: <i>inter simple sequence repeats</i> (ISSRs) | 15 |
| 1.6. La familia Agavaceae y <i>Agave</i> | 17 |
| 1.7. Especies estudiadas | 19 |
| 1.8. Producción de mezcal | 21 |

2. Objetivos

24

3. Materiales y Métodos

| | |
|--|----|
| 3.1. Colecta de campo | 25 |
| 3.2. Amplificación de ISSRs | 26 |
| 3.3. Índices de variación, estructuración y flujo génico | 28 |
| 3.4. Distancia genética y aislamiento por distancia | 31 |
| 3.5. Partición de la varianza genética | 32 |

4. Resultados

34

| | |
|--|----|
| 4.1. Índices de variación y estructuración genética | 35 |
| 4.2. Distancia genética y aislamiento por distancia | 37 |
| Distancia genética y aislamiento por distancia en cada una de las especies | |
| Distancia genética y aislamiento por distancia entre las dos especies | |
| 4.3. Partición de la varianza genética | 43 |

5. Discusión

45

6. Conclusiones

58

Apéndice

60

Literatura citada

68

1. Introducción

1.1. Evolución y genética de poblaciones

En el estudio de la evolución pueden identificarse dos grandes problemas: comprender las historias evolutivas de los organismos, y comprender los mecanismos de la evolución. Para el primero se considera a la especie como la unidad evolutiva y se trata de reconstruir la filogenia de los organismos lo mejor posible (Nei, 1987). Respecto al segundo, los mecanismos de la evolución fueron objeto de especulaciones y debates, hasta que en 1859 Charles Darwin publicó *El Origen de las Especies*, cuyo eje es la selección natural, aunque más adelante se agregarían a ésta otros mecanismos como el aislamiento reproductivo, la deriva, la mutación, etc. La evolución, vista como adaptación y diversificación de las especies por medio del mecanismo de la selección natural, fue explicada por Darwin en términos temporales y geográficos, y concebida como proceso gradual. Pero una de las mayores aportaciones de Darwin fue su visión poblacional: la evolución no se refiere a los cambios que ocurren en un individuo; las alteraciones en la composición química, tamaño, forma o estructura en relación con el crecimiento y desarrollo de un individuo son triviales en un sentido evolutivo, porque el individuo no puede evolucionar (Niklas, 1997). Es la población la que evoluciona, por un cambio en la frecuencia de los tipos presentes: al aparecer un carácter novedoso que aumenta la sobrevivencia y la reproducción de los individuos que lo portan, el carácter ancestral se vuelve menos numeroso con el paso del tiempo, mientras que el carácter novedoso se va volviendo cada vez más común. Pero además de la aparición de caracteres novedosos más benéficos en relación con los ancestrales, un cambio en las frecuencias de los tipos puede también deberse a una modificación ambiental que favorezca un carácter que existía en pequeña proporción en la población y desfavorezca el que era más frecuente.

Para Darwin, el cambio evolutivo en los seres vivos es radicalmente diferente a cualquier otro proceso histórico conocido. Antes de *El Origen...*, todas las teorías de cambio histórico eran *transformacionales*: los sistemas parecen sufrir cambios en el tiempo porque cada elemento del sistema sufre una transformación individual durante su vida. En contraste, Darwin propuso un

principio *variacional*: los miembros individuales del conjunto difieren unos de otros en algunas propiedades, y el sistema evoluciona por cambios en las proporciones de los diversos tipos (Levins y Lewontin, 1985). Esta visión poblacional variacional contrastó por igual con la visión tipológica prevaleciente en el siglo XIX, cuyas raíces remontaban a la filosofía de Platón; en ella existe un número limitado de “ideas” fijas, inmutables, que subyacen la variabilidad que se observa. En contraste, para Darwin todos los organismos y fenómenos orgánicos están compuestos de características únicas y pueden ser descritos colectivamente sólo en términos estadísticos. Los individuos forman poblaciones de las que podemos estimar la estadística de la variación. Los promedios son abstracciones estadísticas y sólo los individuos que componen a las poblaciones son reales. Para el tipológico, el tipo (*eidos*) es real y la variación una ilusión, mientras que para el poblacionista, el tipo (promedio) es una abstracción y sólo la variación es real (Mayr, 1959).

La presencia de diferencias heredables entre los miembros de una población o especie es indispensable para el proceso evolutivo y para la concepción de la teoría de la evolución por medio de la selección natural. Sin embargo, Darwin desconocía por completo el mecanismo de la herencia y las fuerzas que daban origen a esa variación; llegó incluso a conceder cierta importancia a los efectos directos del medio ambiente y al uso y desuso de partes, tal como lo había sugerido Lamarck:

Creo que las condiciones de vida, a partir de su acción en el sistema reproductivo, son de la mayor importancia para causar variabilidad (...). La variabilidad es gobernada por muchas leyes desconocidas, especialmente por aquella de la correlación de crecimiento. Algo debe ser atribuido a la acción directa de las condiciones de vida. Algo debe ser atribuido al uso y desuso¹.

La comprensión de la evolución orgánica requería de una teoría genética que pudiera explicar y cuantificar cómo las características son transmitidas de padres a hijos, ya que la aparición de diferencias entre los miembros, así como su heredabilidad, son indispensables para el proceso evolutivo y para la concepción de la teoría. Esta teoría genética fue aportada por Gregor Mendel, cuyos trabajos acerca de la herencia de los caracteres en los chícharos fueron llevados a cabo entre 1854 y 1856. Pero el proceso evolutivo propuesto por Darwin no fue interpretado en

¹ Darwin, Ch., 1859. *On The Origin of Species*, Primera Edición. pp. 43 (traducción libre).

términos mendelianos sino hasta las décadas de 1920 y 1930 por Ronald Fisher, John B.S. Haldane y Sewall Wright, quienes dieron origen a la genética de poblaciones, la base teórica matemática de la Síntesis Moderna. Bajo esta perspectiva, un carácter adaptativo aparece en una población como el efecto fenotípico de un nuevo alelo mutante. El efecto del alelo en el fenotipo es tal que un individuo que lo posee dejará, en promedio, más descendencia en la próxima generación que uno que no lo posee. Así, tras cierto número de generaciones, la frecuencia del alelo mutante aumentará. La *evolución* puede ser entonces definida como el cambio de las frecuencias alélicas en la población; y la *selección natural* como la contribución diferencial de los distintos genotipos a la siguiente generación (Hughes, 1999). Se trata de los mismos principios poblacional y variacional de Darwin, reinterpretados bajo un enfoque matemático. Se considera también que las pozas génicas de cada especie están aisladas una de otra, y la poza de cada especie se mantiene unida por flujo génico. En el caso de las especies que se reproducen sexualmente, cada individuo posee sólo una porción de los genes de la poza génica de la especie, ya que sus alelos son aportados por dos padres distintos. Los alelos pueden ser modificados por mutaciones cromosómicas o génicas, considerando a la mutación como la fuente esencial de variación. Finalmente, las barreras que restringen o eliminan el flujo génico entre las subpoblaciones de una especie son esenciales para la divergencia génica y fenotípica de la subpoblación de la especie, de manera que la especiación se completa cuando el flujo génico ya no ocurre entre la población divergente y la población de la especie parental (Niklas, 1997).

Esta perspectiva dio lugar a otras propuestas sobre el cambio evolutivo como el equilibrio cambiante o *shifting balance* de Wright (propuesto en 1932), la evolución neutral de Kimura (propuesta en 1968), y el papel del cambio en los genes regulatorios y no en los estructurales - en relación con la evolución morfológica - de Wilson y King (propuesto en 1975) (Nei, 1987). Pero no fue hasta la década de 1960 que se encontró una base empírica para la Síntesis Moderna gracias a la introducción de técnicas moleculares. La electroforesis de proteínas permitió mostrar que la mayoría de las poblaciones naturales posee un alto grado de variación genética en el nivel proteico, e hizo surgir una gran controversia sobre el mecanismo que mantenía dicha variabilidad (ver Lewontin, 1991). Más adelante, otras técnicas como la PCR, los métodos de restricción enzimática, la clonación de genes y la secuenciación de DNA generaron una revolución en la biología molecular y descubrieron muchas propiedades inesperadas en la estructura y

organización de los genes (como exones, intrones, regiones flanqueadoras, DNA repetitivo, pseudogenes, familias de genes y transposones); además, mostraron que la cantidad de variación genética que era indetectable por electroforesis de proteínas es enorme. Los datos moleculares permitieron teóricamente eliminar la división entre las dos grandes áreas de los estudios evolutivos: la historia evolutiva de la vida y el mecanismo de la evolución. Por un lado, los evolucionistas bioquímicos concentrados en reconstruir filogenias se dieron cuenta de que el polimorfismo genético dentro de las especies es enorme y no puede ser subestimado en el estudio de la evolución de taxa como géneros y familias, y por el otro, los genetistas de poblaciones supieron que los alelos polimórficos son en ocasiones más antiguos que la especie misma. Debe hacerse énfasis en que mientras la evolución a largo plazo es esencialmente una acumulación de evoluciones consecutivas a corto plazo, el patrón del cambio evolutivo en los organismos es más claro cuando éste se examina a largo plazo (Nei, 1987).

1.2. Bases de la genética de poblaciones

La genética de poblaciones pretende comprender la evolución (en términos de adaptación y especiación) a partir del comportamiento de los genes en las poblaciones, considerando a los genes como unidades sobre los que actúan las distintas fuerzas evolutivas, como la selección natural, la deriva génica, la mutación, la migración y la endogamia. Para lograrlo se trata de determinar cuánta variación genética existe en las poblaciones naturales y explicarla en términos de su origen, mantenimiento e importancia evolutiva (Hartl y Clark, 1997). Las poblaciones con las que se trabaja pueden ser naturales o experimentales; el ambiente puede ser la ciudad, el campo o el laboratorio; el hábitat puede ser el suelo, el agua o el aire. Se requiere además de una gran variedad de aproximaciones, como la construcción de modelos puramente teóricos, observaciones descriptivas cuidadosas e interpretaciones de patrones estadísticos, así como experimentos controlados para poder comprender las complejas interacciones entre las fuerzas evolutivas y los factores ecológicos y genéticos de las poblaciones. Definiendo el marco dentro del que se desarrolla la evolución, los principios de esta teoría son la base de una perspectiva evolutiva amplia a nivel biológico (Hartl y Clark, 1989, 1997).

La herramienta básica de la genética de poblaciones es el modelo matemático, que puede expresar de manera precisa las relaciones cuantitativas hipotetizadas entre los parámetros; revelar qué parámetros son los más importantes en el sistema y entonces sugerir experimentos u observaciones críticas (Hartl y Clark, 1989). El modelo básico ideal de esta teoría es el equilibrio de Hardy-Weinberg (H.W.), a partir del cual se estudia el efecto de las diferentes fuerzas evolutivas en la variación genética inicial. Este modelo explica de modo básico, con base en las leyes de Mendel, el comportamiento esperado del material genético cuando ninguna fuerza evolutiva actúa sobre él. En el modelo del equilibrio de H.W., la población en cuestión consiste de individuos diploides sexualmente maduros y para que el equilibrio se dé, deben cumplirse las siguientes condiciones:

- El tamaño poblacional es muy grande
- Los apareamientos son al azar (la población es panmíctica)
- No hay migración (entrada o salida de genes)
- Todos los alelos son igualmente competentes para dejar hijos (no hay selección natural)
- No hay mutaciones

El equilibrio de H.W. establece que las frecuencias genotípicas de un locus, tras una generación de apareamiento al azar, pueden representarse por una función binomial (con dos alelos en el locus) o multinomial (con múltiples alelos) de las frecuencias alélicas (Hedrick, 2000).

En el caso de un locus con dos alelos, para el locus A se consideran dos alelos: A y a .

| | | |
|---|--------------------------------------|------------------------------|
| Genotípicamente puede haber individuos: | Cuya frecuencia en la población sea: | |
| Homocigos Dominantes (D): AA | $D = NAA/Nt$ | } frecuencias genotípicas |
| Heterocigos (H): Aa | $H = NAa/Nt$ | |
| Homocigos Recessivos (R): aa | $R = Naa/Nt$ | |

La frecuencia del alelo A (p) y del alelo a (q), se calculan:

$$\left. \begin{aligned} p &= D + \frac{1}{2}H \\ q &= R + \frac{1}{2}H \end{aligned} \right\} \text{frecuencias alélicas}$$

y

$$p + q = 1$$

Tras el apareamiento al azar, cuyas probabilidades pueden representarse por el binomio $(p+q)^2$, a la siguiente generación se da la relación:

$$D = p^2$$

$$H = 2pq$$
$$R = q^2$$

Si las condiciones del equilibrio de H.W. se siguen cumpliendo, esta relación se mantiene en todas las generaciones, de manera que las frecuencias de los genes permanecen iguales (no hay evolución). Cuando alguna de las condiciones no se cumple, las frecuencias p y q cambiarán, así como las frecuencias genotípicas D, H y R (Eguiarte, 1986).

Retirando una a una las condiciones dadas para que este equilibrio exista, puede evaluarse el impacto de cada una de las fuerzas evolutivas, generándose modelos más complejos que traten de reflejar la realidad de manera más concreta. De manera inversa, al analizar una población y verificar si los loci analizados están bajo el equilibrio de H.W. puede identificarse la acción de alguna o varias fuerzas evolutivas. Las fuerzas evolutivas consideradas cuando no se cumplen los supuestos del equilibrio son las siguientes (de acuerdo con Hedrick, 2000; Eguiarte, 1986):

Deriva génica

Se presenta cuando las poblaciones son muy pequeñas. Al haber pocos individuos en la población se generan errores de muestreo: algunos individuos producen más hijos que otros, independientemente de la selección natural. Tales errores son más bruscos entre más pequeña sea la población, cambiando de manera aleatoria las frecuencias alélicas de generación en generación. El resultado es un cambio de frecuencias alélicas al azar, así como la fijación de uno de los alelos en la población. Como el error de muestreo se da en los gametos, el cambio de las frecuencias alélicas y genotípicas será similar para todos los loci del genoma. Para estimar la importancia de la deriva en una población no debe considerarse el tamaño total de ésta, sino el número de individuos que se están reproduciendo, ya que el error de muestreo se da en el número de gametos que cada individuo reproductivo deja. Este número es el *tamaño efectivo de población*, cuyo índice es N_e .

Endogamia

Se presenta cuando los apareamientos no son al azar, sino que se cruzan con más frecuencia individuos con un grado de consanguinidad mayor al de dos individuos que se tomaran al azar en la población. La endogamia no cambia las frecuencias de los alelos, pero sí la de los genotipos,

aumentando la frecuencia de los homocigos y reduciendo la de los heterocigos. Una de las consecuencias más importantes de este fenómeno es que los cambios genotípicos ocurren en todos los loci del genoma, tal como en la deriva.

Migración o flujo génico

Depende principalmente de la tasa de migración, denominada m y definida como la proporción de migrantes o individuos nuevos provenientes de otras poblaciones, así como de la frecuencia génica de los individuos migrantes. El efecto de esta fuerza es la homogenización entre las poblaciones, influenciando las frecuencias alélicas y genotípicas de todos los loci. Cuando el flujo génico es bajo o heterogéneo, la deriva génica, la selección e incluso la mutación en los distintos grupos pueden llevar a la diferenciación genética.

Selección natural

Se da cuando los distintos genotipos no poseen la misma eficiencia para dejar hijos y/o sobrevivir. Esta eficiencia se interpreta en términos de sobrevivencia y fecundidad o *adecuación* (denominada w). La adecuación es una medida que indica la eficiencia de un genotipo dado y señala cuántos hijos en promedio deja un portador de ese genotipo. Se considera que la selección natural actúa sobre un locus (o potencialmente, en otros que se encuentren en una región cercana).

Mutación

Fuente primaria del material evolutivo, es el origen de toda novedad y variación genética. El proceso de mutación puede involucrar un cambio de un solo nucleótido, varios nucleótidos, parte de un gen, parte de un cromosoma, un cromosoma completo o conjuntos de cromosomas. Dentro del modelo, las mutaciones que se consideran son aquellas que dan origen a un nuevo alelo o una nueva secuencia nucleotídica. La aparición de alelos mutantes (o nuevos alelos) genera un cambio en las frecuencias alélicas, cuya naturaleza depende del tipo de mutación.

La acción de estas fuerzas puede ser visualizada en la topografía adaptativa (también conocida como *shifting balance*) concebida por Sewall Wright en 1932 (Figura 1).

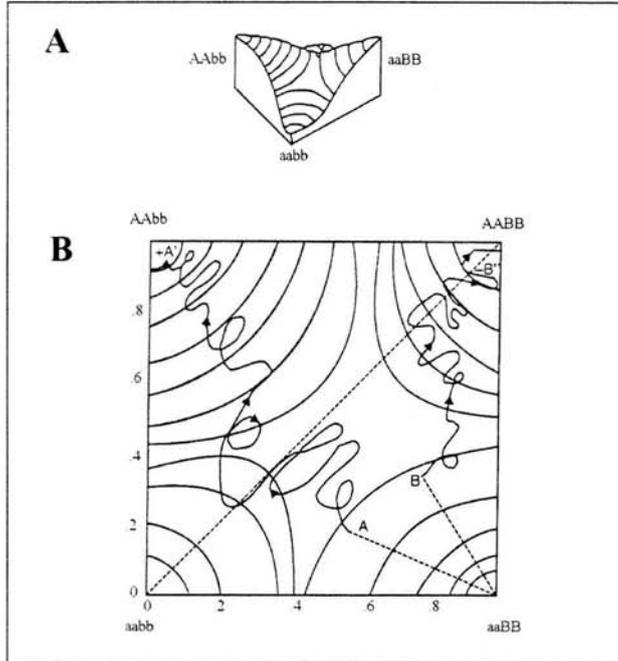


Figura 1. Topografía adaptativa con dos picos y dos valles. **A.** Vista de perfil. **B.** Vista de arriba: hay dos poblaciones con su ruta si opera la selección natural (+) y la posible ruta si opera la deriva génica (·). Las líneas topográficas son líneas de igual adecuación. Los picos adaptativos son aaBB, AAbb; los valles son aabb y AAbb. Si sólo opera la selección natural, las dos poblaciones llegan al pico aaBB (tomada de Eguiarte, 1986).

En una población, la adecuación promedio (\bar{W}) es la adecuación de cada uno de los genotipos multiplicada por la frecuencia de esos genotipos. Esto significa que en función de los genotipos y de su frecuencia, la población puede tener una adecuación alta o baja. En la topografía, las combinaciones de genotipos con \bar{W} alta generan picos, mientras que las de \bar{W} baja generan valles. La acción de las diversas fuerzas puede desplazar a la población de una combinación genotípica a otra: la selección conduce a la población a un pico adaptativo, aunque no necesariamente al más alto (la lleva al pico a cuyo pie se encuentra inicialmente); para bajar de un pico y desplazarse por los valles, de los pies de un pico a otro, se necesita de las demás fuerzas evolutivas. Por ejemplo, la migración puede ayudar a la población a llegar a un pico si aumenta la variabilidad genética por la llegada de nuevos alelos que sean seleccionados positivamente, o bien hacerla bajar o desplazarse si los individuos recién llegados estaban adaptados a otras condiciones. La deriva génica y la endogamia generan un desplazamiento al azar en la topografía, que puede llegar a ser muy brusco. En general, la acción de las fuerzas

evolutivas se combina, de tal forma que la especie va adaptándose y explorando de manera íntegra la topografía adaptativa (Eguiarte, 1986).

1.3. Variación y estructura genética de las poblaciones naturales

En las poblaciones naturales, para comprender cómo estas fuerzas actúan sobre el material genético disponible, es necesaria la estimación de los niveles de diversidad genética y sus dinámicas. Debe recordarse que la variación o diversidad genética de los organismos, representada en el nivel del DNA, de las proteínas, de los cromosomas o incluso en el nivel del genoma, refleja la enorme diversidad de la vida en términos de las diferencias que existen entre los individuos de una población, entre los individuos en diferentes poblaciones de la misma especie y, por lo tanto, también en las diferencias entre individuos de diferentes especies. De hecho en el nivel genotípico la variación es la regla y la uniformidad es la excepción, aunque ello no anula la relativa uniformidad que se observa en el nivel fenotípico de los organismos, de manera que la genética ha podido explicar simultáneamente la existencia de uniformidad y variación dentro de las poblaciones (Mettler *et al.*, 1988; Creighton, 1999). Si se toma en cuenta la visión darwiniana de que la evolución es la conversión de las variaciones individuales en variaciones entre poblaciones y especies en el tiempo y en el espacio, es esencial incluir en el estudio de la evolución el origen y las dinámicas de la variación genética dentro de las poblaciones (Lewontin, 1974).

Uno de los aspectos más importantes en este sentido es la estructuración de esta variación. Las especies o poblaciones no suelen formar unidades panmícticas sencillas donde los individuos se cruzan al azar, sino que están subdivididas en entidades más pequeñas, que pueden ser grupos o regiones, divididos a su vez en unidades menores (Excoffier, 2001). Cuando una población está subdividida, las partes pueden estar conectadas en diferente proporción, dependiendo principalmente del monto del flujo génico presente entre las subpoblaciones. Cuando el flujo génico es alto, tiene como efecto la homogenización de la variación genética entre los grupos. Cuando es bajo, la deriva génica, la selección o incluso la mutación en cada grupo pueden provocar diferenciación genética; por ejemplo la selección disruptiva puede favorecer diferentes

genotipos en diferentes ambientes. Pero los patrones de la diversidad genética en el espacio pueden también desarrollarse independientemente del mosaico ambiental, siendo resultado de la deriva génica dentro de una población, o por un efecto fundador en la historia de la población. En otras palabras, las fuerzas evolutivas mencionadas anteriormente pueden contribuir a la estructuración de una población o especie (Eguiarte, 1986; Hedrick, 2000).

La subdivisión o estructuración de las poblaciones se ve también afectada por aspectos ecológicos y demográficos como el tamaño, el número y la edad de los individuos que contiene cada población, así como por el sistema reproductivo de la especie, el monto de la variación producida y su capacidad de dispersión (Hartl y Clark, 1997). En el caso de las plantas, los sistemas reproductivos incluyen múltiples posibilidades, no excluyentes, que se presentan según el estado fisiológico y ecológico de la planta. Pueden mencionarse la propagación asexual (clonalidad), apomixis (producción de semillas sin meiosis), automixis (semilla producto de una pseudofecundación del cigoto con otra célula haploide de la misma planta madre), auto-polinización y polinización cruzada (entre estas dos hay un gradiente de situaciones). Esta última es la única que aporta de manera importante genotipos diferentes, aunque la auto-polinización y la automixis también, pero de manera limitada (Eguiarte *et al.*, 1992). El monto de la variación producida depende del sistema reproductivo, pero también de la escala temporal en la que se presenta la reproducción y su frecuencia. Asimismo, la acción de los polinizadores y dispersores de semillas juega un papel fundamental en el flujo de genes entre los miembros de una población o bien de una población a otra.

La estructura genética de una población juega un papel dominante en su evolución ya que puede influenciar los niveles de selección, la cantidad de variación genética que es mantenida y la capacidad de explotar las oportunidades ecológicas. Si una población está compuesta de muchas subpoblaciones discontinuas que están parcialmente aisladas una de otra y están genéticamente diferenciadas, el monto de variabilidad en la población será mucho mayor que en una población panmíctica del mismo tamaño. De acuerdo con Wright (1965), la tasa de evolución en las poblaciones grandes subestructuradas es substancialmente mayor que en poblaciones pequeñas o poblaciones grandes sin estructuración. Esto se debe a que una población pequeña no alcanzaría fácilmente un pico a causa de la deriva génica, mientras que una población grande sin

estructuración puede alcanzar un pico relativamente bajo y permanecer allí indefinidamente. Para esta última es difícil alcanzar un pico más alto, porque necesita cruzar un valle en la superficie adaptativa. En cambio, en una población estructurada, el tamaño efectivo de una subpoblación es tan pequeño que la deriva génica opera antes de que la población entera haya alcanzado un pico, y es posible que la subpoblación particular cruce un valle y alcance un pico de mayor altura. Esto es, algunos de los genotipos nuevos pueden ser útiles en la explotación de nuevos hábitats o frente a cambios en el presente hábitat; dada la oportunidad ecológica, los genotipos nuevos serán favorecidos, y la subpoblación prosperará en el nuevo ambiente. Finalmente, la dispersión a partir de esta subpoblación hacia otras aportará un mayor nivel de adaptación a la población como un todo (Nei, 1987; Levin, 1988).

Cuando no se reconoce adecuadamente la estructura de una población, puede interpretarse erróneamente el patrón observado de la diversidad genética y ocultarse el efecto de la selección o de las fuerzas que hayan generado la estructuración. El efecto Wahlund muestra que en presencia de una subdivisión, si existen diferencias importantes en las frecuencias alélicas de las subpoblaciones, cuando éstas se unen habrá una deficiencia neta de heterócigos y un exceso de homócigos, aún cuando exista equilibrio de H.W. en cada subpoblación. Por otra parte, cuando se consideran varios loci la subdivisión puede mostrar patrones de desequilibrio de ligamiento, incluso entre loci físicamente no ligados. Pero cuando hay selección, la subdivisión adecuadamente reconocida puede permitir la distinción entre varias formas de selección que tienen efectos diferentes en la diversidad dentro y entre los subgrupos (Excoffier, 2001; Hedrick, 2000).

1.4. Genética de poblaciones, conservación y manejo

Entre las diversas razones por las que el hombre decide conservar los recursos naturales están las ecológicas (como el mantenimiento de la biodiversidad), económicas (por el valor comercial de los recursos), éticas (por la discusión de si tenemos o no derecho de alterar los patrones de extinción que naturalmente ocurren) y genéticas. Desde el punto de vista genético, los genomas de las especies son archivos de información sobre patrones de desarrollo, ciclos de vida,

explotación de fuentes de energía y vida en ambientes extremos. Además de la información genética que se expresa, existen porciones del genoma que no lo hacen, pero que son la materia prima de la futura evolución, y en este sentido, la conservación de las especies nos permite posibilidades de evolución y de explotación de recursos que de otra manera no conoceríamos (Eguiarte y Piñero, 1990; Ehrlich y Ehrlich, 1981).

La conservación de las especies, de acuerdo con Frankel y Soulé (1981), se logra sólo si se les da la oportunidad de seguir evolucionando, esto es, de continuar sus procesos de adaptación y especiación, para lo cual se necesita conocer su historia natural y aspectos genéticos. Sin embargo, los aspectos genéticos son importantes no sólo para la conservación de la especie en cuestión, sino también para la preservación de la diversidad biológica de la biosfera, ya que ésta (antes sinónimo del número de especies) incluye actualmente la diversidad dentro de las especies mismas. Se considera que la biodiversidad se compone esencialmente de los siguientes niveles (Frankham *et al.*, 2002):

- 1) Variación genética intraespecífica
- 2) Variedad de especies dentro de los ecosistemas
- 3) Variedad de ecosistemas en la biosfera

Pero a un nivel todavía más reducido, Ledig (1988) concibe la biodiversidad, debajo del nivel de ecosistema, como la unión de tres entidades que en realidad son una sola y deben ser objeto de un programa de conservación biológica ideal:

- 1) La diversidad de formas del mismo gen dentro de una especie
- 2) El cúmulo de diferencias genéticas que caracterizan a diferentes poblaciones
- 3) Las enormes bibliotecas de información genética que caracterizan a cada una de las especies

Es en este sentido que ha surgido recientemente una nueva herramienta frente a los problemas de conservación, la genética de la conservación, que puede definirse como la aplicación de la genética de poblaciones para preservar las especies como entidades dinámicas capaces de hacer frente al cambio ambiental. Abarca el manejo genético de poblaciones pequeñas, la resolución de incertidumbres taxonómicas, la definición de unidades dentro de especies y el uso de análisis

genéticos moleculares en aspectos forenses, así como en la comprensión de la biología de las especies (Frankham *et al.*, 2002).

En particular, uno de sus problemas más relevantes es la extinción, ya que aunque ésta puede presentarse por diversas causas (catástrofes, estocasticidad demográfica o ambiental), puede también suceder por razones genéticas. Cuando una población se vuelve demasiado pequeña, ya sea por la fragmentación del hábitat, porque es endémica, por la caza o por la explotación excesiva, puede experimentar niveles altos de endogamia, deriva génica y poco flujo génico. Si el tamaño de la población es muy bajo y la especie presenta gran cantidad de genes recesivos deletéreos, pueden producirse individuos homocigos cuya viabilidad se vea disminuida, ya sea por que es menos vigoroso, se muere más joven o por que es menos fecundo (depresión por endogamia). Si la reducción del tamaño de la población fue rápida, la fecundidad o sobrevivencia puede bajar tanto como para que la población se extinga. Éste es uno de los problemas más frecuentes en el manejo de poblaciones pequeñas (como las de cautiverio o en reservas). En otra situación, la extinción puede ser consecuencia del flujo excesivo de genes o individuos provenientes de otras poblaciones adaptadas a otras condiciones. Si el flujo es demasiado grande, la población puede quedar tan pobremente adaptada que se extinga (depresión por exogamia). Por otro lado, si se presenta un cambio ambiental y la población es tan pequeña que por deriva génica posee poca variación, no podrá adaptarse y se extinguirá (Eguiarte y Piñero, 1990).

En el caso del manejo de poblaciones naturales, la fragmentación de los ecosistemas genera una división de las poblaciones en unidades más pequeñas o parches, de manera que para comprender la dinámica de los genes en estas subpoblaciones, deben considerarse parámetros como la tasa de mutación, la tasa de apareamiento entre parientes (endogamia) y el tamaño poblacional. Este último será importante en la posible pérdida de variabilidad genética, ya que con un menor tamaño poblacional la heterocigosis se perderá a una tasa proporcional a $1/2N$, donde N es el tamaño de la población (Crawford, 1984). Pero la división de las poblaciones en unidades más pequeñas puede también ser de origen natural y depender de aspectos geográficos y ecológicos intrínsecos a las especies. En ese caso, la estructuración natural de las poblaciones puede ser crucial en la comprensión de patrones filogeográficos, en el reconocimiento de subespecies y en la protección de la diversidad genética total existente en la especie (Excoffier,

2001). En otras situaciones, la genética de la conservación puede aportar datos sobre el estatus taxonómico de muchas especies, ya que una especie aparentemente en poco riesgo y con una distribución amplia puede, en realidad, comprender un complejo de taxa distintos, algunos raros o en peligro. Inversamente, puede suceder que una especie en peligro resulte indistinguible genéticamente de otra que no lo esté. Asimismo, es posible que las poblaciones dentro de una especie puedan estar suficientemente diferenciadas (por estar adaptadas a ambientes diferentes) como para merecer un manejo como unidades separadas, mientras que sus híbridos pueden ser desventajosos. Muchos aspectos de la biología de los organismos puede también ser determinada usando análisis moleculares. Entre estos pueden mencionarse los patrones de apareamiento y sistemas de reproducción, la determinación del sexo, paternidad, así como censos de especies animales que son difíciles de capturar y sensibles a la perturbación, cuyas muestras de DNA se toman de heces o pelo. El análisis molecular permite igualmente determinar patrones de dispersión y migración que son comúnmente críticos para la supervivencia de una especie (Frankham *et al.*, 2002).

La genética de la conservación puede también aportar datos importantes sobre las poblaciones manejadas, sobre todo de especies con importancia económica. Se ha observado que la disminución en la diversidad genética de las especies cultivadas es un fenómeno directamente asociado al manejo y puede deberse a la propagación de sólo algunas de las variedades de la especie o bien por una baja representatividad del total de la diversidad al establecer las plantaciones. En el caso de las semillas comercialmente importantes como el arroz, trigo, maíz, soya y frijol, el monocultivo, la industrialización de la agricultura y la generalización de sólo ciertas variedades mejoradas han provocado una disminución importante en la poza génica de dichas especies. Se estima que sólo el 10% de las variedades que se han desarrollado en la historia se sigue cultivando, debido a que las locales han sido reemplazadas por las mejoradas (Millstone y Lang, 2003). Frente a esta situación se han creado bancos de germoplasma de las múltiples variedades de los granos comerciales más importantes, particularmente maíz y trigo, pero este tipo de medidas de conservación *ex situ* ha mostrado tener muchas limitantes, sobre todo en relación con el financiamiento y capacidad de almacenamiento a largo plazo, así como con la manutención de la viabilidad del material colectado y su regeneración frente al paso del tiempo. La alternativa parece ser la conservación de las variedades presentes en los sitios de

origen y diversificación de estos granos, ya que son las que aún conservan *in situ* la mayor parte de la diversidad genética de estas especies (Frisvold y Condon, 1998).

Se ha observado también una disminución en la diversidad genética en plantaciones de árboles sujetas a prácticas de manejo basadas en la regeneración artificial. Estas plantaciones presentan niveles de diversidad mucho menores a las poblaciones silvestres de edad avanzada y a aquellas en las que la regeneración natural ha reforestado el área (Rajora, 1999). La selección, intencional o no, puede presentarse en cada una de las etapas del proceso de reforestación: durante la contribución parental al lote de semillas (que suele ser asimétrica, disminuyendo el tamaño efectivo de la población); en los métodos de procesamiento y almacenamiento de semillas (en el que la pérdida de viabilidad es genotipo-específica), así como en la germinación. Es evidente que, en estos casos, es necesario ampliar la base genética de las plantaciones monitoreando las colecciones de semillas y cada una de las etapas del proceso, para abarcar el mayor número de árboles parentales, así como propiciar la regeneración natural por medio de sistemas de árboles semilleros y áreas naturales de refugio de la diversidad genética (El-Kassaby, 1995; Rajora, 1999). En otros casos, el impacto de la silvicultura no ha sido tan alto gracias a la robustez genética de la especie, asociada con su biología reproductiva (altas tasas de exogamia, sincronización de la floración) y flujo génico via polen con áreas vecinas no explotadas (Glaubitz *et al.*, 2003).

1.5. Marcadores moleculares: *inter simple sequence repeats* (ISSRs)

Los primeros estudios sobre la variación genética de las poblaciones naturales (en las décadas de 1940 y 1950) estuvieron enfocados a aspectos detectables o cuantificables como el color, variantes morfológicas, inversiones cromosómicas y grupos sanguíneos. Más adelante, el desarrollo de técnicas moleculares permitió observar y cuantificar de manera más precisa el grado de variación genética que existe en las especies y sus poblaciones (Hedrick, 2000). Las primeras se enfocaron al uso de la variación de las proteínas como una estimación de la variación en la secuencia de DNA que determina la secuencia de aminoácidos de dichas proteínas (Hedrick, 2000; Martínez, 1997). Después se desarrollaron las técnicas relacionadas con ácidos

nucleicos, que han cobrado auge desde el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR. Entre las técnicas más comunes en genética de poblaciones que utilizan ácidos nucleicos pueden mencionarse los *restriction fragment length polymorphisms* (RFLPs), *amplified fragment length polymorphism* (AFLPs), *randomly amplified polymorphic DNA* (RAPDs) y el uso de DNA disperso repetitivo (drDNA) presente en el genoma nuclear eucarionte como un componente principal de la heterocromatina y de los microsatélites (Whitkus *et al.*, 1994).

Los microsatélites consisten en repeticiones en tandem de motivos simples como $(CT)_n$ ó $(CA)_n$, ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucarionte. Los motivos repetidos, llamados también SSRs (*simple sequence repeats*) pueden ser penta-, tetra-, tri- y dinucleótidos. La longitud de las secuencias de microsatélites tiende a ser altamente variable entre individuos debido a las altas tasas de mutación que experimentan, ya que cuando el DNA se replica durante la meiosis, la DNA polimerasa puede “tartamudear” hacia adelante o hacia atrás en las unidades repetidas, eliminando o agregando unidades a la cadena. Las cadenas resultantes pueden entonces presentar menos o más unidades de repetición (o pares de bases) que las cadenas parentales. Estos segmentos pueden ser utilizados como marcadores en la resolución de múltiples problemas biológicos. Los polimorfismos que presentan, además de su heredabilidad, permiten aplicarlos en la identificación de individuos, distinción de variedades intraespecíficas (particularmente en especies con importancia económica), identificación de paternidad y maternidad, mapeo genético, evaluación de diversidad y subdivisión genética en poblaciones, reconstrucciones filogenéticas, introgresión e hibridización, y distinción de individuos con origen clonal y sexual (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Wolfe, 2000; Pradeep *et al.*, 2002).

Los ISSRs son marcadores semiarbitrarios amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de la presencia de un oligonucleótido o *primer* complementario a un microsatélite, diseñado para unirse a los motivos repetidos de di y trinucleótidos (evitando los mononucleótidos presentes en el cloroplasto). Los primers de ISSRs incluyen un motivo repetido y un par de bases arbitrario en el extremo 3', utilizando un primer a la vez por reacción de amplificación. El nucleótido adicional del extremo 3' permite la amplificación sólo si el primer se une al extremo 5' de un microsatélite; la polimerasa elongará el primer si el nucleótido extra se acopla con el primero del microsatélite. Cuando dos secuencias repetidas se presentan dentro

de una distancia amplificable y con una orientación invertida, el decanucleótido complementario puede inducir la amplificación del segmento de DNA intermedio. La molécula generada, con un tamaño particular (peso molecular), se considera un “locus”, que representa el segmento de DNA entre los microsatélites. Al analizar electroforéticamente una muestra se genera un patrón característico de productos de PCR de un individuo que se considera una “huella digital genética”. El polimorfismo entre individuos de la misma población puede detectarse, ya que el análisis es sensible a la presencia/ausencia del elemento genómico reconocido por el primer y a la longitud de la secuencia intermedia amplificada (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

Las bandas de ISSRs son consideradas marcadores dominantes, en los que el locus se considera dialélico: cada individuo con banda puede ser tanto heterócigo como homócigo dominante, mientras que la ausencia de esa misma banda en otro individuo representa el genotipo homócigo recesivo.

1.6. La familia Agavaceae y *Agave*

La familia Agavaceae, propuesta desde 1841, está formada por los géneros *Agave*, *Manfreda*, *Furcraea*, *Yucca*, *Hesperaloe*, *Beschorneria*, *Polianthes* y *Prochnyanthes*, todos ellos presentes en nuestro país. Las agaváceas son exclusivas del Continente Americano (Gentry, 1982), con una distribución neotropical, concentrada principalmente en México. Su distribución natural se encuentra asociada en particular a las zonas áridas y semiáridas del centro de México, mientras que en las áreas circunvecinas van decreciendo paulatinamente en diversidad; es por ello que se considera que su centro de origen se localiza en el Altiplano Mexicano. Por otro lado, los miembros de esta familia son contrastantes en cuanto a su biología reproductiva, ya que algunos son iteróparos (se reproducen varias veces a lo largo de su vida; como *Manfreda*, *Yucca*) y otros semélparos (se reproducen sólo una vez y mueren; como *Agave*, *Furcraea*). Asimismo, tienen una notable diversidad de morfologías florales y polinizadores como abejas, murciélagos, aves y polillas (Eguiarte *et al.*, 2000).

El género *Agave* es el más diverso en número de especies dentro de la familia (166), 75% de las cuales se encuentra presente en el país (García-Mendoza, 2002). Este número de especies es muy alto si tomamos en cuenta su reciente origen de hace 8 millones de años (Eguiarte *et al.*, 2000), en comparación con el de la familia que es de hace 15 millones de años (Eguiarte, 1995). Se ha sugerido que la gran diversidad que presenta este género se debe principalmente a procesos de especiación alopátricos facilitados por la compleja topografía de México (González, 2000; Navarro, 1999). Las especies de *Agave* en México pueden encontrarse desde el nivel del mar hasta 3400 msnm, aunque son más comunes entre 1000 y 2000 msnm, donde pueden verse sobre las montañas y en los valles; en altitudes mayores es común verlas a lo largo de bordes de río y en lugares expuestos al sol. Los ambientes en los que se les encuentra incluyen bosques tropicales caducifolios y subcaducifolios, bosques espinosos, pastizales, desiertos y matorrales xerófilos. El 68% de las especies en México se encuentra en matorrales, mientras que el 30% se ubica en bosques templados de *Pinus* y *Quercus*. Sólo 4 especies pueden encontrarse en bosques de niebla, donde la humedad y la niebla son constantes la mayoría del año. Los suelos que prefieren son diversos: crecen en rocas ígneas ácidas, así como en suelos básicos de piedra caliza de origen marino. Es común verlos en sustratos derivados de rocas volcánicas, como los del Eje Neovolcánico (García-Mendoza, 2002). Cabe mencionar que de los 186 taxa reportados para México por García-Mendoza (2002), el 69% (129) son endémicos de nuestro país. Sugiere que esta riqueza de especies endémicas posiblemente se deba a los hábitats heterogéneos del país, así como a las propiedades intrínsecas de cada taxón, como plasticidad genética, tolerancia ecológica, capacidad de dispersión y variedad de interacciones con otros organismos, sobre todo polinizadores.

Gentry (1982) divide el género en dos subgéneros (Gentry, 1982): *Littaea*, reconociendo 53 especies en 8 grupos, y *Agave* con 102 especies en 12 grupos. La diferencia entre ellos es el tipo de inflorescencia: el primero posee inflorescencias de apariencia espigada y flores en pares, mientras que en el segundo las inflorescencias son paniculadas y las flores se encuentran en grandes agregados umbelados sobre pedúnculos laterales. Geográficamente, *Littaea* posee una distribución más restringida, desde Utah, Nevada y Arizona en los EU hasta Guatemala, pero no se encuentra en Yucatán ni en Baja California. El subgénero *Agave* se encuentra desde California hasta Perú, Colombia y Venezuela, incluyendo las Antillas (Eguiarte *et al.*, 2000).

Reproductivamente, en el subgénero *Agave* las características del néctar y flores sugieren que sus polinizadores coadaptados son murciélagos, aunque en algunas especies han sido sustituidos por animales diurnos, principalmente abejas y colibríes. En el subgénero *Littaea* las visitas de murciélagos son raras, siendo las polillas, abejas y esfingidos los más importantes polinizadores (Eguiarte *et al.*, 2000).

1.7. Especies estudiadas

De acuerdo con Gentry (1982), tanto *Agave cupreata* como *Agave potatorum* pertenecen al subgénero *Agave* (grupos *Crenatae* y *Hiemiflorae*, respectivamente). El grupo *Crenatae* se distingue por los márgenes crenados de las hojas, con dientes variados y panículos profundos y angostos, pero las flores son estructuralmente homogéneas, por lo que la distinción de especies dentro del grupo se hace con base en caracteres de las hojas. Las plantas van del verde claro al verde-amarillo y las hojas más jóvenes están cubiertas por un vello glauco que se acentúa con los patrones impresos de las espinas de hojas anteriores. *A. cupreata*, cuyo nombre responde al color cobre de sus espinas, se distingue también por sus hojas anchas verde claro, muy dentadas y con impresiones de espinas muy marcadas en los brotes (Figura 2). Al igual que otras especies del género en sus correspondientes hábitats, *A. cupreata* constituye una especie clave al proveer alimento y morada a múltiples organismos, sobre todo durante la época seca en que florece y produce gran cantidad de néctar, consumido por insectos y aves. Se trata de una especie que se distribuye de manera restringida en poblaciones aisladas, en bosques de pino y pino/encino, y ha sido reportada por Gentry (1982) en el norte del estado de Michoacán y el centro del estado de Guerrero, entre los 1220 y 1800 msnm.

Por su parte, el grupo *Hiemiflorae* se caracteriza por poseer agregados de flores apelonadas que forman panículos poco profundos. En algunas especies como *A. hiemiflora*, *A. congesta* y *A. potatorum* los pedúnculos laterales son muy cortos, dando a la inflorescencia una apariencia racimosa. En cuanto a la estructura floral, existe un amplio intervalo de variación dentro de las especies, lo que causa problemas taxonómicos. *A. potatorum*, cuyo nombre en náhuatl es “papalometl” o maguey mariposa, tiene rosetas pequeñas con hojas glaucas blancas a verdes

cuyos márgenes son ondulados a profundamente crenados con espinas prominentes (Figura 3). Por su naturaleza polimórfica se trata de una especie taxonómicamente problemática. Se distribuye en las tierras altas semiáridas de Puebla y Oaxaca entre los 1240 y 2300 msnm, donde se asocia en las pendientes con remanentes de vegetación de pinos y encinos. Florece en otoño, de septiembre a diciembre (Gentry, 1982).

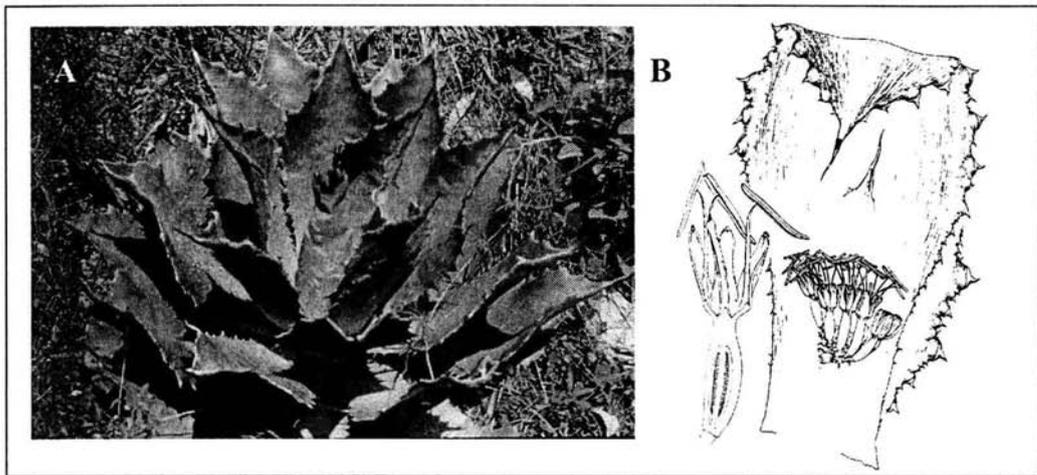


Figura 2. A. Aspecto morfológico de *A. cupreata*, roseta de la población C10-Mesones con un diámetro aprox de 40 cm. **B.** Forma de la hoja y espinas, corte transversal de la flor y un panículo de flores según Gentry (1982).

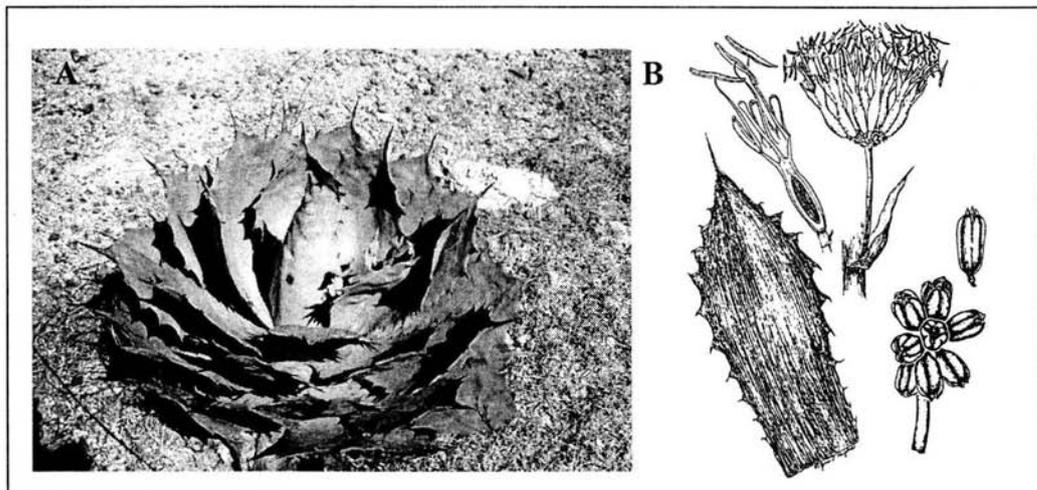


Figura 3. A. Aspecto morfológico de *A. potatorum*, fotografía de un individuo de la población P11-Zapotitlán. **B.** Hoja y agregado floral x ca 1/2, sección de flor x ca 1, cápsulas x 1/2-3/5 según Gentry (1982).

1.8. Producción de mezcal

En la producción de mezcal se escogen habitualmente plantas adultas que han comenzado a producir su inflorescencia central, que se corta antes de que continúe creciendo. La planta permanece en su sitio por algunos meses acumulando azúcares y agua en el tallo (originalmente destinados a la generación de las flores y néctar), hasta que son cortadas las hojas o pencas, dejando al desnudo el tallo que adquiere la apariencia de una piña enorme. Estas *piñas* son transportadas hasta la “fábrica”, donde se lleva a cabo la cocción, fermentación y destilación de manera artesanal. Los tallos se cuecen en un horno hecho en la tierra, calentado a base de leña de encino y con piedras para concentrar el calor. Se cubren las piñas con hojas de palma y mantas y se dejan cocer. Más adelante, son machacadas y colocadas en grandes barricas donde se les agrega agua, y en las que se deja la mezcla descubierta para la fermentación natural con las propias levaduras del maguey de 4 a 8 días. Posteriormente se destila y se obtiene el mezcal. De manera general, este es el proceso que se lleva a cabo en la producción de este alcohol, tanto en los estados de Guerrero y Michoacán con las poblaciones naturales de la especie *A. cupreata*, como en el de Oaxaca con las de *A. potatorum*. Cabe mencionar que en el estado de Oaxaca se produce también una importante cantidad de mezcal con la especie *A. angustifolia*, pero ésta no se incluyó en el presente estudio por ser ampliamente cultivada.

El proceso de selección de plantas de *A. cupreata* y *A. potatorum* para esta industria tiene implicaciones demográficas y genéticas en la conservación de las especies. Primero, la extracción de individuos adultos lleva a una disminución en el número de integrantes de las poblaciones. Considerando que en su mayoría estas plantas provienen de semillas, y que por ello son genéticamente distintas, el eliminar individuos implica una disminución en la diversidad genética de la población. En términos evolutivos, la baja diversidad genética podría impedir a la especie responder a cambios ambientales, ya sea en aras de la adaptación o bien de la diversificación (generación de nuevas variedades o especies). Segundo, al seleccionarlas y extraerlas en el momento en el que van a producir flores se suprime la producción de polen y de semillas, lo que puede disminuir el flujo génico entre los individuos y las poblaciones, así como impedir la recuperación del número de integrantes de éstas últimas.

Actualmente, el mezcal producido con estas dos especies depende fundamentalmente de las poblaciones naturales y ante la creciente demanda del mezcal es necesario implementar programas que permitan su conservación, así como la preservación de las técnicas artesanales de producción del alcohol cuya importancia es tanto cultural como biológica. Culturalmente, el mezcal suele ser producido por pequeñas organizaciones locales de campesinos, cuyas actividades incluyen también otros productos agrícolas, y representa un ingreso altamente apreciado, sobre todo en las regiones donde la agricultura y ganadería son difíciles de llevar a cabo. Se trata de una bebida indispensable durante los eventos sociales, donde se ofrecen las variedades más finas y especiales del alcohol (como el mezcal “de pechuga”). Por otro lado, cada una de las versiones regionales de mezcal cuyo sabor y grado dependen del proceso de destilación y de las condiciones locales (clima, suelo, precipitación, agua para la fermentación) forman parte del acervo gastronómico de nuestro país y de la identidad de los pueblos que lo producen. Biológicamente, la producción a partir de poblaciones naturales es fundamental para evitar la adopción de prácticas de cultivo como las plantaciones monoespecíficas, que propician la pérdida de variación genética y pueden favorecer la aparición de plagas, y la utilización de agroquímicos.

Existe actualmente un programa de colecta y germinación de semillas de *Agave cupreata* en la región de Chilapa en el estado de Guerrero (en la que se encuentran tres de las poblaciones incluidas en este estudio) para reforestar las áreas de distribución naturales de esta planta con la intención de mantener las poblaciones naturales y asegurar la materia prima para la producción del mezcal. Sin embargo, como ya se mencionó, la colecta de semillas y reforestación a partir de un grupo poco representativo de plantas puede disminuir el tamaño efectivo de las poblaciones y alterar los montos de variación genética y su estructuración espacial. Aunque la implementación de programas de esta naturaleza puede ser una buena herramienta en la conservación de las especies, sobre todo al estar enfocados en la reforestación de las poblaciones naturales y no en la propagación y siembra de individuos en plantaciones.

Dentro del género *Agave*, en los casos del henequén y del tequila, se han presentado problemas genéticos similares a los sufridos por los cultivos de granos comercialmente importantes y las

plantaciones de árboles. El henequén, *A. fourcroydes*, tiene sus orígenes en una especie silvestre domesticada por los mayas en la época prehispánica, *A. angustifolia*. Aunque ya era cultivado para utilizar sus fibras, a fines del siglo XIX empezaron a establecerse enormes plantaciones para la industria cordelera que provocaron una rápida erosión de la diversidad genética de la especie. Prácticas como la propagación estrictamente vegetativa a partir de rizomas, poca variación morfológica en las variedades cultivadas y una selección artificial hacia fibras más gruesas, plantas más grandes y una menor capacidad reproductiva, disminuyeron drásticamente la diversidad genética de *A. fourcroydes* en relación con su ancestro silvestre (Colunga-GarcíaMarín, 1998; Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1999). Por otro lado, en la producción del tequila, las restricciones legales y la alta demanda en el mercado han llevado a los productores a reproducir el agave azul (*A. tequilana* var. azul) exclusivamente a partir de las plántulas que emergen del final de los rizomas. Análisis moleculares en *A. tequilana* var. azul han mostrado que el uso exclusivo de la propagación vegetativa y la remoción de las inflorescencias antes de la fertilización y producción de semillas han resultado en uno de los niveles más bajos de diversidad genética reportados entre las especies cultivadas (Gil-Vega *et al.*, 2001).

Pensando en que la riqueza genética de las especies, sean o no comerciales, radica en sus sitios de origen y diversificación, y que la mejor alternativa es conservarla *in situ*, resulta fundamental pensar en estrategias que permitan planificar adecuadamente el manejo de estas especies, así como de las que se utilizan para el mezcal. Debe recordarse que México, además de ser el centro de origen y diversificación del maíz, frijol, calabaza y otras plantas útiles, lo es también de los agaves. Este trabajo pretende aportar elementos que permitan la conservación de dos especies silvestres de *Agave* utilizadas en la producción de mezcal, importantes tanto ecológica como económicamente. Utilizando la genética de poblaciones como aproximación se espera conocer el estado actual de las poblaciones, empezar a entender sus procesos ecológicos y evolutivos, y con ello ayudar a la planificación de las estrategias que permitan su conservación a largo plazo.

2. Objetivos

- Describir la genética de las poblaciones naturales de *Agave cupreata* y *Agave potatorum*, en términos de los niveles de variación genética, su distribución y estructuración espacial.
- Obtener los parámetros de variación genética de heterocigosis y porcentaje de loci polimórficos, así como los de estructuración en términos del estadístico F_{ST} .
- Calcular la partición de la variación genética por medio de un análisis de AMOVA (*Analysis of Molecular Variance*).
- Estimar las distancias genéticas que separan a las poblaciones y esclarecer sus relaciones de similitud.
- Evaluar si estas especies siguen un patrón de aislamiento por distancia.
- Interpretar estos datos en función de la biología de las especies para que sean incorporados a los planes de manejo, en beneficio de la industria local mezcalera y de la conservación de estas especies.

3. Materiales y Métodos

3.1. Colecta de campo

Las poblaciones de *A. cupreata* fueron elegidas de acuerdo con la distribución reportada en Gentry (1982), las localidades de origen de ejemplares de la especie en el Herbario Nacional y el mapa de distribución potencial facilitado por la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). Los esfuerzos se enfocaron en los dos grandes centros de distribución de la especie: el norte de Michoacán y el centro de Guerrero. Las poblaciones de *A. potatorum* en los estados de Puebla y Oaxaca fueron elegidas de acuerdo con la distribución reportada en Gentry (1982). Las especies fueron reconocidas siguiendo la descripción de Gentry (1982). Se colectó material de 10 poblaciones en total, de las cuales 5 pertenecen a *A. cupreata* y 5 a *A. potatorum* (Figura 4, Tabla 1).

| Población | Estado | Altitud (msnm) | Coordenadas | | Vegetación |
|----------------------------|-----------|-------------------|--------------|--------------|---|
| | | | N | W | |
| <i>A. potatorum</i> | | | | | |
| P2 Camarón | Oaxaca | 1281 | 16°32'33.7" | 95°57'37.9" | Huizaches y especies deciduas, algunos encinos, inician los pinos. |
| P7 Miahuatlán | Oaxaca | 1900 | 16°15'15.9" | 96°33'36.9" | Encinar muy abierto y perturbado (basurero). |
| P9 Santa Catarina | Oaxaca | 2064 | 17°18'0.5.1" | 96°32'52.7" | Encinar muy abierto. |
| P11 Zapotitlán | Oaxaca | 2059 | 17°51'21" | 97°49'47" | Izotal de yucas, palmas, <i>Dasylinion</i> , <i>Nolina</i> , pocos encinos. |
| P13 Azumbilla | Puebla | 2174 | 18°40'36.3" | 97°21'26.6" | Pie de monte muy abierto, con zacates, yucas, nopales, <i>Ferocactus</i> , pocos encinos. |
| <i>A. cupreata</i> | | | | | |
| C3 La Esperanza | Guerrero | 1600 | 17°45'53.2" | 99°14'52" | <i>Brahea edulis</i> , <i>Quercus</i> , zacates, poco diverso. |
| C10 Mesones | Guerrero | 1852 | 17°32'37" | 98°51'48.1" | Encinar joven con pinos. |
| C13 La Laguna | Guerrero | 1997 | 17°43' 29.3" | 99°44' 52.7" | Bosque de encino maduro. |
| C14 Etúcuaro | Michoacán | 1792 | 19°25'07.7" | 101°11'28.3" | Encinar abierto en pedregal, pinos y madroños. |
| C16 Tzitzio | Michoacán | 1980 | 19°34'26.2" | 100°56'19.9" | Encinar perturbado, pedregoso. |

Tabla 1. Nomenclatura, ubicación geográfica y características de vegetación de las poblaciones del estudio.

En cada población se colectó tejido vegetal de 50 individuos a partir de la hoja más joven de cada roseta. Las muestras se etiquetaron y conservaron en N₂ líquido hasta su almacenamiento en ultracongelador en el Instituto de Ecología, UNAM. Se registraron la posición geográfica y altitud de cada población con un geoposicionador, así como las características de la vegetación asociada (Tabla 1).

3.2. Amplificación de ISSRs

Tras extraer el DNA de los tejidos de acuerdo al protocolo de CTAB de Doyle y Doyle (1987) modificado con STE (Apéndice), se evaluaron 20 oligonucleótidos con dinucleótidos repetidos, entre los que se incluyeron los motivos CT, GT, CG, AC y AG. Los resultados de las amplificaciones con cada primer fueron similares entre las dos especies, y dos de ellos produjeron patrones de bandeo claros y variables, por lo que se eligieron para el resto del estudio:

| | | |
|-----|-------------------------|-----------|
| 846 | CAC ACA CAC ACA CAC ART | R = A ó G |
| 857 | ACA CAC ACA CAC ACA CYT | Y = C ó T |

Las amplificaciones se llevaron a cabo utilizando un termociclador PCR-Express marca Hybaid y una Taq polimerasa recombinante de la marca Altaenzymes. Las mezclas de reacción pueden consultarse en el Apéndice. El programa de amplificación utilizado fue:

| | | |
|-----|---------|-------------|
| 94° | 4' | |
| 94° | 30 s. | } 30 ciclos |
| 52° | 45 s. | |
| 72° | 2' | |
| 72° | 7' | |
| 4° | 12 hrs. | |

Una vez amplificados, los productos de la PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1.5% con buffer TAE .5X, teñidos con bromuro de etidio.

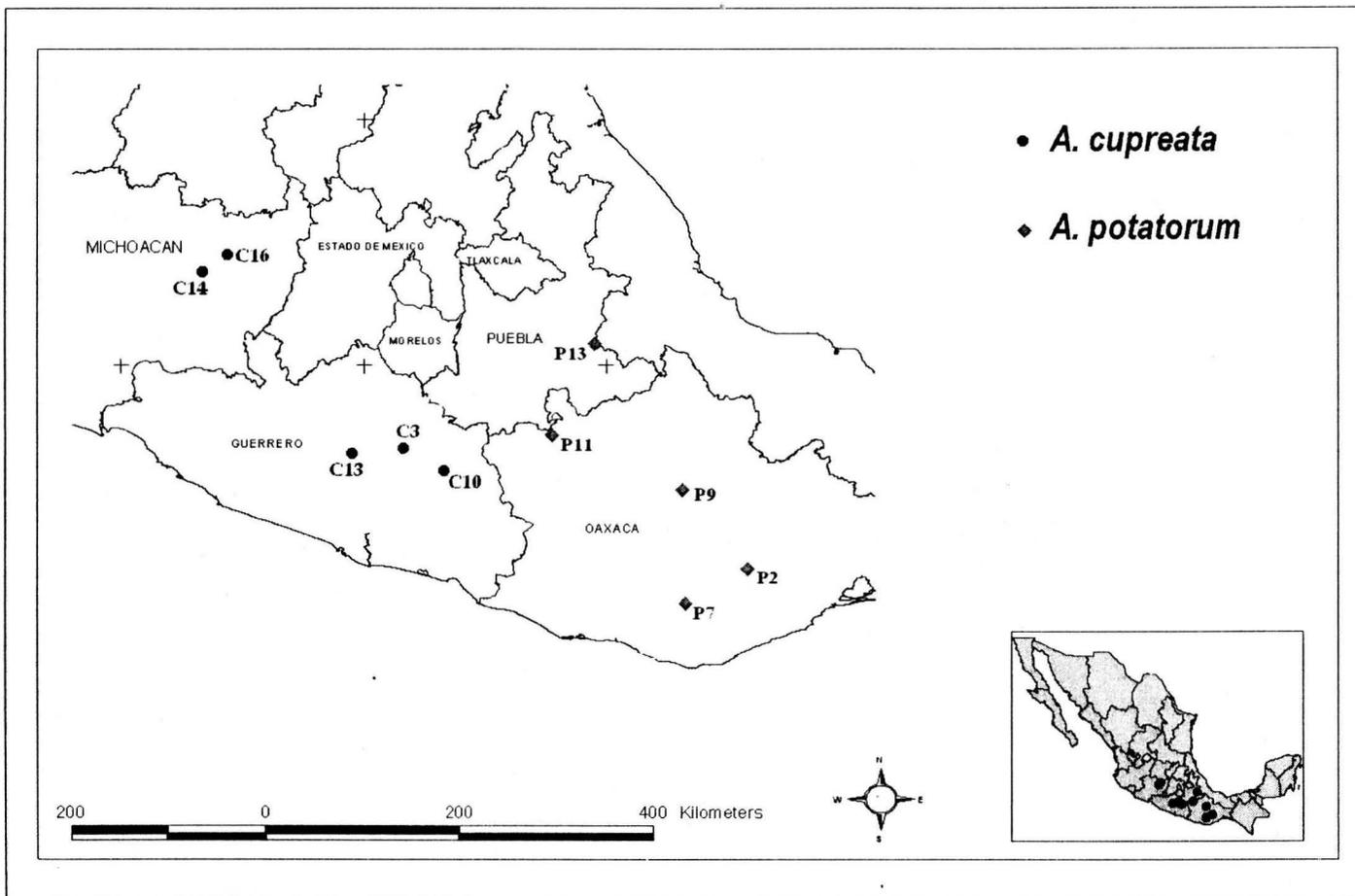


Figura 4. Ubicación geográfica de las poblaciones colectadas de ambas especies. Los círculos y la letra **C** señalan las de *A. cupreata*; los rombos y la letra **P** las de *A. potatorum* (ver Tabla 1).

3.3. Índices de variación, estructuración y flujo génico

Para conocer los niveles de variación genética y estructuración se calcularon las frecuencias alélicas en los loci amplificados. Se analizó la presencia/ausencia de cada banda generada por los primers en los individuos de manera manual para reconocer los patrones y se arreglaron los datos en una matriz de 1 (presencia) y 2 (ausencia). Se obtuvo una matriz por población con los loci amplificados por ambos primers.

Dado que los heterocigos no pueden ser distinguidos, las frecuencias alélicas se estimaron a partir de los individuos sin banda. En un locus, asumiendo que la población se encuentra en equilibrio de H.W., la frecuencia del alelo recesivo (q) es la raíz cuadrada de la frecuencia de las ausencias (x), ya que la ausencia de banda representa el genotipo homocigo recesivo:

$$q = x^{1/2}$$

La frecuencia del alelo dominante es $p = 1 - q$.

La variación genética fue estimada utilizando la heterocigosis esperada en el equilibrio de H.W. y con la proporción de loci polimórficos con el criterio del 95% (sólo se considera un loci polimórfico si el alelo más común tiene una frecuencia alélica máxima del 95 %).

La heterocigosis esperada en un locus particular para una población bajo equilibrio de H.W. es:

$$H_E = 2pq$$

o el equivalente

$$H_E = 1 - \sum p_i^2$$

donde p_i^2 es la frecuencia del genotipo homocigo para el alelo i .

Se utilizó en este punto una corrección para marcadores dominantes sugerida por Lynch y Milligan (1994) en la que la heterocigosis esperada de un locus se calcula como:

$$H_E = 2q(1-q) + 2Var(q)$$

donde

$$\text{Var}(q) = (1-x)/4N$$

$$q = x^{1/2} [1 - \text{Var}(x)/8x^2]^{-1}$$

y

$$\text{Var}(x) = x(1-x)/N$$

donde N es el número de individuos en la muestra, x , p y q son como se describe más arriba.

Cuando se analizan simultáneamente varios loci, la heterocigosis estimada en la población es:

$$\bar{H} = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m H_j$$

donde H_j es la heterocigosis del locus j , y m es el número total de loci.

En el caso de la proporción de loci polimórficos, se aplica la fórmula:

$$P = x/m$$

Donde x es el número de loci polimórficos en una muestra de m loci.

Ambos índices fueron calculados en el nivel poblacional (H_s y P_s) y en el total de las especies (H_t y P_t).

En el caso de la estructuración, se han utilizado diferentes aproximaciones para estimar la diferenciación en las subdivisiones de una población. La más importante fue desarrollada por Wright (1965), quien propone tres coeficientes F distintos, utilizados para localizar la variación genética a nivel de población total (T), de subdivisiones (S) e individual (I).

Cuando una población está subdividida significa que los individuos no se aparean al azar, y que la población no es panmictica. El alejamiento de la panmixis se traduce en diferentes niveles de endogamia aparente cuando se considera a la población total, de manera que se genera una correlación entre genes homólogos en los gametos que se unen en relación con un par de genes tomados al azar en la población. El índice F puede ser visto como la correlación entre genes homólogos tomados de un nivel de la subdivisión en relación con cualquier otro nivel superior. La correlación entre los genes dentro de los individuos (I) en relación con los genes de la población total (T) es representada por F_{IT} . La correlación entre genes dentro de los individuos en relación con los de la subdivisión es representada por F_{IS} , mientras la correlación entre los genes dentro de la subdivisión (S) en relación con los de la población total está representada por

F_{ST} (Excoffier, 2001). En términos estadísticos, estos coeficientes F_{ST} , F_{IT} y F_{IS} son estimadores de la varianza que hay entre las frecuencias alélicas de las subdivisiones, como medidas de la desviación de las proporciones de genotipos esperadas en H.W.. En el presente estudio los estadísticos F_{IS} y F_{IT} no pueden ser calculados ya que la dominancia de los marcadores no permite conocer la heterocigosis de los individuos.

La F_{ST} (también denominada θ) estima la varianza entre la población total – en este caso, especie en conjunto - y las subpoblaciones - poblaciones que integran a la especie. Este coeficiente se obtiene a partir de H_T y H_S , donde H_S es la proporción de heterocigos esperada promedio a nivel subpoblación y H_T es la proporción de heterocigos esperada a nivel global, con equilibrio de H.W.:

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

Si F_{ST} es igual a cero significa que la población total está bajo equilibrio de H.W., mientras que si es igual a uno todas las poblaciones son diferentes entre sí, lo cual se explicaría si cada una de las poblaciones está fija para un alelo dado. También puede interpretarse de otra manera, en términos de porcentaje de la variación genética que se encuentra dentro y entre poblaciones: si es de cero, el total de la variación se encuentra en cualquier subpoblación, mientras que si es de uno quiere decir que para tener el total de la variación se requiere tener a todas las distintas subpoblaciones ya que cada una está fija para un alelo dado. Esta diferenciación puede ser producto de la deriva génica o de la selección natural (Navarro, 1999).

De hecho, pueden describirse estos efectos conjuntos de flujo y deriva génicos en los valores que toma F_{ST} a partir de la fórmula:

$$F_{ST} = 1/(4Nm+1)$$

Si disminuye N (tamaño efectivo de la población) o m (tasa de migración entre las subpoblaciones) aumentará la diferenciación, mientras que si aumenta alguna o las dos, las subpoblaciones se homogenizan entre sí (Eguiarte y Piñero, 1990).

El flujo génico (Nm = número de migrantes por generación) se calcula a partir de la F_{ST} de la siguiente manera:

$$Nm = 1/4((1/F_{ST}) - 1) \alpha$$

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

3.4. Distancia genética y aislamiento por distancia

Las medidas de distancia genética permiten evaluar el monto de la variación compartida entre grupos, ya que las similitudes o diferencias en el tipo, cantidad y patrón de variación genética entre poblaciones puede ser el resultado de muchos factores. El que dos poblaciones sean similares puede deberse a una separación reciente, al flujo génico entre ellas, a su gran tamaño (hay poca deriva génica) o a presiones de selección similares que hayan afectado loci similares en ambas poblaciones (Hedrick, 2000).

La medida más utilizada es la Identidad de Nei (denominada I ; Nei, 1972), que evalúa la diferencia entre las frecuencias alélicas entre poblaciones. Se calcula de la siguiente manera para un solo locus con n alelos:

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

$$J_{xy} = \sum_{i=1}^n p_{ix} p_{iy}$$

$$J_x = \sum_{i=1}^n p_{ix}^2$$

$$J_y = \sum_{i=1}^n p_{iy}^2$$

y p_{ix} y p_{iy} son las frecuencias del alelo i en las poblaciones x y y . Para loci múltiples, los valores de J_{xy} , J_x y J_y se promedian usando todos los loci en el estudio. Estos promedios son usados para calcular la distancia genética (D):

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

El valor de I puede ir de cero, cuando no se comparten alelos entre las poblaciones, hasta uno, cuando las dos poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas. D puede adquirir un valor de cero, para las poblaciones con frecuencias iguales, hasta infinito, cuando las poblaciones no comparten ningún alelo. En el presente trabajo se generó una matriz con las distancias pareadas entre cada una de las poblaciones analizadas para ambas especies, y a partir de estas distancias se construyeron dendrogramas tipo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) para visualizar el grado de similitud entre las poblaciones.

Otro análisis de diferenciación utilizado en el presente estudio es el de probabilidad combinada de Fisher (Raymond y Rousset, 1995), que estima si existen diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de cada locus entre las poblaciones. Utiliza un método de simulaciones MonteCarlo con cadenas de Markov que provee una aproximación a la probabilidad exacta de las diferencias observadas entre las frecuencias alélicas. Un valor de 1 señala una probabilidad del 100% de que las diferencias observadas se deban al azar (no hay diferencia significativa); se considera que los loci con valores de p menores a 0.05 presentan una diferencia estadísticamente significativa en sus frecuencias entre las poblaciones.

Por otro lado, la prueba de Mantel (Mantel, 1967; Sokal, 1979) permite evaluar la correlación que existe entre dos matrices. En este trabajo se consideran la matriz de distancias genéticas y la de distancias geográficas. Cuando la correlación es positiva y posee una $p < 0.05$, se considera que es estadísticamente significativa, y que existe aislamiento por distancia entre las poblaciones.

Los análisis de diversidad, estructuración y distancia genética fueron calculados con el software *Tools For Population Genetic Analyses* (TFPGA; Miller, 1997), que calcula las frecuencias alélicas y los índices para marcadores dominantes bajo la premisa del equilibrio de H.W..

3.5. Partición de la varianza genética

El AMOVA (*Analysis of Molecular Variance*) (Excoffier *et al.*, 1992) examina cómo se reparte la varianza de la diversidad genética entre diversos grupos jerárquicos, como pueden ser los

individuos que componen las poblaciones, grupos de poblaciones y la totalidad de las poblaciones. Los datos con los que trabaja son los genotipos de cada uno de los individuos de las poblaciones. Cada genotipo es la huella digital genética completa, en este caso, la presencia/ausencia de cada uno de los loci detectados por los ISSRs. El AMOVA calcula el componente de la varianza debido a las diferencias entre los demos en el interior de los grupos y el componente de la varianza debido a las diferencias entre los grupos, y estima la estructura genética de la muestra (en términos de F_{ST}) usando las diferencias en el contenido alélico de los genotipos, así como su frecuencia. La información de las diferencias en el contenido alélico entre los genotipos se presenta como una matriz de distancias cuadradas euclidianas y la significancia de los componentes de la varianza asociados con los diferentes niveles de la estructura genética (dentro de las poblaciones, dentro de los grupos de poblaciones y entre grupos) es evaluada usando procedimientos de permutación no-paramétricos (Excoffier *et al.*, 1992).

Utilizando el software Arlequin ver. 2.0 (Schneider *et al.*, 2000), se estimó para ambas especies el porcentaje de la variación que se encontraba dentro de las poblaciones y entre poblaciones. En el caso de *A. cupreata* se agregó un nivel jerárquico más, dividiendo a las poblaciones en dos grupos (el estado de Guerrero y el de Michoacán). Se obtuvo también el estadístico F_{ST} para cada especie y F_{ST} pareados entre las poblaciones.

Dado que en este análisis no se estiman frecuencias alélicas y no se supone que existe equilibrio de H.W., los valores de F_{ST} pueden variar en relación con los calculados por el TFPGA. En particular, cuando la población estudiada posee altos niveles de endogamia, los valores de F_{ST} obtenidos a partir de las frecuencias alélicas (suponiendo equilibrio de H.W.) resultan sesgados, siendo menores que los generados por el AMOVA. Si el valor de F_{ST} generado por el AMOVA es similar al obtenido con el TFPGA, podemos suponer que la premisa del equilibrio de H.W. no es errónea y los datos de estructuración son razonablemente confiables.

4. Resultados

En las ampliaciones de ISSRs se obtuvieron en total 36 bandas polimórficas nítidas, cada una considerada como un locus, 16 con el primer 846 y 20 con el primer 857. Los loci considerados en el análisis se numeraron del 1 al 16 para el primer 846 y del 17 al 36 para el primer 857 (Figuras 5 y 6).

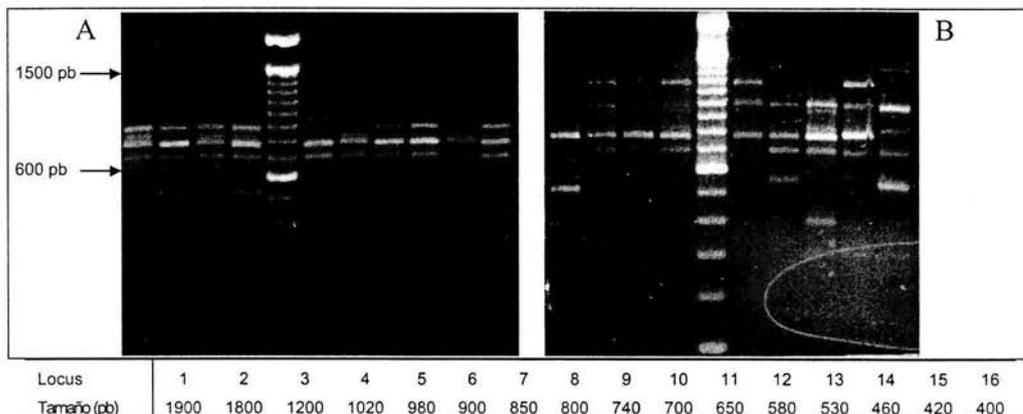


Figura 5. ISSRs amplificadas por el primer 846 en ambas especies. **A.** Individuos de la población C14. **B.** Individuos de la P11. Se generaron 16 loci con tamaños de 400 a 1900 pb. El marcador es de 100 pb.

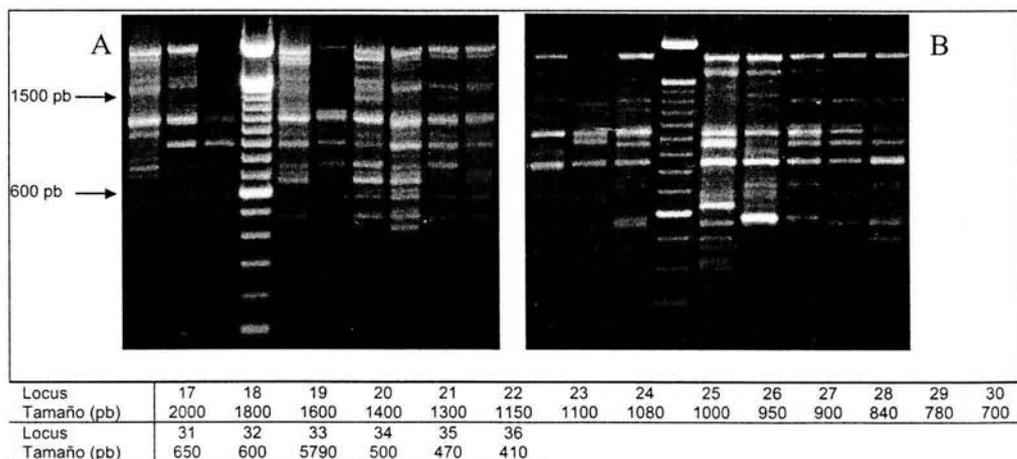


Figura 6. ISSRs amplificadas por el primer 857 en ambas especies. **A.** Individuos de la población C14. **B.** Individuos de la P11. Se generaron 20 loci con tamaños de 410 a 2000 pb. El marcador es de 100 pb.

Las frecuencias de los alelos y las heterocigosis de los 36 loci en cada una de las poblaciones estudiadas y en las especies pueden consultarse en las tablas A, B, C y D del Apéndice.

4.1. Índices de variación y estructuración genética

La heterocigosis esperada y la proporción de loci polimórficos fueron estimados para cada una de las poblaciones y para cada especie en conjunto. Cabe señalar que aunque se extrajo DNA de 50 individuos de cada una de las poblaciones, la cantidad y calidad de DNA obtenida no fue satisfactoria en todas las muestras, por lo que el número de individuos amplificados en cada población y en cada primer es menor a 50 (Tabla 2). Sin embargo, se trabajó con un mínimo de 29 individuos para tener una muestra estadísticamente confiable.

| Especie | Población | N | H _E | P |
|----------------------------|------------------|-----|---|------|
| <i>A. cupreata</i> | C3 La Esperanza | 30 | 0.2924 (±0.153) | 83.3 |
| | C10 Mesones | 30 | 0.2484 (±0.187) | 72.2 |
| | C13 La Laguna | 29 | 0.2120 (±0.162) | 72.2 |
| | C14 Etúcuaro | 33 | 0.2585 (±0.185) | 75.0 |
| | C16 Tzitzio | 31 | 0.2758 (±0.174) | 72.2 |
| | Especie | 153 | $\overline{H_s}=0.2574 (\pm 0.030)$ $H_t=0.2944 (\pm 0.133)$ | 88.8 |
| <i>A. potatorum</i> | P2 Camarón | 39 | 0.2301 (±0.185) | 61.1 |
| | P7 Miahuatlán | 31 | 0.2306 (±0.165) | 72.2 |
| | P9 Sta. Catarina | 29 | 0.2669 (±0.157) | 86.1 |
| | P11 Zapotitlán | 43 | 0.2689 (±0.167) | 75 |
| | P13 Azumbilla | 37 | 0.2125 (±0.182) | 63.8 |
| | Especie | 179 | $\overline{H_s}=0.2459 (\pm 0.025)$ $H_t=0.2689 (\pm 0.149)$ | 83.3 |

Tabla 2. Índices de variación genética en cada población y en cada especie (± DE) con los datos de 36 loci. H_E=heterocigosis esperada, P=porcentaje de loci polimórficos, N=número de individuos en la muestra.

En el nivel de especie, en *Agave cupreata* encontramos valores de diversidad genética mayores, tanto en heterocigosis esperada (H_t= 0.2944) como en proporción de loci polimórficos (P_t= 88.8). Es importante destacar que los valores de las desviaciones estándar reflejan el modo en que los valores de heterocigosis de los loci fluctúan dentro de cada población y dentro de cada especie (Tablas C y D, en el Apéndice). Sin embargo, los valores de heterocigosis de las especies no

resultan significativamente diferentes (prueba t de Student, $t= 0.888$, $p= 0.401$). Asimismo, dentro de cada especie los valores no son significativamente diferentes entre las poblaciones de acuerdo con un análisis de varianza (ANOVA): en *A. cupreata* $F=1.122$, con $p=0.348$, y en *A. potatorum* $F= 0.887$, $p=0.477$.

| loci | <i>A. cupreata</i> | | <i>A. potatorum</i> | |
|----------------|--------------------|---------------|---------------------|---------------|
| | F_{ST} | R&R | F_{ST} | R&R |
| 1 | 0.057 | 0.0017 | - | 1 |
| 2 | 0.184 | 0.0000 | - | 1 |
| 3 | 0.201 | 0.0000 | 0.045 | 0.0000 |
| 4 | 0.007 | 0.3357 | 0.043 | 0.0001 |
| 5 | 0.190 | 0.0000 | 0.045 | 0.0085 |
| 6 | 0.210 | 0.0000 | 0.008 | 0.2203 |
| 7 | 0.004 | 0.5480 | 0.100 | 0.0000 |
| 8 | 0.152 | 0.4835 | 0.144 | 0.1468 |
| 9 | 0.056 | 0.0003 | 0.021 | 0.0662 |
| 10 | 0.075 | 0.6256 | 0.081 | 0.3932 |
| 11 | 0.112 | 0.0000 | 0.085 | 0.0000 |
| 12 | 0.167 | 0.0000 | 0.091 | 0.0000 |
| 13 | 0.400 | 0.0000 | 0.072 | 0.0000 |
| 14 | 0.093 | 0.0001 | 0.065 | 0.0000 |
| 15 | 0.118 | 0.0000 | 0.003 | 0.2761 |
| 16 | 0.182 | 0.0000 | 0.048 | 0.0052 |
| 17 | 0.132 | 0.4042 | 0.446 | 0.0000 |
| 18 | 0.096 | 0.0021 | 0.155 | 0.0000 |
| 19 | 0.000 | 0.4519 | 0.011 | 0.1906 |
| 20 | 0.040 | 0.0252 | 0.024 | 0.0493 |
| 21 | 0.089 | 0.0000 | 0.064 | 0.0001 |
| 22 | 0.010 | 0.1242 | 0.000 | 0.4327 |
| 23 | 0.140 | 0.3557 | 0.088 | 0.0014 |
| 24 | 0.158 | 0.0000 | 0.032 | 0.0268 |
| 25 | 0.024 | 0.0459 | 0.013 | 0.1276 |
| 26 | 0.100 | 0.0000 | 0.028 | 0.0255 |
| 27 | 0.188 | 0.0007 | 0.118 | 0.3892 |
| 28 | 0.055 | 0.0030 | 0.070 | 0.0001 |
| 29 | 0.104 | 0.0001 | 0.017 | 0.1431 |
| 30 | 0.057 | 0.0107 | 0.022 | 0.1056 |
| 31 | 0.004 | 0.4344 | 0.076 | 0.0000 |
| 32 | 0.065 | 0.0040 | 0.052 | 0.0017 |
| 33 | 0.177 | 0.0000 | 0.200 | 0.0000 |
| 34 | 0.010 | 0.2380 | 0.168 | 0.0000 |
| 35 | 0.601 | 0.0000 | 0.101 | 0.0001 |
| 36 | 0.114 | 0.0000 | 0.077 | 0.0001 |
| Todos los loci | 0.145 | | 0.084 | |

Tabla 3. Estructuración genética en ambas especies en términos de F_{ST} y de la prueba de diferenciación de Raymond y Rousset (R&R). En negritas se muestran los valores de probabilidad (p) de esta prueba <0.05 , es decir, aquellos loci que tuvieron diferencias estadísticamente significativas en sus frecuencias alélicas entre las poblaciones.

En cuanto a la estructuración de esta variación genética, se obtuvieron mayores valores de F_{ST} en *Agave cupreata* ($\theta=0.145$) que en *Agave potatorum* ($\theta=0.084$). En ambos casos se aplicaron 1000 réplicas de bootstrap para obtener un intervalo de confianza del 95% de los valores de F_{ST} de cada especie, y se obtuvo un máximo de $\theta=0.2098$ y mínimo de $\theta=0.0941$ para *A. cupreata*, así como un máximo de $\theta=0.1185$ y un mínimo de $\theta=0.0584$ para *A. potatorum*. Los dos primeros loci se registraron en *A. cupreata*, pero no existían en *A. potatorum*, de manera que no puede calcularse el estadístico F_{ST} en ellos en esta última especie (Tabla 3).

Al calcular este índice en las especies con base en las distancias entre los genotipos en el AMOVA se obtuvieron valores de $F_{ST}=0.192$ en *A. cupreata* ($p<0.01$), y $F_{ST}=0.099$ en *A. potatorum* ($p<0.01$), valores que concuerdan con los obtenidos con el TFGA.

En el análisis de diferenciación exacta de Raymond y Rousset (1995) se encontraron diferencias significativas entre poblaciones en más de la mitad de los loci, tanto en *A. cupreata* (26/36) como en *A. potatorum* (23/34) (Tabla 3). Con base en los valores de F_{ST} del TFGA los valores de flujo génico obtenidos fueron menores para *A. cupreata* ($Nm=1.49$), mientras que *A. potatorum* tiene un flujo prácticamente del doble ($Nm=2.99$); esto en asociación con la alta estructuración del primero y la baja del segundo.

4.2. Distancia genética y aislamiento por distancia

Distancia genética y aislamiento por distancia en cada una de las especies

La distancia genética entre las poblaciones de *A. cupreata* es mayor que entre las de *A. potatorum*. En *A. cupreata* las menores distancias se encontraron entre las poblaciones C3, C10 y C13 en Guerrero, y las mayores entre éstas y las poblaciones de Michoacán (Tabla 4, Figura 7). Los valores entre las poblaciones de esta especie van de 0.0348 a 0.0930 ($\bar{D}=0.0672$), siendo las poblaciones C3-La Esperanza y C10-Mesones las más cercanas, y C14-Etúcuaro y C16-Tzitzio las más lejanas. Las distancias son más claras en los dendrogramas UPGMA, donde las poblaciones de Guerrero son más similares, y las de Michoacán se mantienen en la base,

ramificándose a una mayor distancia de las demás poblaciones (esto es, son genéticamente más diferentes). Los valores del índice F_{ST} entre pares de poblaciones obtenidos a partir de los genotipos con el software Arlequin ver. 2.0 reflejan también las diferencias genéticas entre las poblaciones, encontrándose valores de 0.097, entre las poblaciones C10-Mesones y C13-La Laguna, hasta 0.228, entre C10-Mesones y C14-Etúcuaro (Tabla 4).

| Población | C3 | C10 | C13 | C14 | | | | |
|------------|--------------------------|-----|--------------------------|-----|--------------------------|---|-------------------------|---|
| C3 | - | | | | | | | |
| C10 | 0.0348 (0.131) 47.56 | A | - | | | | | |
| C13 | 0.0353 (0.107) 53.21 | B | 0.0381 (0.097) 95.97 | E | | | | |
| C14 | 0.0716 (0.171) 274.88 | C | 0.0820 (0.228) 321.65 | F | 0.0864 (0.216) 241.66 | H | | |
| C16 | 0.0924 (0.192) 268.24 | D | 0.0787 (0.201) 313.86 | G | 0.0596 (0.157) 240.35 | I | 0.0930 (0.178) 31.53 | J |

Tabla 4. Distancias genéticas (Nei, 1972) y geográficas (km, en *itálicas*) entre las poblaciones de *A. cupreata*. Entre paréntesis, valor de la F_{ST} entre cada par de poblaciones. C3=La Esperanza, C10=Mesones, C13=La Laguna, C14=Etúcuaro, C16=Tzitzio. Las letras designan cada punto de la prueba de Mantel.

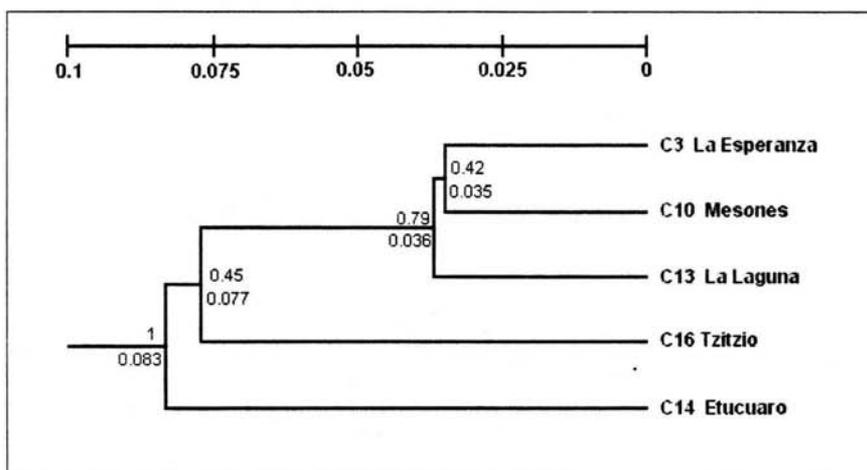


Figura 7. Distancias genéticas entre las poblaciones de *A. cupreata*. En cada nodo se muestra arriba el valor de bootstrap que lo soporta (proporción) y abajo la distancia genética.

El análisis de aislamiento por distancia entre la matriz de distancias genéticas (Nei, 1972) y geográficas (km) indica que en esta especie existe un patrón de aislamiento por distancia ($r=0.5594$, $p=0.039$), siendo las poblaciones de Michoacán las que contribuyen más en este resultado (Figura 8). El punto J señala que a pesar de la proximidad geográfica, existen diferencias genéticas importantes entre las dos poblaciones de Michoacán, y lógicamente si se elimina del análisis, la correlación entre ambas matrices aumenta ($r=0.95258$, $p=0.029$).

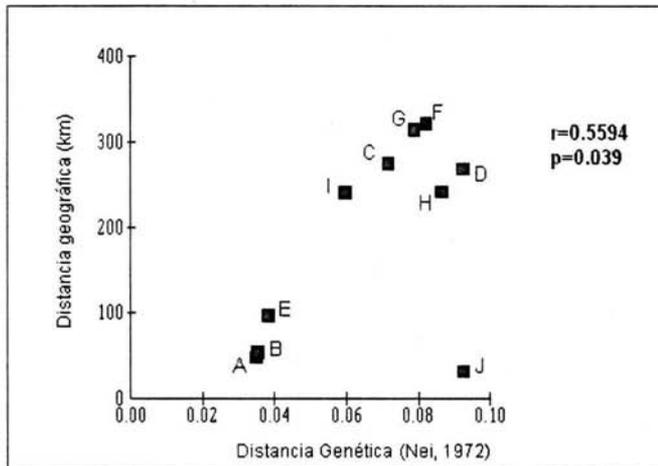


Figura 8. Prueba de Mantel para evaluar aislamiento por distancia entre las poblaciones de *A. cupreata*. Para las letras de cada par de poblaciones referirse a la Tabla 4.

En el caso de *A. potatorum* las distancias genéticas fueron menores, de 0.0228 a 0.0550 con un promedio de $\bar{D} = 0.0364$ (Tabla 5). Las más cercanas son P2-Camarón y P11- Zapotitlán, y las más lejanas P2-Camarón y P9-Santa Catarina.

En el dendrograma se observan las relaciones de similitud entre las poblaciones, con pequeñas distancias genéticas y valores de bootstrap bajos, que hacen pensar en este árbol como un peine, sin orden claro de ramificación de los grupos (Figura 9). La baja estructuración en esta especie se observa también en los valores del índice F_{ST} entre pares de poblaciones, que van de un mínimo

de 0.051 entre P2-Camarón y P11-Zapotitlán hasta un máximo de 0.138 entre las poblaciones P2-Camarón y P7-Miahuatlán.

| Población | P2 | P7 | P9 | P11 |
|------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| P2 | - | | | |
| P7 | 0.0402 (0.138) <i>71.66</i> A | - | | |
| P9 | 0.0550 (0.131) <i>104.69</i> B | 0.0435 (0.075) <i>115.71</i> E | - | |
| P11 | 0.0228 (0.051) <i>243.60</i> C | 0.0273 (0.109) <i>220.71</i> F | 0.0480 (0.090) <i>146.23</i> H | - |
| P13 | 0.0224 (0.070) <i>278.87</i> D | 0.0291 (0.124) <i>281.10</i> G | 0.0516 (0.132) <i>174.77</i> I | 0.0239 (0.090) <i>102.46</i> J |

Tabla 5. Distancias genéticas (Nei, 1972) y geográficas (km, en *itálicas*) entre las poblaciones de *A. potatorum*. Entre paréntesis valores de F_{ST} entre cada par de poblaciones. P2=Camarón, P7=Miahuatlán, P9=Santa Catarina, P11=Zapotitlán, P13=Azumbilla. Cada letra designa un punto de la prueba de Mantel.

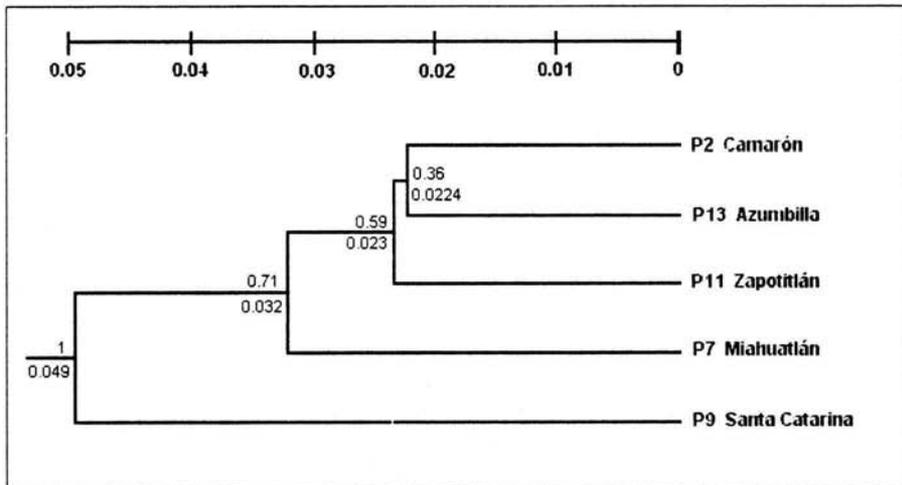


Figura 9. Dendrograma UPGMA que muestra las distancias genéticas (Nei, 1972) entre las poblaciones de *A. potatorum*. Sobre cada nodo se muestran los valores de bootstrap que lo soportan y debajo, la distancia.

En esta especie no se registró un aislamiento por distancia con la prueba de Mantel ($r=-0.5794$, $p=0.99$, Figura 10), considerando que la distancia máxima entre las poblaciones es de 281 km (entre las poblaciones P7-Miahuatlán y P13-Azumbilla), en comparación con la máxima de 321 en *A. cupreata* entre las poblaciones C10-Mesones y C14-Etúcuaro (Tablas 4 y 5).

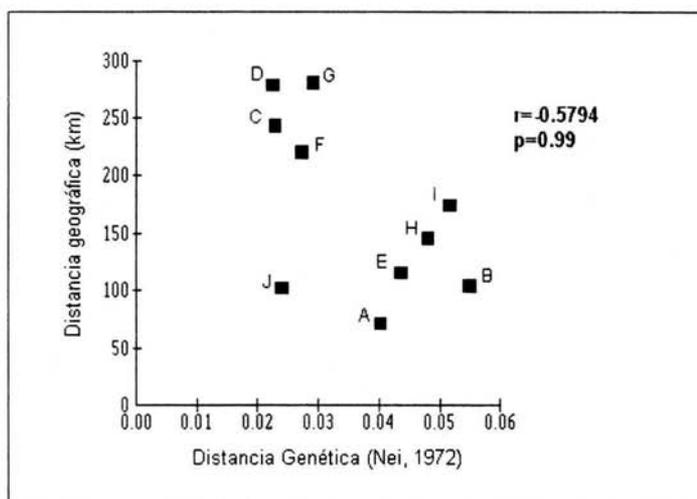


Figura 10. Aislamiento por distancia ausente entre las poblaciones de *A. potatorum*. Aunque la regresión es negativa, la correlación entre la distancia genética y la geográfica no es significativa. Cada letra representa un par de poblaciones, ver Tabla 5.

Distancia genética y aislamiento por distancia entre las dos especies

Uno de los resultados más relevantes en este trabajo es el hecho de que los ISSRs hayan amplificado de manera muy similar en ambas especies con los diversos oligonucleótidos que se probaron. Al observar que los primers que generaban bandas nítidas eran los mismos para las dos especies, se decidió elaborar un análisis conjunto para conocer el grado de similitud entre ellas. Las distancias genéticas fueron calculadas y se elaboró un árbol de UPGMA con las diez poblaciones, obteniendo un dendrograma en el que éstas no se agrupan claramente por especie. Las distancias genéticas entre las especies conservan sus proporciones en relación al cálculo elaborado con las especies por separado, en el que las de *A. potatorum* tienen distancias más pequeñas entre sí, mientras que las de *A. cupreata* son más lejanas, en particular las de Michoacán (Tabla 6).

En la topología del dendrograma se observa que, aunque algunas poblaciones de cada especie se mantienen juntas, los valores de bootstrap y las distancias genéticas muestran que existe una gran similitud entre ambas. Las poblaciones de Michoacán, por su parte, mantienen su posición en la

base del árbol como las más diferentes, a gran distancia de las poblaciones de *A. cupreata* de Guerrero y de las de *A. potatorum* (Figura 11).

| Población | P2 | P7 | P9 | P11 | P13 | C3 | C10 | C13 | C14 |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| P2 | - | | | | | | | | |
| P7 | 0.040 | - | | | | | | | |
| P9 | 0.055 | 0.044 | - | | | | | | |
| P11 | 0.023 | 0.027 | 0.048 | - | | | | | |
| P13 | 0.022 | 0.029 | 0.052 | 0.024 | - | | | | |
| C3 | 0.053 | 0.049 | 0.056 | 0.038 | 0.053 | - | | | |
| C10 | 0.055 | 0.036 | 0.044 | 0.031 | 0.052 | 0.035 | - | | |
| C13 | 0.053 | 0.026 | 0.040 | 0.041 | 0.042 | 0.035 | 0.038 | - | |
| C14 | 0.087 | 0.086 | 0.080 | 0.082 | 0.064 | 0.072 | 0.082 | 0.086 | - |
| C16 | 0.084 | 0.076 | 0.090 | 0.087 | 0.074 | 0.092 | 0.079 | 0.060 | 0.093 |

Tabla 6. Distancias genéticas (Nei, 1972) entre las diez poblaciones estudiadas de ambas especies.

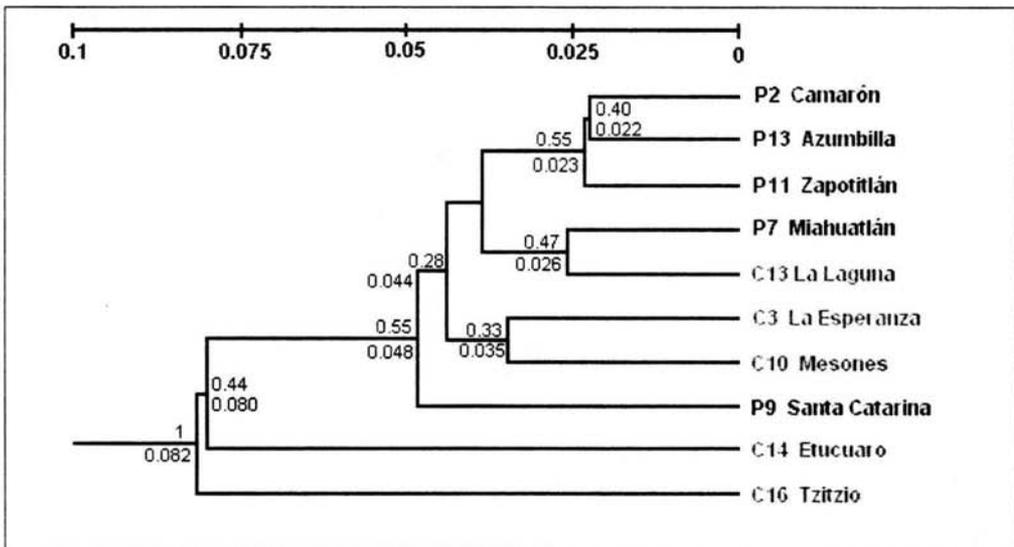


Figura 11. Dendrograma UPGMA de las dos especies estudiadas con base en las distancias de Nei (1972), en oscuro las de *A. potatorum* y en claro las de *A. cupreata*. Sobre cada nodo se muestran los valores de bootstrap que lo soportan y debajo, la distancia.

Asimismo, una prueba de Mantel señaló que las diez poblaciones presentan aislamiento por distancia ($p < 0.01$, Figura 12).

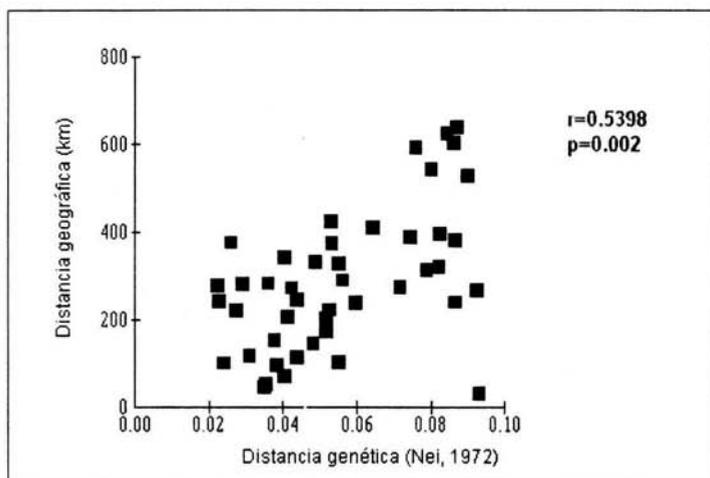


Figura 12. Aislamiento por distancia entre las diez poblaciones analizadas de acuerdo a la prueba de Mantel.

4.3. Partición de la varianza genética

En el caso de *Agave cupreata* se estableció una jerarquía por estados, colocando las poblaciones en dos grupos: Guerrero y Michoacán. En el AMOVA se encontró que en esta especie el 81% de la variación genética se encuentra en el interior de las poblaciones, mientras el 13% se encuentra entre poblaciones dentro de los estados, y tan sólo el 6% se encuentra entre los estados. Si se analizan los loci de cada primer por separado esta tendencia se mantiene, con 89% y 74% de la variación dentro de las poblaciones con el primer 846 y el 857 respectivamente. En esta especie tan sólo 4 genotipos se repitieron dos veces con el 857 mientras que con el 846 se repitieron 15, de los cuales sólo 3 lo hicieron más de dos veces. Los genotipos repetidos de un primer a otro no correspondieron a los mismos individuos, por lo que ningún genotipo completo (con 36 loci) se repitió entre los 153 individuos analizados en total en la especie.

En *Agave potatorum* se encontró que el 90% de la variación se encuentra dentro de las poblaciones, y el 10% restante se encuentra entre las poblaciones analizadas. Al hacer el análisis con los primers por separado se obtiene un 94% y 90% de la variación dentro de las poblaciones con los primers 857 y 846 respectivamente. No se incluyó otro nivel de jerarquía ya que no

existen elementos que permitan establecer alguna en particular. Cabe mencionar también que en esta especie se repitieron más genotipos: con el primer 846 nueve genotipos aparecieron en dos ocasiones y 16 genotipos aparecieron más de dos veces; en cambio, con el 857 hubo sólo un genotipo que apareció en dos ocasiones. Pero al igual que en *A. cupreata*, los genotipos completos con 36 loci en los 179 individuos no se repitieron en ninguna ocasión.

Al considerar que las dos especies comparten los loci de ISSRs se hizo un análisis colocando las diez poblaciones estudiadas en dos grupos (uno por especie), y se encontró que la mayoría de la variación se encuentra dentro de las poblaciones (83%), mientras que entre las poblaciones dentro de cada especie y entre las especies se encuentra sólo el 13% y 4% de la variación, respectivamente. Haciendo el análisis con los primers por separado, con el primer 846 se encuentra el 10% de la varianza entre las dos especies, mientras que 15% está entre las poblaciones dentro de las especies y el 75% dentro de las poblaciones. En el caso del primer 857, el 1% se encuentra entre las especies, mientras que el 91% se encuentra dentro de las poblaciones, y el resto (8%) está entre las poblaciones dentro de las especies. Entre ambas especies hubo más genotipos repetidos con el primer 846 (9) que con el 857 (2), aunque con ambos primers no se repitió ningún genotipo en los 332 individuos en total.

5. Discusión

Parámetros de genética de poblaciones

Los ISSRs (*Inter Simple Sequence Repeats*) resultaron ser una herramienta útil en el estudio de la genética de poblaciones de las especies *Agave cupreata* y *Agave potatorum*, tanto por su alto polimorfismo como por ser reproducibles y fácilmente visualizados en geles de agarosa. Estos marcadores pueden ser utilizados confiablemente en los estudios de genética de poblaciones, ya que se heredan de manera mendeliana y experimentalmente son poco sensibles a variaciones en la concentración de primer y DNA en la muestra (Wolfe, 2000; Zietkiewicz *et al.*, 1994; Bornet y Branchard, 2001). A pesar de la similitud entre las secuencias de los primers utilizados, la temperatura de hibridación de la PCR (52°C) asegura su especificidad, además de la secuencia desfasada de la adenina y citosina, junto con la presencia de dos bases diferentes en el extremo 3'. Por otro lado, los oligonucleótidos (CA)_n son ampliamente utilizados en las amplificaciones de ISSRs, ya que este tipo de dinucleótido repetido es común tanto en especies animales como vegetales, y se ha observado que aunque hay muchas diferencias entre los patrones de bandedo de individuos, aquellos que provienen de la misma especie son claramente similares. Esto permite utilizarlos en el *fingerprinting* intraespecífico e incluso en la inferencia de relaciones de parentesco cuando los patrones son similares entre especies cercanas. Lo anterior hace suponer que, a pesar de la variabilidad en el número de unidades repetidas por locus, las secuencias repetidas (CA)_n son relativamente estables en su localización genómica (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

Los datos generados con esta técnica mostraron que en la especie *A. cupreata* existen valores de variación genética ($\overline{H_s}$ =0.2574, P=88.8) ligeramente más altos que en *A. potatorum* ($\overline{H_s}$ =0.2459, P=83.3), aunque esta diferencia no resultó ser estadísticamente significativa. Los niveles de estructuración fueron más altos en *A. cupreata*, tanto en el estadístico F_{ST} (θ =0.145) como en el número de loci con diferencias significativas en sus frecuencias alélicas entre las poblaciones (R&R=26/36), que en *A. potatorum* (θ =0.084, R&R=23/34). Los valores del estadístico F_{ST} obtenidos con el AMOVA coincidieron con los obtenidos con el TFPGA,

mostrando una mayor estructuración *A. cupreata* ($\theta=0.192$) que *A. potatorum* ($\theta=0.099$). En asociación con la estructuración, el flujo génico es más reducido en *A. cupreata* ($Nm=1.49$), mientras que en *A. potatorum* es dos veces mayor ($Nm=2.99$).

Las poblaciones de *A. cupreata* resultaron ser genéticamente más distantes ($\bar{D} = 0.0672$), siendo las más lejanas entre sí las poblaciones C14-Etúcuaro y C16-Tzitzio del estado de Michoacán ($D=0.093$), y las más cercanas las poblaciones C3-La Esperanza y C10-Mesones del estado de Guerrero ($D=0.035$). En cambio, las poblaciones de *A. potatorum* son todas genéticamente cercanas ($\bar{D} = 0.0364$), con la mayor distancia entre las poblaciones P2-Camarón y P9-Santa Catarina ($D=0.055$), y la menor entre las poblaciones P2-Camarón y P13-Azumbilla ($D=0.022$). La especie *A. cupreata* muestra aislamiento por distancia ($p=0.039$), mientras que *A. potatorum* no ($p=0.99$).

Haciendo un análisis conjunto con las diez poblaciones, éstas no se agrupan por especie: las de *A. cupreata* del estado de Guerrero resultan ser más similares a las de *A. potatorum* que a las dos poblaciones del estado de Michoacán. Asimismo, la población de *A. potatorum* P7-Miahuatlán es más similar a una de *A. cupreata* (C13-La Laguna) que a las demás de los estados de Puebla y Oaxaca, mientras la población P9-Santa Catarina se mantiene más diferenciada, quedando por fuera del grupo formado por las otras cuatro poblaciones de *A. potatorum* y las tres poblaciones de *A. cupreata* del estado de Guerrero. Finalmente, las dos poblaciones de Michoacán de *A. cupreata* quedan en la parte externa del dendrograma, con las mayores distancias genéticas en relación con todas las demás poblaciones, e incluso entre ellas (Figura 11). El resultado del análisis de AMOVA señaló que la mayor parte de la variación genética, en ambas especies, se encuentra dentro de las poblaciones (81% en *A. cupreata* y 90% en *A. potatorum*).

En el listado de los genotipos de los individuos analizados entre los que correspondían al primer 846 se repitieron 15 en *A. cupreata* y 25 en *A. potatorum*; y entre los del 857 se repitieron 4 y 1 respectivamente. Sin embargo, los genotipos repetidos de los dos primers no correspondían a los mismos individuos, lo que al hacer el listado con los 36 loci resultó en 332 genotipos diferentes correspondientes a los 332 individuos analizados, ninguno repetido.

Los altos niveles de variación genética en las dos especies corresponden a lo que se ha reportado previamente para la familia Agavaceae, tanto en el género *Agave* como en *Yucca* y *Manfreda* (Tabla 7, Figura 13). Los valores de estructuración de *A. cupreata* coinciden con los promedios de estos índices obtenidos con aloenzimas de Hamrick y Godt (1996) correspondientes a monocotiledóneas de distribución regional con polinización cruzada, con semillas dispersadas por gravedad ($G_{ST}=0.12-0.157$), pero los valores de diversidad genética (tanto heterocigosis como porcentaje de loci polimórficos) son más altos que los promedios con aloenzimas ($H=0.15-0.18$, $P=52.5-65.5$). *A. potatorum* posee también valores de diversidad más elevados, pero su estructuración es más baja que los promedios reportados por estos autores.

| | H | P | F _{ST} | Técnica | Referencia |
|--|-------|------|-----------------|------------|--|
| <i>Agave cupreata</i> | 0.29 | 89 | 0.145 | ISSRs | Este estudio |
| <i>A. potatorum</i> | 0.27 | 83 | 0.084 | ISSRs | Este estudio |
| <i>A. garciae-mendozae</i> | 0.27 | 85 | 0.1 | ISSRs | A. González (com. pers.) |
| <i>A. subsimplex</i> | 0.14 | 76 | 0.08 | RAPDs | Navarro-Quezada <i>et al.</i> (2003) |
| <i>A. cerulata</i> | 0.24 | 90 | 0.1 | RAPDs | Navarro-Quezada <i>et al.</i> (2003) |
| <i>A. deserti</i> | 0.19 | 78 | 0.14 | RAPDs | Navarro-Quezada <i>et al.</i> (2003) |
| <i>A. lechuguilla</i> | 0.39 | 96 | 0.09 | Isoenzimas | Silva y Eguiarte (2000) |
| <i>A. victoriae-reginae</i> | 0.33 | 83 | 0.24 | Isoenzimas | Martínez-Palacios <i>et al.</i> (1999) |
| <i>Manfreda brachystachia</i> | 0.48 | 100 | 0.03 | Isoenzimas | Eguiarte <i>et al.</i> (2000) |
| <i>Yucca</i> | 0.20 | 68 | 0.17 | Isoenzimas | Massey y Hamrick (1998) |
| Monocotiledóneas de polinización cruzada | 0.158 | 52.5 | 0.157 | Isoenzimas | Hamrick y Godt (1996) |
| Perenes longevas | 0.18 | 65.5 | 0.094 | Isoenzimas | Hamrick y Godt (1996) |
| Distribución regional | 0.171 | 59.9 | 0.12 | Isoenzimas | Hamrick y Godt (1996) |
| Monocotiledóneas | 0.19 | | 0.38 | RAPDs | Nybom y Bartish (2000) |
| Perenes longevas | 0.242 | | 0.25 | RAPDs | Nybom y Bartish (2000) |
| Distribución regional | 0.222 | | 0.43 | RAPDs | Nybom y Bartish (2000) |

Tabla 7. Índices de diversidad y estructuración genética reportados para miembros de Agavaceae con diversas técnicas, así como para monocotiledóneas, plantas perenes longevas y de distribución regional.

En comparación con otros estudios realizados con la técnica de RAPDs, las dos especies coinciden con los valores de heterocigosis promedio reportados para plantas perenes longevas ($H=0.24$) y con distribución regional ($H=0.22$), aunque son más altos que el promedio de monocotiledóneas ($H=0.19$; Nybom y Bartish, 2000). Los valores de estructuración son menores en este estudio que en los promedios de RAPDs, en los que $F_{ST}=0.38$ en monocotiledóneas, 0.25 en perenes longevas y 0.43 en plantas con distribución regional (Tabla 7, Figura 13).

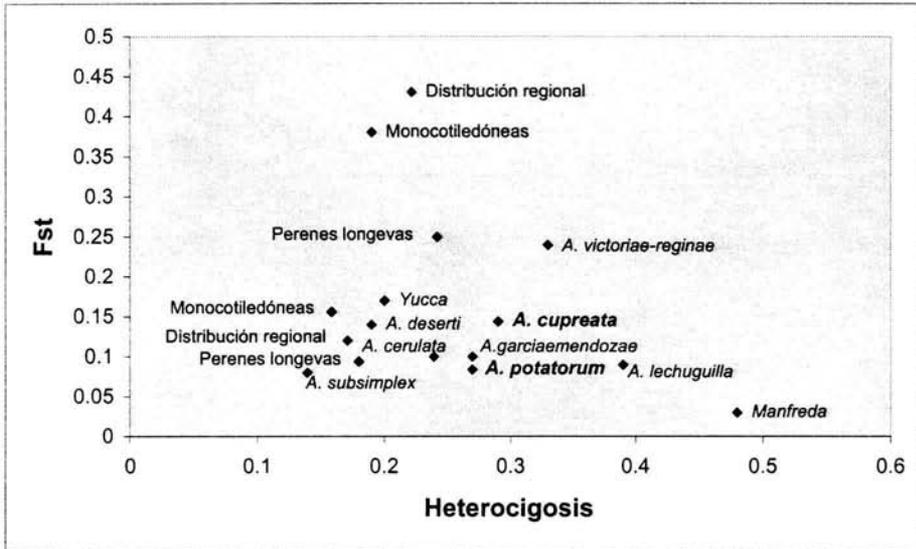


Figura 13. Datos de diversidad (en términos de heterocigosis, H) y estructuración (en términos de F_{ST}) de *A. cupreata* y *A. potatorum* en comparación con otras especies de Agavaceae, plantas monocotiledóneas, perennes longevas y de distribución regional. Técnicas utilizadas y referencias en Tabla 7.

Sin embargo, resulta difícil hacer comparaciones entre datos que han sido obtenidos con técnicas moleculares diferentes. Parece ser que los RAPDs revelan niveles más elevados de polimorfismo dentro y entre especies que muestran poco polimorfismo con RFLPs o isoenzimas, sobre todo en especies endémicas o de distribución restringida (Whitkus, 1994; Nybom y Bartish, 2000), pero sus estimaciones de las frecuencias alélicas pueden ser menos exactas por tratarse de marcadores dominantes (Lynch y Milligan, 1994). Se considera también que los RAPDs son sensibles a la detección de la estructura genética de acuerdo a un modelo de aislamiento por distancia, lo que, junto con los mayores valores de diversidad, puede deberse al hecho de que una mayor proporción de aloenzimas, en comparación con marcadores de DNA, sufren los efectos de la selección natural, ya sea directamente o por ligamiento (Nybom y Bartish, 2000). Pero algunos parámetros muestran la misma asociación en RAPDs e isoenzimas en relación con las historias de vida de las especies estudiadas. Por ejemplo, las plantas anuales presentan el valor más bajo de diversidad intrapoblacional y las perenes de vida larga el más alto; los taxa endógamos son los menos diversos y los exógamos los más diversos; aunque los promedios de diversidad

intrapoblacional con RAPDs en las diferentes categorías de historias de vida ocupan un rango más amplio que los promedios de aloenzimas, tal vez por reflejar una mayor diversidad genética subyacente (Nybom y Bartish, 2000).

En el caso de los ISSRs, cabe la posibilidad de que éstos se comporten de manera similar a los RAPDs, en tanto que se trata de marcadores dominantes obtenidos a partir de DNA nuclear, son heredados de manera mendeliana y se analizan estadísticamente de la misma forma. En lo relativo a la comparación de los datos de la Tabla 7, la comparación de los parámetros debe ser cautelosa, reconociendo las propiedades de cada marcador y su base teórica. Considerando que los parámetros de historia de vida parecen generar patrones similares, me parece que dicha comparación es posible cuando las especies pertenecen a la misma categoría de forma de vida, poseen sistemas reproductivos similares e igual modo de dispersión de semillas. En el caso del género *Agave*, las diferentes especies comparten estas características, por lo que es posible retomar los datos obtenidos con diferentes técnicas para obtener una imagen general de lo que está sucediendo dentro del género.

Ahora bien, a pesar de que las poblaciones silvestres de las dos especies estudiadas han sido sujetas a una explotación importante desde hace varias décadas, conservan altos niveles de variación genética. Esta variación es una base importante para la conservación a largo plazo de ambas y señala que a pesar de la extracción de individuos y la disminución de la producción de flores, no hay una erosión genética importante. La conservación de esta diversidad genética puede deberse a la historia de vida de estas plantas, en la que los ciclos de vida son largos (de 8 a 12 años) y al final de un prolongado periodo de desarrollo somático sucede la reproducción, caracterizada por una alta inversión de recursos por parte de la planta, después de la cual se deteriora y muere. Esta estrategia permite la coexistencia de individuos de generaciones diferentes en la misma población, pero refleja también la importancia de las interacciones con sus polinizadores, considerados como motor en la evolución del sistema reproductivo semélfaro del género *Agave* (Schaffer y Schaffer, 1977). Se considera que algunas especies de *Agave* son altamente dependientes de los polinizadores para la formación de frutos y semillas viables (Howell y Roth, 1981), siendo la depresión por endogamia la expresión más evidente de esta dependencia, a pesar de que las especies sean autocompatibles (Eguiarte *et al.*, 2000; Trame *et*

al., 1995). La obtención de genotipos únicos para todos los individuos analizados, tanto de *A. cupreata* como de *A. potatorum*, señala que no son clonales y que el papel de los polinizadores es fundamental en la producción de semillas por medio de polinización cruzada. Las semillas, producto final de la inversión desplegada en flores y néctar, son producidas en gran cantidad y dispersadas por viento y gravedad por periodos prolongados, ya que los frutos se mantienen unidos al escapo después de abrirse. Estos bancos de semillas pueden contribuir a la conservación de la diversidad de las especies al actuar como reservorios que liberan gradualmente los genotipos a pesar de que el evento reproductivo se haya dado tiempo atrás. En *Agave* el número de frutos y semillas viables por inflorescencia puede ir, por ejemplo, de 51 y 2500, en *A. celsii albicans*, hasta 2500 y 180 000 en *A. garciae mendozae* (M. Rocha y A. González, com. pers.). En particular, en *A. cupreata* el promedio de semillas viables por fruto es de 144, con un promedio de 16 frutos por umbela, con varias umbelas por inflorescencia (P. García-Massyel, com. pers.). No se cuenta con esta clase de datos en *A. potatorum*. Por otro lado, un factor más en la manutención de la diversidad genética de las especies es su tamaño poblacional. De acuerdo con observaciones en campo, tanto el número de individuos como el número de poblaciones que conforman a las especies es alto, lo que puede impedir fenómenos como la deriva génica.

A pesar de que ambas especies poseen niveles de diversidad genética similares, *A. cupreata* es una especie más estructurada ($F_{ST}=0.145$), con dos poblaciones (las de Michoacán) muy diferentes del resto. Esta estructuración puede deberse a la distribución de las poblaciones de esta especie en tipos de vegetación más contrastantes, como los bosques de encino (jóvenes y maduros) y los palmares, además de que en el campo se observaron otras poblaciones en selvas bajas. Aunque no es posible definir qué fuerzas evolutivas han podido participar en esta estructuración, es posible que las poblaciones en tipos de vegetación diferentes hayan sido sujetas de selección natural, con una subsecuente diferenciación genética. La mayor estructuración en *A. cupreata* está también asociada con sus niveles de diversidad ligeramente más altos, ya que el monto de variabilidad en una población es mayor cuando está compuesta de muchas subpoblaciones parcialmente aisladas una de otra y están genéticamente diferenciadas, en comparación con una población panmíctica del mismo tamaño.

La menor estructuración de *A. potatorum* ($F_{ST}=0.084$) puede deberse a una menor tasa de autopolinización o endogamia, con un mayor flujo génico entre las poblaciones (probablemente debida a murciélagos del género *Leptonycteris*, especialmente *L. curasoae* (Rojas-Martínez *et al.*, 1999)), así como a un manejo tradicional más importante y más antiguo (J. Larson, com. pers.) que haya provocado una cierta homogenización entre ellas. La producción de mezcal en Oaxaca es históricamente más conocida que la de Guerrero, y aunque actualmente la mayor parte se fabrica con la especie *A. angustifolia*, es muy probable que *A. potatorum* haya sido sujeto de prácticas de manejo ancestrales.

En relación con los valores de estructuración obtenidos con el AMOVA, y que mostraron ser muy similares a los obtenidos con el TFPGA, se puede concluir que los supuestos teóricos relacionados con el equilibrio de Hardy-Weinberg son correctos. De hecho, los artículos en los que se han calculado ambos parámetros sobre el mismo conjunto de datos muestran valores casi idénticos (con una divergencia que va de 0.02 a 0.04) (Nybom y Bartish, 2000). Los valores de F_{ST} pareados entre las poblaciones mostraron valores más altos en *A. cupreata* (con un máximo de 0.228 y un mínimo de 0.097) que en *A. potatorum* (máximo de 0.138 y mínimo de 0.51), lo que coincide con las mayores distancias genéticas entre poblaciones de la primera especie. En *A. cupreata* existe una correlación positiva entre el valor de la F_{ST} entre cada par de poblaciones y la distancia genética de Nei que las separa ($r=0.876$, $p<0.001$), aunque en las dos especies los pares de poblaciones con las mayores distancias genéticas no necesariamente corresponden con los que poseen los valores más altos de F_{ST} . De hecho, en el caso de *A. potatorum* no existe una correlación positiva entre el valor de F_{ST} y la distancia genética de Nei ($r=0.536$, $p=0.10$). Las diferencias entre estos dos parámetros pueden comprenderse a partir de las fórmulas con que se calculan y los valores que pueden adquirir. La distancia de Nei se basa en las diferencias entre frecuencias alélicas de las poblaciones, calculadas bajo H.W., y puede ir de 0 a infinito, mientras que los valores de F_{ST} pareados, calculados con el AMOVA, se basan en las distancias entre los genotipos completos de los individuos que forman esas poblaciones, y pueden ir de 0 a 1. En el caso de *A. potatorum*, la falta de correlación entre las distancias y las F_{ST} puede deberse a que los valores en ambos parámetros son pequeños y reflejan la similitud entre las poblaciones. Esto es, las frecuencias alélicas son similares entre los loci de las poblaciones y al mismo tiempo cada población tiene una varianza pequeña en relación con la media del par al que pertenece. En

cambio, en *A. cupreata* las diferencias entre las poblaciones son mayores, y se reflejan tanto en las frecuencias alélicas en los loci entre poblaciones, lo que resulta en una mayor distancia, como en las varianzas en relación con la media de cada par, lo que resulta en valores más altos de F_{ST} .

La mayor estructuración de *A. cupreata* se reflejó también en las distancias genéticas que existen entre las poblaciones, que en los dendrogramas aportan elementos importantes en el manejo de éstas y, en particular, de las del estado de Michoacán. Aunque las poblaciones C14-Etúcuaro y C16-Tzitzio poseen niveles de variación genética total similares a las de las poblaciones de Guerrero, las frecuencias alélicas en los loci son muy diferentes, lo que resulta en una mayor distancia en relación con las demás, e incluso entre ellas. Afortunadamente no parecen estar genéticamente erosionadas, pero es posible que esa variabilidad se pierda pronto y a una velocidad mayor que las de Guerrero ante el deterioro de la vegetación de las localidades donde se encontraban las plantas y el tamaño reducido de las poblaciones, además de que no existen programas de recuperación de semillas ni de reforestación. Considerando además que entre ellas son muy diferentes, estas poblaciones requieren de una atención particular. En cambio, las poblaciones de Guerrero son más similares entre sí, aunque las distancias genéticas que las separan ($D=0.036$) son de la misma magnitud de las que separan a la mayoría de las poblaciones de *A. potatorum* ($D=0.032$).

En *A. potatorum* hay distancias genéticas pequeñas y se agrupan casi todas las poblaciones, aunque la P9-Santa Catarina se mantiene en la base del dendrograma como una población diferenciada, incluso cuando se hace un solo dendrograma con las poblaciones de las dos especies. Estas distancias genéticas menores reflejan una mayor similitud en las frecuencias alélicas de las poblaciones, que resultan también en la estructuración menos marcada de esta especie. Por otro lado, las razones por las que la población P9- Santa Catarina se mantiene a una mayor distancia de las demás no son evidentes. En efecto, no se encuentra geográficamente aislada, y no se encuentra en algún tipo de vegetación diferente. Es posible que esta población haya sido fundada por un reducido número de individuos o que esté sujeta a alguna fuerza evolutiva como la selección o la deriva.

Consideraciones taxonómicas

El análisis global de las diez poblaciones permite observar que las poblaciones P2, P7, P11 y P13 de *A. potatorum* se mantienen formando un grupo cercano, mientras que entre las poblaciones de Guerrero, la C13-La Laguna es más similar a una de *A. potatorum* que a las demás de Guerrero. Las otras dos poblaciones guerrerenses se mantienen juntas, mientras que de manera externa a todas ellas se asocia la P9-Santa Catarina. Finalmente, se observan en la parte más externa del dendrograma cada una de las poblaciones de Michoacán. Este resultado lleva a pensar que estas dos especies pueden ser parte de un solo complejo y que existe flujo génico entre ellas, ya que no se observan diferencias taxonómicas claras en las ramas del dendrograma, y algunos nodos tienen valores muy bajos de bootstrap. Es posible que se trate de un caso similar al reportado en el complejo de *Agave deserti*, en el que tres especies – *A. deserti*, *A. cerulata* y *A. subsimplex* – y varias subespecies no siguen el tratamiento de Gentry (1982) en los dendrogramas obtenidos a partir de datos de RAPDs, además de que las distancias genéticas que separan a las poblaciones de especies diferentes van de $D=0.02$ a 0.042 (Navarro-Quezada *et al.*, 2003).

De acuerdo con observaciones en el campo, existe una gran variabilidad dentro de las poblaciones en la morfología de las plantas, no sólo en el tamaño de los individuos sino también en la forma de las hojas (largo, ancho, espinas) y en el color. En particular los individuos jóvenes son muy parecidos entre las dos especies. La distinción de estas especies y su ubicación en grupos diferentes (Crenatae para *A. cupreata* y Hiemiflorae para *A. potatorum*) fue elaborada por Gentry (1982) con base en caracteres de las hojas, ya que las flores son muy similares en todo el género. El grupo Crenatae se distingue por los márgenes crenados de las hojas, con espinas sobresalientes, y el Hiemiflorae por los pedúnculos cortos sobre los que se desarrollan las flores. Tanto el tamaño y forma de las espinas como el largo de los pedúnculos pueden ser producto de variación intraespecífica, así como de una cierta diferenciación geográfica. En Gentry (1982), las localidades reportadas coinciden con las regiones de mayor acceso en el centro del estado de Guerrero y con las de los estados de Puebla y Oaxaca. En este estudio se reportan dos localidades más a las ya reportadas para *A. cupreata* (C10-Mesones y C3-La Laguna) y en el campo se observaron varias más sobre la autopista México-Acapulco, antes y después de la ciudad de Chilpancingo. Es muy probable que la distribución de la especie sea mayor, sobre el largo de la

Sierra Madre del Sur, donde existen regiones con vegetación y condiciones climáticas similares a las de las localidades donde ha sido reportada. Puede suceder entonces que las distribuciones de ambas especies se unan sobre la sierra en la frontera entre Guerrero y Oaxaca, donde hay pocas vías de acceso, pero donde existen tipos de vegetación y suelo que comparten las especies. La existencia de otras poblaciones no reportadas (y tal vez no explotadas) en esta distribución potencialmente mayor podría estar ayudando a la manutención de los altos niveles de diversidad genética en las especies, mediada por flujo génico. Por otro lado, Gentry (1982) reporta que *A. cupreata* florece a partir de enero, mientras que *A. potatorum* lo hace a partir de septiembre. La falta de sincronización en los tiempos de floración no permitiría el flujo entre ellas y favorecería la diferenciación entre las especies. Contrario a esto hemos observado en el campo individuos de *A. cupreata* floreciendo en octubre y hay reportes de floración de *A. potatorum* durante los meses de enero, febrero y parte de marzo (Rojas-Martínez *et al.*, 1999).

Como en otras especies del subgénero *Agave*, *A. cupreata* es polinizado por murciélagos, en particular *Leptonycteris nivalis*, y aunque es visitado por organismos diurnos como abejas y colibríes, la mayor parte de los frutos y semillas es producto de visitas nocturnas (P. García-Massyel, com. pers.). Tanto *L. nivalis* como *L. curasoae* son consideradas especies migratorias cuyos patrones de desplazamiento entre México y Estados Unidos dependen de la disponibilidad estacional del néctar como recurso alimenticio en las zonas que visitan; aunque *L. curasoae* se encuentra en la vertiente del Pacífico y la Cuenca del Balsas a lo largo de todo el año (Rojas-Martínez *et al.*, 1999). Cabe mencionar que tal como estos murciélagos pueden visitar varias especies de agaves, tanto *A. cupreata* como *A. potatorum* pueden ser visitados por otras especies más de quirópteros, ya que se reportan 6 especies de murciélagos nectarívoros para la zona en que se distribuyen (Medellín *et al.*, 1997). Es así como la posible existencia de más poblaciones, cierta sincronización en la floración y el desplazamiento de polen gracias a murciélagos podría estar permitiendo el flujo entre estas dos especies.

La ubicación en el dendrograma global de las poblaciones de Michoacán, así como las distancias genéticas que las separan de las demás de *A. cupreata* y de las de *A. potatorum* sugieren que se trata de poblaciones muy diferenciadas. Existe además una barrera geográfica importante entre ellas y las del estado de Guerrero: la cuenca del río Balsas. Considerando los datos genéticos y la

geografía de los estados de Michoacán, Guerrero, Puebla y Oaxaca, es necesario revisar la taxonomía de estas dos especies. Además, tan sólo el 4% de la variación genética total se encuentra entre las especies, mientras que el 83% se encuentra dentro de las poblaciones.

Consideraciones sobre manejo

En cuanto al manejo, los datos de distancias genéticas permiten establecer tres grupos en *A. cupreata*: uno en el estado de Guerrero y dos en Michoacán. Esto es, se sugiere que se pueden manejar de manera conjunta las poblaciones C3-La Esperanza, C10-Mesones y C13-La Laguna, mientras que las de Michoacán deberán manejarse cada una por separado. La propuesta consiste en coleccionar semillas y reforestar con las plántulas dentro de cada grupo, sin mezclar lotes de un grupo a otro. En el grupo de Guerrero, por la alta estructuración en la especie – hay poco flujo génico – y las distancias genéticas – que son medianamente altas – deberá coleccionarse de todas las poblaciones del grupo de manejo para evitar una subrepresentación de algún tipo genético. Una colecta de semillas del mayor número de individuos posible implica dejar que florezcan también un número elevado de plantas en cada población. Esto permitiría conservar los genotipos ya existentes dentro del grupo al que pertenecen y no modificar drásticamente sus frecuencias por la introducción de genotipos que no existían previamente ahí. Sin embargo, sería necesario hacer estudios de trasplantes recíprocos para analizar el grado de adaptación local, sobre todo en tipos de suelo y vegetación diferentes.

En *A. potatorum* se pueden plantear dos grupos: uno formado por las poblaciones P2-Camarón, P7-Miahuatlán, P11-Zapotitlán y P13-Azumbilla, y otro por la población P9-Santa Catarina. La ubicación de esta última en el dendrograma global de las dos especies – en el que se mantiene separada (Figura 11) – refuerza la idea de un manejo aparte a pesar de que la distancia que la separa de las demás poblaciones de *A. potatorum* ($D=0.048$) no sea mucho mayor que la distancia que une al grupo de las poblaciones guerrerenses de *A. cupreata* ($D=0.036$), y para el que se propone un solo manejo. Igualmente, el dendrograma global permite mantener la idea de un manejo separado para cada una de las poblaciones de *A. cupreata* en Michoacán, ya que éstas mantienen su posición basal como las más diferenciadas.

En *A. potatorum* existe afortunadamente mayor flujo génico entre las poblaciones (menor estructuración) y las distancias son más pequeñas, por lo que la colecta de semillas dentro del primer grupo no necesita incluir a todas las poblaciones, ya que una subrepresentación de alguna de ellas tendrá consecuencias menos importantes a largo plazo. Por ejemplo, entre las poblaciones P2-Camarón y P13 Azumbilla, puede escogerse sólo una dada su gran similitud genética (Figura 9).

En general, en las dos especies es necesaria la búsqueda de otras poblaciones y la determinación de su distribución total real. La ubicación de otras localidades permitirá conservar la totalidad de la variabilidad que poseen las especies, además de conocer y comprender mejor sus características ecológicas. En particular, esta búsqueda debe realizarse en el estado de Michoacán, dada su gran diferenciación genética y el grado de deterioro en el que se encuentran sus sitios de distribución ya reportados. La conservación de las diversas poblaciones de *A. potatorum* tiene también interés desde el punto de vista de la conservación del género, ya que su distribución corresponde a una de las áreas recomendadas para focalizar actividades de conservación *in situ* de *Agave*, en la región de Puebla-Oaxaca (que incluye Tehuacán-Cuicatlán y la Sierra Madre del Sur) (Tambutti-Allende, 2002).

Por último, aunque los datos de genética de poblaciones aquí presentados aportan elementos importantes en el conocimiento y manejo de estas especies, se trata de plantas poco conocidas a pesar de su importancia económica. Desde el punto de vista biológico sería interesante hacer estudios complementarios con marcadores moleculares de herencia paterna para saber con mayor certeza la proporción del flujo génico entre los individuos y poblaciones por medio de polen, así como la aportación que éste hace a la diversidad total de la poza de las especies. También son necesarios estudios sobre la biología reproductiva de *A. potatorum* para conocer y proteger a sus polinizadores, que juegan un papel fundamental en la manutención de la diversidad y estructuración genética, además de ser los responsables de la formación de semillas que son indispensables para la reproducción de estas plantas. Los murciélagos *L. curasoae* y *L. nivalis* son especies consideradas en peligro tanto en EU como en México, y aunque existen programas de protección, al dejar florecer los agaves no sólo se estará ayudando a la reproducción de las plantas sino también a la alimentación de estos mamíferos. El estudio de la biología reproductiva

permitiría asimismo conocer la compatibilidad que existe entre *A. cupreata* y *A. potatorum* como posibles miembros del mismo complejo evolutivo, aunque para determinar su estatus taxonómico son también necesarios estudios de morfología y anatomía.

En cuanto a la producción de mezcal, no basta pensar sólo en los magueyes, ya que en ella son también utilizadas cantidades importantes de leña de encino de las mismas regiones, así como agua. Los programas de producción de mezcal deben también incluir la protección de los bosques de encino, así como los manantiales de los que se obtiene el agua para la fermentación. En el caso de la región de Chilapa Gro., la organización campesina Sanzekan Tinemi, además de organizar los viveros de magueyes, ha decidido también trabajar en la elaboración de un ordenamiento territorial en el que se organicen el manejo de la leña, las áreas de pastoreo y la recarga de acuíferos. Con el apoyo del Grupo de Estudios Ambientales A.C. (GEA), esta organización ha empezado a trabajar en la producción de mezcal de calidad, diferenciado por especie, maestro mezcalero y comunidad; enfocada a pequeños volúmenes pero de buena calidad. A través del programa de Recursos Biológicos Colectivos de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), en particular el de "Mezcales y Diversidad Biológica" han decidido elaborar una Marca Colectiva como primer paso hacia una denominación de origen (Illsley *et al.*, s/f).

Considero que se trata de una experiencia campesina importante en el desarrollo de proyectos que sean sustentables no sólo desde el punto de vista biológico de las especies vegetales, sino también desde el punto de vista social. La idea de mantener la diversidad de los mezcales y producir cantidades limitadas con características distintivas puede resultar en un mayor valor de los productos, sobre todo cuando la elaboración y el envasado se encuentra a cargo de los propios productores y de la gente de la región. Este tipo de experiencias pueden ser extendidas a los productores de mezcal papalote de *A. potatorum*, así como a otros magueyes silvestres usados en la producción de mezcales, como el bacanora y el raicilla.

6. Conclusiones

- Los ISSRs mostraron ser una técnica molecular conveniente para estudios intraespecíficos de genética de poblaciones por ser específicos, repetibles y polimórficos. Se obtuvieron para las dos especies 36 loci utilizando dos oligonucleótidos.
- Los valores de diversidad genética en *A. cupreata* y *A. potatorum* son altos ($H_s=0.2574$ y 0.2459 ; $P=89\%$ y 83%); la ausencia de erosión genética puede deberse a los ciclos de vida largos de estas especies, a sus bancos de semillas y a la reproducción mayoritariamente sexual.
- La mayor parte de la variación genética (81% y 90%) se encuentra dentro de las poblaciones, en las que todos los individuos analizados fueron genéticamente diferentes (no hay clonalidad).
- En *Agave cupreata* existe mayor estructuración ($F_{ST}=0.145-0.192$) y menor flujo génico ($Nm=1.49$). Las distancias genéticas entre las poblaciones sugieren tres grupos de manejo: a) poblaciones C3-La Esperanza, C10-Mesones y C13-La Laguna del estado de Guerrero, b) la población C14-Etúcuaro en Michoacán, y c) la población C16-Tzitzio, también en Michoacán.
- En *Agave potatorum* la estructuración es menor ($F_{ST}=0.084-0.099$), con alto flujo génico ($Nm=2.99$). Las distancias genéticas entre poblaciones son menores y sugieren dos grupos de manejo: a) poblaciones P2-Camarón, P7-Miahuatlán, P11-Zapotitlán y P13-Azumbilla, y b) la población P9-Santa Catarina.
- En *A. cupreata* las frecuencias alélicas de los loci son diferentes de una población a otra, por lo que será necesario coleccionar de todas las poblaciones para evitar una subrepresentación de algún tipo genético.
- En las dos especies es necesario buscar más localidades para registrar la distribución total real de las plantas y conservar la poza génica total de las especies.
- Es necesario revisar la taxonomía de estas especies, ya que parecen formar parte del mismo complejo evolutivo. Los datos genéticos, la polinización por murciélagos y sus características ecológicas apoyan esta idea. Es posible que las poblaciones de Michoacán pertenezcan a otra línea evolutiva.

- Son necesarios estudios de biología reproductiva en *A. potatorum* que confirmen el papel de *Leptonycteris curasoae* o *L. nivalis* como polinizadores. La protección de las especies de murciélagos nectarívoros es fundamental para la reproducción de los magueyes y su conservación a largo plazo.
- Las iniciativas de organización campesina que incluyen la producción artesanal del mezcal con base en marcas colectivas o denominaciones de origen, así como un manejo de maguey, leña y agua, son un primer gran paso en la conservación a largo plazo de *A. cupreata* que puede ser extendida a *A. potatorum* y otras especies silvestres utilizadas en la producción de mezcal.

Apéndice

Protocolo de extracción de DNA con CTAB de acuerdo con Doyle y Doyle (1987) modificado con STE.

1. Moler en un mortero el tejido con nitrógeno líquido.
2. Agregar 250 μ l de buffer CTAB y 750 μ l de STE, seguir moliendo. Recuperar el todo en un tubo eppendorf de 1.5 ml y centrifugar a 10 000 rpm durante 8 minutos.
3. Eliminar el sobrenadante, sacar con espátula el exceso y resuspender con 600 μ l de buffer CTAB 2X. Volver a centrifugar a 10 000 rpm 8 minutos, eliminar el sobrenadante y resuspender en 600 μ l de CTAB 2X. Agregar 4 μ l de RNAsa (7000 U/ml) e incubar a 37°C por 20 minutos.
4. Cambiar la incubación a 65°C con 40 μ l de proteinasa K (20 mg/ml) durante 20 minutos. Poner en hielo 5-10 minutos.
5. Agregar a cada tubo 600 μ l de cloroformo-octanol 24:1, agitar hasta homogenizar y centrifugar a 9 000 rpm durante 12 minutos (10 a 15 min hasta que el sobrenadante quede transparente). Opcional: si el sobrenadante no queda bien transparente, repetir la extracción con el cloroformo-octanol.
6. Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo (con una pipeta de 200 μ l) y precipitar el DNA con 2/3 del volumen final (600 μ l aprox.) de isopropanol frío. Dejar reposar 2 hrs. a -20°C.
7. Centrifugar a 9 000 rpm durante 5 minutos.
8. Limpiar el pellet con 1 ml de etanol 70% frío y centrifugar a 7 000 rpm durante 5 minutos.
9. Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet con 100 μ l de agua ultra pura.

CTAB 2X – Tris-HCl 100 mM pH 8
NaCl 1.4 M
EDTA 20 mM pH 8
CTAB 2%
b-ME 0.3%

STE – Tris HCl 100 mM pH 8
EDTA 50 mM pH 8
NaCl 100 mM
b-ME 0.3%

CTAB – Tris HCl 100 MM pH8
EDTA 20 mM pH 8
CTAB 4%
NaCl 1.5 M
PVP 40 4%
Ác. ascórbico 0.1%
DIECA 0.1%
b-ME 0.3%

Mezclas de reacción utilizadas para la amplificación de ISSRs por medio de PCR

| | Primer 846 | | Primer 857 | |
|-------------------------|--------------|---------------------|------------|---------------------|
| | Volumen (µl) | Concentración final | Volumen | Concentración final |
| H ₂ O | 19.07 | | 18.88 | |
| Buffer 10X | 2.5 | 1X | 2.5 | 1X |
| MgCl ₂ 50 mM | .48 | .96 mM | .75 | 1.5 mM |
| dNTPs 10 mM c/u | .5 | .2 mM c/u | .5 | .2 mM c/u |
| Primer 10 µM | 1.25 | .5 µM | 1.25 | .5 µM |
| Taq 5 U/µl | .2 | 1 U | .2 | 1 U |
| DNA 30-40 ng/µl | 1 | | 1 | |

Tabla A. Frecuencias alélicas en cada uno de los 36 loci en *Agave cupreata*

| Loci/Pobl. | C3 | C10 | C13 | C14 | C16 | Total Especie |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------|
| 1 | 0.257 | 0.000 | 0.223 | 0.087 | 0.086 | 0.124 |
| | 0.743 | 1.000 | 0.777 | 0.913 | 0.914 | 0.876 |
| 2 | 0.552 | 0.016 | 0.245 | 0.495 | 0.267 | 0.295 |
| | 0.448 | 0.984 | 0.755 | 0.505 | 0.733 | 0.705 |
| 3 | 0.374 | 0.048 | 0.069 | 0.000 | 0.034 | 0.092 |
| | 0.626 | 0.952 | 0.931 | 1.000 | 0.966 | 0.908 |
| 4 | 0.049 | 0.098 | 0.034 | 0.014 | 0.034 | 0.045 |
| | 0.951 | 0.902 | 0.966 | 0.986 | 0.966 | 0.955 |
| 5 | 0.137 | 0.526 | 0.182 | 0.165 | 0.069 | 0.203 |
| | 0.863 | 0.474 | 0.818 | 0.835 | 0.931 | 0.797 |
| 6 | 0.033 | 0.016 | 0.069 | 0.419 | 0.202 | 0.142 |
| | 0.967 | 0.984 | 0.931 | 0.581 | 0.798 | 0.858 |
| 7 | 0.156 | 0.048 | 0.050 | 0.166 | 0.123 | 0.110 |
| | 0.844 | 0.952 | 0.949 | 0.834 | 0.877 | 0.890 |
| 8 | 0.796 | 0.734 | 0.792 | 1.000 | 1.000 | 0.836 |
| | 0.204 | 0.266 | 0.203 | 0.000 | 0.000 | 0.164 |
| 9 | 0.000 | 0.000 | 0.068 | 0.000 | 0.000 | 0.013 |
| | 1.000 | 1.000 | 0.932 | 1.000 | 1.000 | 0.987 |
| 10 | 0.796 | 0.734 | 0.726 | 1.000 | 1.000 | 0.818 |
| | 0.204 | 0.266 | 0.274 | 0.000 | 0.000 | 0.182 |
| 11 | 0.033 | 0.000 | 0.017 | 0.199 | 0.245 | 0.096 |
| | 0.967 | 1.000 | 0.983 | 0.801 | 0.755 | 0.904 |
| 12 | 0.066 | 0.151 | 0.162 | 0.014 | 0.338 | 0.135 |
| | 0.934 | 0.849 | 0.838 | 0.986 | 0.662 | 0.865 |
| 13 | 0.137 | 0.359 | 0.418 | 0.271 | 0.792 | 0.355 |
| | 0.863 | 0.641 | 0.582 | 0.729 | 0.208 | 0.645 |
| 14 | 0.066 | 0.032 | 0.086 | 0.165 | 0.289 | 0.124 |
| | 0.934 | 0.968 | 0.914 | 0.835 | 0.711 | 0.876 |
| 15 | 0.016 | 0.064 | 0.142 | 0.117 | 0.390 | 0.135 |
| | 0.984 | 0.936 | 0.853 | 0.883 | 0.610 | 0.865 |
| 16 | 0.590 | 0.464 | 0.447 | 0.057 | 0.202 | 0.317 |
| | 0.410 | 0.536 | 0.553 | 0.943 | 0.798 | 0.683 |
| 17 | 1 | 1 | 0.73 | 0.808 | 0.746 | 0.825 |
| | 0 | 0 | 0.27 | 0.192 | 0.254 | 0.175 |
| 18 | 0.495 | 0.546 | 0.4 | 0.261 | 0.696 | 0.465 |
| | 0.505 | 0.454 | 0.6 | 0.739 | 0.304 | 0.535 |
| 19 | 0.217 | 0.224 | 0.137 | 0.171 | 0.28 | 0.207 |
| | 0.783 | 0.776 | 0.863 | 0.829 | 0.72 | 0.293 |
| 20 | 0.271 | 0.321 | 0.195 | 0.387 | 0.188 | 0.272 |
| | 0.729 | 0.679 | 0.805 | 0.613 | 0.812 | 0.728 |
| 21 | 0.117 | 0.28 | 0.084 | 0.058 | 0.321 | 0.168 |
| | 0.883 | 0.72 | 0.916 | 0.942 | 0.679 | 0.832 |
| 22 | 0.057 | 0 | 0.016 | 0.074 | 0.044 | 0.039 |
| | 0.943 | 1 | 0.984 | 0.926 | 0.956 | 0.961 |
| 23 | 0.75 | 0.746 | 1 | 0.746 | 1 | 0.809 |
| | 0.25 | 0.254 | 0 | 0.254 | 0 | 0.191 |
| 24 | 0.31 | 0.121 | 0.033 | 0.014 | 0.029 | 0.098 |
| | 0.69 | 0.879 | 0.967 | 0.986 | 0.971 | 0.902 |

| | | | | | | |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 25 | 0.057 | 0.014 | 0.016 | 0 | 0 | 0.018 |
| | 0.943 | 0.986 | 0.984 | 1 | 1 | 0.982 |
| 26 | 0.182 | 0.121 | 0.033 | 0.342 | 0.342 | 0.2 |
| | 0.818 | 0.879 | 0.967 | 0.658 | 0.658 | 0.8 |
| 27 | 0.81 | 0.546 | 1 | 0.614 | 0.488 | 0.641 |
| | 0.19 | 0.454 | 0 | 0.386 | 0.512 | 0.359 |
| 28 | 0.199 | 0.105 | 0.049 | 0.089 | 0.224 | 0.134 |
| | 0.801 | 0.895 | 0.951 | 0.911 | 0.776 | 0.866 |
| 29 | 0.33 | 0.461 | 0.325 | 0.614 | 0.171 | 0.366 |
| | 0.67 | 0.539 | 0.675 | 0.384 | 0.829 | 0.634 |
| 30 | 0.29 | 0.28 | 0.236 | 0.546 | 0.242 | 0.313 |
| | 0.71 | 0.72 | 0.764 | 0.454 | 0.758 | 0.687 |
| 31 | 0.199 | 0.271 | 0.279 | 0.364 | 0.28 | 0.276 |
| | 0.801 | 0.739 | 0.721 | 0.636 | 0.72 | 0.724 |
| 32 | 0.182 | 0.014 | 0 | 0.137 | 0.074 | 0.082 |
| | 0.818 | 0.986 | 1 | 0.863 | 0.926 | 0.918 |
| 33 | 0.419 | 0.261 | 0.677 | 0.342 | 0.746 | 0.455 |
| | 0.581 | 0.739 | 0.323 | 0.658 | 0.254 | 0.545 |
| 34 | 0.29 | 0.105 | 0.215 | 0.206 | 0.224 | 0.207 |
| | 0.71 | 0.895 | 0.785 | 0.794 | 0.776 | 0.793 |
| 35 | 0.199 | 0.074 | 0.066 | 1 | 0.387 | 0.264 |
| | 0.801 | 0.926 | 0.934 | 0 | 0.613 | 0.736 |
| 36 | 0.419 | 0.364 | 0.049 | 0.488 | 0.342 | 0.326 |
| | 0.581 | 0.636 | 0.951 | 0.512 | 0.658 | 0.674 |

Tabla B. Frecuencias alélicas en cada uno de los 36 loci en *Agave potatorum*

| Loci/Pobl. | P2 | P7 | P9 | P11 | P13 | Total Especie |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------|
| 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| 2 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| 3 | 0.133 | 0.069 | 0.101 | 0.187 | 0.000 | 0.098 |
| | 0.867 | 0.931 | 0.899 | 0.813 | 1.000 | 0.902 |
| 4 | 0.000 | 0.017 | 0.101 | 0.095 | 0.150 | 0.075 |
| | 1.000 | 0.983 | 0.899 | 0.905 | 0.850 | 0.925 |
| 5 | 0.384 | 0.364 | 0.257 | 0.453 | 0.192 | 0.327 |
| | 0.616 | 0.636 | 0.743 | 0.547 | 0.808 | 0.673 |
| 6 | 0.025 | 0.051 | 0.016 | 0.023 | 0.000 | 0.022 |
| | 0.975 | 0.949 | 0.984 | 0.977 | 1.000 | 0.988 |
| 7 | 0.078 | 0.202 | 0.301 | 0.307 | 0.047 | 0.175 |
| | 0.922 | 0.798 | 0.699 | 0.693 | 0.953 | 0.825 |
| 8 | 0.820 | 0.726 | 1.000 | 0.728 | 1.000 | 0.818 |
| | 0.180 | 0.274 | 0.000 | 0.272 | 0.000 | 0.182 |
| 9 | 0.000 | 0.017 | 0.066 | 0.011 | 0.012 | 0.019 |
| | 1.000 | 0.983 | 0.934 | 0.989 | 0.988 | 0.981 |
| 10 | 1.000 | 0.625 | 0.796 | 0.773 | 0.771 | 0.778 |
| | 0.000 | 0.375 | 0.204 | 0.227 | 0.229 | 0.222 |
| 11 | 0.000 | 0.182 | 0.049 | 0.046 | 0.000 | 0.046 |
| | 1.000 | 0.818 | 0.951 | 0.954 | 1.000 | 0.954 |
| 12 | 0.025 | 0.223 | 0.119 | 0.023 | 0.000 | 0.063 |
| | 0.975 | 0.774 | 0.881 | 0.977 | 1.000 | 0.937 |
| 13 | 0.051 | 0.338 | 0.195 | 0.095 | 0.178 | 0.156 |
| | 0.949 | 0.662 | 0.805 | 0.905 | 0.822 | 0.844 |
| 14 | 0.025 | 0.182 | 0.137 | 0.023 | 0.164 | 0.098 |
| | 0.975 | 0.818 | 0.863 | 0.977 | 0.836 | 0.902 |
| 15 | 0.025 | 0.086 | 0.084 | 0.083 | 0.023 | 0.057 |
| | 0.975 | 0.914 | 0.916 | 0.917 | 0.977 | 0.943 |
| 16 | 0.091 | 0.123 | 0.257 | 0.120 | 0.047 | 0.119 |
| | 0.909 | 0.877 | 0.743 | 0.880 | 0.953 | 0.881 |
| 17 | 0.771 | 1 | 0.364 | 1 | 1 | 0.73 |
| | 0.229 | 0 | 0.636 | 0 | 0 | 0.27 |
| 18 | 0.725 | 0.348 | 0.223 | 0.628 | 0.634 | 0.501 |
| | 0.275 | 0.652 | 0.777 | 0.372 | 0.366 | 0.497 |
| 19 | 0.299 | 0.309 | 0.142 | 0.224 | 0.247 | 0.249 |
| | 0.701 | 0.691 | 0.858 | 0.776 | 0.753 | 0.751 |
| 20 | 0.267 | 0.172 | 0.314 | 0.196 | 0.122 | 0.209 |
| | 0.733 | 0.828 | 0.686 | 0.804 | 0.878 | 0.791 |
| 21 | 0.387 | 0.068 | 0.223 | 0.331 | 0.377 | 0.276 |
| | 0.613 | 0.932 | 0.777 | 0.669 | 0.623 | 0.723 |
| 22 | 0.15 | 0.111 | 0.202 | 0.182 | 0.182 | 0.165 |
| | 0.85 | 0.889 | 0.798 | 0.818 | 0.818 | 0.835 |
| 23 | 0.826 | 0.815 | 0.478 | 0.83 | 0.712 | 0.73 |
| | 0.174 | 0.185 | 0.522 | 0.17 | 0.288 | 0.27 |
| 24 | 0.368 | 0.156 | 0.202 | 0.224 | 0.122 | 0.215 |
| | 0.632 | 0.844 | 0.798 | 0.776 | 0.878 | 0.785 |

| | | | | | | |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 25 | 0.035 | 0 | 0 | 0.011 | 0.052 | 0.021 |
| | 0.965 | 1 | 1 | 0.989 | 0.948 | 0.979 |
| 26 | 0.316 | 0.188 | 0.418 | 0.268 | 0.3 | 0.291 |
| | 0.684 | 0.812 | 0.582 | 0.732 | 0.7 | 0.709 |
| 27 | 0.826 | 1 | 0.726 | 0.776 | 1 | 0.836 |
| | 0.174 | 0 | 0.274 | 0.224 | 0 | 0.164 |
| 28 | 0.333 | 0.126 | 0.069 | 0.182 | 0.122 | 0.171 |
| | 0.667 | 0.874 | 0.931 | 0.818 | 0.878 | 0.829 |
| 29 | 0.333 | 0.458 | 0.223 | 0.439 | 0.377 | 0.371 |
| | 0.667 | 0.542 | 0.777 | 0.561 | 0.623 | 0.629 |
| 30 | 0.387 | 0.291 | 0.277 | 0.419 | 0.514 | 0.379 |
| | 0.613 | 0.709 | 0.733 | 0.581 | 0.486 | 0.621 |
| 31 | 0.085 | 0.054 | 0.267 | 0.196 | 0.013 | 0.114 |
| | 0.915 | 0.946 | 0.733 | 0.804 | 0.987 | 0.886 |
| 32 | 0.035 | 0 | 0.051 | 0.156 | 0.026 | 0.055 |
| | 0.965 | 1 | 0.949 | 0.844 | 0.974 | 0.945 |
| 33 | 0.826 | 0.666 | 0.418 | 0.6 | 0.712 | 0.64 |
| | 0.174 | 0.334 | 0.582 | 0.4 | 0.288 | 0.36 |
| 34 | 0.206 | 0.04 | 0.069 | 0.48 | 0.198 | 0.199 |
| | 0.794 | 0.96 | 0.931 | 0.52 | 0.802 | 0.801 |
| 35 | 0.316 | 0.172 | 0.142 | 0.182 | 0.465 | 0.252 |
| | 0.684 | 0.828 | 0.858 | 0.818 | 0.535 | 0.748 |
| 36 | 0.446 | 0.096 | 0.182 | 0.283 | 0.318 | 0.266 |
| | 0.554 | 0.904 | 0.818 | 0.717 | 0.682 | 0.734 |

Tabla C. Valores de heterocigosis esperada por locus en *Agave cupreata*

| Loci/Pobl. | C3 | C10 | C13 | C14 | C16 | Total Especie |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------|
| 1 | 0.347 | 0.000 | 0.252 | 0.172 | 0.124 | 0.185 |
| 2 | 0.500 | 0.033 | 0.332 | 0.499 | 0.338 | 0.392 |
| 3 | 0.448 | 0.097 | 0.100 | 0.000 | 0.063 | 0.156 |
| 4 | 0.065 | 0.158 | 0.034 | 0.030 | 0.063 | 0.070 |
| 5 | 0.244 | 0.496 | 0.306 | 0.274 | 0.094 | 0.319 |
| 6 | 0.065 | 0.065 | 0.067 | 0.487 | 0.314 | 0.236 |
| 7 | 0.271 | 0.128 | 0.223 | 0.249 | 0.264 | 0.230 |
| 8 | 0.329 | 0.329 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.214 |
| 9 | 0.000 | 0.000 | 0.132 | 0.000 | 0.000 | 0.026 |
| 10 | 0.329 | 0.398 | 0.402 | 0.000 | 0.394 | 0.341 |
| 11 | 0.065 | 0.000 | 0.100 | 0.321 | 0.382 | 0.191 |
| 12 | 0.158 | 0.323 | 0.193 | 0.030 | 0.489 | 0.263 |
| 13 | 0.271 | 0.463 | 0.471 | 0.384 | 0.000 | 0.462 |
| 14 | 0.158 | 0.033 | 0.193 | 0.274 | 0.439 | 0.236 |
| 15 | 0.065 | 0.158 | 0.252 | 0.198 | 0.468 | 0.247 |
| 16 | 0.486 | 0.499 | 0.492 | 0.116 | 0.338 | 0.437 |
| 17 | 0.000 | 0.000 | 0.402 | 0.318 | 0.394 | 0.302 |
| 18 | 0.499 | 0.500 | 0.483 | 0.403 | 0.394 | 0.497 |
| 19 | 0.323 | 0.347 | 0.252 | 0.274 | 0.402 | 0.324 |
| 20 | 0.412 | 0.463 | 0.306 | 0.487 | 0.289 | 0.408 |
| 21 | 0.216 | 0.392 | 0.163 | 0.116 | 0.454 | 0.284 |
| 22 | 0.128 | 0.000 | 0.034 | 0.144 | 0.094 | 0.083 |
| 23 | 0.398 | 0.398 | 0.000 | 0.386 | 0.000 | 0.323 |
| 24 | 0.431 | 0.244 | 0.067 | 0.030 | 0.032 | 0.174 |
| 25 | 0.128 | 0.033 | 0.034 | 0.000 | 0.000 | 0.039 |
| 26 | 0.271 | 0.187 | 0.067 | 0.452 | 0.439 | 0.309 |
| 27 | 0.329 | 0.496 | 0.000 | 0.479 | 0.496 | 0.467 |
| 28 | 0.370 | 0.128 | 0.100 | 0.172 | 0.360 | 0.236 |
| 29 | 0.448 | 0.500 | 0.440 | 0.479 | 0.289 | 0.470 |
| 30 | 0.431 | 0.412 | 0.356 | 0.498 | 0.360 | 0.434 |
| 31 | 0.347 | 0.392 | 0.401 | 0.477 | 0.421 | 0.416 |
| 32 | 0.298 | 0.033 | 0.000 | 0.249 | 0.124 | 0.150 |
| 33 | 0.476 | 0.392 | 0.445 | 0.466 | 0.325 | 0.497 |
| 34 | 0.431 | 0.216 | 0.332 | 0.343 | 0.360 | 0.343 |
| 35 | 0.298 | 0.158 | 0.100 | 0.000 | 0.489 | 0.396 |
| 36 | 0.494 | 0.476 | 0.100 | 0.500 | 0.439 | 0.444 |
| Promedio | 0.292 | 0.248 | 0.212 | 0.259 | 0.276 | 0.294 |
| SD | 0.153 | 0.187 | 0.162 | 0.185 | 0.174 | 0.133 |

Tabla D. Valores de heterocigosis esperada por locus en *Agave potatorum*

| Loci/Pobl. | P2 | P7 | P9 | P11 | P13 | Total Especie |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------|
| 1 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 2 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 3 | 0.236 | 0.153 | 0.163 | 0.310 | 0.000 | 0.185 |
| 4 | 0.000 | 0.063 | 0.193 | 0.176 | 0.270 | 0.145 |
| 5 | 0.479 | 0.480 | 0.422 | 0.498 | 0.291 | 0.454 |
| 6 | 0.050 | 0.124 | 0.034 | 0.046 | 0.000 | 0.050 |
| 7 | 0.123 | 0.360 | 0.440 | 0.432 | 0.104 | 0.305 |
| 8 | 0.298 | 0.438 | 0.000 | 0.399 | 0.000 | 0.321 |
| 9 | 0.000 | 0.032 | 0.132 | 0.023 | 0.027 | 0.039 |
| 10 | 0.000 | 0.438 | 0.333 | 0.354 | 0.372 | 0.337 |
| 11 | 0.000 | 0.289 | 0.100 | 0.090 | 0.000 | 0.093 |
| 12 | 0.050 | 0.314 | 0.223 | 0.046 | 0.000 | 0.119 |
| 13 | 0.075 | 0.439 | 0.306 | 0.176 | 0.270 | 0.252 |
| 14 | 0.050 | 0.338 | 0.252 | 0.046 | 0.270 | 0.185 |
| 15 | 0.050 | 0.153 | 0.163 | 0.134 | 0.053 | 0.108 |
| 16 | 0.167 | 0.153 | 0.401 | 0.216 | 0.104 | 0.209 |
| 17 | 0.366 | 0.000 | 0.471 | 0.000 | 0.000 | 0.396 |
| 18 | 0.411 | 0.439 | 0.356 | 0.454 | 0.469 | 0.500 |
| 19 | 0.420 | 0.439 | 0.252 | 0.327 | 0.370 | 0.370 |
| 20 | 0.405 | 0.264 | 0.440 | 0.327 | 0.225 | 0.338 |
| 21 | 0.459 | 0.124 | 0.356 | 0.455 | 0.472 | 0.406 |
| 22 | 0.257 | 0.153 | 0.332 | 0.274 | 0.291 | 0.265 |
| 23 | 0.298 | 0.322 | 0.498 | 0.287 | 0.372 | 0.396 |
| 24 | 0.459 | 0.289 | 0.306 | 0.344 | 0.225 | 0.338 |
| 25 | 0.050 | 0.000 | 0.000 | 0.023 | 0.104 | 0.039 |
| 26 | 0.420 | 0.264 | 0.492 | 0.391 | 0.435 | 0.412 |
| 27 | 0.298 | 0.000 | 0.402 | 0.354 | 0.000 | 0.284 |
| 28 | 0.459 | 0.237 | 0.132 | 0.292 | 0.202 | 0.288 |
| 29 | 0.434 | 0.489 | 0.356 | 0.494 | 0.472 | 0.464 |
| 30 | 0.470 | 0.439 | 0.401 | 0.482 | 0.498 | 0.475 |
| 31 | 0.170 | 0.094 | 0.380 | 0.310 | 0.027 | 0.204 |
| 32 | 0.075 | 0.000 | 0.100 | 0.255 | 0.053 | 0.108 |
| 33 | 0.000 | 0.438 | 0.483 | 0.484 | 0.372 | 0.456 |
| 34 | 0.336 | 0.094 | 0.132 | 0.500 | 0.332 | 0.334 |
| 35 | 0.420 | 0.264 | 0.252 | 0.292 | 0.500 | 0.377 |
| 36 | 0.498 | 0.182 | 0.306 | 0.391 | 0.435 | 0.395 |
| Promedio | 0.230 | 0.231 | 0.267 | 0.269 | 0.212 | 0.268 |
| SD | 0.185 | 0.165 | 0.157 | 0.167 | 0.182 | 0.149 |

Literatura citada

- Bornet B. y Branchard M. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:209-215.
- Crawford T.J., 1984. What is a population? En: B. Shorrocks (ed.). *Evolutionary Ecology*. Blackwell Scientific Publ. Oxford.
- Creighton T.E. (ed.), 1999. *Encyclopedia of Molecular Biology*. John Wiley and Sons Inc. London.
- Colunga-GarcíaMarín P. 1998. Origen, variación y tendencias evolutivas del henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). *Bol. Soc. Bot. México* 62:109-128.
- Colunga-GarcíaMarín P., Coello-Coello J., Eguiarte L.E. y Piñero D. 1999. Isozymatic variation and phylogenetic relationships between henequén (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *A. angustifolia* (Agavaceae). *American Journal of Botany* 86(1):115-123.
- Darwin, C. 1859. *On the Origin of Species*. Facsimile of the first edition. Harvard University Press. London, UK.
- Doyle J.J. y Doyle J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- Eguiarte L.E., 1995. Hutchinson (Agavales) vs. Huber y Dahlgren: Análisis moleculares sobre la filogenia y evolución de la familia Agavaceae *sensu* Hutchinson dentro de las monocotiledóneas. *Bol. Soc. Bot. México* 56:45-56.
- Eguiarte L.E., 1986. Una guía para principiantes a la genética de poblaciones. *Ciencias* núm. Especial 1:30-38. En: Núñez-Farfán J. y Eguiarte L. (comp.), 1999. *La Evolución Biológica*. Facultad de Ciencias e Instituto de Ecología, UNAM y Conabio. pp 35-50.
- Eguiarte L.E. y Piñero D., 1990. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. *Ciencias* número especial 4:34-47. En: Núñez-Farfán J. y Eguiarte L. (comp.), 1999. *La Evolución Biológica*. Facultad de Ciencias e Instituto de Ecología, UNAM y Conabio. pp 371-398.
- Eguiarte L.E., Núñez-Farfán J., Domínguez C. y Cordero C., 1992. Biología evolutiva de la reproducción en plantas. *Ciencias* núm. Especial 6:69-86. En: Núñez-Farfán J. y Eguiarte L. (comp.), 1999. *La Evolución Biológica*. Facultad de Ciencias e Instituto de Ecología, UNAM y Conabio. pp 117-151.

- Eguiarte L.E., Souza V. y Silva A., 2000. Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Bol. Soc. Bot. México* 66:131-150.
- Ehrlich P. y Ehrlich A., 1981. Extinction: the causes and consequences of the disappearance of species. Ballantine Books. New York.
- El-Kassaby Y.A., 1995. Evaluation of the tree-improvement delivery system: factors affecting genetic potential. *Tree Physiol* 15:545-550.
- Excoffier L., 2001. Analysis of population subdivision. *En*: Balding D.J., Bishop M. y Cannings L. (ed.). Handbook of statistical genetics. John Wiley & Sons, Ltd.
- Excoffier L., Smouse P.E. y Quattro J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:179-191.
- Frankham R., Ballou J.D. y Briscoe D.A., 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press UK.
- Frankel O.H. y Soule M.E., 1981. Conservation and Evolution. Cambridge University Press. Cambridge.
- Frisvold G.B. y Condon P.T., 1998. The Convention on Biological Diversity and Agriculture: implications and unresolved debates. *World Development* 6:551-570.
- García-Mendoza A., 2002. Distribution of *Agave* (Agavaceae) in Mexico. *Cactus and Succulent Journal* 74:177-187.
- Gentry H.S., 1982. Agaves of continental North America. The University of Arizona Press.
- Gil-Vega K., González-Chavira M., Martínez de la Vega O., Simpson J. y Vandemark G., 2001. Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. azul using RAPD markers. *Euphytica* 119:335-341.
- Glaubitz J.C., Wu H.X., Moran G.F., 2003. Impacts of silviculture on genetic diversity in the native forest species *Eucalyptus sieberi*. *Conservation Genetics* 4:275-287.
- González, R. 2000. Análisis de variación genética de *Agave deserti* en el desierto sonorense por medio de marcadores moleculares (RAPDs). Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias UNAM, México D.F..
- Hamrick J.L. y Godt M.J.W., 1989. Allozyme diversity in plant species. Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources (eds. A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler y B.S. Weir) pp. 43-63. Sinauer, Sunderland MA.

- Hamrick J.L. y Godt M.J.W. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society in London, Series B*, 351:1291-1298. *En*: Silvertown J., Franco M., Harper J., (ed.) 1997. *Plant Life Histories, Ecology, Phylogeny and Evolution*. The Royal Society UK, University Press Cambridge.
- Hartl D.L., y Clark A.G., 1989. *Principles of population genetics*. Second edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland Massachusets.
- Hartl D.L., y Clark A.G., 1997. *Principles of population genetics*. Third edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland Massachusets.
- Hedrick P.W., 2000. *Genetics of populations*. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury, Massachusets.
- Howell D.J. y Roth B., 1981. Sexual reproduction in agaves: the benefits of bats; the cost of semelparous advertising. *Ecology* 62:1-7.
- Hughes A.L., 1999. *Adaptive evolution of genes and genomes*. Oxford University Press. New York.
- Illsey C., Gómez-Alarcón T., Morales-Mendoza P., García-Bazán J., Ojeda A., Aguilar J., Corrales N., Calzada-Rendón M., Tlacotempa A. s/f. El mezcal papalote del Chilapan: una marca colectiva campesina. *En*: Documentos sobre el manejo campesino de recursos naturales y productos forestales no maderables. Red de aprendizaje e intercambio para la sistematización de experiencias hacia la sustentabilidad (RAISES). <http://www.raises.org/PFNM-documentos.htm>
- Ledig T.F., 1988. Conservation of genetic diversity: the road to La Trinidad. The Leslie L. Schaffer Lectureship in Forest Science. Octubre 27. The University of British Columbia.
- Levin D.A., 1988. Local differentiation and the breeding structure of plant populations. *En*: Gottlieb L.D. y Jain S.K., 1988. *Plant Evolutionary Biology*. Chapman & Hall, Ltd. Cambridge, UK. p. 305-329.
- Levins R. y Lewontin R., 1985. *The dialectical biologist*. Harvard University Press. Massachusets.
- Lewontin R.C., 1974. *The genetic basis of evolutionary change*. Columbia University Press.
- Lewontin R.C., 1991. Twenty-five years ago in GENETICS: Electrophoresis in the development of evolutionary genetics: milestone or millstone? *Genetics* 128:67-72.
- Lynch M. y Milligan B.G., 1994. Analysis of population genetic structure with RAPDs markers. *Molecular Ecology* 3:91-99.

- Mantel B.F.J., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27:209-232.
- Martínez M., 1997. Sistemática molecular: comparación entre diferentes métodos y sus aplicaciones. *Bol. Soc. Bot. México* 60:123-136.
- Martínez-Palacios A., Eguiarte L.E. y Furnier G., 1999. Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. *American Journal of Botany* 86:1093-1098.
- Massey L. y Hamrick J.L., 1998. Genetic diversity and population structure of *Yucca filamentosa* (Agavaceae). *American Journal of Botany* 85:340-345.
- Mayr E., 1959. *En: Evolution and Anthropology*. Anthropological Society of Washington. p. 2.
- Medellín R.A., Arita H.T. y Sánchez O., 1997. Identificación de los murciélagos de México. Clave de campo. Agrupación Sierra Madre. 83 p.
- Mettler L.E., Gregg T.G. y Schaffer H.E., 1988. Population genetics and evolution. 2nd edition. Prentice Hall.
- Miller M.P., 1997. Tools For Population Genetic Analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.
- Millstone E. y Lang T., 2003. The Atlas of Food, who eats what, where and why. Earthscan Publications Limited. London, UK.
- Navarro A., 1999. Estructura genética y procesos de especiación de *Agave cerulata* (Trel.) y *Agave subsimplex* (Trel.) en el desierto sonorense a partir de RAPDs. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México D.F. 96 p.
- Navarro-Quezada A., González-Chauvet R., Molina-Freaner F. y Eguiarte L.E., 2003. Genetic differentiation in the *Agave deserti* (Agavaceae) complex of the Sonoran desert. *Heredity* 90:220-227.
- Nei M., 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106(949): 283-292.
- Nei M., 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. New York.
- Niklas K.J., 1997. The evolutionary biology of plants. Cambridge University Press.
- Nybohm H. y Bartish V., 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in plant ecology, evolution and systematics*. 3/2, 93-114.

- Pradeep R., Sarla N. y Siddiq E.A., 2002. Inter simple sequence repeats (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128(1):9-17.
- Rajora O.P., 1999. Genetic biodiversity impacts of silvicultural practices and phenotypic selection in white spruce. *Theor Appl Genet* 99:954-961.
- Raymond M.L. y Rousset F., 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.
- Rojas-Martínez A., Valiente-Banuet A., del Coro-Arizmendi M., Alcántara-Eguren A. y Arita H.T., 1999. Seasonal distribution of the long-nosed bat (*Leptonycteris curasoae*) in North America: does a generalized migration pattern really exist? *Journal of Biogeography* 26:1065-1077.
- Roughgarden J., 1996. Theory of population genetics and evolutionary ecology: an introduction. Stanford University Press, Prentice Hall. New York..
- Schaffer W. y Schaffer V., 1977. The reproductive biology of Agavaceae I: pollen and nectar production in four Arizona agaves. *The Southwestern Naturalist* 22:157-168.
- Schneider S., Roessli D., y Excoffier L., 2000. Arlequin ver. 2.000. A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Silva-Montellano A. y Eguiarte L.E., 2003. Geographical patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. II: Genetic variation, differentiation and inbreeding estimates. *American Journal of Botany* 90: 700-706.
- Sokal R., 1979. Testing statistical significance of geographic variation patterns. *Systematic Zoology* 28:227-232.
- Tambutti-Allende M.I, 2002. Diversidad del género *Agave* en México: una síntesis para su conservación. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. México D.F., 53 p.
- Trame A., Coddington A.J. y Paige K.N., 1995. Field and genetic studies testing optimal outcrossing in *Agave schottii*, a long-lived clonal plant. *Oecologia* 104:93-100.
- Whitkus R., Doebley J. y Wendel J.F., 1994. Nuclear DNA markers in systematics and evolution. En: Phillips R.L. y Vasil I.K. (ed). *Advances in cellular and molecular biology of plants*, Vol. 1 – Nuclear based markers in plants. Kluwer Academic Publishers.
- Wright S., 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19:395-420.

Wolfe A., 2000. ISSR Resource Website.

<http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/ISSR.html>

Zietkiewicz E., Rafalski A. y Labuda D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.