



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Variabilidad genética de Agave marmorata
ROEZL. en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla.
Evaluación de efectos de manejo.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A

JOSÉ CARLOS ROSAS OSORIO



DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS.

2005



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

m345388



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a disponer en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: José Carlos Rosas Osorio
FECHA: 13 de junio 2005
FIRMA: Rosas Osorio José Carlos

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:

"Variabilidad genética de Agave marmorata ROEZL. en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. Evaluación de efectos de manejo."

realizado por José Carlos Rosas Osorio

con número de cuenta 09301384-8 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director
Propietario Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras
Propietario Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán
Propietario Biól. Alejandra Vázquez-Lobo Yurén
Suplente Biól. Alejandro Cruz Monsalvo Reyes
Suplente Biól. Miguel Jiménez Valdés

Consejo Departamental de Biología

M en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

"Variabilidad genética de Agave marmorata ROEZL. en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. Evaluación de efectos de manejo."

José Carlos Rosas Osorio

DEDICATORIA

A mi madre por todo el esfuerzo, la comprensión, la tolerancia, el sacrificio y el amor que has puesto en mí y en todo lo que hago, por ser mi amiga y confidente, por motivarme siempre a dar lo mejor, por entenderme y hacer de mí siempre una mejor persona. A ti todo el amor y agradecimiento, mamá ésta tesis es tuya y todo mi esfuerzo y mi corazón son para ti.

A mi padre por apoyarme en todo, por quererme se modos diferentes y mostrarme el camino de cómo funciona todo y lo sencillo que pueden ser las cosas.

A mis hermanos Hilda, Flor, Daniel, Macario y Araceli por apoyarme en todo lo que hago, por hacerme la vida más fácil y divertida, por hacer que todo sea posible y por las incontables alegrías y tristezas que hemos compartido juntos. Por no dejarme caer y levantarme siempre con un consejo. Para ustedes todo mi respeto y admiración.

A mi sobrina Daniela por regalarme una sonrisa todas las mañanas a Aarón por las incontables travesuras diarias y a Valeria por llenarnos de luz a todos en el momento de nacer.

A mis tíos: Humberto, Ranulfo, José, Lorenzo, Eusebio, Jerónimo, Alfonso, Román, Fidel, Eleuterio, Alfonso y Lorenzo. A mis tías: Margarita, Concepción, Lola, Lourdes, Carmen, Lilia, Lala, Lupe, Lucha, Esther, Teresa y Alejandra. A mi tía Lucy y Tita que a pesar de la distancia siempre están conmigo. Gracias a todos por apoyarme económica y mentalmente, por dejarme hacer lo que quiero y confiar en mí, por todos sus consejos y ejemplos. Para ustedes mi esfuerzo.

A Isis: Gracias por tener voluntad y paciencia, por darme una sonrisa y un reto, por hacer que las horas no se sientan y los instantes duren más, por hacer que me sienta feliz y orgulloso. Por darme una luz y sobretodo: por revivir la voluntad, los sueños y las esperanzas. Por todo esto y más. Gracias. Te quiero.

A Anahí: Gracias por ayudarme con los consejos, los regaños, escuchar mis sueños y compartir los tuyos, por ser mi amiga y confidente, por servir de apoyo en los momentos más difíciles de mi vida y por ser causa y participe de los más felices. Por hacerme sentir afortunado al perdonar mis defectos y recordarme virtudes, ponerme los pies en la tierra y la mente en el cielo. En fin gracias por compartir conmigo todas las formas y colores posibles que puede tener al amor. Te quiero.

A Martha y Elidia: Jamás voy a olvidar el momento en que aparecieron en mi vida, la forma en la que me cambiaron, los consejos para seguir adelante, la diversión que implica estar con ustedes, pero sobretodo la forma tan especial con la que me hicieron saber que me quieren, yo también las adoro. Gracias por estar a mi lado.

A Esteban (tripa), Maripili y Diego (Mano): No sé que hubiera pasado en mi vida si no me hubieran hecho reflexionar y regresar al camino de la ciencia. Por ese momento y todos los demás gracias.

Al Rick (¡ya ves!), Arturo, Florencia, Elisa, Chino, Araceli, Rodrigo, Antonio, Cristalito, Itzel, Godo, Alejandro, Laura, César, Paty, Nino, Karina, Miguel, Donaji, Israel, Ivan, Lalo, Marcia, Ingrid. Ustedes son igual de importantes en mi vida, gracias por todos los momentos compartidos juntos, la diversión, las penas y tristezas, las ahogadas noches y las largas pláticas en la facultad, gracias por hacer que los años se hicieran cortos, por hacerme sentir parte de un grupo, por dejarme ver de cerca los cambios que ocurren en sus vidas, por ser felices y compartir la felicidad, por aguantarme y confiarme alegrías y tristezas. Puedo poner muchas palabras para agradecer todo lo que me han dado, pero prefiero decir –gracias por su amistad-.

A Aurora (mi vida), Larita, Odette, RoLoGo y Alejandra: Gracias por las interminables pláticas en cuerna, por los momentos de convivencia, por apoyarme en todo, por las noches de insomnio, el himno nacional y los artículos a media noche, los días de espera y aguantar el baño. Por eso y más, muchas gracias.

A Luzma: Podría agradecer todas las técnicas de Biología molecular que me enseñaste, pero prefiero agradecer la confianza que depositaste en mí desde el primer día y todos los demás a través de la amistad.

A Sonia (Marcela) que con sus consejos y dichos colombianos las horas se hacen minutos y las penas pasan con un cigarro y una taza de café. Te quiero Marcela.

A mis amigos del CCH: Luis, Raquel, Edith, Alejandra y Mauricio. Por impulsarme a seguir y hasta servirles de mal ejemplo. Sin su ayuda nunca hubiera llegado éste momento.

A Paty, Irma, Lety y Alejandro: Gracias por hacer del laboratorio un nuevo hogar, por darme consejos y mucho más que eso, para que éste momento ocurriera, por poner siempre voluntad en todo lo que hacen y lograr transmitirla, por considerar que vale la pena ayudar y haberlo hecho conmigo en los momentos más difíciles. Pero sobre todo, gracias por ser mis amigos. Espero no defraudarlos.

A Ricardo, Ramón, Lalo, Miguel, Adriana y Pilar. Gracias por aguantarme en el laboratorio por ser mis amigos, por aceptarme y hacerme sentir parte de un gran equipo.

A mis maestros de la Facultad de Ciencias y el instituto de Biotecnología, gracias por transgredir los muros de las aulas y forjar en mí y todos los estudiantes un sentido crítico y analítico de los fenómenos de la vida.

Al Dr. Jorge Campos Contreras: Por asumir la dirección de mi tesis, por ayudarme a darle buen término en todos los sentidos, por darme el tiempo para escucharme, por poner voluntad y buscar la forma de ayudarme en todo haciendo siempre mucho más que lo necesario. Gracias Doctor.

A la Dra. Martha Martínez: Gracias por brindarme la oportunidad de realizar mi tesis en su laboratorio, pero sobretodo agradezco las enseñanzas de vida que tuve a su lado, me permitió escuchar la forma tan sencilla en la que comparte sus sueños y la voluntad que pone en ellos, por ser una científica excelente y a la vez una mejor persona. Gracias, personas como usted se necesitan en todas partes.

A todos aquellos que ayudaron voluntaria e involuntariamente para la realización de éste trabajo y a formarme en la Biología, muchas gracias.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
<i>Biodiversidad</i>	1
<i>Efectos Antropogénicos Sobre la Biodiversidad</i>	2
<i>El Manejo en Las Poblaciones Naturales</i>	3
<i>Variabilidad Genética</i>	4
<i>Las Poblaciones</i>	5
<i>La Estructura Genética</i>	6
<i>Los Marcadores Genéticos</i>	8
<i>El Género Agave</i>	12
<i>Antecedentes</i>	15
<i>Hipótesis</i>	19
<i>Objetivos</i>	20
MATERIAL Y MÉTODOS	21
RESULTADOS	33
DICUSIÓN	43
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51
APENDICE 1	56
APENDICE 2	58

ABREVIATURAS

AFLP	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados
AK	<i>Agave karwinskii</i>
AMOVA	Análisis de varianza molecular
AP-PCR	Iniciadores arbitrarios PCR
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
D	Distancia genética promedio
DAF	Huellas digitales de DNA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
F_{ST}	Variabilidad genética entre poblaciones
G_{ST}	Variabilidad genética entre poblaciones (Shannon)
H'	Diversidad
H'_e	Heterocigocidad por locus
Kb	Kilobases
m	Número de migrantes por generación
M	Manejo
N_e	Número efectivo de población
$N_e m$	Flujo génico
p	Frecuencia
pb	Par de bases
PCO	Análisis de coordenadas principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
r	Coefficiente de correlación
RAPD	Amplificación aleatoria de fragmentos polimórficos
RFLP	Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción
S	Silvestre
T	Tilapa
UPGMA	Agrupamiento aritmético por promedios no ponderados
UV	Ultra violeta
VNTR	Número variable de repeticiones en tándem
Φ_{ST}	Variabilidad entre las poblaciones (AMOVA)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

Resumen

Introducción. La variabilidad genética puede ser vista como un índice de salud evolutiva y a la par del análisis de la estructura genética poblacional nos permiten interpretar efectos de los fenómenos evolutivos. El factor humano puede modificar las poblaciones de tal forma que la estructura genética puede cambiar y disminuir la variabilidad genética en las poblaciones. Al ser *Agave marmorata* una especie utilizada comúnmente en el Valle de Zapotitlán Salinas, se corre el riesgo de empobrecer a las poblaciones genéticamente. **Objetivos.** Evaluar el nivel de variabilidad genética, la estructura poblacional y determinar efectos de manejo en dos poblaciones de *A. marmorata*. **Métodos.** Fueron seleccionadas dos zonas del valle consideradas "silvestre" o "manejada". Se utilizaron marcadores tipo RAPD con los que se construyó una matriz binaria para realizar agrupamientos por similitud y calcular parámetros como: índice de polimorfismos, distancias genéticas, diversidad genética entre poblaciones (G'_{ST} , Φ'_{ST}), heterocigocidad esperada y flujo génico. **Resultados.** El índice de polimorfismos es alto (94%), la variabilidad genética se encuentra dentro de las poblaciones (G'_{ST} 0.048 ó Φ'_{ST} 0.065), las cuales comparten flujo génico ($N_e m = 3.54$) y la heterocigocidad esperada en ambas no difiere significativamente de 0.5. **Conclusiones.** Ambas poblaciones se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg y en general se puede considerar que las poblaciones son iguales para los parámetros analizados. Sin embargo, el agrupamiento refleja que algunos de los individuos de la población en manejo comienzan a formar grupos delimitados, lo cual puede ser indicio del efecto de manejo. Ambas poblaciones son saludables en términos evolutivos y lo anterior nos muestra un panorama alentador que nos conduce a pensar que todavía estamos a tiempo de implementar planes de manejo adecuados.

Abstract

Introduction. The genetic variability could be considered as an index of evolutionary health and together with analysis of genetic population structure allows us to assume effects of the evolutionary phenomena. Human factors can modify the populations of such form that the genetic structure can change and diminish the genetic variability of such populations. Being *Agave marmorata* a species used commonly in Zapotitlán Salinas Valley, there is a risk of genetically impoverishing populations. **Objectives.** To evaluate the level of genetic variability, population structure patterns and to determine effects of handling in two populations of *A. marmorata*. **Methods.** Two populations from valley, considered as "wild" or "handled" were selected. RAPD markers were used to construct a binary matrix to make groups by similarity and to calculate parameters such as index of polymorphisms, genetic distances, genetic diversity between populations (G'_{ST}, Φ'_{ST}), expected heterocigocity and genetic flow. **Results.** Polymorphism index was high (94%), genetic variability was within the populations (G'_{ST} 0.048 or Φ'_{ST} 0.065), which share genic flow ($N_e m = 3.54$) and expected heterocigocity in both, does not differ significantly from 0.5. **Conclusions.** Both populations are in Hardy-Weinberg equilibrium and in general it is possible to be considered that populations are equal for the analyzed parameters. Nevertheless, the group reflects that some of the individuals of the handled population form delimited groups, which could be an indication of an incipient handling effect. Both populations are healthful in evolutionary terms and this work shows an encouraging panorama to us that it leads us to think that still we are on time to implement suitable plans of handling.

INTRODUCCIÓN

Biodiversidad

La biodiversidad ha sido definida de varias formas, pero el significado del término ha sido utilizado en su forma más comprensible como “la variabilidad de la vida en su composición, estructura y función” (McNeely *et al*, 1990). Esta puede ser representada como una jerarquía entrelazada de elementos de muchos niveles de organización biológica (Noss, 1992). Dado que el término de variabilidad trasciende todos los niveles de la vida desde los genes hasta las comunidades y todas las escalas espaciales y temporales (Noss, 1990; Savard, 1994), los vínculos pueden ocurrir en cualquier nivel de organización. Los niveles de organización biológica a menudo corresponden a escalas temporales y espaciales específicas y deben ser encaminadas a una escala apropiada. Es importante, cuando se trata con un concepto tan general como la biodiversidad, identificar a qué nivel de organización queremos intervenir o a qué grupo de organismos nos dirigimos (Savard *et al*, 2000).

Como la biodiversidad se expresa en una multitud de escalas espaciales, es esencial especificar la escala de interés cuando se utiliza el término de biodiversidad. Un estudio multi-escala es entonces necesario para asignar apropiadamente estudios relacionados con la biodiversidad. Las escalas no son independientes unas de otras pero se relacionan de forma jerárquica (Allen y Starr, 1982), así los efectos y las acciones en una escala determinada deben ser consideradas en escalas superiores e inferiores (Savard, 1994).

Un aspecto importante cuando se estudia la biodiversidad, es que no todas las especies son iguales. Las especies varían en formas, tamaños, abundancia, distribución, posición trófica, función ecológica, hábitos alimenticios, etc. Algunas especies pueden jugar papeles importantes en la comunidad así que su ausencia podría afectar significativamente a muchas otras especies. Identificar a éstas especies es difícil dado que su papel puede desempeñarse temporal o estacionalmente y puede ser específico a un hábitat (Savard *et al*, 2000).

Efectos antropogénicos sobre la biodiversidad

Los efectos antropogénicos en la actualidad se pueden notar prácticamente en cualquier ecosistema de la tierra. Los hábitats originales se están fragmentando o perdiendo a velocidades alarmantes y más sistemas biológicos requieren de la intervención humana y su manejo para mantenerse. Para hacer frente a la corriente de la extinción debida a la pérdida de hábitats, a la introducción de especies externas y a la sobreexplotación, se deben tomar medidas urgentes. Existe una necesidad en aumento de conocer, entender y considerar la relación con la evolución de las fuerzas antropogénicas. Está previsto que la perturbación ocurre a velocidades tan rápidas, en contraste con los lentos procesos de adaptación a través de selección natural y llevan en su última consecuencia a la extinción de las especies (Ashley *et al*, 2003).

Es obvio que las causas fundamentales de tales extinciones resultan de los factores sociales y culturales asociados con las actividades económicas que llevan a la eliminación directa de las especies y la degradación o destrucción de hábitats y la pérdida de la biodiversidad es una manifestación dramática del inadecuado manejo de los recursos naturales (Bolger, 2001).

Desde siempre, las diferentes especies vegetales han estado sometidas a una activa interacción con el medio ambiente y aunado a la mutación se han generado una gran cantidad de genotipos que amplían la diversidad genética (Becerra y Paredes, 2000). Sin embargo, en las últimas décadas ésta diversidad se ha visto severamente reducida por las exigencias del mercado y el aumento de los suelos cultivados. La conservación y utilización de los recursos naturales es de importancia estratégica para la humanidad (Becerra y Paredes, 2000).

Dentro de los efectos que tienen las actividades humanas sobre las poblaciones están entre otros la fragmentación del hábitat o la extracción directa de los individuos. Esto indudablemente resulta en la disminución del tamaño poblacional, lo que favorece el efecto de fuerzas evolutivas que tienden a disminuir la variabilidad genética.

Dado que la fragmentación causa aislamiento, la pérdida de variabilidad genética por deriva, puede no ser compensada por la migración de polen o semillas de una población vecina. Lo cual causa diferenciación genética entre poblaciones (Oostermeijer *et al*, 2003).

La endogamia es otra consecuencia del bajo tamaño poblacional y es resultado de un número mayor de cruces entre individuos cercanamente emparentados. La endogamia no involucra la pérdida de los alelos sino que los distribuye de combinaciones heterocigas a homocigas, lo cual causa la expresión de alelos recesivos deletéreos y está asociada a la abortición de semillas, bajos rangos de germinación, alta mortandad de plántulas, bajo crecimiento y floración fuera de temporada (Oostermeijer *et al*, 2003).

El manejo en las poblaciones naturales

El manejo de las poblaciones naturales es una ciencia interdisciplinaria, en la cual la toma de decisiones y las correspondientes acciones de manejo implican repercusiones sociales, ecológicas, políticas y económicas (Hidalgo, 2001). Los objetivos fundamentales del manejo de la vida silvestre son: evaluar la dinámica de las poblaciones de la flora y la fauna, las relaciones existentes entre estas poblaciones y la disponibilidad de los recursos limitantes de los ecosistemas y las correspondientes implicaciones sociales, económicas y políticas de la implementación de acciones necesarias para garantizar la conservación de la biodiversidad a corto y largo plazo, mediante las alternativas del uso sostenible de los recursos naturales. Para llevar a cabo un manejo adecuado de la vida silvestre es necesario establecer claramente el problema a resolver, las causas y los efectos, así como las repercusiones reales y potenciales de las diferentes opciones y acciones de manejo tanto en las poblaciones silvestres como en los ecosistemas, en los diversos aspectos económicos, sociales, éticos, legales y políticos de todos los sectores de la población humana involucrados y por supuesto la factibilidad económica de las mismas (Hidalgo, 2001).

La población de una especie silvestre de interés puede considerarse como manejada; al incrementar o disminuir el tamaño de la población por extraer individuos (cosecha) o sus órganos, y no intervenir, pero mantener el registro permanente de la condición de la población (Hidalgo, 2001).

Además al analizar las opciones de manejo, es necesario considerar los diversos valores tangibles e intangibles que tiene la vida silvestre para el ser humano: valor comercial, recreativo, biológico, científico, religioso, social y estético (Hidalgo, 2001).

Al considerar las alternativas anteriores existen básicamente dos tipos de manejo de la vida silvestre:

Por un lado manejo manipulativo que implica modificar el tamaño de las poblaciones de manera directa al extraer individuos, sacrificarlos, manipular la estructura de la población o indirecta al manipular el hábitat, limitar el suministro de alimento y agua, regular la abundancia y/o presencia de los depredadores, controlar las enfermedades (Hidalgo, 2001). Para el presente trabajo el término “manejado” se aplicará a los grupos en condiciones de manejo manipulativo.

Por otro lado manejo conservador o protector que como su nombre lo indica consiste en conservar la biodiversidad al garantizar la estabilidad de los ecosistemas y los correspondientes procesos ecológicos al proteger y minimizar al menos teóricamente el impacto de las influencias externas nocivas sobre las poblaciones silvestres y sus hábitats (Hidalgo, 2001).

La implementación de las opciones de manejo de vida silvestre deben estar respaldadas por una detallada evaluación de la factibilidad de éstas, la que debe considerar los siguientes aspectos: factibilidad técnica, prácticamente viable, económicamente ventajosa, ambientalmente aceptable, políticamente adecuada y socialmente apropiada (Hidalgo, 2001).

Variabilidad genética

La variabilidad genética es la materia prima de la cual dependen la adaptación y la evolución. Los altos niveles de variabilidad son vistos como saludables, confiriendo la capacidad de responder a amenazas tales como las enfermedades, parásitos, depredadores y cambios ambientales. Inversamente, niveles bajos de variabilidad son vistos como limítrofes de la capacidad de las especies para responder a tales amenazas a corto y largo plazo (Amos y Harwood, 1998). Por lo tanto no es para sorprenderse que exista una amplia preocupación en lo que concierne a la fragmentación del hábitat. La fragmentación, casi siempre conducirá a una reducción en el tamaño de población y un aumento consiguiente en el ritmo en el cual la variabilidad se pierde a través de deriva génica. En casos extremos, la población puede ser reducida a números muy bajos y tener pérdidas exageradas, un acontecimiento que se refiere a menudo como cuello de botella génico (Amos y Harwood, 1998).

A pesar del reconocimiento casi universal de la importancia de la variabilidad genética existen algunos casos dónde el nivel de variabilidad de especies, medido según técnicas moleculares y aparente éxito evolutivo, difieren notablemente de las expectativas. Algunas especies en las que se prevé un empobrecimiento genético no lo tienen, mientras que otras albergan mucha menor variabilidad de la que se espera. De igual forma se ha visto que existen numerosas excepciones a la regla de que altos niveles de variabilidad es igual a salud evolutiva. Algunas especies poseen baja variabilidad y poblaciones que se incrementan exponencialmente, mientras que otras disminuyen su tamaño poblacional a pesar de su gran variabilidad (Amos y Harwood, 1998).

En última instancia, cualquier nivel dado de variabilidad genética, debe ser explicado en términos de equilibrio entre los procesos opuestos de ganancia y pérdida. Así, por encima o cerca del equilibrio entre la deriva y la mutación, los altos niveles de la variabilidad implican amplios rangos de ganancia o bajos rangos de pérdida, así como bajos niveles de diversidad implican bajos rangos de ganancia o pérdida rápida. La diversidad puede ser incrementada por mutación en la población o flujo génico con de una población vecina. La pérdida de la diversidad ocurre pasivamente a través de deriva génica y activamente a través de la selección natural (Amos y Harwood, 1998).

Como el reabastecimiento de la diversidad puede ser lento (mutaciones *de novo*), o infrecuente (afluencia de una especie o población vecina), la mayoría de los cambios rápidos o grandes en diversidad pueden ser atribuibles a la pérdida, más que al aumento (Amos y Harwood, 1998).

Las poblaciones

Una población es un conjunto de organismos de la misma especie que comparten características genéticas y reproductivas, que coexisten en el tiempo y en el espacio (Odum, 1972).

La forma como las poblaciones han y están reaccionando frente a los cambios ambientales depende de las características genéticas de los individuos así como del tipo y la magnitud de la variabilidad genética de la población además de sus relaciones ecológicas. Por lo que se refiere a los individuos, las características más importantes con respecto a la variabilidad genética son: a) la continuidad de la herencia, que depende de la

autorreplicación del DNA cromosómico, b) la capacidad de cambio por mutación y la integración armónica del genotipo. Por lo que se refiere a las poblaciones las características más importantes son: a) su capacidad ilimitada de crecimiento, lo que exige la destrucción de individuos a fin de que el tamaño de población se mantenga constante, b) su gran reserva de variabilidad genética y c) las limitaciones de dicha variabilidad en cualquier población en particular. Ésta última característica es la que determina si una población al responder a un cambio ambiental determinado se adaptará a ese ambiente nuevo o se extinguirá (Dobzhansky *et al*, 1988).

La estructura genética

La diversidad genética de una especie puede estar estructurada a distintas escalas, como poblacional, subpoblacional o entre individuos vecinos. Tal distribución es necesariamente producto de influencias ambientales que incluyen actividades humanas (Escudero *et al*, 2003).

La estructura genética es la distribución no aleatoria de alelos o genotipos en el tiempo y en el espacio y es indiferente a la organización del genoma y los procesos meióticos que pueden afectar la frecuencia de alelos y genotipos (Loveless y Hamrick, 1984).

Para el caso de las plantas la estructura puede ser manifestada entre poblaciones geográficamente distintas, dentro de un grupo local o en la progenie de los individuos. La estructura genética resulta de la acción conjunta de la mutación, migración, selección natural, deriva génica y sistemas de entrecruzamiento, que a su vez operan dentro de un contexto histórico de cada especie vegetal (Loveless y Hamrick, 1984). Sin embargo de acuerdo a Allard (1975), los factores ecológicos que afectan la dispersión y la reproducción son probablemente los más importantes en la determinación de la estructura génica. La reproducción es el proceso que traslada el arreglo genotípico actual a las generaciones siguientes, mientras que la dispersión del polen y las semillas determinan los patrones post-reproductivos de la dispersión de los genes dentro y entre las poblaciones (Loveless y Hamrick, 1984).

Las variables ecológicas que determinan la estructura genética de las poblaciones vegetales comprenden a los sistemas de entrecruzamiento, morfología floral, modo de

reproducción, mecanismos de polinización, dispersión de las semillas, latencia de las semillas, fenología, el ciclo de vida, el estado sucesional, el rango geográfico, el tamaño poblacional, la densidad poblacional y la estructura espacial de la población (Loveless y Hamrick, 1984). Siendo los más importantes aquellos que tienen que ver con la reproducción y la dispersión, destacan aquellos que inciden directamente sobre tales atributos como:

- a) Los sistemas de cruzamiento. Abarcan desde la endogamia hasta el entrecruzamiento y afectan la variabilidad genética dentro de las poblaciones, las diferencias entre ellas y la divergencia de las especies. Los aspectos más obvios que la determinan son la frecuencia de los genotipos heterocigotos comparados con los homocigotos y el alcance de la recombinación genética. Las poblaciones altamente endogámicas incrementan la frecuencia de los heterocigotos mientras que con el entrecruzamiento, se esperan las frecuencias comunes del equilibrio Hardy-Weinberg sin que las especies se subdividan en poblaciones aisladas (Charlesworth y Wright, 2001).
- b) Los sistemas de dispersión. Básicamente se dividen en dos la *i*) dispersión del polen o mecanismo de polinización y *ii*) la dispersión de la semilla. En la dispersión del polen, es importante considerar que solo el flujo del polen maduro aumenta el número efectivo de la población (N_e). La forma en que viaja el grano de polen determina el radio de incidencia sobre otras poblaciones, se ha visto que la dispersión del polen por viento cuando el movimiento es direccional tiende a disminuir el número efectivo de la población, mientras que los polinizadores (animales) tienden a aumentar el número efectivo de la población y a prevenir la diferenciación geográfica. La dispersión de las semillas es muy similar a la dispersión del polen. La dispersión y el establecimiento a larga distancia de plántulas tiende a disminuir la divergencia de las poblaciones, mientras que la dispersión por gravedad o por cápsulas explosivas, donde se depositan las semillas cerca de los progenitores y aumentan la probabilidad de diferenciar las poblaciones, a menos que cuenten con un tipo de dispersión secundario que depende solo de las características del fruto. Los dispersores de semillas como los animales tienden a

aumentar el N_e de las poblaciones además de distribuir más aleatoriamente a los individuos (Loveless y Hamrick, 1984).

Los marcadores genéticos

Los marcadores moleculares son una serie de análisis genético-moleculares que se basan en la detección de polimorfismos en proteínas y DNA, cuyos principios se han utilizado para resolver problemas específicos en genética y ecología de poblaciones, evolución de sistemas reproductivos, mapeo genético de caracteres de interés agronómico, procesos de hibridación e introgresión, determinación de patrones biogeográficos, resolución e identificación de relaciones taxonómicas, reconstrucción de filogenias y biología de la conservación (Otero *et al*, 1997).

Las estrategias clásicas para la detección de variación (anatomía, morfología, embriología y fisiología comparadas) han sido completadas con técnicas moleculares. Estas técnicas incluyen el análisis de los constituyentes químicos y la caracterización de macromoléculas.

El uso de los marcadores genéticos, en estudios de poblaciones de plantas, nos permite examinar en gran detalle cambios en la estructura poblacional y la diversidad genética en el tiempo y en el espacio. También permiten inferir los mecanismos microevolutivos proveyendo los medios para registrar los patrones de segregación y comparar los procesos reproductivos de los individuos (Kohut, 2003).

Las técnicas moleculares varían en la forma en la que resuelven diferencias genéticas, en el tipo de datos que generan y en los niveles taxonómicos en los que pueden ser apropiadamente utilizados (Kart y Buiatii, 1996).

Marcadores morfológicos

La herencia de marcadores morfológicos puede ser monitoreada visualmente sin equipo especializado o técnicas moleculares. Los rasgos morfológicos que son controlados por un solo gen pueden ser utilizados como marcadores genéticos con la condición que sean reproducibles dentro de un rango ambiental. Además de ambiental, la expresión de tales marcadores está alterada por las interacciones epistáticas y pleiotrópicas, el número de

marcadores morfológicos es muy limitado; sus alelos interactúan de forma recesivo-dominante, lo que hace imposible la distinción entre individuos homocigos y heterocigos en un solo tiempo generacional (Kumar, 1999).

Las aplicaciones tradicionales para la cuantificación de la variación se basan en la habilidad para detectar diferencias en caracteres morfológicos. El rango de los caracteres disponibles se puede incrementar utilizando microscopía electrónica con ensayos fitoquímicos y bioquímicos (Kumar, 1999).

Marcadores moleculares

Marcadores bioquímicos

Los marcadores bioquímicos se basan en el análisis de proteínas que se producen como resultado de la expresión genética que pueden ser separados por electroforesis para identificar los alelos. Los marcadores proteicos más comúnmente utilizados son las isoenzimas que son formas variantes de la misma enzima (Vodenicharova, 1989). Los marcadores proteicos muestran diferencias en la secuencia de los genes y funcionan como marcadores codominantes sin embargo su uso es limitado debido a su número limitado en cualquier especie cultivada y también porque están sujetas a modificaciones postranscripcionales (Kumar, 1999).

Las aloenzimas son proteínas de alelos del mismo locus que realizan la misma función, se heredan mendelianamente y tienen tasas de mutación en el orden de 10^{-6} y pueden aplicarse sin un desarrollo tecnológico extensivo, pueden ser una buena elección en términos de la información que brindan además de que el análisis es barato. Sin embargo existen razones por las cuales utilizar otro tipo de marcadores, dado que también existe una baja variabilidad en las aloenzimas y puede ser que la selección natural altere la variedad de los polimorfismos (Ouborg *et al*, 1999), haciendo los muestreos de polimorfismos menos aleatorios.

Marcadores de DNA

Los marcadores de DNA pueden clasificarse en dos categorías dependiendo de cómo se detecten los polimorfismos: los polimorfismos basados en la hibridación con sondas y los polimorfismos basados en PCR (Kumar, 1999).

Los marcadores basados en la hibridación incluyen los RFLP (de sus siglas en inglés: *Restriction Fragment Length Polymorphisms*), y VNTR (de sus siglas en inglés: *Variable Number Tandem Repeats*), donde se hibridan pruebas tales como clonas genómicas aleatorias, clonas de cDNA, pruebas para secuencias de microsatélites y minisatélites, contra filtros que contienen DNA digerido con enzimas de restricción. Los polimorfismos en el caso de los VNTR son detectados por las diferencias en el número de repeticiones, mientras que en los RFLPs son detectados debido a los eventos de mutaciones puntuales, inversiones, deleciones o translocaciones que cambian los sitios de restricción del DNA. La electroforesis de gradiente en gel desnaturalizante, (DGGE, de sus siglas en inglés: *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), es una alternativa para los análisis de RFLP que es capaz de detectar polimorfismos entre dos fragmentos del mismo tamaño que difieran en un solo par de bases. En la DGGE los fragmentos corren a través de un gel de poliacrilamida que contiene un gradiente que incrementa la concentración de un químico desnaturalizante. En una concentración particular del desnaturalizante, el fragmento de DNA va sufriendo una fusión parcial que resulta en una reducción de la movilidad del DNA (Kumar, 1999).

Dado que los heterocigotos son distinguibles, los RFLP y VNTR son marcadores codominantes. Sus limitaciones técnicas son: a) se necesitan una buena cantidad de sondas, si las sondas heterólogas no están disponibles se deben generar sondas de DNA genómico o de cDNA b) los pasos de hibridación y fijación de las bandas (blot) son muy tardados y difíciles de automatizar y c) se requieren cantidades suficientes de DNA y de muy buena calidad y así los RFLP no son aplicables cuando solo se dispone de muy poca cantidad de la fuente del material o tejido preservado (Karp, 1996).

El desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR de sus siglas en inglés: *Polymerase Chain Reaction*) para la amplificación de DNA, ha dado origen a una revolución en el campo de aplicación de métodos moleculares y gran cantidad de nuevas tecnologías fueron desarrolladas para resolver muchas de las limitaciones técnicas de los RFLP (Karp, 1996) y han resuelto el uso de altas cantidades de DNA en los VNTR utilizando cebadores dirigidos contra las secuencias flanqueantes para obtener diferencias en los tamaños de los productos sin la necesidad de la hibridación (Hartl, 1999). Una modificación de la PCR involucra el uso de un cebador (*primer*) “arbitrario” y resulta en la

amplificación de varios productos discretos de DNA. Cada producto va a derivar de una región del genoma que contiene dos segmentos pequeños con similitud a la secuencia del *primer* en segmentos opuestos, lo suficientemente cerca para su amplificación. La versión más común es el análisis de la amplificación aleatoria de fragmentos polimórficos “RAPD” (de sus siglas en inglés: *Randomly Amplified Polymorphic DNA*) utilizados en este estudio, en donde los productos de amplificación son separados en geles de agarosa en la presencia de bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta (Williams *et al*, 1990). Los AP-PCR (iniciadores arbitrarios PCR, de sus siglas en inglés: *arbitrary primed PCR*) y las huellas digitales de la amplificación de DNA (DAF, de sus siglas en inglés *DNA fingerprinting*) difieren de los RAPD principalmente en el tamaño de los *primers*, el radio del *primer* al templado y la matriz de gel en la que se visualizan. Las enormes atracciones de tales amplificaciones mediadas por *primers* arbitrarios son: a) que no se requiere de sondas de DNA o información de las secuencias para el diseño de primers específicos; b) dado que el procedimiento no involucra pasos de hibridación o fijado de bandas, son fáciles, simples y automatizables y eliminan la necesidad de pruebas radiológicas; y c) se requieren bajas cantidades de DNA (10 ng por reacción). Es absolutamente crítico, sin embargo, mantener estrictamente constantes las condiciones de reacción de PCR para mantener perfiles reproducibles (Karp, 1996).

Los RAPD son relativamente sencillos de aplicar en un amplio rango de taxones de animales y plantas, el número de loci que puede ser analizado es esencialmente ilimitado, se ha visto que los RAPD tienen grandes ventajas sobre los RFLP y las huellas digitales de DNA. Cuando los *primers* son de tamaño intermedio (en el orden de 10 pares de bases), se pueden amplificar múltiples fragmentos por genoma. Dado que los *primers* consisten en secuencias aleatorias y no discriminan entre regiones codificantes y no codificantes se espera que la técnica obtenga muestras del genoma más aleatorias que métodos convencionales (Lynch y Milligan, 1994). La presencia o ausencia de las bandas puede ser registrada en una base de datos como presencia-ausencia y ser convertidas en matrices de similitud para calcular distancias genéticas. (Ellsworth *et al*, 1993). Los RAPD también han sido utilizados para estudios poblacionales, ecología molecular y para la taxonomía. Las desventajas de los RAPD son: a) los marcadores son dominantes y los heterocigotos no pueden ser detectados; en la ausencia de un análisis de pedigrí, la identidad de las bandas

individuales en un perfil de multibandeo no se conoce y puede haber incertidumbre en la asignación de marcadores a loci específicos; c) la presencia de bandas de peso molecular aparentemente idénticas en diferentes individuos no debe ser tomado como evidencia de que los dos individuos compartan un fragmento homólogo, a pesar de esto, ésta suposición se hace comúnmente y; d) bandas sencillas en un gel, pueden ser compilaciones de varios productos de amplificación que migran a la par (Karp, 1996).

Se ha desarrollado también una técnica basada en la PCR llamada AFLP, que es esencialmente un intermedio entre los PCR y los RFLP. El primer paso involucra la digestión en sitios de restricción del DNA genómico, que está seguida por etapas de selección de amplificación por PCR desde los sitios de restricción. Los fragmentos amplificados son marcados radioactivamente o por fluorescencia y separados en geles de secuencia. Los AFLP son tan reproducibles como los RFLP, requieren mayor cantidad de DNA que los RAPD. Comparten algunas de las limitaciones de los RAPD, pero sus datos son reproducibles y al parecer, pueden amplificar más de 100 bandas, mientras que los RAPD producen alrededor de 20 por reacción, por lo cual son particularmente buenos para el mapeo, la identificación y el cálculo de distancias genéticas (Karp, 1996).

El género Agave

El subgénero *Agave* pertenece al género *Agave*, Familia Agavaceae, Orden Asparagales, Clase Monocotiledoneae, División Angiospermeae y Reino Plantae. Cuenta con 136 especies organizadas en 20 grupos y dos subgéneros (Gentry, 1982).

Los agaves pueden ser considerados como plantas perennes, dado que requieren largos períodos de tiempo para crecer y florecer. Si se descartan los años que requieren para su maduración, se pueden considerar como plantas suculentas herbáceas. El crecimiento y la acumulación de reservas ocurren al mismo tiempo y tardan períodos de 8 a 20 años. El surgimiento de la superestructura de la inflorescencia es enfático y seca las hojas y a su vez los bulbos maduros y semillas. Muchos de los agaves se reproducen tanto clonalmente, como por semilla (Gentry, 1982).

Las rosetas pueden ser monocarpicas o multianuales y mantener una posición axial o apical. Aquellas que son axiales y florecen anualmente son perennes y las apicales con una sola floración son semélparas. Los bulbos en la base de la roseta pueden formar nuevos

individuos y a su vez pueden abarcar grandes extensiones de terreno. Muchos agaves poseen rosetas acaulescentes. El tallo es corto y grueso, almacena agua y posee una amplia región del meristemo terminal que funciona como fuente de yemas y hojas nuevas. Esto junto con la base de las hojas en disposición espiral imbricada, forma una masa blanca fibrosa de tejido meristemático que almacena carbohidratos los cuales pueden ser convertidos a azúcares por calor generalmente son llamadas “cabezas” y son utilizadas en la alimentación o elaboración de bebidas fermentadas o destilados como el tequila y mezcal (Gentry, 1982).

La roseta es también una forma de defensa, las afiladas espinas terminales protegen las hojas jóvenes de la inflorescencia que son fácilmente digeribles por animales grandes. Son generalmente gruesas y suculentas, después del establecimiento de las plántulas, las hojas requieren de un largo tiempo para formarse en las yemas. En muchas especies se forma gran cantidad de fibras al interior de la hoja. Al principio tienen un arreglo casi vertical que con el tiempo van cambiando a posición horizontal mientras la hoja envejece. La floración marca el término del desarrollo de las hojas y comienzan a secarse y adquirir consistencia fibrosa y eventualmente la muerte de las hojas. El arreglo radial de las hojas permite coleccionar agua y dirigirla a su base donde el agua es depositada en el suelo cercano a la raíz que está protegido por la sombra de las hojas lo cual reduce los niveles de evaporación. El pigmento, la forma, el grosor, la coloración y la epidermis de las hojas son utilizados para definir grupos dentro de los agaves, pero la atención se dirige más hacia la apariencia de la armadura. Esto consiste en la posesión de espina terminal y bordes cuniculares, continuos o discontinuos y algunas veces ausente. Los bordes de las hojas frecuentemente poseen espinas terminales llamadas dientes. La variación de las hojas en una sola planta abarca desde hojas comunes en la roseta, hasta la formación de tépalos, brácteas y pedicelos en la inflorescencia (Gentry, 1982).

El indumento es casi ausente en los agaves, las hojas son glabras, la cutícula es serosa y solo en algunas flores se presenta un almacén seroso, en algunas especies aparece como glándulas papilares situadas por debajo de la cutícula. Los exudados serosos probablemente protegen a las plantas de la radiación solar y la deshidratación (Gentry, 1982).

La inflorescencia puede presentar dos formas alternativas que divide a los dos subgéneros: la espiculada o racimosa como en el subgénero *Littaea* y la forma paniculada del subgénero *Agave* (Gentry, 1982; Arizaga & Ezcurra, 2002; Figura 1). Las espículas más cortas no alcanzan los dos metros, mientras que las grandes alcanzan los 9 o 10 metros sobre el nivel del suelo en uno o dos meses de crecimiento. El arreglo espiculado es más frecuente en el resto de las monocotiledóneas que el arreglo paniculado único del subgénero *Agave*, lo cual sitúa al subgénero *Littaea* como un grupo más antiguo dentro de las agaváceas. Dentro de las flores la variabilidad es sobresaliente y existe una estricta determinación para definir las limitaciones del género. Todas las flores de agave son perfectas, trilobulares con muchos óvulos, seis tépalos iguales o desiguales en una o dos series unidos usualmente en la base del tubo profundo. El perianto puede aparecer como una serie sencilla, pero también puede transponerse con tépalos externos en la yema en algunas especies (Gentry, 1982).

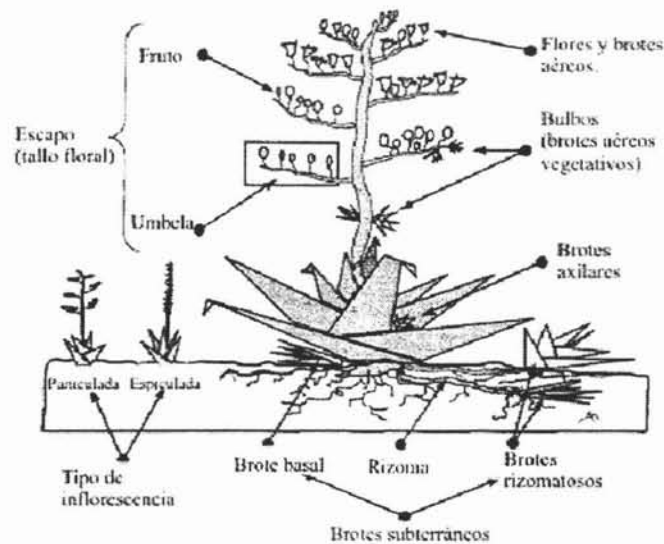


Figura 1. Representación esquemática de un agave con inflorescencia paniculada (tomada de Arizaga & Ezcurra, 2002)

Antecedentes

Evaluaciones de variabilidad genética en especies de la familia Agavaceae

Autor(es)	Año	Tipo de marcadores moleculares	Especie(s)	Resultados	Conclusiones
Martínez Palacios <i>et al</i>	2003	Aloenzimas	<i>Agave victoriaeae-reginae</i>	83% de loci polimórficos, F_{ST} de 0.236, $D = 0.182$	Diferenciación entre poblaciones, altos niveles de variabilidad genética y de diferencias entre los individuos.
Colunga García-Marín <i>et al</i>	1999	Isoenzimas	<i>A. fourcroydes</i> y <i>A. angustifolia</i>	33 electromorfos de los cuales solo dos pertenecen a <i>A. fourcroydes</i> y 31 a <i>A. angustifolia</i> (especie ancestral).	Pérdida de la variabilidad genética atribuible al cultivo.
Infante <i>et al</i>	2003	AFLPs	<i>A. fourcroydes</i>	83% de bandas polimórficas, coeficientes de similitud que varían entre 0.823 y 1.0, el 20% de la variabilidad se encuentra entre las poblaciones.	Alta similitud entre las poblaciones, la propagación clonal también es fuente de variabilidad genética.
González <i>et al</i>	2003	AFLPs	<i>A. fourcroydes</i>	Variación entre clones de una generación a la siguiente de 0 a 0.3%	La propagación por clones también es fuente de variabilidad genética.

Continuación

Autor(es)	Año	Tipo de marcadores moleculares	Especie(s)	Resultados	Conclusiones
Silva Montellano <i>et al</i>	2003	Aloenzimas	<i>A. lechuguilla</i>	Variabilidad genética de 0.394 y F_{ST} 0.083	Poblaciones muy poco diferenciadas y altos niveles de endogamia
Navarro-Quezada <i>et al</i>	2003	RAPD	Complejo <i>A. deserti</i> (3 especies y 7 subespecies)	Variabilidad genética entre 0.121 y 0.292, $D = 0.040$	Las poblaciones así como las subespecies presentan diferencias significativas, existe diferenciación geográfica entre las subpoblaciones y subgrupos.
Gil-Vega <i>et al</i>	2001	RAPD	<i>A. tequilana</i> var Azul	0.8% de bandas polimórficas, 39 de los 40 individuos son isogénicos, la distancia con el mismo es de 0.007, calculan la distancia con una variedad distinta (chango) y encuentran valores de 0.15 y 0.12	Disminución de variabilidad genética, es el dato más bajo de variabilidad genética dentro del grupo de las agaváceas.
López Urrutia	2004	RAPD	<i>A. karwinskii</i>	El 26.8% de la variabilidad genética se encuentra entre las poblaciones, $\Phi_{ST} = 0.340$ y $N_e m = 0.47$	Poblaciones en procesos de estructuración.

Estudios y líneas de investigación relacionadas con la especie *A. marmorata*

Publicados

Autor	Año	Descripción
Ornelas <i>et al</i>	2002	Realizan contribuciones en relación a la floración de <i>A. marmorata</i> la importancia que tiene su presencia en el valle de Zapotitlán Salinas como productor de néctar y el efecto que tiene la producción de néctar sobre la distribución temporal y espacial de las especies nectarívoras asociadas, que se identifican como murciélagos, aves e insectos.
Valverde <i>et al</i>	1996	Realizan un análisis morfométrico para la evaluación de un híbrido entre <i>A. parrasana</i> y <i>A. kerchovei</i> , llamado <i>A. peacockii</i> . La evaluación comprende la identificación de radios de medidas morfométricas para la identificación de ambas especies y las utilizan como posibles pruebas para la identificación del supuesto híbrido, además de hacer una inferencia del significado evolutivo que tiene el establecimiento de un híbrido como nueva especie.
Martínez <i>et al</i>	2001	Ensayo de recomendaciones técnicas acerca de la protección y manejo de especies que se distribuyen en la mixteca oaxaqueña, resaltando la importancia de la conservación de especies representativas de la región como lo es <i>A. marmorata</i> .
López-Galindo <i>et al</i>	2003	Realizan estudios de los tipos de suelos del valle de Zapotitlán Salinas, Puebla en el cual incluyen el tipo de vegetación asociado a tipos de suelo, así como la degradación de los suelos en el valle. En éste artículo denominan a <i>A. marmorata</i> como una especie representativa del valle que se encuentra en matorral rosetófilo, Izotal de <i>Yucca periculosa</i> , mezquital y tetchera de <i>Neobuxbaumia tetetzo</i> , siendo un factor común la identificación de material calcáreo en la composición del suelo, así como la presencia de caliza en el sustrato en toda la distribución.

Continuación

Presentaciones en congreso

Autor	Año	Descripción
Espinoza <i>et al</i>	2004	Reportan el registro de colecta de germoplasma de agaves que se distribuyen en Oaxaca y son utilizados para la producción de mezcal. Colectan material de 25 especies, entre ellas <i>A. marmorata</i> con fines de conservación <i>ex situ</i> y evaluación de la diversidad genética.
Jiménez <i>et al</i>	2004	Hacen una explicación detallada de las formas de aprovechamiento de la especie <i>A. marmorata</i> . Evalúa los efectos de manejo sobre la demografía de la especie, obteniendo como resultados preliminares la drástica disminución de plántulas e individuos adultos, esto asociado a efectos de extracción excesiva de individuos en las poblaciones para la elaboración de mezcal, además de obtener datos dónde es evidente que existe una tendencia de la especie a reproducirse preferiblemente de forma clonal sobre la forma de reproducción por semilla.

Hipótesis

Dado que la extracción de individuos de *Agave marmorata*, implica una reducción en el tamaño poblacional, lo cual a su vez aumenta la probabilidad de reproducción entre individuos cercanamente emparentados, se espera entonces que la población en manejo vea reducida su variabilidad genética y se formen grupos definidos por alta similitud genética entre los individuos.

Objetivos

Objetivo general

Determinar los niveles de variabilidad genética de *Agave marmorata* **Roehl.** en el Valle de Zapotitlán Salinas Puebla.

Objetivos particulares

Estimar los niveles de variabilidad genética de dos poblaciones de *A. marmorata* en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla. Mediante el uso de RAPD como marcadores moleculares.

Identificar si existen patrones de estructura poblacional en dos poblaciones de *A. marmorata* en el Valle de Zapotitlán Salinas Puebla.

Determinar en general si existen efectos de reducción del nivel de variabilidad genética o patrones de estructuración genética en la población en condición de manejo de *A. marmorata*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Descripción del sitio de estudio

Los sitios analizados se encuentran en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla en las coordenadas (18° 12' y 18° 24' N y entre 97° 24' y 97° 36' W) (figura 5), la elevación promedio es de 1407 m.s.n.m. y el clima es árido a semiárido con lluvias en verano (Zavala-Hurtado, 1982). El promedio anual de lluvia es de 380 mm, con una temperatura media de 21.4° C (García, 1987).

El tipo de vegetación es matorral xerófilo (Rzedowski, 1978) y la especie dominante es el cactus columnar gigante *Neobauxbamia tetetzo*, creciendo en asociación de otros cactus, rosetas suculentas de agaváceas, arbustos xerófilos y anuales (Zavala-Hurtado, 1982). Zapotitlán Salinas es uno de los muchos valles que convergen en el gran Valle de Tehuacán que a su vez forman parte de la reserva de la biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, en la región fronteriza entre Puebla y Oaxaca. El tramo de la Sierra madre Oriental que se conoce como Sierra de Zongolica y Sierra de Juárez, crea un efecto de sombra orográfica, que constituye la principal causa de aridez en el valle de Tehuacán (Smith 1965; Villaseñor *et al*, 1990). De acuerdo a Valiente (1991), en contraste con otras zonas áridas, la pequeña temporada de lluvias en el valle de Tehuacán es relativamente predecible. El período lluvioso comienza hasta el final de Mayo y termina al final de Septiembre. Ocasionalmente los huracanes prolongan las lluvias hasta Noviembre. En Agosto es común una sequía de medio verano (Valiente, 1991).

Los suelos del valle de Tehuacán son poco profundos, derivados de rocas calcáreas y sedimentarias y frecuentemente halomórficos que varían en grados de alcalinidad y salinidad. En general el suelo tiene textura marga, colores brillantes, pH alcalino, poca materia orgánica y altos contenidos de carbonato (Aguilera, 1970).

Por otro lado, la economía de Zapotitlán de las Salinas se basa en extraer y procesar onix, extracción de sal de acuíferos salobres y el forrajeo de matorrales naturales por ganado caprino. La agricultura se limita al fondo de los valles. La colecta de frutos y plantas silvestres es común, pero generalmente encaminados hacia el autoconsumo y no salen a mercados externos (Arizaga y Ezcurra, 2002).

Agave marmorata Pertenece a la familia Agavaceae, de la sección Agave del grupo Marmoratae. Rosetas grandes, tallo acortado, sencillo, raramente surculoso, apertura radial con 30 a 50 hojas, de 1.2 - 1.3 m de alto 2 m de ancho; las hojas maduras 100 - 135 X 20 - 30 cm, lanceoladas ampliamente, frecuentemente unduladas, gruesas en la base, planas al término, convexas en el envés, dobladas en la mitad, involucreo en la base de la espina, gris glauco a verde brillante, algunas veces zonada, generalmente rugosas y escabras, el margen crenado y carnosos, dientes entre 6 y 12 mm de largo, separados de 2 a 5 cm de color castaño a café oscuro espina corta y cónica de 1.5 a 3 cm de largo, panícula de 5.0 - 6.5 m de altura con pedúnculo robusto y de 20 a 25 umbelas difusas descompuestas en la parte superior del eje, flores pequeñas amarillo brillante de 40-48 mm de largo, ovario de 20 - 25 mm de largo, verde brillante cilíndricas el cuello libre y apenas acanalado; tubo 5 - 6 mm de profundidad, 12 mm de ancho. El nombre de *A. marmorata* le fue dado por las bandas gris marmóreo y la textura de las hojas (Figura 2). Las espinas cónicas cortas, las hojas engrosadas grisáceas y alta cantidad de pezones en hojas y las flores pequeñas doradas en panículas grandes y difusas distinguen a la especie (Gentry, 1982).

Es una planta con polinización obligadamente cruzada, semélpara y puede propagarse clonalmente. La forma de las flores sugiere polinización por murciélagos como *Choeronycteris mexicana* Tschudi y *Leptonycteris nivalis* (Saussure), aunque también es visitado por 15 especies de pájaros (principalmente colibríes, orioles y carpinteros) e insectos (*Xilocopa*, *Apis* y *Bombus*, generalmente) los cuales desempeñan funciones de polinización (Ornelas, 2002).



Figura 2. Individuo adulto de *A. marmorata* donde se muestra el inicio de la floración.

De acuerdo a Ornelas (2002) *A. marmorata* representa para las especies anteriores la principal fuente de néctar en el Valle de Zapotitlán durante los meses desde Junio hasta Agosto funcionando como un oasis, lo cual lo sitúa como una especie muy importante para el ecosistema (Ornelas, 2002).

Aunque su distribución solo comprende los estados de Puebla y Oaxaca, *A. marmorata* es el agave más ampliamente distribuido del subgrupo Marmoratae en la república mexicana (Gentry, 1982; Figura 3).

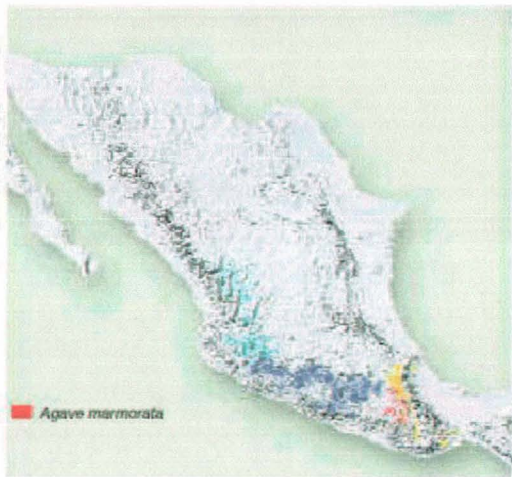


Figura 3: Distribución de *A. marmorata* (modificado de Soberón, 2002).

Los nombres comunes asociados a ésta especie son “picho”, “Maguey curandero”, “pitzomel”, “pichu” o simplemente como “pitchomel”; en el Valle de Zapotitlán es usado como alimento, bebida alcohólica, resina, estimulante, transplantado como cerco vivo y en medicina. Se utilizan principalmente las hojas, flores, tallos (cabezas o piñas) y el tallo de la inflorescencia (Gentry, 1982; Dávila, 2002; Espinosa, 2004; Blanckaert *et al*, 2004; Jiménez, 2004). La instalación de una destiladora de mezcal en el Valle de Zapotitlán Salinas cerca de la localidad de las granjas (Figura 4), es un ejemplo del uso comercial que se le da a la planta y la importancia económica derivada de ese fin en particular. La elaboración de bebidas alcohólicas forzosamente implica la muerte de los individuos y el tratamiento previo incluye la extirpación del tallo floral (en algunos casos), lo cual no permite la reproducción sexual. Es por esto, que aumenta la preocupación por identificar los efectos que ha tenido sobre la variabilidad genética la sustracción de individuos de las poblaciones naturales dentro del Valle de Zapotitlán Salinas.



Figura 4. Molienda de las “cabezas” de *A. marmorata*.

Trabajo de campo

Se seleccionaron tres sitios dentro del Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla, denominados “Jardín Botánico”, “Las Granjas” y “Tilapa” (Figura 5). Las tres son poblaciones no cultivadas y pueden considerarse silvestres, aunque el criterio utilizado para la selección, está definido por la presencia de la destiladora de mezcal que se encuentra en la localidad de las granjas denominando a esta población “manejada” ya que ocurre manejo manipulativo, la población de jardín botánico se denomina “silvestre” dado que los individuos de *A. marmorata* dentro del jardín no son utilizados para la producción de mezcal y la zona de Tilapa fue tomada como un control externo a ambas poblaciones que corresponde a una población fuera del área de estudio donde no ocurre manejo manipulativo y se considera una población silvestre. Fueron colectados al menos cinco individuos de cada población, con la precaución de no coleccionar hijuelos (clonas) del mismo individuo, el criterio establecido fue *i)* no estar conectados por la base del tallo y *ii)* si estaban cerca; verificar que fueran de variedad distinta. Para la toma de muestras se procuró coleccionar fragmentos de hoja jóvenes de aproximadamente 10 cm de longitud medidos desde la espina terminal que no presentasen plagas visibles los cuales fueron almacenados en bolsas de papel debidamente etiquetadas, el individuo fue identificado con una clave e irrigado con solución saturada de Bórax en el sitio de corte para permitir su rápida cicatrización. El transporte de los fragmentos de hoja hacia el laboratorio ocurrió en un período entre 12 a 24 hrs para su almacenamiento a 4° C.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

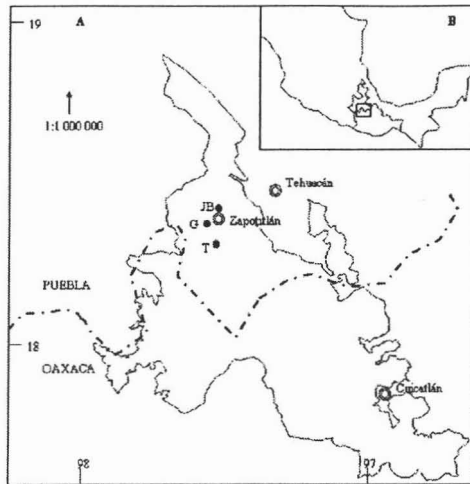


Figura 5. Localización geográfica del valle de Zapotitlán Salinas. **JB** Jardín Botánico, **G** Las granjas, **T** Tilapa.

Una vez en el laboratorio fueron cortados subfragmentos de cada hoja de aproximadamente 4 X 4 cm, se les retiró la cutícula y la mayor parte de las fibras, para su posterior congelación con nitrógeno líquido y almacenamiento a -73° C en sistema REVCO. El resto de la hoja se almacenó directamente en el sistema REVCO.

Fueron colectadas fragmentos de hoja de 64 individuos, de los cuales 29 pertenecen al jardín botánico ($18^{\circ} 19' 44''$ N, $97^{\circ}27' 16''$ W) a la que se denominó silvestre, 30 pertenecen a la zona de las granjas a la que me referiré como “manejada” ($18^{\circ}18'22''$ N, $97^{\circ}29'30''$ W) y 5 individuos de la zona de Tilapa ($18^{\circ}16'42''$ N, $97^{\circ}29'12''$ W) como control externo de población. Una breve descripción de los individuos se muestra en el apéndice 1, las claves asignadas para el tratamiento de laboratorio se muestran el cuadro 1.

Cuadro 1. Relación de claves de individuos y su lugar de colecta

Lugar de colecta.	Población.	Claves.
Jardín botánico.	Silvestre.	S 1-29
Las Granjas.	Manejo.	M 1-30
Tilapa.	Control externo.	T 1-5

Extracción de DNA.

La extracción de DNA se realizó de acuerdo al protocolo DNeasy Plant Kit de QIAGEN (No Cat 69106) con algunas modificaciones, el cual está diseñado para obtener DNA de alta calidad y alto peso molecular. El protocolo de extracción se describe en el apéndice 2.

Fue aislado el DNA de 64 individuos de *A. marmorata*, de los cuales 30 pertenecen a la zona manejada, 29 pertenecen a la zona del jardín botánico (silvestre) y 5 a Tilapa (silvestre control externo), con el protocolo DNeasy Plant Kit se obtuvieron altas cantidades de DNA de buena calidad en todos los individuos (Figura 6). El DNA del individuo "M17" fue utilizado como patrón control de la concentración de DNA y a partir de la cantidad observada se realizaron diluciones para la amplificación RAPD. Fue incluido el DNA de un individuo de *A. karwinskii* proporcionado por el Biól. Eduardo López Urrutia como grupo control externo.

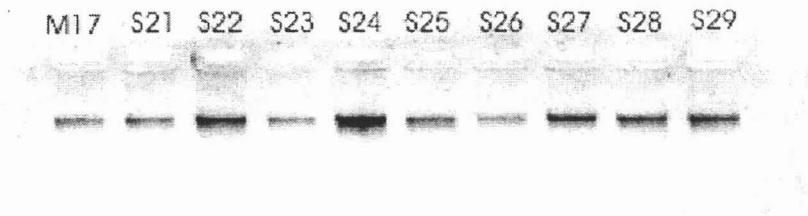


Figura 6. Extracción de DNA. Gel revelado con BrET y capturado digitalmente

Cuantificación de DNA

La cuantificación de DNA se realizó siguiendo un método visual, corriendo alícuotas de la dilución de DNA con Buffer de carga en electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % en TBE 0.5 X a 100 V por 45 min, en presencia de alícuotas de muestras de diluciones ya conocidas (10mMol/ml) como patrón estándar y un marcador de peso molecular de 1 Kb DNA Ladder GIBCO.

Los geles fueron revelados con bromuro de etidio en presencia de luz UV y fotografiados digitalmente con el programa Alfa Imager del equipo (Alfa Imager Analyzer 2000, Alfa Innotech Company), con exposición UV de 1 segundo y valor Gamma 2.

RAPD

La reacción de amplificación se realizó en un volumen de 25 µl por reacción, 1 µl primer, 200 mMol de dNTPs y 1 unidad de Taq Polimerasa (Invitrogen, Co), BR 1X, MgCl₂ 2m Mol/µl y 20 pm/ml de DNA.

La amplificación se llevó a cabo en un Termociclador Gene Amp PCR System 9700 programado a 94° C 2 min, [94° C 1 min (desnaturalización), 37° C 1 min (alineación), 72° C 1 min 15 seg (extensión)] X 40 (ciclos) y 72° C 15 min (amplificación complementaria). Los productos se corren en geles al 1.2 % de agarosa, 70 V durante 180 min y visualizados con BrET expuesto a luz UV, utilizando como referencia el marcador 1 Kb en los extremos derecho e izquierdo de cada gel. Los archivos fueron fotografiados como se describe anteriormente para cuantificación de DNA.

Fueron evaluados 12 *primers* de la serie *Operon Life Sciences* de los cuales se seleccionaron 6 para la amplificación de todos los individuos. Los individuos utilizados para la estandarización son M17, M2, S3 y S13 y los *primers* utilizados para la amplificación son A02, B05, B20, C07, G06 y J13, los cuales fueron seleccionados por su reproducibilidad y la cantidad de bandas que mostraron durante la evaluación. Sus secuencias se describen en el cuadro 2. Los individuos S19 y T2 presentaron problemas en la amplificación con los primers G06 y J13 debido a la degradación de la dilución de DNA, razón por la cual fueron excluidos del presente análisis, el resto de los individuos no presentaron problemas durante la amplificación. Un ejemplo de la amplificación por RAPD puede observarse en la Figura 8.

Cuadro 2. Secuencias de *primers* utilizados para el análisis

<i>Primer</i>	Secuencia 5'-3'
A02	TGC CGA GCT G
B05	TGC GCC CTT C
B20	GGA CCC TTA C
C07	GTC CCG ACG A
G06	GTG CCT AAC C
J13	CCA CAC TAC C

Análisis estadístico

Con el patrón de bandeo producto de RAPD se elaboró una matriz básica de datos, donde “1” corresponde a la presencia de una banda en un sitio determinado y “0” corresponde a la ausencia de una banda en relación a un individuo que sí posee la banda en esa posición. La matriz básica de datos fue transformada de acuerdo a las necesidades de cada prueba estadística.

Índice de polimorfismos

Un locus polimórfico es aquel cuya frecuencia en una población es mayor a cero y menor que 1, el porcentaje de loci polimórficos se obtiene dividiendo el número de loci polimórficos entre el total de loci observados y el resultado se multiplica por 100. Si el valor es igual a cero, indica que todos los loci son monomórficos y si es de 100 indica que todos los loci son polimórficos, a mayor porcentaje, mayor variabilidad genética.

Para estimar la variabilidad genética dentro de las poblaciones, se elaboró un cuadro de polimorfismos promedio, en la cual se mide la frecuencia (p) de bandas polimórficas por locus y por población.

$$p = \frac{x}{n} \times 100$$

dónde:

p = porcentaje de polimorfismos, x = frecuencia del marcador, n = número de individuos.

Distancias genéticas.

Para calcular las distancia genética fue utilizado el índice de similitud de Jaccard, el cual utiliza la matriz binaria para calcular la similitud entre los individuos, valores cercanos a 0 indican completa disimilitud entre los organismos, valores cercanos a 1 indican alta similitud. El cálculo de distancia fue representado en un dendrograma mediante UPGMA (agrupamiento aritmético por promedios no ponderados), con la matriz producto del índice de similitud de Jaccard, fue generada una matriz cofenética y con ambas, se calculó el coeficiente de correlación (r) mediante una prueba de Mantel con 1000 permutaciones, para medir la correlación del agrupamiento, valores cercanos a 1 indican confiabilidad en el

agrupamiento y cercanos a 0.7 indican baja confiabilidad en la representación. Todas aplicaciones del programa NTSySpc v2.2 Applied Biostatistics.

Para establecer hasta qué punto el agrupamiento está mejor representado, se calculó el punto de corte con la matriz básica de datos y 100 combinaciones con el programa Seqboot v 3.6 a2.1 (University of Washington; Felsenstein, 2000) los agrupamientos en similitud menores al punto de similitud sobre el punto de corte son más confiables que aquellos que son mayores.

Para medir la estabilidad del agrupamiento, se realizó un bootstrap con 500 repeticiones a partir del índice de similitud de Jaccard con el programa winboot (International Rice Research Institute; Yap & Nelson, 1996) valores cercanos a 100 son muy confiables y valores menores a 50 no son confiables.

Análisis de coordenadas principales (PCO)

Para identificar los patrones de similitud y segregación de las poblaciones en un espacio bidimensional y tridimensional, se realizó un análisis de coordenadas principales. Con la matriz de similitud de Jaccard se generó una matriz DCenter, que a su vez fue convertida a dos componentes con la aplicación Eigen, ambos componentes son vectores derivados de la similitud que ayudan a representar la distribución de similitud entre los individuos en las poblaciones. Todas aplicaciones del programa NTSySpc v 2.2.

Diversidad genética

Para calcular la diversidad genética fueron utilizados dos métodos, el índice de Shannon (Bussell, 1999) y análisis molecular de varianza (AMOVA).

Índice de Shannon

La diversidad genética por locus fue calculada de acuerdo a la fórmula:

$$H'_j = -\sum p_i \log_2 p_i$$

dónde:

H'_j = Índice de diversidad de Shannon.

p_i = es la frecuencia del alelo presente en el i ésimo locus en la población.

A partir de H'_j se calculó la diversidad promedio poblacional:

$$H'_{pop} = \frac{1}{n} \sum H'_j$$

donde:

H'_{pop} : Diversidad promedio por población.

n = número de poblaciones.

Finalmente se obtuvo la diversidad por especie:

$$H'_{sp} = - \sum p_i \log_2 p_i$$

dónde:

H'_{sp} = Diversidad promedio de la especie.

p_i = frecuencia del alelo presente del i ésimo locus en la muestra total.

El grado de diferenciación poblacional se estimó a partir de la diversidad promedio poblacional y la diversidad promedio de la especie, obtenidas mediante el índice de Shannon utilizando la siguientes fórmulas.

Para el componente de diversidad dentro de las poblaciones (Bussell, 1999):

$$\frac{H'_{pop}}{H'_{sp}}$$

y para la diversidad entre poblaciones:

$$G'_{ST} = \frac{H'_{sp} - H'_{pop}}{H_{sp}}$$

La G_{ST} total se calculó con base en los valores promedio por cebador de H' , H'_{pop} y H'_{sp} (Bussell, 1999)

La heterocigosis promedio esperada se calculó para cada población (H'_e) y para la muestra total (H'_{sp}) mediante el método de Lynch y Milligan (1994). El método parte del parámetro convencional de diversidad:

$H_e = 2pq$ (dónde $q = 1 - p$) por lo tanto la fórmula para calcular la heterocigosidad por locus es:

$$H_e = 2 \left[(1 - \sqrt{x}) \sqrt{x} \right]$$

x = frecuencia del alelo presente en el i ésimo locus.

AMOVA

Para calcular la variabilidad genética dentro (A) y entre las poblaciones (B) se realizó un AMOVA (Análisis molecular de varianza) con la ayuda del programa AMOVA 155 de Genetics and Biometry Laboratory University of Geneva 1992-1993. Utilizando parámetros de haplotipos moleculares, prueba de varianzas y homogeneidad de varianzas, para obtener información adicional de pruebas pareadas y prueba de distancias filogenéticas. Valores de “A” cercanos a 100% reflejan identidad de varianzas en las poblaciones, mientras que valores cercanos a 0% reflejan diferencias en las varianzas entre las poblaciones, “B” es inversamente proporcional a “A”. Valores altos de B reflejan estructura poblacional y endogamia, valores altos de A reflejan poblaciones no estructuradas y alto flujo génico.

Flujo génico ($N_e m$)

Para evaluar el flujo génico, fueron utilizados los datos pareados de Φ_{ST} producto del AMOVA utilizado la siguiente fórmula.

$$N_e m = \left(\frac{1}{4a} \right) \left(\frac{1}{\phi_{st}} - 1 \right)$$

dónde:

$N_e m$: número de migrantes por generación.

$a = \left(\frac{n}{n-1} \right)$ para 3 ó más poblaciones ($a=1$ para dos poblaciones) n = número de poblaciones.

Valores cercanos a 0 indican bajo intercambio de loci entre las poblaciones, mientras que valores mayores a 1 indican intercambio de loci entre las poblaciones, el flujo génico es un buen indicador de estructura poblacional, ya que depende de la variabilidad entre las poblaciones y de ser un valor entre 0 y 1 indica que las poblaciones están estructuradas.

Subdivisión de poblaciones

Una vez que fue visualizado el agrupamiento de todos los individuos, se realizó un análisis complementario para la identificación de posibles patrones asociados a estructura poblacional. Los análisis complementarios comprenden: el índice de polimorfismos, índice

de Shannon, AMOVA y representación gráfica del agrupamiento de subgrupos utilizando como parámetro de disimilitud la Φ_{ST} pareada producto del AMOVA, al agrupamiento le fue realizada una prueba de Mantel al igual que evaluado el coeficiente de correlación. El organigrama de la metodología se muestra en la figura 7.

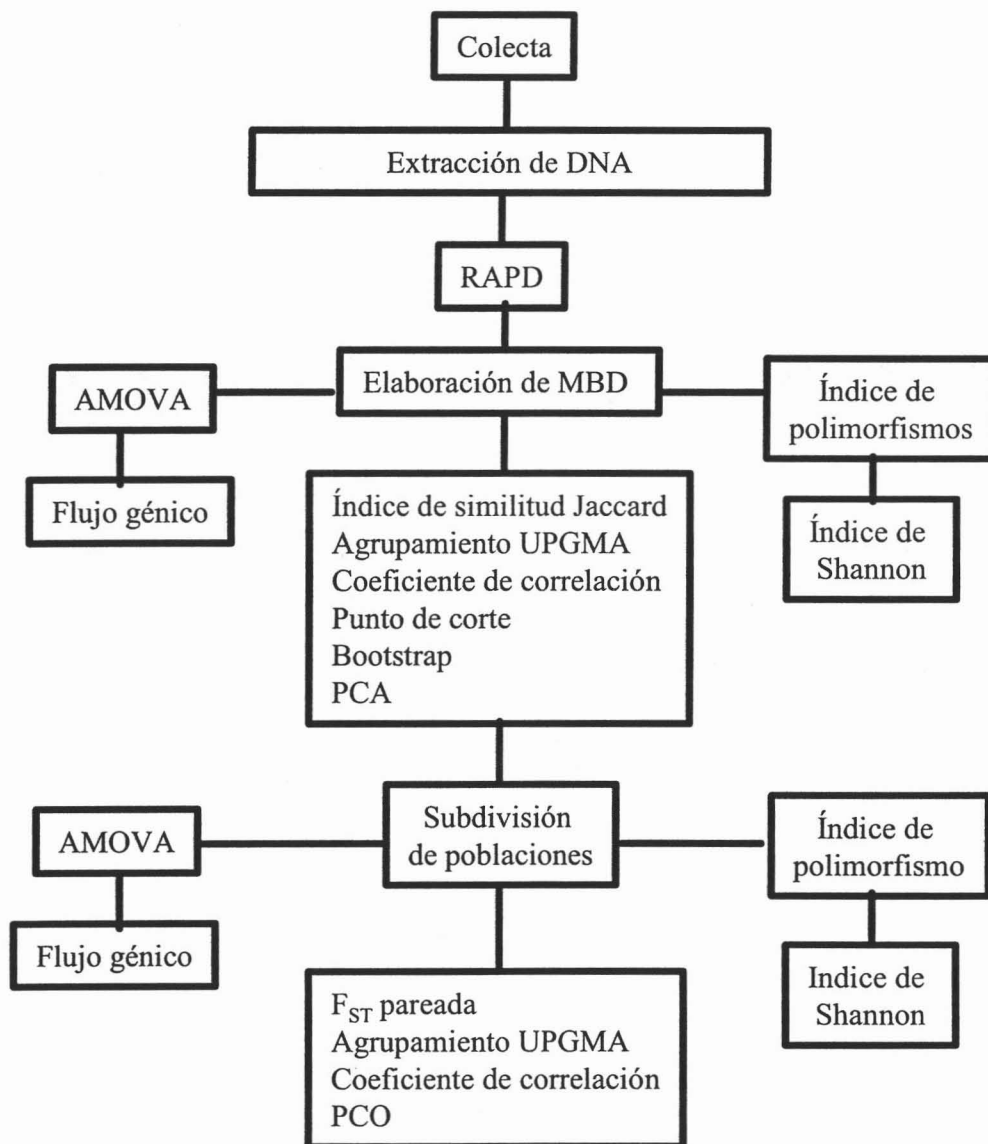


Figura 7. Organigrama de metodología

RESULTADOS

Matriz básica de datos

Fueron incluidas en el análisis todas las bandas producto de la amplificación RAPD desde 2,036 pb hasta 298 pb.

Se obtuvo una matriz básica de datos de 112 bandas (marcadores) por 63 individuos, que incluye a las poblaciones manejada, silvestre, control silvestre y al individuo de *A. karwinskii*, como individuo externo.

La cual fue subdividida, extrayendo a los grupos control silvestre y *A. karwinskii*, Se eliminaron en ésta subdivisión aquellos marcadores dónde la frecuencia es 0 (exclusivos de *A. karwinskii* e individuo externo de población), y el resultado fue una segunda matriz de 58 individuos por 104 marcadores.

Índice de polimorfismos

Fueron tomadas como polimórficas a todas las bandas en las que se tuvieran los dos estados de carácter (1,0), sin importar el número de individuos en los que se presentasen, teniendo cuidado de verificar el patrón de bandeo de todos los individuos y en especial de aquellos en los que las bandas son exclusivas (Figura 8).

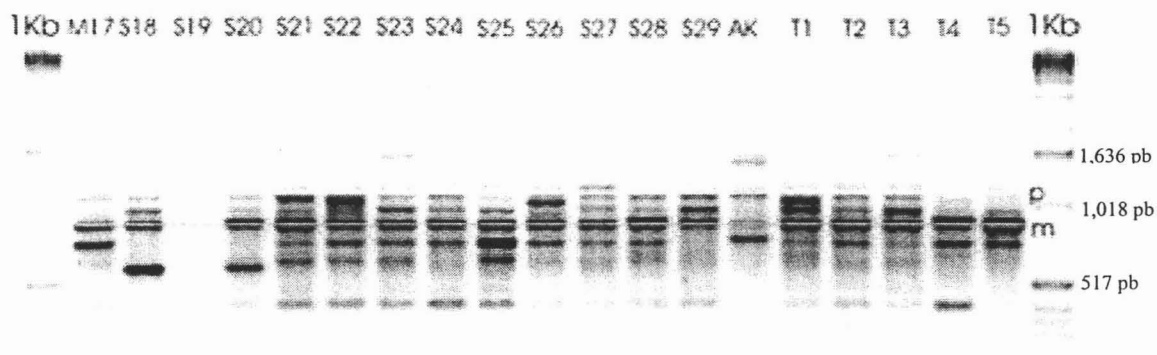


Figura 8. Electroforésis en gel que muestra la amplificación por RAPD. 1Kb: marcador de peso molecular, S: silvestre, AK: *A. karwinskii*, T: Tilapa, p: banda polimórfica, m: banda monomórfica

El análisis de polimorfismos incluyó solo a los individuos de las poblaciones manejada y silvestre. Los porcentajes de polimorfismos por *primer* son muy altos y varían

entre 89 y 100%, se observa que el porcentaje promedio de polimorfismos por *primer* por población también es alto y varía entre 92 y 98%, los porcentajes promedio de todos los primers para cada población también son altos 93 y 96% y por último el promedio de los promedios de todos los primers por ambas poblaciones también es alto 94% (Cuadro 3). Cabe señalar que dentro la población en manejo se encontró un mayor número de bandas polimórficas que no son estadísticamente diferentes ($p > 0.05$).

Cuadro 3. Índice de polimorfismos

Cebador	Número de bandas			Porcentajes.		
	Total de bandas observadas	Polimórficas población en manejo (M)	Polimórficas Población silvestre (S)	Manejo (M)	Silvestre (S)	PROMEDIO
A02	12	11	11	92	92	92
B05	24	23	24	96	100	98
B20	17	17	16	100	94	97
C07	14	13	13	93	93	93
G06	19	19	17	100	89	95
J13	18	17	16	94	89	92
Total	104 bandas	100 bandas	97 bandas	96	93	94

Índice de similitud

Del análisis comparativo con el índice de similitud de Jaccard y agrupado con el programa UPGMA (Figura 9), se obtuvo que las distancias genéticas varían en un rango entre 0.653 y 0.386, lo cual refleja que las diferencias entre los individuos de diferentes poblaciones son altas. El índice de correlación del árbol producto de la prueba de Mantel (r) fue de 0.714 (1000 permutaciones), lo cual es un valor bajo y marca agrupaciones no estrictas. El punto de corte calculado es 0.35, el cual indica que todas las asociaciones a la izquierda del punto de corte son estadísticamente confiables, una segunda prueba con el programa winboot (International Rice Research Institute; Yap & Nelson, 1996) corroboró las relaciones entre éstos individuos en un 72.4 % con 500 repeticiones.

De acuerdo al patrón de agrupamiento se puede notar que 17 individuos de la zona manejada se agrupan en el mismo brazo del árbol de similitud y 10 individuos de la zona silvestre se agrupan en otro brazo con solo dos individuos del área de manejo, razón por la cual se realizó una subdivisión de cada población para el análisis que se describe más adelante.

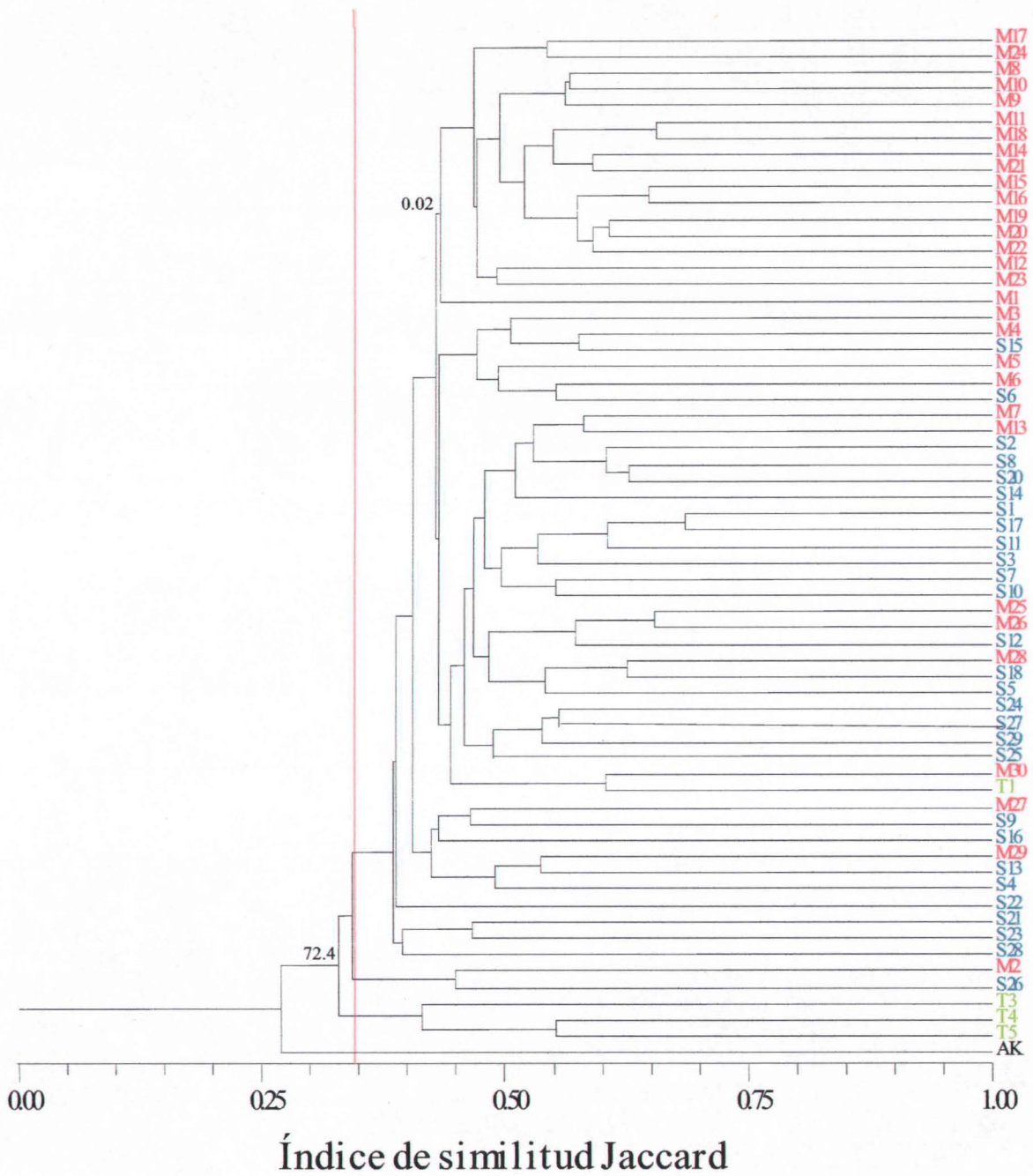


Figura 9. Índice de similitud Jaccard agrupado por UPGMA. La línea vertical muestra el punto de mejor corte. Los valores sobre las líneas muestran los porcentajes de estabilidad en la rama

PCO

El agrupamiento tridimensional que resulta del agrupamiento por el índice de similitud de Jaccard se muestra en la figura 10, donde se nota claramente la separación por condición de manejo en relación con los individuos silvestres que se encuentran mezclados con algunos individuos de la población manejada y los de Tilapa, el individuo de *A. karwiskii* se encuentra perfectamente aislado de las poblaciones de *A. marmorata*.

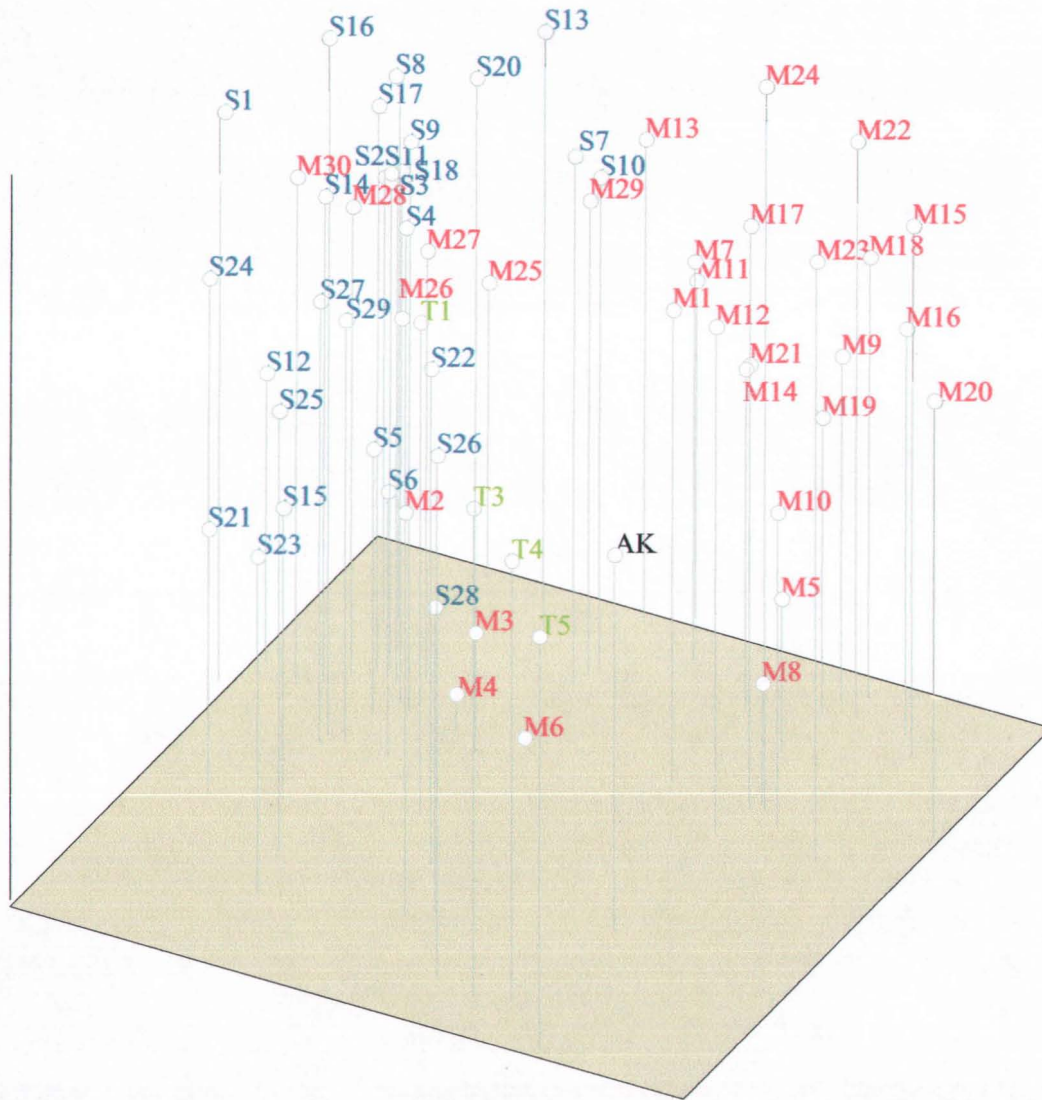


Figura 10. Análisis de coordenadas principales en tres dimensiones (PCO)

Índice de Shannon

La variabilidad genética entre las poblaciones, calculada por el índice de Shannon G'_{ST} es de 0.048 lo cual indica que la variación se debe a la diferencia entre las poblaciones y el 95.2 se atribuye a las diferencias dentro de las poblaciones. La variabilidad genética por población dentro de la especie toma valores entre 0.976 y 0.926, lo cual nos dice que el aporte de cada población para la variabilidad genética de la especie es alto (Cuadro 4).

Por otro lado, la heterocigocidad observada en ambas poblaciones se muestra en el mismo cuadro, en la cual se observa que la probabilidad por locus corresponde a la esperada por el equilibrio Hardy-Weinberg, los resultados en la prueba χ^2 cuadrada muestra la probabilidad de aceptar la hipótesis nula, lo cual nos indica que la probabilidad en cada población no difiere significativamente por la esperada en una población en equilibrio (0.5), al mismo tiempo el análisis arroja que las poblaciones son estadísticamente idénticas.

Cuadro 4. Variabilidad genética por el índice de Shannon y heterocigosis calculada por el método de Litch. Prueba χ^2 cuadrada (χ^2_{sq}) para heterocigocidad

	$H'_{j\ man}$	$H'_{j\ sil}$	H'_{pop}	H_{sp}	H'_{pop}/H_{sp}	G'_{ST}	$H'e_{man}$	$H'e_{sil}$
A02	4.544	4.429	4.487	4.596	0.976	0.024	0.331	0.344
B05	8.879	8.980	8.929	9.240	0.966	0.034	0.468	0.480
B20	6.742	7.283	7.013	7.535	0.931	0.069	0.467	0.463
C07	4.267	4.298	4.283	4.622	0.926	0.074	0.462	0.437
G06	6.796	6.956	6.876	7.289	0.943	0.057	0.478	0.451
J13	6.682	7.171	6.927	7.138	0.970	0.030	0.446	0.459
					Promedio	0.048	0.442	0.439
	$\chi^2_{sq\ de\ H'e}$		$p_{man\ vs\ esp}$	0.99993060	$p_{sil\ vs\ esp}$	0.99993667	$p_{man\ vs\ sil}$	0.99999994

AMOVA

La Φ_{ST} producto del AMOVA para las poblaciones fue de 0.0658, la variabilidad genética dentro de las poblaciones A es de 93.42% (17.24) y la variabilidad entre las poblaciones (B) es del 6.58% (1.21), $p < 0.0010$ lo cual indica que la mayor proporción de la variabilidad genética se encuentra dentro de las poblaciones. La Φ_{ST} observada es un valor muy bajo y es congruente con resultados para poblaciones de polinización cruzada y con flujo génico alto.

Flujo génico

El flujo génico calculado para las poblaciones manejada y silvestre utilizando Φ_{ST} producto del AMOVA es de 3.549 el cual es mayor que 1 y nos indica que existe alto flujo génico entre ambas poblaciones, también nos dice que las poblaciones no están estructuradas.

Subdivisión de poblaciones

A pesar de saber que las poblaciones no están diferenciadas, la distribución tanto de heterócigos como de polimorfismos es muy similar y el flujo génico es alto y todo apunta a que ambas poblaciones pueden considerarse idénticas estadísticamente hablando, es realizada una subdivisión de ambas poblaciones, de acuerdo a los resultados del agrupamiento por UPGMA y PCO en dónde se nota que 17 individuos de la población en manejo se encuentran dentro del mismo brazo del dendrograma y 10 individuos de la población silvestre se agrupan dentro de la misma rama con solo dos individuos de la población en manejo. Por tal motivo se separa a éstos grupos y se les nombra como población en manejo A (MA), población en manejo B (MB), población silvestre A (SA) y población silvestre B (SB). (Cuadro 5).

Cuadro 5. Descripción de subgrupos

Subgrupos.	Individuos.	Descripción.
Manejo A (MA)	M17, M24, M8, M10, M9, M11, M18, M14, M21, M15, M16, M19, M20, M22, M12 M23 y M1.	Individuos de la población en manejo agrupados en el mismo brazo del dendrograma.
Manejo B (MB)	M3, M4, M5, M6, M7, M13, M25, M26, M28, M30, M27, M29 y M2.	Individuos de la población en manejo que comparten los brazos del agrupamiento con los de la población silvestre.
Silvestre A (SA)	S8 S20 S14 S1 S17 S11 S3 S7 S10 S2.	Individuos de la población silvestre que se encuentran dentro del mismo brazo del cladograma solo lo comparten con 2 individuos de la población en manejo.
Silvestre B (SB)	S15, S6, S12, S18, S5, S24, S27, S29, S25, S9, S16, S13, S4, S22, S21, S23 y S28.	Individuos de población silvestre que comparten los brazos del agrupamiento con individuos de población en manejo

A partir de éste punto se muestran resultados de acuerdo a la subdivisión establecida.

Índice de polimorfismos

Los porcentajes de polimorfismos por primer varían entre 53 y hasta 95 %, el subgrupo que presenta menor número de polimorfismos es SA y el que presenta mayor número es SB, el promedio de polimorfismos por locus por subgrupo es de 85 % el cual es un valor alto y representa variabilidad genética alta (cuadro 6). En estos datos es de resaltar que la población silvestre debe la mayor parte de su variabilidad genética al subgrupo SB, los grupos MA y MB son muy similares entre sí.

Cuadro 6. Índice de polimorfismos para subgrupos

	Bandas observadas	Porcentajes								
		MA	MB	SA	SB	MA	MB	SA	SB	Promedio
A02	12	11	11	9	11	92	92	75	92	88
B05	24	22	20	20	22	92	83	83	92	88
B20	17	14	16	14	16	82	94	82	94	88
C07	14	11	12	8	13	79	86	57	93	79
G06	19	18	16	10	17	95	84	53	89	80
J13	18	14	17	16	15	78	94	89	83	86
TOTAL	104	90	92	77	94	86	89	73	91	85

Índice de Shannon

La variabilidad entre los subgrupos G'_{ST} calculada por el índice de Shannon es de 0.129 y dentro de las poblaciones es de 0.871, que traducidos a porcentajes son 12.9 y 87.1% respectivamente, lo cual indica que los subgrupos no están diferenciados entre sí y que la variabilidad genética se encuentra dentro de los subgrupos.

La heterocigocidad calculada para cada *primer* por subgrupo varía entre 0.2997 y 0.4920 y la prueba de χ^2 muestra que todas los subgrupos se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg. Los valores de variabilidad así como los de heterocigocidad se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Variabilidad genética por el índice de Shannon, heterocigocidad calculada por el método de Lynch y prueba $Xi\ sq$ para los subgrupos.

	H'_{jMA}	H'_{jMB}	H'_{jSA}	H_{jSB}	H_{pop}	H'_{sp}	H'_{pop}/H'_{sp}	G'_{ST}	H'_{eMA}^1	H'_{eMB}^2	H'_{eSA}^3	H'_{eSB}^4
A02	4.105	4.784	3.126	4.806	4.205	4.596	0.915	0.085	0.307	0.361	0.300	0.367
B05	8.745	7.937	7.505	8.525	8.178	9.240	0.885	0.115	0.469	0.467	0.450	0.492
B20	4.752	7.203	6.374	7.405	6.433	7.535	0.854	0.146	0.463	0.471	0.465	0.461
C07	3.609	4.125	2.876	4.606	3.804	4.622	0.823	0.177	0.465	0.457	0.452	0.428
G06	7.105	5.303	4.286	7.112	5.951	7.289	0.816	0.184	0.479	0.477	0.446	0.454
J13	5.850	6.595	7.429	6.681	6.639	7.138	0.930	0.070	0.427	0.468	0.453	0.462
	Promedio						0.871	0.129				
	$Xi_{sub\ vs\ obs}$				0.99986 ¹	0.999971 ²	0.99982 ³	0.99996 ⁴				

AMOVA

La Φ_{ST} producto del AMOVA es de 0.093 el cual es un valor bajo y refleja variabilidad dentro de las poblaciones, la variabilidad dentro de las poblaciones A es de 90.73% (16.59) y entre las poblaciones B es de 9.27% (1.69) con $p < 0.0010$ con 1000 permutaciones y 3 g.l. Los valores de Φ_{ST} pareada son utilizados como índice de disimilitud para construir un dendrograma por UPGMA (Figura 11) y PCA (Figura 12), oscilan entre 0.0364 y 0.1511 los mismos valores son utilizados para calcular el flujo génico entre las poblaciones.

Dendrograma

La representación gráfica muestra que los subgrupos más parecidos entre sí son MB y SB, que forman un nodo con SA, la población más separada es MA, el agrupamiento concuerda con el motivo de la separación en subgrupos y agrupa como un solo nodo a los subgrupos que incluyen a la población silvestre.

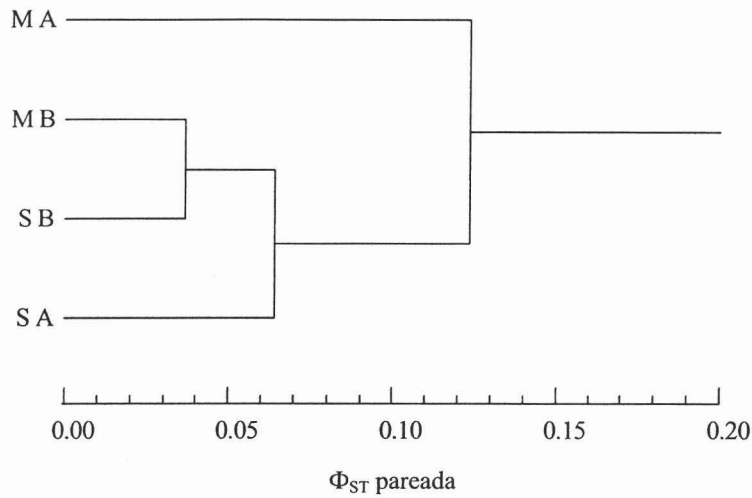


Figura 11. Representación gráfica de la similitud entre subgrupos

PCO

A partir de la Φ_{ST} pareada del AMOVA, fue realizado un análisis PCO para visualizar las relaciones entre las poblaciones, los componentes que mejor relacionaron a los subgrupos son 1 y 2 fue añadida una red de tendido mínimo para su mejor evaluación (Figura 12), se muestra nuevamente la asociación que es más estrecha entre los subgrupos SA, SB y MB, Siendo el más lejano el subgrupo MA.

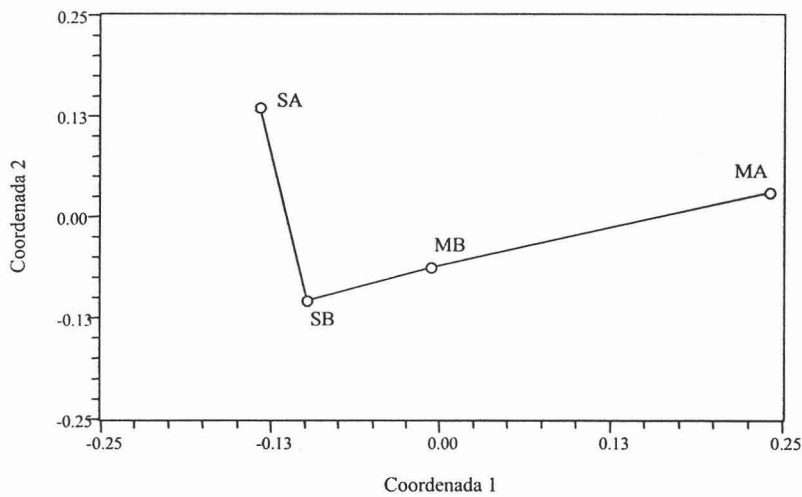


Figura 12. PCO con red de tendido mínimo para los subgrupos.

Flujo génico

El flujo génico calculado para todos los subgrupos es de 5.486, 3 g. l. lo cual indica que los subgrupos no están estructurados y comparten alelos entre ellos. El flujo génico fue calculado entre datos pareados para evaluar el aporte de loci entre los subgrupos teniendo como mínimo 1.405 y como máximo 6.618. Los valores se muestran en el cuadro 8.

Cuadro 8. Flujo génico y Φ_{ST} entre los subgrupos

		Φ_{ST}			
		<i>MA</i>	<i>MB</i>	<i>SA</i>	<i>SB</i>
N_{em}	<i>MA</i>		0.0845	0.1511	0.1347
	<i>MB</i>	2.709		0.0649	0.0364
	<i>SA</i>	1.405	3.602		0.0629
	<i>SB</i>	1.606	6.618	3.725	
N_{em}		5.486	Φ_{ST}	0.093	

DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta que la evaluación de la diversidad genética es muy importante para conocer el estado en el que se encuentra la riqueza de formas y condiciones alternativas que pueda tomar una especie en su medio, es de entenderse que se está evaluando la biodiversidad, aunque al nivel particular de las poblaciones.

Agave marmorata es una especie importante para los ecosistemas del valle de Zapotitlán y representa la principal fuente de néctar en el período de Mayo a Junio y esto lo sitúa como la principal fuente de alimento de aves, murciélagos e insectos. La presencia de ésta especie dentro del valle es vital para el funcionamiento de la comunidad (Ornelas, 2002).

Es por esto que los estudios acerca de la especie toman una dimensión mayor al conocer la importancia que tiene la misma para el ecosistema. La variabilidad genética viene a ser una medida importante para determinar el estado de conservación en el que se encuentran las poblaciones y por ende se puede evaluar si los mecanismos de propagación y dispersión son saludables, ya que la variabilidad genética se mantiene a través de ambos.

El evaluar dos condiciones de manejo, uno de conservación y el otro manipulativo, está justificado por los diversos usos para los que la especie funciona como recurso, como ya se ha dicho, la extracción de individuos a largo plazo genera empobrecimiento genético y en casos extremos la extinción de las especies, es por esto que la presente evaluación de la diversidad genética tuvo como fin evaluar cuál es el efecto de la condición de manejo manipulativo sobre la diversidad genética en la actualidad utilizando como referencia una población silvestre.

Utilizando solamente el porcentaje de polimorfismos observados en ambas poblaciones, podemos notar que la variabilidad tiende a ser mayor en la población en manejo que en la condición silvestre, esto parece ser un dato contradictorio, pero los datos no difieren significativamente entre ellos ($p < 0.05$), lo cual nos habla de identidad en variabilidad. El porcentaje de polimorfismos por loci y poblaciones es de 94% lo cual nos habla de variabilidad genética alta dentro de la especie.

El grado de variabilidad genética de ambas poblaciones es alto cuantificado por dos métodos distintos ($G'_{ST} 0.048$, $\Phi_{ST} 0.0658$) y la mayor cantidad de variabilidad genética

se encuentra dentro de las poblaciones. Los niveles de heterocigocidad no difieren significativamente de los esperados por el equilibrio Hardy-Weinberg. Esto nos habla del alto nivel de entrecruzamiento que existe en la especie y que los mecanismos de dispersión se encuentran conservados y lo confirma el alto flujo génico que existe entre ambas (3.549), hasta el momento todos los datos son congruentes, ya que *A. marmorata* tiene polinización obligadamente cruzada y está mediada por vectores animales los cuales suelen ser muy efectivos en el mantenimiento de la diversidad genética. La dispersión de las semillas está mediada por el viento, el cual es efectivo en comunidades dónde predominan especies arbustivas y columnares. La combinación de ambos elementos puede ser la razón por la cual el mantenimiento de la diversidad genética es efectivo. La propagación clonal juega también un papel efectivo en el mantenimiento de la variabilidad, según Gentry (1982), la propagación por semilla genera casi la misma cantidad de los individuos producto de propagación clonal. Sin embargo, estudios actuales, revelan que la propagación clonal es preferente sobre la propagación por semilla en *A. marmorata* (Jiménez *com. pers.*) en tales condiciones los clones funcionan como un amortiguador ya que mantienen la diversidad genética de un individuo por varias generaciones al ser *A. marmorata* una planta semélpara y en el caso de *A. fourcroydes* (Infante *et al*, 2003) se ha visto que también aumenta la variabilidad por éste tipo de reproducción. Dicho de otro modo, un equilibrio entre la reproducción sexual y clonal ayudan al mantenimiento de la variabilidad genética de la especie.

El agrupamiento por distancias genéticas, evaluadas por el índice de similitud de Jaccard, sugiere que las distancias genéticas entre los individuos son altas y varían en rangos entre 0.653 y 0.386, lo cual habla de la similitud de las distancias, probablemente es por ésta condición que el agrupamiento es poco confiable ($r = 0.714$), ya que por la disimilitud entre los individuos no se pueden establecer un valor confiable de la correlación entre los individuos. Para la población el agrupamiento refleja salud en términos evolutivos, aunque es de notarse que a pesar que las distancias sean altas, algunos individuos sobretodo de la población en condición de manejo se agrupan en el mismo brazo del dendrograma.

Probablemente no se han detectado efectos del manejo manipulativo sobre la variabilidad genética porque la reproducción de individuos en el valle de Zapotitlán Salinas no está mediada por la selección artificial y cultivo para su propagación. Hasta el momento

en términos generales, no se puede atribuir un efecto de empobrecimiento genético producto de la condición de manejo en términos estadísticos, mas bien nos habla de identidad genética entre ambas poblaciones, esto es un panorama alentador, ya que habla de una población sana que traducido a una condición geográfica se puede hablar de la misma población desde las granjas hasta la población del jardín botánico.

Aunque existe la posibilidad de atribuir la similitud en los índices de polimorfismos entre ambas poblaciones a la variabilidad presente en una población ancestral de *A. marmorata* que se distribuía en la zona analizada del Valle de Zapotitlán y ambas poblaciones sean producto de la fragmentación de la población inicial y la fragmentación ha sido tan reciente que el tiempo no ha sido suficiente para diferenciarlas genéticamente. De éste modo podría justificarse la evaluación de presencia de flujo génico. Para evaluar correctamente tal panorama, es necesario extender los estudios de variabilidad genética a todo el Valle de Zapotitlán Salinas, combinados con la correcta identificación geográfica de cada individuo para detectar por similitud la distribución ancestral de cada población y es por esto que el presente estudio se limita a utilizar el flujo génico como una medida de características genéticas compartidas que reflejan que hasta el momento no ha ocurrido un fenómeno de estructuración genética poblacional.

Tomar como única justificación el agrupamiento de los individuos para la subdivisión de ambas poblaciones es una decisión totalmente arbitraria, pero va encaminada a detectar la formación de subdivisiones de una población en términos genéticos. Si bien, solo los datos de las poblaciones en condición de manejo y silvestre deben ser considerados como confiables por el claro establecimiento de las poblaciones en el análisis desde su inicio, la subdivisión en subgrupos debe tomarse en cuenta como un ejercicio de cómo puede afectar en los parámetros de variabilidad genética la subdivisión de poblaciones dentro de un ambiente natural.

La variabilidad genética medida por el porcentaje de polimorfismos promedio es de 84%, siendo por un lado un subgrupo de la población silvestre el de mayor porcentaje de polimorfismos (SA 91%) y por otro, el segundo subgrupo de silvestres es el que menor porcentaje posee de polimorfismos (SB 73%), estos datos comparados como promedio en una población no son evidentes para el análisis comparativo, pero analizados en detalle pueden ser la diferencia en análisis con un fundamentos biológicos más profundos. En

general los índices de polimorfismos son más bajos comparados contra aquellos en dónde la población no se ha subdividido.

La variabilidad genética entre subgrupos cuantificada por dos métodos distintos (G'_{ST} 0.129 y Φ_{ST} 0.093) nos habla de que la variabilidad entre los subgrupos es baja y dentro de ellos es alta, que de ser poblaciones bien definidas geográficamente y de acuerdo al flujo génico calculado (N_{em} 5.486) las poblaciones no estarían estructuradas, aunque el menor valor de N_{em} registrado es el que comparten los subgrupos MA y SA (1.405) que de ser poblaciones definidas, serían los que menos características comparten entre ellos. Los datos son casi tres veces mayores a los obtenidos para las poblaciones sin dividir, la presente condición debe ser considerada al establecer estudios de variabilidad genética. La heterocigocidad calculada para cada locus en cada subgrupo no difiere significativamente de los esperados por el equilibrio Hardy-Weinberg.

Los agrupamientos por similitud muestran claramente que los subgrupos que comparten individuos de la población silvestre (MB, SA y SB), se agrupan entre sí y la mayor diferencia la encuentran con el subgrupo de la condición de manejo (MA). Es de notarse que la mayor similitud se encuentra entre los subgrupos para los cuales no se tiene un criterio de agrupamiento (SB y MB).

Si bien las poblaciones no están estructuradas genéticamente, si es de llamar la atención que la mayor distancia entre las poblaciones sea la de los subgrupos silvestres contra el grupo de individuos exclusivo de manejo (MA). Probablemente, a pesar de que la estabilidad de la rama de el agrupamiento dónde se organizan individuos de condición de manejo sea baja y muy probablemente dependa del azar, también nos habla de que los individuos se agrupan por su similitud y puede ser producto de un estado muy inicial de la reproducción entre individuos familiares cercanos, los datos presentados en el presente análisis sugieren ser resultado de una etapa muy inicial de cómo el manejo puede afectar sobre la variabilidad genética. Así entonces el establecimiento de grupos que comparten características en común en una etapa dónde la variabilidad genética no ha sido reducida (medida cómo índice), puede ser el principio de la pérdida de la misma.

De ser esto cierto y a medida en que pueda incrementarse por la extracción constante de individuos, se corre el riesgo de perder la variabilidad genética en la población en manejo, esto por eliminar directamente la carga genética que posee cada individuo

dentro de la población, si la extracción de individuos es extensiva, el número de individuos para posibles cruzas será menor y cada vez se presentará un menor número de características a través del tiempo, la evaluación exacta de los efectos de manejo, sobre la variabilidad genética puede solo entenderse a través de las generaciones, sin embargo existen reportes asociados a éste tema en plantas de ciclos de vida largos. La extracción de individuos afecta negativamente la variabilidad genética, por citar un ejemplo, en los bosques de Ontario, Canadá, después de tres cosechas del 75% de la densidad de *Pinus strobus* de individuos adultos, se perdió el 26% de la variabilidad genética (Rajora *et al*, 2000). El caso puede ser comparable a la especie *A. marmorata* en el que se utilizan individuos adultos que no han llegado a su etapa reproductiva, si bien esto debe ser evaluado bajo reserva de que *A. marmorata* presenta también propagación clonal, existen al menos dos ejemplos en dónde la propagación clonal ha sido la principal fuente de propagación asociadas al cultivo para uso humano: uno de ellos es *A. fourcroydes*, utilizado principalmente como fibra, que en la evaluación de la variabilidad genética solo dos de 33 enzimas eran polimórficas esto indica una pérdida notable de la variabilidad (Colunga *et al*, 1999), posteriormente fue detectada mayor variabilidad genética producto de AFLP's en dos etapas distintas, en condiciones de cultivo e *in vitro*, con tales marcadores fueron detectados tanto variabilidad genética como el incremento en la misma (González *et al*, 2003), el simple hecho del bajo nivel de polimorfismo en electromorfos es un dato preocupante, el segundo es el caso más impresionante de pérdida de la variabilidad de la familia Agavaceae, *A. tequilana* var Azul utilizado para la elaboración de tequila, presentó solo una banda polimórfica en un estudio realizado con RAPD lo cual indica la pérdida casi total de su variabilidad genética (Gil-Vega *et al*, 2001). Ambos ejemplos nos hablan de la susceptibilidad de la familia Agavaceae no solo para el manejo mediante cultivo, sino de la pérdida de la variabilidad genética atribuible al manejo.

La idea de utilizar *A. marmorata* como recurso para fines humanos, no es nueva y el posible uso va dirigido desde la extracción de las comunidades naturales hasta el cultivo (Espinosa, 2004). El manejo que debe adoptarse para ésta especie no debe ser solo del establecimiento de una reserva dónde no se permita el uso de la especie. Los agaves han sido importantes para el desarrollo de las culturas americanas y en especial de las del centro

de México (Gioanetto y Franco, 2004) desde épocas prehispánicas y por ende no se debe discriminar su uso.

La riqueza de formas en la que se utiliza *A. marmorata* como recurso, debe también protegerse y es por esto que es muy delicado plantear una estrategia para su conservación. Una alternativa para conservar tanto la riqueza de la variabilidad genética como la riqueza de usos de la especie puede ser el establecimiento por un lado, de áreas naturales protegidas dónde los niveles de variabilidad genética sean más altos y por otro lado el cultivo intensivo de la especie para conservar las formas de uso de los pobladores en áreas dónde ha desaparecido u otros cultivos no han funcionado. Por el momento, para mantener la variabilidad genética se debe instruir un plan urgente de manejo dónde se instruya a la gente a utilizar solo individuos que ya tengan hijuelos para asegurar su permanencia al menos en la siguiente generación.

Es por esto que es urgente detectar los niveles de variabilidad genética de las zonas de distribución de *A. marmorata*, complementado con un estudio demográfico para evaluar tanto la diversidad genética como el comportamiento demográfico poblacional en los que se encuentran las poblaciones actualmente para plantear adecuadamente una alternativa de manejo, los comentarios personales obtenidos hasta el momento (Jiménez, *com. pers.*), son preocupantes, ya que en su estudio se nota claramente que la distribución de estructura por tamaño en las poblaciones en manejo, está fuertemente cargada hacia la abundancia de individuos juveniles, eliminando individuos adultos y juveniles y esto tiene una doble consecuencia, por un lado no se generan semillas por lo tanto no se producen plántulas por germinación y por el otro se elimina la condición de nodricismo que necesitan para su desarrollo los individuos producto de propagación clonal. A nivel demográfico al parecer, sí existen consecuencias del manejo y de seguir este proceso está destinada la desaparición de las poblaciones en tal condición a corto plazo.

El panorama puede ser desalentador si las condiciones del manejo siguen en la misma proporción, sin embargo, existe en los individuos analizados en el presente estudio, el potencial para mantener la variabilidad genética de la población en manejo y es por esto que toma mayor importancia la implementación de un plan en el que se asegure el mantenimiento de la variabilidad genética.

El estado actual de las dos poblaciones de *A. marmorata* en su variabilidad genética nos ofrece una oportunidad única para plantear adecuadamente estudios y planes de manejo dirigidos a la conservación de la especie así como la riqueza de usos asociados.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

CONCLUSIONES

Agave marmorata **Roezl** presentó altos niveles de variabilidad genética y lo cual sugiere que en el Valle de Zapotitlán, la salud de las poblaciones es estable.

En las poblaciones el flujo génico es alto entre ambos grupos y subgrupos, y las poblaciones no están genéticamente estructuradas y de esta manera se infiere que los sistemas de entrecruzamiento y dispersión mantienen el movimiento de loci entre las poblaciones.

Puede considerarse a las poblaciones analizadas en términos genéticos para los parámetros analizados como la misma población.

En la actualidad la condición de manejo manipulativo no ha tenido efectos detectables sobre la variabilidad genética. Sin embargo se observó un efecto incipiente sobre algunos organismos manejados.

Es necesario realizar estudios demográficos de las poblaciones del valle y ser extensivos a toda la zona de distribución de *Agave marmorata*, para evaluar más a fondo la condición de manejo y la variabilidad genética de la especie.

La variabilidad genética actual es una oportunidad única para implementar un plan de manejo en el que se protejan tanto la especie como los usos y costumbres asociados a ésta especie.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilera N. 1970. Suelos de las zonas áridas de Tehuacán Puebla y sus relaciones con las cactáceas. *Cactáceas y succulentas mexicanas* **15**: 51-63.

Allard RW. 1975. The matting system and microevolution. *Genetics* **79**: 115-126.

Allen TF, Starr TB. 1982. Hierarchy: Perspectives for Ecological Complexity. *University of Chicago Press*, Chicago.

Amos W, Harwood J. 1998. Factors affecting genetic diversity in natural populations. *Phil. Trans. Royal. Society of London B*. **353**: 177-186.

Arizaga S, Ezcurra E. 2002. Propagation mechanism in *Agave macroacantha* (Agavaceae), A tropical arid-land succulent rosette. *American Journal of Botany* **89**(4): 632-641.

Ashley MV, Wilson MF, Pergams OR, O' Dowd DO, Gende SM, Brown JS. 2003. Evolutionarily enlightened management. *Biological Conservation* **111**: 115-123.

Becerra V, Paredes M. 2000. Uso de marcadores bioquímicos en el estudio de la diversidad genética. *Agricultura Técnica* **60**(3): 270-281.

Bolger T. 2001. The functional value of species biodiversity: a review. *Biology and Environment. Proceedings of the Royal Irish Academy*. **101B** 3: 199-224.

Blanckaert I, Swennen RL, Paredes-Flores R, Rosas-López, Lira-Saade R. 2004. Floristic composition, plant uses and management practices in homegardens of San Rafael Coxcatlán, Valley of Tehuacán-Cuicatlán, México. *Journal of Arid Environments* **57**: 39-62.

Bussell JD. 1999. The distribution of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) diversity among population of *Isotoma petraea* (Lobeliaaceae). *Molecular Ecology* **8**: 775-789.

Charlesworth D, Wright S. 2001. Breeding systems and genome evolution. *Current Opininn in Genetics & Development* **11**: 685-690.

Colunga García-Marín P, Coello-Coello J, Eguiarte LE, 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.

Dahlgren RMT, Clifford HT, Yeo PF. 1985. The families of the monocotyledons. Structure, evolution and Taxonomy. *Springer Berlag*. Berlin.

Dávila P (resp). 2002. La Flora Util de Dos Comunidades Indígenas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: Zapotitlán Salinas y San Rafael Coxcatlán, Puebla. *Informe final del Proyecto T015. CONABIO* pp 1-74.

Dobzhansky T, Ayala F, Stebbins G, Valentine J. 1988. Evolution. *Ed. Omega*. 558pp. Barcelona.

Ellsworth DL, Rittenhouse KD, Honeycut RL. 1993. Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques* **14**: 214-217.

Escudero A, Iriondo JM, Torres ME. 2003. Spatial analysis of genetic diversity as tool for plant conservation. *Biological Conservation* **113**: 351-365.

Espinosa P, Arredondo V, Cano G, Canseco L, Vázquez F. 2004. Diversidad genética del maguey mezcalero oaxaqueño (resum). *En IV Simposio internacional sobre Agavaceae y Nolinaceae los agaves de importancia económica en México*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. Del 3 al 5 de marzo de 2004 Mérida, Yucatán.

Felsenstein J. 2000. SEQBOOT (v 3.6) Bootstrap, jackknife, or permutation resampling of molecular sequence, restriction site, gene frequency or character data. University of Washington.

García E. 1987. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köpen (para adaptarlo a las condiciones climáticas de la república mexicana). *Instituto de Geografía UNAM*. México DF. 4ta Ed.

Gentry HS. 1982. Agaves of continental North America. Tucson, EUA. *University of Arizona Press*. 670p.

Gioanetto y E. Franco J. Usos medicinales y etnobotánicos de las Agavaceae y Nolinaceae en México y Centroamérica. *En IV Simposio internacional sobre Agavaceae y Nolinaceae los agaves de importancia económica en México*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. Del 3 al 5 de marzo de 2004 Mérida, Yucatán.

Gil Vega K, González Chavira M, Martínez de la Vega O, Simpson J, Vandemark G. 2001. Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. *Azul* using RAPD markers. *Euphytica* **119**: 335-341.

González G, Alemán S, Infante D. 2003. Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes* II: selection among individuals in a clonally propagated population. *Plant Science* **165**: 595-601.

Hartl DL. 1999. A primer of population genetics. *Sinauer Associates Inc*. Massachusetts EUA 221pp.

Hidalgo C. 2001. Introducción al manejo de la vida silvestre. *Escuela de ciencias biológicas UNA*. 1-7pp.

- Infante D, Gonzáles G, Peraza-Echeverría L, Keb-Llanes M. 2003. Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes*. *Plant Science* **164**: 223-230.
- Jiménez M, Caballero J, Godínez HO, Lira-Saade R. 2004. Evaluación del efecto de las formas de aprovechamiento sobre la dinámica poblacional de *Agave marmorata* **Roehl.** Agavaceae en el valle de Tehuacán-Cuicatlán: un estudio demográfico. *En IV Simposio internacional sobre Agavaceae y Nolinaceae los agaves de importancia económica en México.* Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. Del 3 al 5 de marzo de 2004 Mérida, Yucatán.
- Karp A, Buiatti M. 1996. Molecular techniques in the assesment of botanical Diversity. *Annals of Botany* **78**:143-149.
- Kohut R. 2003. The long-term effects of carbon dioxide on natural systems: issues and research needs. *Environment International* **29**: 171-180.
- Kumar LS. 1999. DNA markers in plant improvement: an overview. *Biotechnology Advances* **17**: 143-182.
- Linch M, Milligan BG. 1994. Analisis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* **3**: 91-99
- López-Galindo F, Muñoz-Iniestra D, Hernández-Moreno M, Soler-Aburto A, Castillo-López MC, Hernández-Arzate I. 2003. Análisis integral de la toposecuencia y su influencia en la distribución de la vegetación y la degradación del suelo en la Subcuenca de Zapotitlán Salinas, Puebla. *Boletín de la sociedad geológica mexicana* **56**(1); 19-41
- López-Urrutia E. 2004. Variabilidad genética de la población *Agave karwinskii* Zucc. en el Valle de Zapotitlán Salinas Puebla. *Tesis de licenciatura.* FES Iztacala, UNAM. 51pp.
- Loveless MD, Hamrick JL. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Reviews in Systematics* **15**; 65-95.
- Martínez-Palacios A, Eguiarte LE, Furnier GR. 1999. Genetic Diversity of the Endangered Endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert. *American Journal of Botany* **86**(8): 1093–1098.
- Martínez-Ramírez S, Pedro-Santos EC, Sustaita-Rivera F. 2001. Recomendaciones técnicas para el manejo sustentable de los recursos florísticos, edáficos e hídricos en la cuenca alta del Río Mixteco. *Temas de ciencia y tecnología* **5** (15); 3-19.
- McNeely JA, Miller KR, Reid WV, Mittermeier RA, Werner TB. 1990. Conserving the world's biological diversity. *International union for conservation of nature and natural resources, gland, Switzerland; World wildlife fund-US and the world bank, Washington, DC, 193pp.*

Navarro-Quezada A, Gonzáles-Chauvet R, Molina-Freaner F, Eguiarte LE. 2003. Genetic differentiation in the *Agave deserti* (Agavaceae) complex of the Sonoran desert. *Heredity* **90**: 220–227.

Noss RF. 1990. Indicators for Monitoring Biodiversity: a Hierarchical Approach. *Conservation Biology* **4**, 355-364.

Noss RF. 1992. Issues of Scale in Conservation Biology. En: Savard JL, Clergeau P, Mennechez G. 2000. Biodiversity concepts and urban ecosystems. *Landscape and Urban Planning* 131pp.

Odum EP. 1972. Ecología. *Nueva Editorial Interamericana*. Tercera Edición. México D.F 639p

Oostermeijer JGB, Luisten SH, De Nigs SCM. 2003. Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation. *Biological Conservation* **113**:389-398.

Ornelas JF, Ordano M, Hernández A, López JC, Mendoza L, Perroni Y. 2002. Nectar oasis produced by *Agave marmorata* Roezl (Agavaceae) lead to spatial and temporal segregation among nectarivores in the Tehuacán Valley, México. *Journal of Arid Environments* **52**: 37-51.

Otero A, De la Cruz M, Oyama K. 1997. El uso de los RAPD como marcadores moleculares en plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **60**: 85-117.

Ouborg NJ, Piquot Y, Van Groenendael JM. 1999. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology* **87**: 551-568.

Rajora OP, Rahman MH, Buchert GP, Dancik BP. 2000. Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobus*) in Ontario, Canada *Molecular Ecology* **9**: 339–348

Rzedowski J. 1978. Vegetación de México. *Editorial Limusa*. México DF.

Savard JL, 1994. General Concepts related to biodiversity. Biodiversity in Canada: A Science Assesment for Environment Canada. *Environment Canada*, Ottawa, pp. 9-40.

Savard JL, Clergeau P, Mennechez G. 2000. Biodiversity concepts and urban ecosystems. *Landscape and Urban Planning* **48**: 131-142.

Silva-Montellano A y Eguiarte LE. 2003. Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. II. Genetic variation, differentiation, and inbreeding estimates. *American Journal of Botany* **90**(5): 700–706.

Smith EC. 1965. Flora of Tehuacán Valley. *Fieldiana Botany* **31**: 107-143.

Soberón J *tit*. 2002. CONABIO. *Biodiversitas*. Año 6 **44** 1-20pp.

Valiente Banuet A, Casas A, Alcántara A, Dávila P, Flores-Hernández N, Arizmendi MC, Villaseñor JL, Ortega J. 2000. La vegetación del Valle de Tehuacan-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **67**: 24-74.

Valiente L. 1991. Patrones de precipitación del Valle semi-árido de Tehuacán Puebla, México. Tesis. *Facultad de Ciencias UNAM*. México DF.

Valverde PL, Vite F, Zavala-Hurtado JA. 1996. A morphometric analysis of a putative hybrid between *Agave marmorata* **Roezl** and *Agave kerchovei* **Lem.**: *Agave peacockii* **Croucher**. *Botanical Journal of the Linnean Society* **122**: 155-161.

Villaseñor JL, Dávila P, Chiang F. 1990. Fitogeografía del Valle de Tehuacan-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **50**: 135-149.

Vodenicharova M. 1982. Use of proteins as molecular genetic markers in plants. *Genetics Selection*. **22**: 269- 277.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingley SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers as useful as genetic markers. *Nucleic Acids Reseach* **18**: 6531-6535.

Yap IB y Nelson R. 1996. Winboot: A program for performing bootstrap análisis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms. International Rice Research Institute. Philipinnes.

Zavala-Hurtado JA. 1982. Estudios ecológicos en el valle semiárido de Zapotitlán Salinas, Puebla. I Clasificación numérica de la vegetación basado en atributos binarios de presencia ausencia de las especies. *Biotica* **7**: 99-120.

APÉNDICE 1

Breve descripción de los individuos colectados.

Clave	Localidad	Etapas	Variedad
S1	Jardín botánico	Juvenil	Blanca
S2	Jardín botánico	Adulto	Amarilla
S3	Jardín botánico	Adulto	Amarilla
S4	Jardín botánico	Adulto	Amarilla
S5	Jardín botánico	Adulto	Amarilla
S6	Jardín botánico	Adulto	Amarilla
S7	Jardín botánico	Adulto	Amarilla
S8	Jardín botánico	Juvenil	Amarilla
S9	Jardín botánico	Juvenil	Amarilla
S10	Jardín botánico	Adulto	Amarilla
S11	Jardín botánico	Juvenil	Blanca
S12	Jardín botánico	Juvenil	Blanca
S13	Jardín botánico	Juvenil	Blanca
S14	Jardín botánico	Juvenil	Blanca
S15	Jardín botánico	Juvenil	Amarilla
S16	Jardín botánico	Juvenil	Amarilla
S17	Jardín botánico	Juvenil	Blanca
S18	Jardín botánico	Juvenil	Blanca
S19	Jardín botánico	Juvenil	Blanca
S20	Jardín botánico	Juvenil	Blanca
S21	Jardín botánico	Adulto	Amarilla
S22	Jardín botánico	Juvenil	Blanca
S23	Jardín botánico	Adulto	Amarilla
S24	Jardín botánico	Adulto	Blanca
S25*	Jardín botánico	Adulto	Blanca
S26	Jardín botánico	Juvenil	Blanca
S27	Jardín botánico	Juvenil	Amarilla
S28	Jardín botánico	Adulto	Amarilla
S29	Jardín botánico	Adulto	Blanca
M1	Las Granjas	Adulto	Amarilla
M2	Las Granjas	Juvenil	Blanca
M3	Las Granjas	Juvenil	Blanca
M4	Las Granjas	Adulto	Blanca
M5	Las Granjas	Adulto	Amarilla
M6	Las Granjas	Juvenil	Blanca
M7	Las Granjas	Adulto	Blanca
M8	Las Granjas	Adulto	Blanca
M9	Las Granjas	Adulto	Blanca
M10	Las Granjas	Adulto	Blanca
M11	Las Granjas	Juvenil	Blanca
M12	Las Granjas	Adulto	Amarilla
M13	Las Granjas	Juvenil	Amarilla
M14	Las Granjas	Adulto	Amarilla
M15	Las Granjas	Adulto	Amarilla
M16	Las Granjas	Adulto	Amarilla
M17	Las Granjas	Juvenil	Amarilla
M18	Las Granjas	Adulto	Blanca
M19	Las Granjas	Adulto	Amarilla
M20	Las Granjas	Adulto	Amarilla
M21	Las Granjas	Adulto	Blanca
M22	Las Granjas	Adulto	Amarilla
M23	Las Granjas	Juvenil	Amarilla
M24	Las Granjas	Adulto	Amarilla
M25	Las Granjas	Adulto	Amarilla

Breve descripción de los individuos (*continuación*)

Clave	Localidad	Etapa	Variedad
M26	Las Granjas	Juvenil	Blanca
M27	Las Granjas	Adulto	Amarilla
M28	Las Granjas	Adulto	Amarilla
M29	Las Granjas	Adulto	Amarilla
M30	Las Granjas	Adulto	Blanca
T1	Tilapa	Juvenil	Amarilla
T2	Tilapa	Juvenil	Blanca
T3	Tilapa	Juvenil	Amarilla
T4	Tilapa	Adulto	Amarilla
T5	Tilapa	Adulto	Amarilla

* Individuo con inflorescencia

La descripción de los individuos fue realizada con la ayuda del Biól. Miguel Jiménez del Laboratorio de Recursos Naturales de la Unidad de Biología y Prototipos.

APENDICE 2

Extracción de DNA por el método DNeasy Plant Kit (QIAGEN).

1. Moler con nitrógeno líquido un fragmento de hoja de 2 X 2cm hasta obtener un polvo fino y transferir el polvo a un tubo eppendorf de 1.5ml (se obtienen aproximadamente 500 a 800ml de volumen de polvo).
2. Agregar 400µl de la solución AP1 y 2µl de RNasa A. Agitar con vórtex 10 segundos e incubar a 65° C durante 10min. Agitar 2 o 3 veces durante la incubación.
3. Agregar 130µl de la solución AP2 e incubar 5min en hielo.
4. Centrifugar 15min a 14,000rpm.
5. Transferir el sobrenadante a la columna lila (shedder).
6. Centrifugar 2min a 14,000rpm.
7. Recuperar el filtrado y transferir a un tubo eppendorf de 1.5ml, cuidando de no tomar cualquier pastilla de filtrado que llegara a formarse. Se obtienen de 400 a 450µl de filtrado.
8. Agregar 1.5 volúmenes de la solución AP3E (binding buffer) al tubo eppendorf (aproximadamente 625µl) e invertir varias veces.
9. Agregar 750µl de la mezcla a la columna blanca y centrifugar 1min a 8,000rpm. Decantar el filtrado.
10. Agregar el resto de la mezcla a la columna blanca y centrifugar 1min a 8,000rpm. Decantar el filtrado.
11. Agregar 500µl de la solución AW a la columna blanca y centrifugar 1min a 8,000rpm. Para el lavado de DNA.
12. Agregar 500µl de la solución AW a la columna blanca y centrifugar 2min a 14,000rpm. Para secar la membrana.
13. Transferir la columna blanca a un tubo eppendorf de 1.5ml
14. Agregar 100µl de la solución AE preincubada a 65° C e incubar 5min y centrifugar 1min a 8,000rpm para eluir el DNA.
15. Repetir paso anterior y almacenar a -20° C.