

Informe final* del Proyecto CS016 Genética de poblaciones en viveros de *Agave cupreata* e impacto de los planes de manejo en la diversidad y estructuración de esta especie

Responsable: Dr. Luis E Eguiarte Fruns
Institución: Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Ecología
Departamento de Ecología Evolutiva
Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental
Dirección: Circuito Exterior Ciudad Universitaria, Copilco Universidad, Coyoacán, México, DF, 04510 , México
Correo electrónico: fruns@servidor.unam.mx
Teléfono/Fax: Tel: 622 9006 Fax: 616 1976, 622 8995
Fecha de inicio: Noviembre 30, 2004
Fecha de término: Abril 3, 2006
Palabras clave: Genética, Poblaciones, Viveros, *Agave cupreata*, impacto, plan de manejo, Diversidad, Estructuración

Principales resultados: Base de datos, Informe final

Forma de citar el informe final y otros resultados:** Eguiarte Fruns, L. E., González González, A. y E. Sheinvar Gottdiener, 2006. Genética de poblaciones en viveros de *Agave cupreata* e impacto de los planes de manejo en la diversidad y estructuración de esta especie. Universidad Nacional Autónoma de México. **Informe final** SNIB-CONABIO proyecto No. CS016. México.

Forma de citar Hojas de cálculo Eguiarte Fruns, L E., González González, A. y E. Sheinvar Gottdiener, 2006. Genética de poblaciones en viveros de *Agave cupreata* e impacto de los planes de manejo en la diversidad y estructuración de esta especie. Universidad Nacional Autónoma de México. **Hoja de cálculo** SNIB-CONABIO proyecto No. CS016. México.

Resumen:

Este proyecto es la continuación del proyecto V038; se estudiarán los aspectos básicos de la genética de poblaciones de 4 viveros en los que se propaga a *Agave cupreata* por medio de la colecta de semillas de poblaciones naturales y cuyas plántulas permiten reforestar las zonas de distribución natural de esta especie. Es fundamental evaluar si estas prácticas pueden alterar los niveles de diversidad genética y estructuración existentes de manera natural en *A. cupreata* (valores reportados en el proyecto CONABIO V038 como altos en ambos casos). En este proyecto se analizarán muestras de los viveros que fueron colectadas en el proyecto previo, más dos poblaciones silvestres que permitirán ampliar el muestreo de las poblaciones naturales de *A. cupreata* en la región de Chilapa, Gro. Los datos genéticos se obtendrán por medio de ISSRs y se analizarán los niveles de diversidad, estructuración, distancias genéticas y se elaborarán dendrogramas, siguiendo los métodos utilizados en el proyecto CONABIO V038. Los datos se integrarán a las bases de datos de dicho proyecto, y su interpretación global permitirá hacer sugerencias sobre esta estrategia de manejo, cuyas implicaciones afectan directamente la conservación y utilización sustentable de esta especie.

-
- * El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en www.conabio.gob.mx
 - ** El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

“Genética de poblaciones en viveros de *A. cupreata* e impactos de los planes de manejo en la diversidad y estructuración de esta especie”

INFORME FINAL

16 de enero del 2006

PROYECTO CONABIO CS016

LUIS E. EGUIARTE FRUNS
ANDREA GONZÁLEZ GONZÁLEZ
ENRIQUE SHEINVAR GOTTDIENER

DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA EVOLUTIVA

INSTITUTO DE ECOLOGIA

Teléfono 56229006

Dirección postal: Apartado postal 70-275, C.U., UNAM, 0410, Méx. D.F.

Correo-e: fruns@servidor.unam.mx

ANTECEDENTES

Los agaves son un grupo de plantas de gran importancia económica y ecológica para México (Gentry, 1982; Eguiarte et al., 2000). El género *Agave* cuenta con más de 160 especies, 75% de las cuales se encuentran presente en el país (Eguiarte et al., 2000). Este número de especies es notable, tomando en cuenta la gran similitud morfológica y ecológica entre la mayoría de las especies del género (Eguiarte et al., 2000).

El estudio de la estructura genética de estas especies usando marcadores moleculares es crítico para entender cómo están evolucionando, adaptándose y coexistiendo (Eguiarte, 1990). Siguiendo este enfoque, el Instituto de Ecología ha realizado diferentes estudios sobre la genética de poblaciones de este género utilizando diferentes marcadores moleculares como isoenzimas, RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) e ISSRs (Inter-Simple Sequence Repeats) (Colunga et al., 1999; Martínez-Palacios et al., 1999; Navarro, 1999; González, 2000; Navarro-Quezada, 1999; Silva, 2001; Aguirre, 2004; González, 2004). La generación de datos utilizando ISSRs ha mostrado ser conveniente para estudios intraespecíficos de genética de poblaciones por ser específicos, repetibles y polimórficos (Zietkiewicz et al., 1994; Wolfe, 2000, Aguirre, 2004; González 2004) y dado que ya se encuentran optimizados y montados en el Instituto de Ecología, su uso permitirá integrar e interpretar la información recabada en este proyecto con lo ya reportado en el proyecto V038 El objetivo del proyecto anterior fue el de estudiar los aspectos básicos de la genética de poblaciones de dos especies mezcaleras (*A. potatorum* y *A. cupreata*) para comprender sus dinámicas ecológicas y evolutivas. Pero sobre todo, dado que en estas dos especies se aprovechan principalmente las poblaciones naturales en la producción de mezcal, estos datos son de gran utilidad para su manejo sustentable a largo plazo.

En el proyecto CONABIO V038, con respecto a *A. cupreata* se colectó material vegetal de un total de 12 poblaciones naturales y 4 viveros, aunque de acuerdo con los objetivos originales se analizaron solamente cinco poblaciones naturales. Se encontró que al igual que en otras especies del género *Agave* sus niveles de diversidad genética son altos, lo que se asocia al hecho de que son poblaciones naturales que se reproducen por medio de semillas y que son polinizadas principalmente por murciélagos (Informe final, proyecto CONABIO V038). Estos datos contrastan con los niveles de diversidad genética presentes en especies cultivadas extensivamente, como el henequén y el agave azul, que son muy bajos (Colunga et al., 1999; Gil-Vega et al., 2001). Esta disminución

en la diversidad genética de las especies cultivadas es un fenómeno directamente asociado al manejo y puede deberse a la propagación de sólo algunas de las variedades o por una baja representatividad del total de la diversidad al establecer las plantaciones (Millstone y Lang, 2003). Asimismo, en las prácticas de manejo enfocadas a la reforestación puede presentarse cierta selección, intencional o no, en cada una de las etapas del proceso: 1) durante la contribución parental al lote de semillas (que suele ser asimétrica i.e., que hay a veces de 1 a pocas plantas semilleras); 2) debido a los métodos de procesamiento o almacenamiento de semillas, 3) diferencia entre las tasas de germinación (El-Kassaby, 1995; Rajora, 1999). Estos procedimientos pueden entonces alterar en diversos grados los niveles de diversidad genética, generalmente disminuyéndola así como su estructuración (generalmente aumentando la diferenciación entre los diferentes sitios), lo que puede poner en riesgo la conservación de las especies en cuestión.

Considerando lo anterior, en la construcción de un programa de manejo sustentable integral para *A. cupreata* es necesario tomar en cuenta no sólo la condición de las poblaciones en su estado natural, sino también incluir a los viveros. Estos se han establecido en la región de Chilapa, Guerrero, como una estrategia para propagar a la especie por medio de semillas que son colectadas a partir de las poblaciones naturales, que son después reforestadas con las plántulas. Debido a la naturaleza de esta práctica, existen riesgos como los citados anteriormente, que nos llevan a la necesidad de evaluar la condición genética de los viveros utilizando las mismas herramientas y plataforma teórica que en el proyecto CONABIO V038 para integrar y comparar la información a éste.

OBJETIVOS ORIGINALES DEL PROYECTO

Utilizando el material vegetal colectado en el proyecto CONABIO V038, correspondiente a cuatro viveros y a las poblaciones silvestres de Ayahualco y Santa Cruz se planteó:

1. Extraer el ADN de todos los individuos disponibles por población.
2. Obtener y capturar los datos de los marcadores moleculares ISSRs, previamente utilizados en el proyecto CONABIO V038. Los primers (cebadores) que se utilizaron fueron el 846 y el 857.

3. Obtener los niveles de variación genética por población e interpretarlos en términos de genética de poblaciones.
4. Integrar los resultados correspondientes a las poblaciones naturales de Ayahualco y Santa Cruz a los datos reportados en el proyecto CONABIO V038 sobre las demás poblaciones silvestres. Asimismo anexar los resultados de todas las poblaciones trabajadas en el proyecto V038, utilizando el primer 857, trabajo realizado por Aguirre (2004).
5. Comparar los marcadores genéticos entre las poblaciones silvestres y los viveros.
6. Evaluar la diversidad genética de los viveros y su estructuración, en términos de su representatividad de lo que existe en las poblaciones naturales, y sus implicaciones para el manejo y la conservación a largo plazo.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de los datos

Extrajimos el ADN de los individuos correspondientes a las 6 poblaciones en estudio utilizando el protocolo de extracción de Doyle y Doyle (1987) detallado en Aguirre (2004) y González (2004) (Anexo 1). En la Tabla 1 se muestra el número de individuos extraídos por población. En la Figura 1 se muestra su localización geográfica.

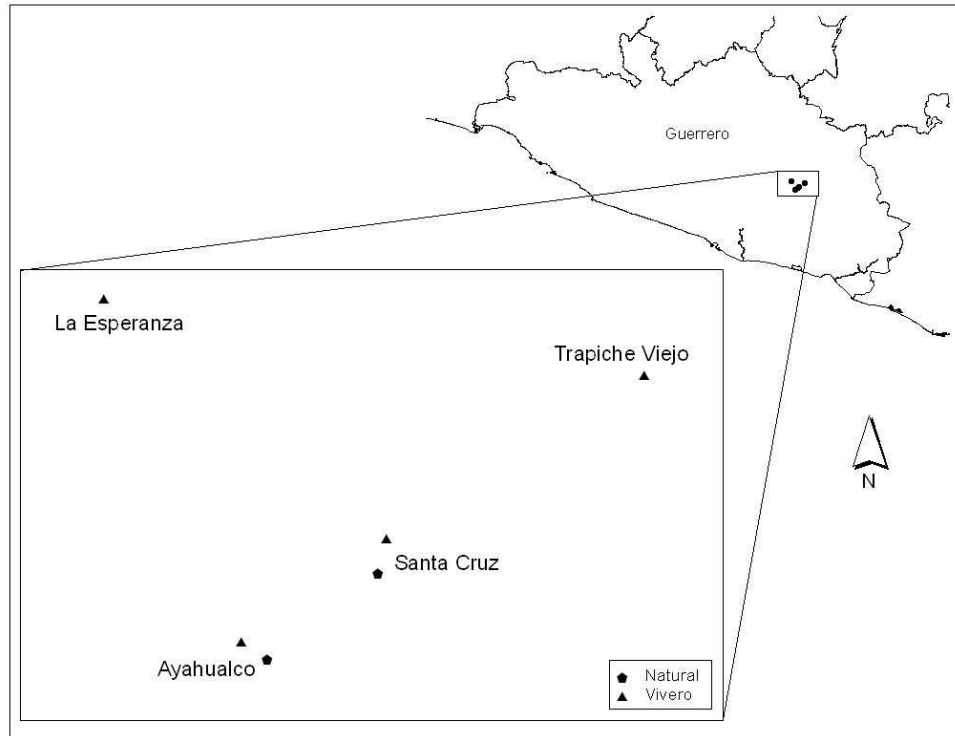


Figura 1. Distribución geográfica de las poblaciones silvestres y vivero de *Agave cupreata* elaborado con el programa ARCVIEW 3.2 a partir de las coordenadas geográficas.

Tabla 1. Poblaciones de *Agave cupreata* a analizar en este trabajo.

Población	Nombre	Estado	Municipio	No. de individuos extraídos
C1	Ayahualco/vivero	Guerrero	Chilapa	40
C2	Ayahualco/pobl. silvestre	Guerrero	Chilapa	63
C4	La Esperanza/vivero	Guerrero	Chilapa	43
C5	Trapiche viejo/vivero	Guerrero	Chilapa	48
C8	Santa Cruz/vivero	Guerrero	Chilapa	39
C9	Santa Cruz/pobl. silvestre	Guerrero	Chilapa	55

Cuantificamos el ADN de cada uno de los individuos utilizando un bioespectofotómetro he hicimos diluciones de 30ng/μl las cuales se utilizaron para hacer las reacciones de amplificación del marcador molecular.

Para generar los datos genéticos utilizamos la técnica de ISSRs (Inter Simple Sequences Repeats) (Zietkiewicz *et al.*, 1994) y optimizamos las concentraciones y condiciones de amplificación de los oligos **846** cuya secuencia nucleotídica es CAC ACA CAC ACA CAC ART en donde R= A ó G y el **857** de secuencia ACA CAC ACA CAC ACA CYT en donde Y= C ó T (Tabla 2 y 3).

Tabla 2. Condiciones de amplificación para ambos primers.

Concentraciones	Oligo
Buffer PCR	1X
MgCl ₂	1.5 mM
DNTPs	0.2 mM c/u
Oligo	0.5 μM
DNA	20 ng/μl
Taq	1 U

Tabla 3. Programa de amplificación del PCR para cada ambos oligos.

Paso No.	Temperatura °C	Tiempo
1	94	4 minutos
2	94	30 segundos
3	52	50 segundos
4	72	2 min
	33 ciclos	del paso 1 al 4
5	72	5 minutos
6	4	1 hora

Asimismo optimizamos las condiciones de corrida de los productos de PCR quedando las siguientes: geles de agarosa al 2%, buffer TAE 1X, 180 voltios por 2 horas. Posteriormente se tiñeron con bromuro de etidio. Se capturaron las imágenes

utilizando el fotodocumentador Kodak ID™ 3.6.3. Las figuras 2a y 2b son fotos representativas del patrón de bandeado del oligo 846 y 857 respectivamente.

Finalmente, analizamos la presencia/ausencia de cada banda (o locus) generada por el oligo en los individuos utilizando el programa 1D Imaging de Kodak Scientific y se arreglaron los datos en una matriz de 1 (presencia) y 0 (ausencia). De esta manera se obtuvo una matriz por población (ver archivo adjunto Marcadores moleculares por población) a partir de la cual se llevaron a cabo los análisis que a continuación se enumeran:

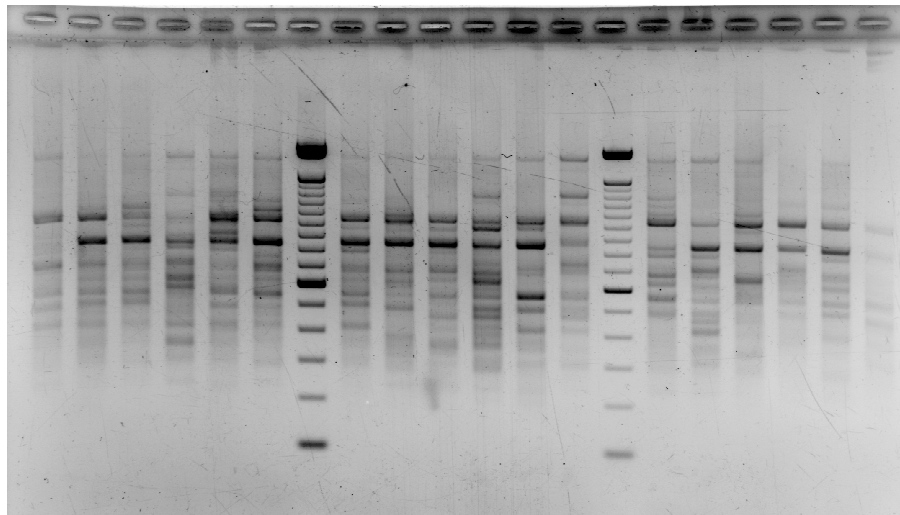


Figura 2a. Gel del oligo 857

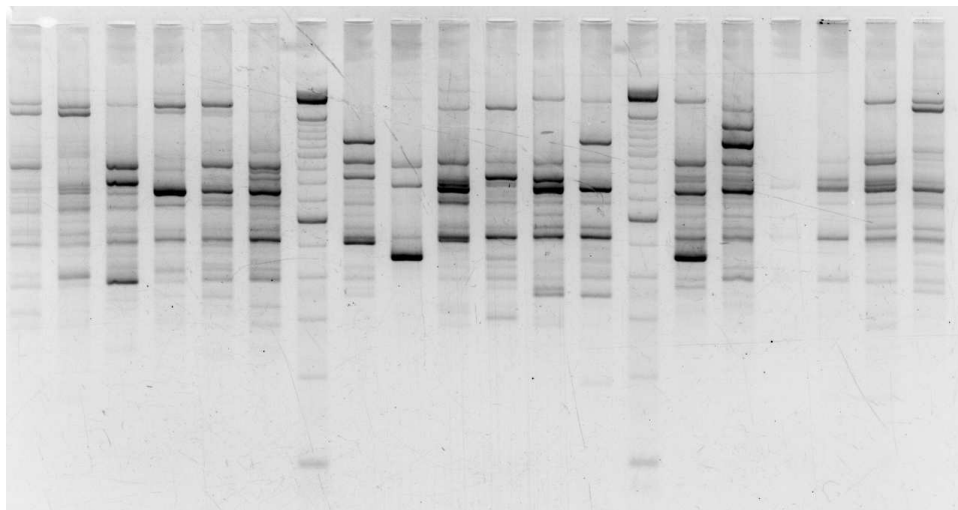


Figura 2b. Gel del oligo 846

Análisis de los datos

Frecuencias alélicas

Debido a que los ISSR's son marcadores dominantes, los heterocigotos no pueden ser distinguidos, por lo que para calcular las frecuencias alélicas se estimó la frecuencia de los alelos recesivos (q) a partir de los individuos sin banda como la raíz cuadrada de la frecuencia de las ausencias, esto es, $x = q^2$, siendo $q = x^{1/2}$. Por otro lado, la frecuencia de los alelos dominantes (p) es igual a $1 - q$.

Sin embargo, este cálculo arroja estimados estadísticamente sesgados. Con el fin de reducir éste sesgo, se implementó la corrección propuesta por Lynch y Milligan (1994) utilizando el programa Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA, M. P. Miller, 1997, Northern Arizona University). Esta corrección recomienda ignorar aquellos individuos para los cuales el número de individuos homocigotos nulos no exceda a tres. Asimismo, el algoritmo propone realizar el análisis utilizando las bandas con frecuencias $< 1 - (3/N)$ para evitar seleccionar loci con altas frecuencias de alelos nulos (Lynch y Milligan, 1994).

Variación genética

La variación genética se estimó utilizando dos índices: la heterocigosis esperada y el % de loci polimórficos.

La heterocigosis esperada promedio en un locus particular para una población se calcula como $H_E = 1 - \sum p_i^2$, donde p_i es la frecuencia promedio del alelo p para todos los loci.

Para calcular el % de loci polimórficos (%P), se utilizó un criterio del 95% esto quiere decir que ese loci se considera polimórfico siempre y cuando el alelo más común presente una frecuencia alélica máxima del 95%. Eguiarte (1990) propone que éste índice es confiable siempre y cuando se haga un muestreo de los loci al azar.

Diferenciación genética

Con el programa TFPGA se calculó el estimador de diferenciación llamado θ , conocido como el coeficiente de coancestría (Weir y Cockerham (1984) y es equivalente a la F_{st} de Wright (1951, Weir, 1996). El estimador θ se utiliza óptimamente para el caso de dos alelos por locus y considera el número de individuos y de

localidades de las cuales se realizó un muestreo explícitamente. θ se calculó utilizando el programa TFGA el cual a su vez emplea el algoritmo de Weir y Cockerham (1984) en donde se hacen análisis de varianza de las frecuencias alélicas esperadas y su posterior correlación dentro de las poblaciones con respecto al total de la especie.

Flujo génico

Para estimar el flujo génico se utilizó un método indirecto. Mediante el valor de θ estimado previamente, se calculó el valor de Nm para las 4 poblaciones estudiadas. Slatkin (1989) propone que θ es un buen estimador, ya que no introduce sesgo en los datos.

El flujo génico se calculó según la fórmula del modelo de islas (Wright, 1951) con la corrección de Crow y Aoki (1984):

$$\theta = 1 / (4 \alpha Nm + 1)$$

donde $\alpha = (n/n-1)^2$ y n es el número de subpoblaciones. Si n es muy grande la fórmula corregida converge con la original. En el modelo de islas de Wright se menciona que si Nm es mayor que uno se debe esperar muy poca diferenciación, ya que el flujo génico evita la deriva (Hedrick, 2000).

Distancias genéticas

Se considera que a nivel genético, cualquier diferencia alélica en la presencia o ausencia de los “loci” es originada gracias a que un codón (o una base nucleotídica en el caso de los ISSRs) es distinto. Por lo tanto, a partir de datos de frecuencias alélicas, es posible calcular estadísticamente el número promedio de las diferencias en los codones o en las bases nucleotídicas por locus. Dado que éste número es una medida directa de las diferencias genéticas entre dos poblaciones, se le considera como una medida de distancia genética (Nei, 1972).

Aislamiento por distancia

Con el fin de saber si ésta especie sigue un modelo de aislamiento por distancia, es decir sea, si existe una correlación entre la distancia geográfica y la genética, se hizo la prueba de Mantel (1967) para lo cual fue necesario tener tanto la matriz de distancias genéticas entre las diferentes poblaciones como la matriz de distancias geográficas, las

cuales fueron calculadas a partir de las coordenadas geográficas mediante el programa ARCVIEW 3.2.

Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el programa Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA, M. P. Miller, 1997, Northern Arizona University).

RESULTADOS

Analizamos entre 30 y 40 (Tabla 4) individuos por población dando un total de 198 individuos analizados. La diferencia entre el número de individuos colectados (Tabla 1) y analizados se debe a que en algunos individuos se obtuvo ADN de calidad moderada o que las amplificaciones por PCR fueron muy débiles.

Resolvimos un total de 28 loci, 14 loci por oligo (846 y 857), los cuales tienen pesos moleculares entre 300 y 1000 pares de bases (Figura 3). En total se generó una base de datos de 5,544 caracteres (ver archivo adjunto Marcadores moleculares por población). Las frecuencias alélicas por locus por población para cada especie se encuentran en el archivo adjunto mencionado previamente.

Variación genética

Utilizando el programa TFPGA (Tools for Population Genetics Analysis) con la corrección de Lynch y Milligan (1994), se encontraron niveles de heterocigosis esperada relativamente altos, tanto para el análisis a nivel de especie total ($H_T = 0.3691 \pm 0.1126$ D.E. promedio, 100 % de loci polimórficos (Tabla 4), como para el de cada población ($H_s = 0.3259 \pm 0.0124$ D.E. promedio, 87.5 ± 4.9 % de loci polimórficos (Tabla 2). La población que presentó el valor más alto de variación genética fue la de Ayahualco/vivero ($H_s = 0.3740$, % $P = 89.2857$) y la que presentó el valor más bajo fue la de la Esperanza/vivero ($H_s = 0.2766$, % $P = 82.1429$) (Tabla 4).

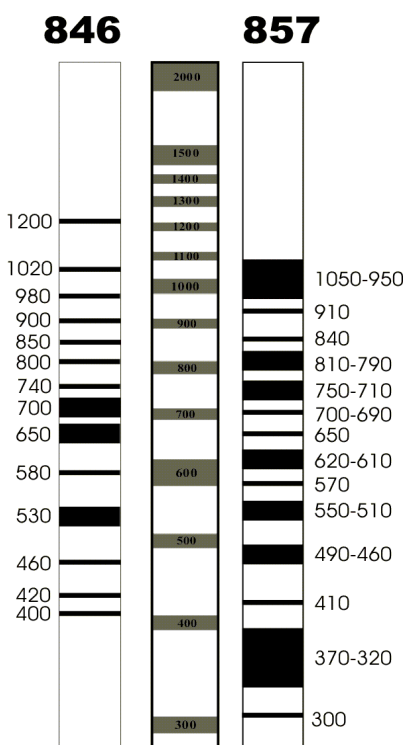


Figura 3. Pesos moleculares de los 29 loci generados por los primers 846 y 857

Tabla 4. Valores de los componentes de la variación genética: heterocigosis esperada (H_s) \pm desviación estándar (D.E.) y porcentaje de loci polimórficos (%P, criterio del 95%) para cada una y el total de las poblaciones.

Población	N	H_s	% P
Ayahualco/vivero	32	0.3740	89.28
Ayahualco/pobl. silvestre	40	0.3538	92.86
La Esperanza/vivero	33	0.2766	82.14
Trapiche viejo/vivero	30	0.3008	82.14
Santa Cruz/vivero	32	0.3162	85.71
SantaCruz/pobl. silvestre	31	0.3341	92.85
Promedio	33 \pm 3.6 (D.E.)	0.3259 \pm 0.01 (D.E.)	87.5 \pm 4.9(D.E)
Total	198	0.3691 \pm 0.11 (D.E.)	100

Diferenciación entre poblaciones

Para detectar diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones realizamos la prueba exacta de Raymond y Rousset (1995). Encontramos diferencias significativas entre poblaciones en 23 de los 28 loci ($P < 0.05$) (ver archivo anexo de marcadores moleculares).

La diferenciación genética, medida como la θ (F_{st}) según Weir y Cockerham (1984), resultó significativa para las especies de *Agave cupreata* estudiadas ($\theta = 0.1133 \pm 0.0174$). El intervalo de confianza al 95% obtenido por 1000 iteraciones bootstrap para la θ de todas las poblaciones es de 0.0801– 0.1472 o sea, θ es diferente de 0. El valor de Nm calculado a partir de la θ , según Crow y Aoki (1984) es de 1.36 valor que es mayor a 1 por lo que el flujo génico impide la diferenciación total entre las poblaciones.

Distancias genéticas

Las distancias genéticas se estimaron con la Distancia de Nei (1972), D , y fueron en promedio $D = 0.0717$ D.E. = 0.0305 (Tabla 5), con un mínimo de 0.0275 entre la población de Ayahualco/vivero y la de Santa Cruz/población Silvestre y un máximo de 0.1367 entre La Esperanza/vivero y Santa Cruz/vivero.

Tabla 5. Distancias genéticas de Nei (1972) entre pares de poblaciones

Poblaciones	C1	C2	C4	C5	C8	C9
C1	*****					
C2	0.0437	*****				
C4	0.0885	0.1062	*****			
C5	0.1124	0.0925	0.0646	*****		
C8	0.0664	0.0652	0.1367	0.0714	*****	
C9	0.0275	0.0364	0.0601	0.0622	0.0416	*****

Para visualizar más claramente cómo se relacionan las diferentes poblaciones se realizó un análisis de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) utilizando un bootstrap de 1000 permutaciones. Como se observa en la Figura 4, se forman dos grupos bien definidos: uno más grande, que se agrupa bajo un valor de bootstrap relativamente alto (0.7207) que comprende a las poblaciones de Ayahualco/vivero, Ayahualco/pobl. silvestre, Santa Cruz/vivero y Santa Cruz/pobl.

Silvestre y un segundo grupo más pequeño que comprende a las poblaciones de La Esperanza/vivero y Trapiche viejo/vivero agrupadas bajo un valor de bootstrap de 0.6667.

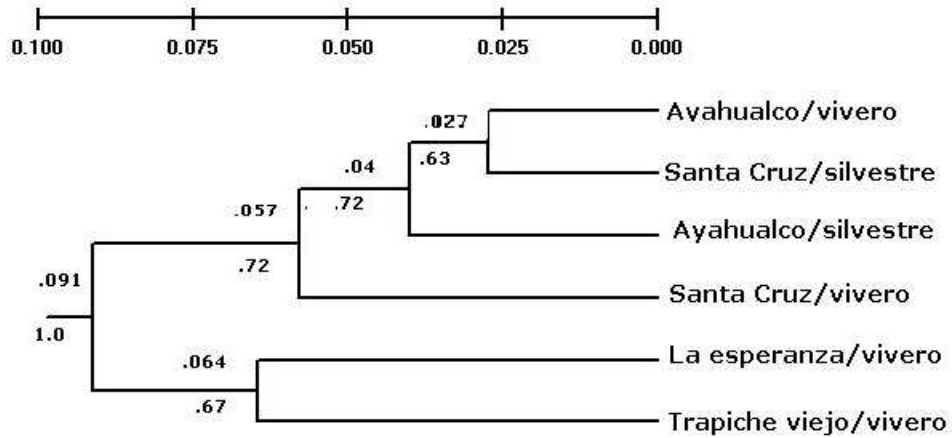


Figura 4. UPGMA de 6 poblaciones de *A. cupreata*. En la parte superior de las ramas se muestran las distancias genéticas (Nei, 1972) y por debajo, el valor de bootstrap (10,000 permutaciones).

Aislamiento por distancia

Para analizar si existe algún patrón de aislamiento por distancia (Slatkin, 1994), realizamos pruebas de Mantel con el programa TFGA (Miller, 1997) usando 1000 permutaciones para cada especie. La figura 5 muestra el patrón para las poblaciones de *Agave cupreata* en estudio en donde encontramos una correlación significativa entre las distancias genéticas y las geográficas (Tabla 6) aunque un poco baja (1000 permutaciones; $Z = 7.3514$, $r = 0.6546$, $P = 0.0030$), lo que nos sugiere que ésta especie de agave sigue en términos generales un modelo de aislamiento por distancia (Figura 5), a pesar de que las poblaciones están separadas por una muy baja distancia geográfica (13.2 km el valor máximo).

Tabla 6. Matriz de las distancias genéticas de Nei (1972) calculadas a partir de los 28 loci arrojados por los primers 846 y 857 y las distancias geográficas en Km., calculadas a partir de las coordenadas geográficas utilizando el programa ARCVIEW 3.2.

Poblaciones	C1	C2	C4	C5	C8	C9
C1	*****	0.5	9	11.5	3.5	4.4
C2	0.0437	*****	9.57	9.37	3.3	3.6
C4	0.0885	0.1062	*****	13.2	9.3	9
C5	0.1124	0.0925	0.0646	*****	7.8	7.23
C8	0.0664	0.0652	0.1367	0.0714	*****	0.71
C9	0.0275	0.0364	0.0601	0.0622	0.0416	*****

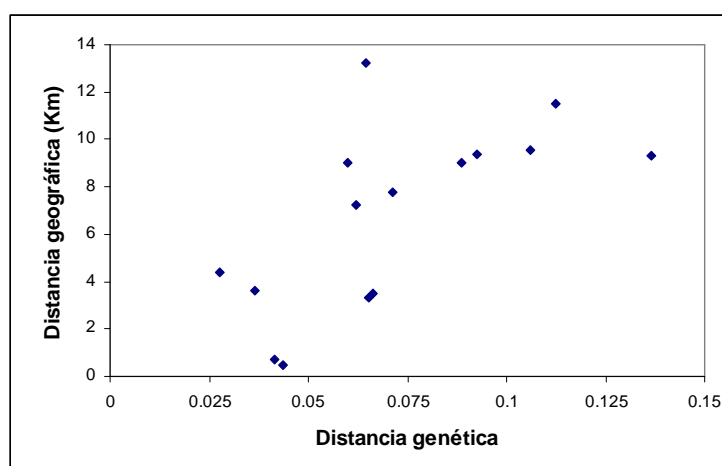


Figura 5. Prueba de Mantel ($r = 0.6546$, $P = 0.0030$) para las 6 poblaciones de *A. cupreata*.

DISCUSIÓN

Marcadores moleculares

La mayoría de los trabajos en donde se utilizan ISSRs se han enfocado en estudiar una amplia gama de especies vegetales cultivables en el ámbito de su diversidad genética, análisis filogenéticos, marcaje y mapeo genético y biología evolutiva (Pradeep et al., 2002). Investigaciones previas han demostrado que los ISSRs frecuentemente detectan niveles de polimorfismo mayores que los RFLPs o los RAPDs (Esselman et al., 1999)

Lo anterior se debe principalmente a la naturaleza de los “primers”, ya que al ser un motivo de secuencias simples repetidas, la frecuencia y distribución de los motivos

microsatélite repetidos complementarios serán abundantes sobre todo en el ADN nuclear (Pradeep, 2002).

Variación genética

Los niveles y distribución de la diversidad genética mantenidos por una especie se encuentran influenciados por su historia evolutiva, así como también por las características específicas que presenta. Por ejemplo, son importantes la forma de vida, los mecanismos de dispersión de las semillas, sus polinizadores y su extensión geográfica. De todos los caracteres examinados, al parecer el sistema de fertilización y distribución geográfica son los que generalmente determinan los niveles de variación genética (Hamrick y Godt, 1989, 1996).

Encontramos que las poblaciones de *Agave cupreata* en estudio presenta niveles de variación genética relativamente altos ($H_s = 0.3691$, %P = 100). En general, estos valores presentan el mismo patrón que los propuestos por Hamrick y Godt (1989, 1996) para monocotiledóneas longevas, perennes, con un sistema predominante de fertilización cruzada, como es el caso de esta especie mezcalera, esto es, niveles de variación mayores en comparación con especies autopolinizables las cuales generalmente tienen menor diversidad genética. En este estudio los valores que se obtuvieron son mayores con respecto a los promedios reportados ($H_s = 0.15$, %P = 50, Hamrick et al., 1992). Esta diferencia puede deberse a que éstos corresponden a diferentes especies de plantas, así como también a la técnica de obtención de los datos, ya que el método utilizado fue el de las isoenzimas, en comparación de los ISSR's utilizados en este trabajo.

Comparando con los resultados obtenidos en el proyecto V038 para las poblaciones de *A. cupreata*, vemos que nuestros valores ($H_t = 0.3691$, $P_t = 100$) son mayores a los reportados en dicho informe ($H_t = 0.2494$, $P_t = 87.5$), tanto en el caso de la heterocigosis global o por especie así como la heterocigosis por cada una de las poblaciones analizadas. Cabe señalar que en nuestro estudio tanto las poblaciones silvestres como las de vivero presentan niveles de variación genética similares (valores alrededor de 0.34 (de 0.30 a 0.37) (Tabla 4), a excepción de la población de la Esperanza/vivero cuyo valor es de 0.2766. Uno esperaría encontrar valores de diversidad genética más altos en las poblaciones silvestres que en las manejadas, dado

que las prácticas tradicionales de manejo de especies clonales generalmente se centran en escoger a los genotipos más grandes, más resistentes, etc. y luego estos propagarlos asexualmente, para tener poblaciones enteras con estas mismas características, promoviendo a la larga la pérdida de la diversidad genética en las poblaciones de vivero.

Para explicar las diferencias entre los dos estudios (el V038 y el presente) tenemos los siguientes argumentos:

a) A pesar de que se utilizó la misma técnica molecular (ISSR's), en el proyecto V038 solamente se analizó un oligo, el 846 el cual arrojó 16 loci. En el presente estudio también se analizó este oligo, el cual nos dio en un principio esos 16 loci pero finalmente el análisis se hizo con 14, pues se decidió quitar 2 loci debido a que no eran muy reproducibles y claros (lo cual metería sesgo e inconsistencia a los análisis). Además, en este estudio se analizó otro oligo, el 857 el cual dio 14 loci, por lo que el análisis final se llevó a cabo con 28 loci totales.

b) Asimismo, la técnica de captura de los geles así como el de su lectura para obtener la matriz de presencias/ausencias, difiere en ambos proyectos. En nuestro caso utilizamos un sistema de fotografías digitales y su análisis posterior en un programa especial de lectura de geles con lo cual obteníamos una resolución y nivel de detalle mucho más altos. En cambio en el caso de los resultados del proyecto V038, los geles fueron capturados vía fotografías instantáneas Polaroid y leídos a ojo.

Por otro lado, para entender el hecho de que tanto las poblaciones silvestres como los viveros presentan los mismos niveles de diversidad genética (altos) hay que recurrir al sistema de manejo al que están sujetas las poblaciones. En estos viveros, lo que se ha hecho es hacer una mezcla de semillas de *Agave cupreata* provenientes de las diferentes poblaciones silvestres y esta misma mezcla es la que se crece en cada uno de los viveros por lo que los niveles de diversidad genética en vez de ser menor como se pensaría, son semejantes a los de las poblaciones silvestres demostrando así que ésta práctica de manejo es bastante exitosa pues mantiene los niveles de diversidad genética de la especie.

Se han utilizado diferentes métodos para describir la variación genética en diferentes especies del género *Agave* y de la familia Agavaceae, como se observa en la Tabla 7, nuestros valores encontrados son los más altos junto con los de *Agave*

lechuguilla. Utilizando la técnica de los ISSR's, Aguirre (2004) y Eguiarte et al. (2003) o reporte del proyecto V038 encontraron que poblaciones silvestre de *A. potatorum*, otra especie mezcalera, presentan valores de diversidad genética más bajos con respecto a los reportados en este estudio (Tabla 7). Utilizando RAPD's Navarro et al. (2003) encontraron valores más bajos al estudiar a *A. cerulata*, *A. subsimplex* y *A. deserti*, asimismo, al utilizar isoenzimas la diversidad genética de *A. subsimplex* es mucho menor. Utilizando también isoenzimas, *A. lechuguilla* tiene un valor promedio de H_s alto (0.394, similar al reportado en este trabajo) a lo largo de su gradiente latitudinal de distribución. A pesar de no presentar un patrón geográfico en los niveles de variación genética, las poblaciones del sur exhiben un exceso de heterócigos con relación a lo esperado en equilibrio de Hardy-Weinberg, mientras que las poblaciones norteñas presentan un exceso de homócigos (Silva-Montellano y Eguiarte 2003).

Diferenciación genética

Las poblaciones, tanto silvestres como de viveros, de *A. cupreata* estudiadas en este trabajo presenta niveles moderados de diferenciación genética ($\theta = 0.113$). Si se compara entre silvestres y viveros encontramos niveles de diferenciación bajos ($\theta = 0.0376$), lo que reafirma el hecho de que tanto las poblaciones de viveros como las silvestres son muy parecidas o se comportan como una gran población. De nuevo estos valores de diferenciación poblacional se ajustan al patrón propuesto por Hamrick y Godt (1996) utilizando isoenzimas, para especies perennes y de vida larga con un sistema de fertilización cruzada ($G_{ST} = 0.094$), las cuales presentan niveles de diferenciación más bajos con relación a los presentes en especies que se autofecundan. Comparando con los valores de diferenciación obtenidos en el proyecto V038 (0.154), vemos que nuestros valores son un poco más bajos lo cual es lógico dada la diferencia en el rango de distribución total de las poblaciones del proyecto V038. Con respecto a otras especies de agaves, encontramos similitud tanto en los reportados para el complejo *A. deserti* (Navarro et al., 2003) (rango de 0.084 a 0.135 utilizando RAPDs) como en los presentes en *A. potatorum* (0.084), *A. cupreata* (0.145 utilizando ISSRs y dos primers) (Aguirre, 2004) y *A. lechuguilla* (0.083 utilizando isoenzimas) (Silva y Eguiarte, 2003); sin embargo, son mucho más bajos que los reportados en *A. victoriae-reginae* (0.23) (Martínez y Eguiarte, 1999) (Tabla 7).

Comparando con plantas de otros grupos taxonómicos y utilizando RAPDs, Nybom y Bartish (2000) encuentran un valor promedio de F_{ST} de 0.35 y de G_{ST} de 0.29,

por lo que se puede concluir que los niveles de diferenciación genética encontrados en este trabajo son bajos, así como también los presentes en otros miembros del género *Agave*, lo cual es congruente con los rasgos especie específicos que presenta: se trata de plantas perennes de vida larga, con polinización cruzada y probablemente polinizadas por murciélagos, que potencialmente pueden mover el polen a larga distancia.

Tabla 7. Parámetros de estructura genética en especies de la familia Agavaceae así como valores promedio para diferentes rasgos especie específicos de varias especies de plantas.

* Valores de Φ_{ST}

	H_{esp}	% P	F_{ST}	Técnica	Referencia
A. cupreata(silvestre/vive ros)	0.3691	100	0.113	ISSRs	Este estudio
<i>A. garciae-mendozae</i>	0.27	85	0.1	ISSRs	González (2004)
<i>A. cupreata</i>	0.29	89	0.145	ISSRs	Aguirre (2004)
<i>A. cupreata</i>	0.25	87.5	0.154	ISSRs	Proyecto V038
<i>A. potatorum</i>	0.27	83	0.084	ISSRs	Aguirre (2004), Eguiarte et.al.,(2003)
<i>A. subsimplex</i>	0.28	88	0.31	Isoenzimas	Eguiarte et al. (2000)
<i>A. subsimplex</i>	0.14	76	0.08	RAPDs	Navarro et al. (2003)
<i>A. cerulata</i>	0.24	90	0.1	RAPDs	Navarro et al. (2003)
<i>A. deserti</i>	0.19	78	0.14	RAPDs	Navarro et al. (2003)
<i>A. lechuguilla</i>	0.39	96	0.083	Isoenzimas	Silva y Eguiarte (2003)
<i>A. victoriae-reginae</i>	0.33	83	0.24	Isoenzimas	Martinez Palacios et al (1999)
<i>Yucca filamentosa</i>	0.20	68	0.17	Isoenzimas	Massey y Hamrick (1998)
<i>Manfreda brachystachya</i>	0.48	100	0.03	Isoenzimas	Eguiarte et al. (2000.)
Monocotiledóneas	0.19		0.38*	RAPDs	Nybom y Bartish (2000)
Perenes longevas	0.242		0.25*	RAPDs	Nybom y Bartish (2000)
Anuales	0.125		0.70*	RAPDs	Nybom y Bartish (2000)
Distribución regional	0.222		0.43*	RADPs	Nybom y Bartish (2000)
Perenes de vida corta	0.207		0.39*	RADPs	Nybom y Bartish (2000)
Heterocruza	0.260		0.28*	RADPs	Nybom y Bartish (2000)
Autocruza	0.091		0.70*	RADPs	Nybom y Bartish (2000)

Flujo génico

El flujo génico es el principal componente de la estructura poblacional, ya que determina qué tanto se comporta cada población de una especie como una unidad evolutivamente independiente. Si existen niveles de flujo génico elevados entre las poblaciones, entonces éstas evolucionan juntas, pero si los niveles son bajos, cada población evoluciona prácticamente de manera independiente (Slatkin, 1994).

Qué tanto flujo génico es necesario para prevenir la evolución independiente de las poblaciones de una especie dependerá de las otras fuerzas evolutivas presentes y de su estructura. Nm es la multiplicación del tamaño efectivo, (N_e) por la tasa de migración (m), y nos habla del número de “migrantes efectivos” Si Nm o el número de migrantes efectivos es mayor a 1, teóricamente el flujo génico supera los efectos de la deriva génica y previene la diferenciación local. Si Nm es menor a 1 entonces se puede decir que la deriva actúa independientemente en cada una de las poblaciones y si es mayor de 4, entonces las poblaciones se comportan como una gran población más o menos panmíctica. No hay que olvidar que los valores calculados de Nm dependen directamente de nuestra estimación de la F_{st} .

El valor estimado de Nm para las poblaciones de *A. cupreata* en estudio fue de 1.36, lo cual nos sugiere que existe el suficiente flujo génico como para contrarrestar los principales efectos de la deriva génica y mantener a las poblaciones conectadas evolutivamente aunque menos que 4 por lo que no se comportan como una super población. Si comparamos con los valores reportados para poblaciones silvestres (Proyecto V038) vemos que éstos son menores (0.88). Cuando realizamos el análisis comparando las poblaciones silvestres contra sus viveros asociados encontramos un valor de Nm de 6.4, valor muy alto. Lo anterior es congruente con la práctica de manejo que se lleva a cabo en los viveros, ya que de manera artificial se está simulando un flujo génico en el momento en que se mezclan las semillas de las diferentes poblaciones naturales para hacer el banco de semillas a plantar en los viveros.

Comparando con los valores reportados en el mismo Proyecto V038 para *A. potatorum* (2.16), observamos que nuestros valores son mucho más bajos. Si se comparan los valores de este trabajo ($Nm = 1.36$) con los encontrados en otras especies de agaves, observamos que *A. cupreata* presenta valores similares ($Nm = 1.49$, ISSRs) mientras que los estimados para *A. potatorum* ($Nm = 2.99$, ISSRs) y el complejo *A. deserti* (rango de 2.91 a 6.14, RAPDs) son mayores. Cabe señalar que los valores que se

dan aquí sobre *A. cupreata* y *A. potatorum* fueron obtenidos de Aguirre (2004) en donde utiliza más marcadores moleculares (más otro primer) aunque las mismas poblaciones que lo reportado en el Proyecto V038. De los estudios realizados con isoenzimas, *A. victoriae-reginae* arroja niveles bajos ($Nm = 0.655$, isoenzimas), en comparación de *A. lechuguilla*, cuyo valor declina desde el sur de su distribución hacia el norte (12.23, sur; 2.23, centro y 1.08 en el norte, isoenzimas).

Distancias genéticas y aislamiento por distancia

La prueba de Mantel indica que las poblaciones de *A. cupreata* analizadas en este trabajo siguen un patrón de aislamiento por distancia, es decir, las distancias genéticas y las geográficas se encuentran correlacionadas positivamente, lo que significa que conforme más alejadas estén las poblaciones unas de otras, serán más diferentes genéticamente hablando. El valor de correlación no es muy alto (0.6546, $P = 0.0030$) aunque sí es significativo lo que es interesante dada la cercanía de las poblaciones (ver Tabla 6). Siendo la comparación de las poblaciones de Ayahualco (vivero y silvestre) y la de Santa Cruz (vivero y silvestre) las que presentan menor distancia genética así como geográfica.

Como se muestra en el UPGMA de la figura 4, se forman dos grandes grupos, uno formado por las poblaciones más sureñas (Ayahualco/vivero, Santa Cruz/silvestre, Ayahualco/silvestre y Santa Cruz/vivero) y otro grupo que comprende a las poblaciones norteñas (La Esperanza/vivero y Trapiche viejo/vivero).

En general, los estimados de las distancias genéticas entre las diferentes poblaciones de nuestro estudio son un poco mayores ($D=0.0275 - 0.1367$) a las presentes en las poblaciones estudiadas en el Proyecto V038 ($D= 0.02 - 0.106$). Esto suena un poco contradictorio, debido al manejo de los viveros en donde se esperaría encontrar distancias genéticas menores dado el flujo génico “artificial” que se lleva a cabo. Nosotros explicamos esto en la diferencia del número de loci analizados en ambos estudios, ya que las distancias genéticas no son tan diferentes. No obstante cuando comparamos las poblaciones silvestres contra las de sus viveros encontramos una $D= 0.0256$, valor bajo.

A manera de conclusión en este trabajo se evaluó en término de genética de poblaciones la práctica de manejo que se lleva a cabo en los viveros de la región de Chilapa. Utilizando la plataforma teórica de la genética de poblaciones encontramos que ésta técnica de mezclar semillas de las poblaciones silvestres y luego repartir una

porción de esa mezcla para ser sembrada en los diferentes viveros, resulta ser muy exitosa, ya que mantiene los niveles de diversidad genética de las poblaciones silvestres lo cual no debería afectar a largo plazo la dinámica evolutiva de esta especie mezcalera.

AGRADECIMIENTOS:

Queremos agradecer a Manuel Rosas por su invaluable ayuda en la extracción del ADN de las poblaciones así como la elaboración de las electroforesis. También a Aldo Valera por su apoyo en la optimización de las técnicas de extracción de ADN. A Xitlali Aguirre por sus valiosas aportaciones y comentarios en la formulación y a lo largo del desarrollo del proyecto.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre X. (2004). Genética de poblaciones de *Agave cupreata* y *A. potatorum*, aportaciones para el manejo y la conservación de dos especies mezcaleras. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Colunga-GarcíaMarín, P., J. Coello-Coello, L. Eguiarte y D. Piñero. (1999) Isoenzymatic variation and phylogenetic relations between henequén *Agave furcroydes* Lem. and its wild ancestor *A. angustifolia* Haw. *American Journal of Botany* 86: 115-123.
- Crow, J. F. y K. Aoki, 1984. Group selection for a polygenic behavioral trait: Estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA 81: 6073-6077.
- Doyle, JJ y JL Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19 : 11-15.
- Eguiarte, L. E. (1990) Genética de poblaciones de *Astrocaryum mexicanum* Liebm. en Los Tuxtlas, Veracruz. Tesis de doctorado, Centro de Ecología, UNAM.
- Eguiarte, L. E., J. Larson-Guerra, J. Nuñez-Farfán, A. Martínez-Palacios, K. Santos del Prado y H.T. Arita (1999) Diversidad filogenética y conservación: ejemplos a diferentes escalas y una propuesta a nivel poblacional para *Agave victoria-reginae* en el desierto de Chihuahua, México. *Revista Chilena de Historia Natural*. 72: 475-492.
- Eguiarte, L. E., A. Silva y V. Souza (2000) Biología evolutiva de la familia Agavaceae: biología reproductiva, genética de poblaciones y filogenia. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 166: 131-150.
- Eguiarte, L.; X. Aguirre; M. Rocha, C. Torres, A. Silva y A. Valera, 2003. Diversidad genética de dos especies mezcaleras. Proyecto Conabio V038, Informe final.
- Esselman, E. J., L. Jianqiang, D., Crawford, J. Windus y D. Wolfe, 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insoerata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology* 8: 443-451.

- El-Kassaby Y.A. (1995). Evaluation of the tree-improvement delivery system: factors affecting genetic potential. *Tree Physiol* 15:545-550
- Gentry, H. S. (1982) *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona.
- Gil-Vega K., González-Chavira M., Martínez de la Vega O., Simpson J. y Vandemark G. (2001). Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. azul using RAPD markers. *Euphytica* 119:335-341.
- González, A. (2004). *Biología reproductiva y genética de poblaciones del Agave garciae-mendozae*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM.
- González, R. (2000) Análisis de la variación genética de *Agave deserti* en el desierto sonorense por medio de marcadores moleculares (RAPDs) Tesis de licenciatura, Biólogo, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Hamrick, J. L. y J. W. Godt, 1989. Allozyme diversity in plant species. En: H. D. Brown, M. T. Clegg, A. L. Kahler y B. S. Weir (eds.) *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*. Sunderland, M.A., Sinauer. pp: 43-63.
- Hamrick, J. L., J. W. Godt, S. Sherman-Broyles, 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* 6: 95-124.
- Hamrick, J. L. y J. W. Godt, 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 351: 1291-1298.
- Hedrick, W., 2000. *Genetics of Populations*. USA, Jones and Bartlett Publishers, Inc.
- Lynch, M. y B. G. Milligan, 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.
- Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Martínez-Palacios, A., L. E. Eguiarte y G. R. Furnier. (1999) Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. *American Journal of Botany* 86: 1093-1097.
- Massey, L. K. y J. L. Hamrick, 1998. Genetic diversity and Population structure of *Yucca filamentosa* (Agavaceae). *American Journal of Botany* 85(3): 340-345.
- Miller, M. P., 1997. *Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data*. Computer software distributed by author.
- Millstone E. y Lang T. (2003). *The Atlas of Food, who eats what, where and why*. Earthscan Publications Limited. London, UK.
- Navarro, A. (1999). Estructura genética y procesos de especiación de *Agave cerulata* (Trel.) y *Agave subsimplex* (Trel.) en el desierto Sonorense a partir de RAPD's. Tesis de licenciatura, Biólogo, Facultad de Ciencias, UNAM.

- Navarro-Quezada, A., R. González, F. Molina-Freaner y L. E. Eguiarte (1999). Genetic differentiation in the *Agave deserti* complex in the Sonoran Desert. *Enviado a Heredity*
- Navarro, A., R. González, F. Molina-Freaner y L.E. Eguiarte, (2003). Genetic differentiation in the *Agave deserti* (Agavaceae) complex of the Sonoran desert. *Heredity* 90: 220-227.
- Nei M. (1972). Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106(949): 283-292.
- Nybom, H. y I. Bartish, 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD marker in plants *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 3(2): 93-114.
- Pradeep, R.M., Sarla, N y Siddiq E.A., 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128 : 9-17.
- Rajora O.P. (1999). Genetic biodiversity impacts of silvicultural practices and phenotypic selection in white spruce. *Theor Appl Genet* 99:954-961
- Raymond, M.L. and F.Rousset. (1995). An exact test for population differentiation. *Evolution* 49:1280-1283.
- Silva-Montellano, A. y L. E. Eguiarte., 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.
- Silva, A. (2001). Ecología reproductiva y genética de poblaciones de *Agave lechuguilla*. Tesis de doctorado. Instituto de Ecología, UNAM.
- Slatkin, M., 1994. Gene Flow and Population Structure en *Ecological Genetics*. En: L. A. Real (ed.). New Jersey, Princenton University Press: 4-17.
- Weir, B. S., y C. Cockerham. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Weir, S., 1996. *Genetic Data Analysis II*. USA, Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Wright, S., 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenetics* 15:323-354.
- Wolfe A. (2000). ISSR Resource Website.
<http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/ISSR.html>
- Zietkiewicz E., Rafalski A. y Labuda D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183

Anexo 1

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

- 1.- Moler en un mortero el tejido con nitrógeno líquido.
- 2.- Agregar 250 µl de buffer CTAB y 750 µl de STE, seguir moliendo. Recuperar el todo en un tubo eppendorf de 1.5 ml y centrifugar a 10 000 rpm durante 8 minutos. Se agregan estos dos buffers tanto como se necesite para que el todo no quede muy espeso ni baboso, siempre guardando la proporción 1 :3 de CTAB y STE.
- 3.- Eliminar el sobrenadante, secar con espátula el exceso y resuspender con 600 µl de buffer CTAB-2x con β-mercaptoetanol. Homogeneizar en el vortex. Centrifugar a 10000 rpm durante 8 minutos, eliminar el sobrenadante. Escurrir en papel secante y mantener en hielo todo el tiempo. Repetir este paso 2 veces o hasta que el sobrenadante esté un poco transparente y no tan baboso.
- 4.- Agregar 4 µl de RNAasa (7000 u/ml). Homogeneizar suavemente. Incubar a 37° por 20 minutos. Después agregar a cada tubo 40 µl de proteinasa K (20 mg/ml) durante 20 minutos. Incubar a 65° durante 20 minutos. Después poner el hielo de 5 a 10 minutos.
- 6.- Agregar a cada tubo 600 µl de cloroformo-octanol 21 :1, agitar hasta homogeneizar y centrifugar a 9 000 rpm durante 12 minutos. Opcional : repetir la extracción con el cloroformo-octanol hasta que el sobrenadante quede totalmente transparente.
- 7.- Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo (con una pipeta de 200 µl) y precipitar el DNA con 2/3 partes del volumen final (600 µl aprox.) de isopropanol frío. Dejar reposar 2 horas a -20° C.
- 8.- Centrifugar a 9 000 rpm durante 5 minutos.
- 9.- Tirar sobrenadante y limpiar el pellet con 1 ml de etanol al 70% frío y centrifugar a 7000 rpm durante 5 minutos.
- 10.- Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet con 100 µl de H₂O ultra pura.
Nota: el pellet debe de estar bien seco, que no quede nada de etanol. Esto se hace en la campana de flujo laminar y se dejan los tubos abiertos por 10 minutos con la campana encendida.

CTAB 2X- Tris-Hcl 100 mM pH 8
NaCl 1.4 M
EDTA 20 mM
CTAB 2%
β-ME 0.3%

STE – Tris-Hcl 100 mM pH8
EDTA 50 mM pH 8
NaCl 100 mM
β-ME 0.3%

CTAB – Tris-Hcl 100 mM pH 8
EDTA 20 mM pH 8
CTAB 4%
NaCl 1.5 M
PVP 40 4%
Ác. Ascórbico 0.1%
DIECA 0.1%
β-ME 0.3%

El β-mercapto etanol se agrega solamente cuando se va a utilizar el buffer.