

Informe final* del Proyecto V038
Diversidad genética en dos especies mezcaleras
Eguiarte, L.E., X. Aguirre, M.Rocha, C. Torres, A. Silva y A. Valera (2003) Diversidad genética en dos especies mezcaleras. Informe final Proyecto Conabio V038, México D.F., México

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: 5622 9006 Fax: 5616 1976, 5622 8995
Fecha de inicio: Noviembre 30, 2001
Fecha de término: Noviembre 11, 2003
Principales resultados: Informe final, Hoja de cálculo
Forma de citar el informe final y otros resultados:** el Eguiarte, L. E., X. Aguirre, M. Rocha, C. Torres, A. Silva y A. Valera., 2003. Diversidad genética en dos especies mezcaleras. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ecología. **Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. V038.** México D. F.
Forma de citar hoja de cálculo: Eguiarte, L.E., X. Aguirre, M. Rocha, C. Torres, A. Silva y A. Valera., 2003. Diversidad genética en dos especies mezcaleras. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ecología. **Hoja de cálculo SNIB-CONABIO proyecto No. V038.** México D. F.

Resumen:

En este proyecto se estudiarán aspectos básicos de la genética de poblaciones de dos especies utilizadas en la producción de mezcal, *Agave potatorum* y *Agave cupreata*. Se analizará la distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones, utilizando un mínimo de cinco loci polimórficos (RAPDs y/o isoenzimas,) para unas 5 poblaciones por especie, incluyendo poblaciones silvestre y manejadas. Así, se obtendrán las frecuencias alélicas y con ellas se determinarán las diferencias entre sitios con diversos métodos, como la *Fst*; se estimarán los niveles de aislamiento genéticos estilo *Nm* y se obtendrán dendrogramas como UPGMA y/o Neighbor-Joining. Estos datos serán útiles para entender como el manejo afecta la variación genética de las poblaciones, y será información relevante para llegar a proponer un manejo sustentable y para avanzar en la comprensión de la genética de la conservación para el género *Agave*.

-
- * 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.

DIVERSIDAD GENETICA EN DOS ESPECIES MEZCALERAS

INFORME FINAL, primera versión

26 de septiembre del 2003

PROYECTO CONABIO V038

LUIS E. EGUIARTE FRUNS

XITLALI AGUIRRE DUGUA

MARTHA ROCHA MUNIVE

CHRISTIAN TORRES DÍAZ

ARTURO SILVA MONTELLANO

ALDO VALERA VÁZQUEZ

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

INTRODUCCIÓN Y 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 presentes en el país (Eguiarte *et al.*, 2000). Este número 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 las especies, usando marcadores moleculares, es crítico para entender cómo están evolucionando, adaptándose y coexistiendo, así como para proponer estrategias de manejo racional (Eguiarte, 1990). Se han llevado a cabo varios estudios detallados de ecología de poblaciones de diferentes especies del género *Agave* principalmente en el desierto de Chihuahua (Martínez-Palacios *et al.*, 1999; Cadaval, 1999; Silva, 2001; Eguiarte *et al.*, 1999, 2000, Silva y Eguiarte, 2003a, Eguiarte y Molina-Freaner, 2003) y se han estudiado recientemente diversos aspectos de la genética de poblaciones del género en el Instituto de Ecología de la UNAM (Colunga *et al.*, 1999; Martínez-Palacios *et al.*, 1999; Navarro, 1999; González, 2000; Navarro-Quezada *et al.*, 2003 ms.; Silva, 2001, Silva y Eguiarte, 2003b), siendo éstos los primeros estudios en su tipo (Eguiarte *et al.*, 2000). A partir de estos datos se han comenzado a estimar parámetros de genética de poblaciones tales como flujo génico, distancias genéticas y diferenciación genética, que son críticos para poder entender los procesos evolutivos que se encuentran operando en las especies (Eguiarte, 1990; Eguiarte *et al.*, 1999, 2000). En particular, se ha encontrado que las poblaciones silvestres de *Agave* generalmente presentan niveles muy elevados de variación genética, mientras que las poblaciones cultivadas tienen niveles muy bajos (Colunga *et al.*, 1999; Eguiarte *et al.*, 2000).

En la elaboración de mezcal son utilizadas varias especies de *Agave*, pero en muchos casos la explotación se realiza única y exclusivamente de

poblaciones silvestres. Esta práctica tiene un impacto fuerte en las poblaciones silvestres, tanto en términos demográficos como genéticos.

En el sur de México, dos especies son utilizadas para elaborar mezcales, llamados en general “mezcal papalote”, ya que las plantas son conocidas localmente como papalometl. Estos mezcales son localmente muy apreciados, y en el extranjero se vende botellas de ellos en cientos de dólares. En Oaxaca, el mezcal papalote se elabora de *Agave potatorum* Zucc., y en algunas regiones se le llama “mezcal tobalá”, mientras que en Guerrero se usa *A. cupreata* Trel. & Berger. En el caso particular de Guerrero, en la zona de Chilpancingo y Chilapa la industria alrededor de este mezcal es muy importante: existen envasadoras industriales en la región y grandes viveros con plantas juveniles de *A. cupreata*, con las que se pretende reforestar parte de la región de Chilapa. *A. cupreata* también crece y se utiliza para hacer mezcal en Michoacán, pero las poblaciones presentan un alto grado de disminución y perturbación (A. Silva obs. pers.).

De acuerdo con Gentry (1982), tanto *Agave cupreata* como *Agave potatorum* pertenecen al subgénero *Agave* (grupos *Crenatae* y *Hiemiflorae*, respectivamente), que incluye plantas de gran tamaño y con inflorescencias en forma de candelabro, en donde las flores surgen de pedúnculos laterales perpendiculares al eje principal del escapo. Según Gentry (1982), el grupo *Crenatae*, al que pertenece *A. cupreata*, se distingue por los márgenes crenados de las hojas, con dientes variados y con panículas profundas y angostas. Las flores son estructuralmente homogéneas, con tubos poco profundos y tépalos muy largos conduplicados y angostos durante la antesis; es por ello que la distinción de especies dentro del grupo se hace con base en caracteres de las hojas. El color de las plantas va del verde claro al verde-amarillo y las hojas más jóvenes están cubiertas por un vello glauco que se acentúa con los patrones impresos de las espinas de hojas anteriores. *Agave cupreata*, cuyo nombre responde al color cobre de sus espinas, se distingue también por sus hojas anchas verde claro muy dentadas y con impresiones de espinas muy marcadas en los brotes. Al igual que otras especies del género en sus correspondientes hábitats, *A. cupreata* constituye una especie clave al proveer alimento y morada

a múltiples organismos, sobre todo durante la época seca en que florece (de enero a marzo) y produce gran cantidad de néctar, de especial interés para insectos y aves. Es una especie que se distribuye de manera restringida, en poblaciones aisladas, en bosques de pino y pino/encino, y ha sido reportada por Gentry (1982) en el norte del estado de Michoacán y el centro del estado de Guerrero, entre los 1220 y 1800 msnm. Es muy probable que la distribución de la especie sea mayor, sobre el largo de la Sierra Madre del Sur donde existen regiones con vegetación y condiciones climáticas similares a las de las localidades donde ha sido reportada.

Agave potatorum pertenece al grupo Hiemiflorae de Gentry (1982) y se caracteriza por poseer agregados de flores que forman panículas poco profundas. En algunas especies como *A. hiemiflora*, *A. congesta* y *A. potatorum* los pedúnculos laterales son muy cortos, dando a la inflorescencia una apariencia racimosa. En todo el grupo los pedúnculos presentan en su base brácteas oscuras. En cuanto a la estructura floral, existe un amplio intervalo de variación dentro de las especies, lo que causa problemas taxonómicos por resolver. Las plantas son pequeñas a medianas con hojas ovaladas a lanceoladas, frecuentemente glaucas, que forman rosetas simétricas de tallos cortos. *A. potatorum*, tiene rosetas pequeñas con hojas glaucas blancas a verdes cuyos márgenes son ondulados a profundamente crenados con espinas prominentes. Por su naturaleza polimórfica se trata de una especie taxonómicamente problemática. Se distribuye en las tierras altas semiáridas de Puebla y Oaxaca entre los 1,240 y 2,300 msnm, donde se asocia en las pendientes con remanentes de vegetación de pinos y encinos. Florece en otoño, de septiembre a diciembre (Gentry, 1982).

En este proyecto analizamos la variación dentro y entre las poblaciones de *A. cupreata* y *A. potatorum*, así como otros parámetros de genética de poblaciones, con la intención de evaluar sus recursos genéticos, las relaciones de parentesco entre las poblaciones y el impacto que pueden traer sobre estos recursos la extracción excesiva, la deforestación y diferentes prácticas de manejo. Estos datos serán útiles para entender cómo el manejo afecta la

variación genética de las poblaciones, y será información relevante para llegar a proponer un manejo sustentable y para avanzar en la comprensión de la genética de la conservación para el género *Agave*. Así, estaremos en posibilidades de sugerir cuáles serían las poblaciones o individuos que deberían formar una colección núcleo por cada especie.

Para obtener dicha información, realizamos un análisis usando como marcadores moleculares los ISSRs: Inter Simple Sequence Repeats (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Estos marcadores han probado ser una técnica muy poderosa y robusta para el análisis a nivel de poblaciones y entre especies relacionadas (Godwin *et al.*, 1997, Bernet *et al.*, 2002). Los ISSRs pueden considerarse como un tipo de marcadores genéticos asociados a los microsatélites. Los microsatélites son secciones hipervariables de ADN que consisten en repeticiones seriadas de dinucleótidos simples como (CT)_n ó (CA)_n, ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucarionte. Los motivos repetidos, llamados también SSRs (simple sequence repeats) pueden ser penta-, tetra-, tri- y dinucleótidos. Las longitudes de las secuencias de microsatélites tienden a ser altamente variables entre individuos debido a las altas tasas de mutación que sufren, ya que cuando el ADN se replica durante la meiosis la enzima ADN polimerasa puede sintetizar reiteradamente hacia adelante o hacia atrás en las unidades repetidas, eliminando o agregando unidades a la cadena. Las cadenas resultantes pueden entonces presentar menos o más unidades de repetición (o pares de bases) que las cadenas originales. Estos segmentos pueden ser utilizados como marcadores en la resolución de múltiples problemas biológicos como son la identificación de individuos, la distinción de variedades intraespecíficas (particularmente en especies con importancia económica), la identificación de paternidad y maternidad, el mapeo genético, la evaluación de diversidad y subdivisión genética en poblaciones, reconstrucciones filogenéticas, análisis de introgresión e hibridización, y distinción de individuos con origen clonal y sexual (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

Los ISSRs son marcadores semiarbitrarios amplificados por PCR en la presencia de un oligonucleótido complementario a un microsatélite, diseñado

para unirse a los motivos repetidos de di- y trinucleótidos (evitando los mononucleótidos presentes en el cloroplasto). Los oligos de ISSRs incluyen un motivo repetido y un par de bases arbitrario en el extremo 3', utilizando un solo oligo a la vez por reacción de amplificación. El nucleótido extra del extremo 3' permite la amplificación sólo si el oligo se une al extremo 5' de un microsatélite; la enzima polimerasa alargará el oligo si el nucleótido extra se acopla con el primero del microsatélite. Cuando dos secuencias repetidas se presentan dentro de una distancia amplificable y con una orientación invertida, el decanucleótido complementario permite la amplificación del segmento de ADN. La banda generada, con un tamaño particular (peso molecular), se considera un "locus", que representa el segmento de ADN asociado a los microsatélites.

Al analizar una muestra se genera un patrón característico de productos de PCR que se puede considerar una "huella digital genética". El polimorfismo entre individuos de la misma población puede detectarse ya que el análisis es sensible a la presencia/ausencia del elemento genómico reconocido por el oligo, y a la longitud de la secuencia intermedia amplificada (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

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

Palabras clave: *Agave potatorum*, *Agave cupreata*, mezcal, genética de la conservación, genética de poblaciones, ISSR's, AMOVA, estructura genética, diversidad genética.

OBJETIVOS ORIGINALES DEL PROYECTO

1. A partir de los datos de distribución geográfica de las especies mezcaleras *Agave potatorum* y *A. cupreata* de Gentry (1982) y datos de herbario, determinar una serie de posibles poblaciones silvestres y manejadas (mínimo 5 por especie) a analizar.
2. En las localidades elegidas, seleccionar las poblaciones y llevar a cabo la colecta de material genético tanto de las poblaciones silvestres como de las manejadas (30-50 hojas jóvenes de individuos diferentes que representen a la población).
3. Extracción del ADN de los individuos colectados.
4. Obtención y captura de los datos de los marcadores que resulten polimórficos y confiables (ISSRs).
5. Obtención de los niveles de variación genética por población y especie, su interpretación en términos de genética de poblaciones y su comparación entre especies.
6. Comparación de los marcadores genéticos entre las poblaciones silvestres y las manejadas.

MATERIALES Y METODOS

A partir de la información presentada por Gentry (1982), de datos obtenidos de las etiquetas de ejemplares del Herbario Nacional y de mapas de distribución potencial facilitados por la CONABIO, se planearon tres salidas de campo en las que se trató de cubrir la mayor parte de la distribución de las especies. De esta manera colectamos 13 poblaciones de *Agave potatorum*, 12 en Oaxaca y 1 en Puebla y 16 poblaciones de *A. cupreata*, 13 en Guerrero y 3 en Michoacán (Tabla 1). En cada población se registró su posición geográfica y altitud, utilizando un geoposicionador Garmin suministrado por la CONABIO. Se tomó también una medida de densidad de las rosetas utilizando el método del “vecino más cercano” (Krebs, 1989), para tener un estimador que estandarizara el procedimiento de muestreo genético, aunque en algunas poblaciones no fue posible debido a circunstancias adversas por la hora del día o malas condiciones topográficas (densidad por hectárea \pm EE; ver archivo anexo Georreferencia).

Tabla 1. Características geográficas de las poblaciones colectadas de dos especies de *Agave* mezcaltos .

Población	Nombre	Estado	Altitud (msnm)	Coordenadas	
				N	W
<i>Agave potatorum</i>					
P1	San Juan Guelavia	Oaxaca	1643	16°59'35.8"	96°31'50"
P2	Camaron	Oaxaca	1281	16°32'33.7"	95°57'37.9"
P3	San Juan Lajarcia	Oaxaca	1042	16°31'18.5"	95°55'40.2"
P4	San Dionisio Ocotepc	Oaxaca	1893	16°48'45.0"	96°20'53.5"
P5	Zompantle	Oaxaca	2009	16°56'00.1"	96°17'30.5"
P6	Albarradas	Oaxaca	1769	16°57'54.3"	96°10'35.1"
P7	Miahuatlán	Oaxaca	1900	16°15'15.9"	96°33'36.9"
P8	El Estudiante	Oaxaca	2028	17°08'38.9"	96°37'20.5"
P9	Sta. Catarina	Oaxaca	2064	17°18'0.5.1"	96°32'52.7"
P10	Yanhuitlán	Oaxaca	2244	17°32' 13.4"	97°21'26"
P11	Zapotitlán	Oaxaca	2059	17°51'21"	97°49'47"
P12	Tequistepec	Oaxaca	2096	18°01'54.9"	97°41'34.7"
P13	Azumbilla	Puebla	2174	18°40'36.3"	97°21'26.6"
<i>Agave cupreata</i>					
C1	Ayahualco/vivero	Guerrero	1443	17°37'40.5"	99°11'25.0"
C2	Ayahualco	Guerrero	1542	17°37'00"	99°11' 0.5"
C3	La Esperanza	Guerrero	1600	17°45'53.2"	99°14'52"
C4	La Esperanza/vivero	Guerrero	1600	17°45'53.2"	99°14'52"
C5	Trapiche Viejo/vivero	Guerrero	1082	17°43'20.5"	99°01'07.4"
C6	Trapiche Viejo	Guerrero	1082	17°43'20.5"	99°01'07.4"
C7	Antes Trapiche Viejo	Guerrero	1452	17°41'55.8"	99°03'24.8"
C8	Santa Cruz/vivero	Guerrero	1880	17°39'23"	99°07'30.6"
C9	Santa Cruz	Guerrero	1744	17°38'19.6"	99°07'56.6"
C10	Mesones	Guerrero	1852	17°32'37"	98°51'48.1"
C11	Tixtla	Guerrero	1616	17°32'59"	99°26'39.2"
C12	Xochipala	Guerrero	1270	17°48' 03.6"	99°40' 16"
C13	La Laguna	Guerrero	1997	17°43' 29.3"	99°44' 52.7"
C14	Etucuar	Michoacán	1792	19°25'07.7"	101°11'28.3"
C15	Pie de la Mesa	Michoacán	1928	19°37'01.8"	100°56'32.6"
C16	Tzitzio	Michoacán	1980	19°34'26.2"	100°56'19.9"

En cada sitio se registraron las características de la vegetación asociada y las especies más frecuentes (ver archivo anexo Georreferencia). No reportamos la geoposición por cada individuo, ya que fue imposible obtener este dato dado el nivel de resolución del geoposicionador, por la logística (sólo tenemos un geoposicionador, pero usualmente 3 o más personas realizaban la colecta) y por

el hecho de que las poblaciones se encuentran en laderas, donde el error de lectura es mayor y se distorsiona la verdadera distancia entre los individuos.

El área de muestreo abarcó entre una y cuatro hectáreas. En cada población se trató de colectar tejido de entre 40 y 60 individuos, usando para esto la hoja (penca) extendida más joven, de tal manera que la extracción de ADN fuera óptima. Las muestras se etiquetaron y conservaron en N₂ líquido hasta su almacenamiento en ultracongelador en el Instituto de Ecología. Todas las muestras están catalogadas y depositadas en nuestra colección de tejidos a -80°C, separadas en dos (muestra de uso y muestra de respaldo).

De estas poblaciones, se eligieron para cada especie las cinco que nos parecieron más representativas de los diferentes tipos de vegetación en que se encuentran, las que tuvieran un mayor número de individuos y con las que se cubriera la mayor parte de la distribución geográfica de las especies (Figura 1). De cada una de estas 10 poblaciones extrajimos el ADN de entre 35 y 45 individuos, siguiendo el protocolo de CTAB de Doyle & Doyle (1987) modificado con STE, como detallamos en el Apéndice 1.

visualizaron en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio al cual se le tomó una foto Polaroid.

Se analizó 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 2 (ausencia). De esta manera se obtuvo una matriz por población (ver archivo adjunto Datos Genéticos) en cada una de las especies.

Con estas matrices se realizaron los siguientes análisis:

- a) Calculamos las frecuencias alélicas considerando que las poblaciones se encuentran en el equilibrio de Hardy-Weinberg, usando la corrección de Lynch y Milligan (1994),
- b) Obtuvimos los índices de variación genética dentro y entre poblaciones y especies, a partir de la heterocigosis y proporción de loci polimórficos,
- c) Determinamos las diferencias entre sitios con el estadístico F_{st} usando el método de Weir y Cockerham (1984) y las distancias genéticas de Nei (1972),
- d) Obtuvimos estimadores de flujo génico (Nm) a partir del estadístico F_{st} y, dendrogramas UPGMA a partir de las distancias genéticas,
- e) Realizamos un análisis de aislamiento por distancia con una prueba de Mantel, y
- f) Obtuvimos estimaciones de la partición de la varianza genética a varios niveles tipo AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992).

La mayor parte de los análisis se realizó con el programa TFPGA 1.3 (Miller, 1997), excepto el AMOVA, que se realizó con el programa Arlequin 2.0 (Schneider *et al.* 2000)

RESULTADOS

I. Aspectos ecológicos

Ambas especies se encuentran generalmente asociadas a encinares (*Quercus sp.*) y palmas (*Brahea edulis*) en ambientes calcáreos (ver archivo adjunto Georreferencia). La mayoría de los sitios corresponden a laderas, aunque la orientación es variable. En varios de los casos (ver archivo adjunto Georreferencia) las especies se encontraban en sitios altamente perturbados. En general, *A. potatorum* presenta densidades más bajas que *A. cupreata*. Ambas especies presentan gran variación en los tamaños y forma de las rosetas y espinas, especialmente en *A. potatorum*, ya que en algunas poblaciones los individuos reproductivos son pequeños, mientras que en otras son muy grandes y robustos. Sería importante realizar un detallado estudio poblacional y morfométrico de ambas especies.

Agave potatorum parece ser actualmente una especie relativamente rara, aunque sus poblaciones no se ven tan perturbadas como las de *A. cupreata*. Esta última especie presenta abundancias mayores para las poblaciones de Guerrero comparadas con las de Michoacán. En general las poblaciones de Michoacán están mucho más separadas unas de otras, habiendo desaparecido de las cercanías de las comunidades por explotación intensiva. Prácticamente sólo se le encuentra en los sitios donde no hay productores de mezcal locales. Sin embargo, en estos sitios las densidades y aspecto general de las poblaciones llegan a ser similares a las de Guerrero.

II. Genética de poblaciones

Analizamos entre 30 y 44 individuos por población dando un total de 348 individuos analizados (189 para *A. potatorum* y 159 para *A. cupreata*). La diferencia entre el número de individuos colectados 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 16 loci en ambas especies. En total se generó una base de datos de 5,568 caracteres (ver archivo adjunto Datos Genéticos). Las frecuencias alélicas por locus por población para cada especie se encuentran en el archivo adjunto Resultados. Las frecuencias fueron estimadas con el método de expansión de Taylor de Lynch y Milligan (1994), recomendado para marcadores dominantes y que considera que las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg. Esta es una suposición razonable, ya que en general las especies del género no se autopolinizan (ver revisión en Eguiarte *et al.* 2000, ver también Navarro-Quezada *et al.* 2003).

Variación genética

Estimamos la variación genética utilizando la Heterocigosis esperada en el equilibrio de Hardy-Weinberg y con la proporción de loci polimórficos con el criterio del 95%, (solo se considera un loci polimórfico si el alelo más común tiene una frecuencia alélica máxima del 95 %, método que permite comparar muestras de tamaños diferentes), ambas en el nivel poblacional (H_s y P_s) y en el total (H_t y P_t).

Los niveles de variación genética totales en el nivel de especie fueron mayores en *A. cupreata* ($H_t=0.2594$, $P_t= 87.5$) que en *A. potatorum* ($H_t= 0.1705$, $P_t= 68.75$) (Tabla 2).

En el nivel poblacional *A. cupreata* presenta en general mayores niveles de variación genética, aunque la diferencias es solo marginalmente significativa ($g.l = 9$; $F = 4.18$; $p = 0.07$), con un promedio de $H_s = 0.2192$ (SD = 0.026). Los valores poblacionales se encuentran en un rango de $H_s = 0.1910$ en Etúcuaro, a una $H_s = 0.2483$ en La Laguna. En *A. potatorum* la variación genética es más baja, con una H_s promedio = 0.1625 (SD = 0.057) y un rango de H_s que va de 0.1001 en El Camarón a $H_s = 0.2316$ en Miahuatlán (Tabla 2).

Tabla 2. Variación genética en *A. cupreata* y *A. potatozum*: Heterocigosis, porcentaje de loci polimórficos al 95% y número de individuos de las poblaciones analizadas por especie. Se muestran los valores poblacionales, su promedio, y los valores totales por especie.

<i>A. cupreata</i>					
No. pobl.	Edo.	Nombre	N	H_s	P_s
C3	Gro.	La Esperanza	31	0,2322	68,75
C10	Gro.	Mesones	32	0,1933	50,00
C13	Gro.	La Laguna	30	0,2483	87,50
C14	Mich.	Etúcuaro	36	0,1910	62,50
C16	Mich.	Tzitzio	30	0,2314	68,75
Medias			31,8	$H_s = 0,2192$	$P_s = 67,50$
				SD=0,0256	SD=13,55
Total			159	$H_t = 0,2494$	$P_t = 87,5$
				SD=0,0953	
<i>A. potatozum</i>					
No. pobl.		Nombre	N	H_s	P_s
P2	Oax.	Camarón	40	0,1001	37,5
P7	Oax.	Miahuatlán	30	0,2316	75
P9	Oax.	Sta. Catarina	31	0,1898	68,75
P11	Oax.	Zapotitlán	44	0,1827	56,25
P13	Puebla	Azumbilla	43	0,1083	31,25
			37,6	$H_s = 0,1625$	$P_s = 47,563$
				SD = 0,0565	SD = 19,06
Total			188	$H_t = 0,1705$	$P_t = 68,75$
				SD = 0,1440	

Diferenciación entre poblaciones

Para detectar diferencias en las frecuencias alélicas entre poblaciones dentro de las especies, realizamos la prueba exacta de Raymond y Rousset (1995). En *A. potatozum* encontramos diferencias significativas ($P < 0.05$) en 9 de los 14 loci polimórficos (2 loci fueron monomórficos en total, 64.29%), mientras que en *A. cupreata* encontramos diferencias significativas en 12 de estos 16 loci (en el 75% de los casos; Archivo Resultados).

La diferenciación genética, medida como la F_{st} según Weir y Cockerham (1984), resultó significativa dentro de las dos especies, como se podría esperar de las pruebas exactas de Raymond y Rousset (1995). La diferenciación resultó

mayor en *A. cupreata* ($F_{st} = 0.154$, SD = 0.0159, límite inferior del intervalo de confianza al 95% obtenido por 1000 iteraciones bootstrap = 0.1196, superior = 0.1789) que en *A. potatorum* ($F_{st} = 0.068$, SD = 0.0107, límite inferior del intervalo de confianza al 95% = 0.0505, superior = 0.0876). Los intervalos de confianza indican que en ambos casos la diferencia es significativamente diferente de 0 y que *A. cupreata* presenta mayor diferenciación que *A. potatorum*. A partir de las F_{st} estimamos los valores de Nm con la fórmula de Crow y Aoki (1984), y fue más baja en *A. cupreata* ($Nm = 0.88$) que en *A. potatorum* ($Nm = 2.16$).

Distancias genéticas

Las distancias genéticas se estimaron con la Distancia de Nei (1972), D , y fueron en promedio más mayores entre las poblaciones de *A. cupreata* (Tabla 3) $D = 0.0573$ SD = 0.0255, con un mínimo de 0.0196 entre Mesones y La Laguna y un máximo de 0.1057 entre La Esperanza y Tzitzio. La distancia genética promedio entre las poblaciones de *A. potatorum* fue menor (Tabla 3), con una media de $D = 0.0158$, SD = 0.0046, con un rango de 0.0089 Camarón y Zapotitlán, a 0.0239 entre Camarón y Miahuatlán.

Tabla 3. Distancias genéticas de Nei (1972) entre pared de poblaciones de cada especie.

<i>A. cupreata</i>						<i>A. potatorum</i>					
Población	c3	c10	c13	c14	c16	Población	p2	p7	p9	p11	p13
c3	*					p2	*				
c10	0,058	*				p7	0,024	*			
c13	0,028	0,020	*			p9	0,016	0,016	*		
c14	0,062	0,076	0,047	*		p11	0,009	0,016	0,014	*	
c16	0,106	0,082	0,048	0,049	*	p13	0,014	0,020	0,010	0,020	*

Utilizando estas distancias construimos para cada especie sus respectivos dendrogramas con base en el método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), con una prueba de bootstrap de 1000

réplicas. En las Figuras 2 y 3 se ven claramente las relaciones de similitud entre las poblaciones y la mayor distancia entre las poblaciones de *A. cupreata*. En *A. cupreata* hay dos grupos (Fig. 2), uno formado por las tres poblaciones de Guerrero: Mesones, La Laguna y La Esperanza, y otro formado por las dos poblaciones de Michoacán, Etúcuaro y Tzitzio. En *A. potatorum* vemos tres grupos (Fig. 3): uno formado solo por Miahuatlán, que es la población más sureña del estudio, y otros dos grupos no muy bien diferenciados, uno constituido por Camarón y Zapotitlán y otro por Azumbilla y Sta. Catarina.

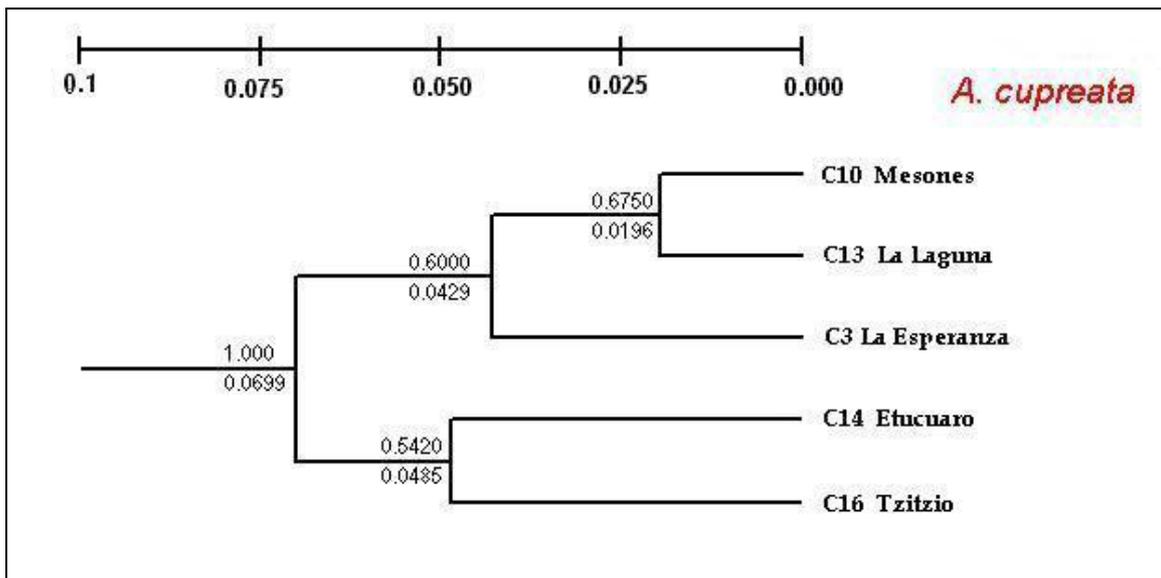


Fig. 2. Relaciones de similitud entre las poblaciones de *A. cupreata* con base en las distancias de Nei (1972). En la parte superior de cada nodo se muestran los valores de bootstrap (proporción) y en la inferior, la distancia genética.

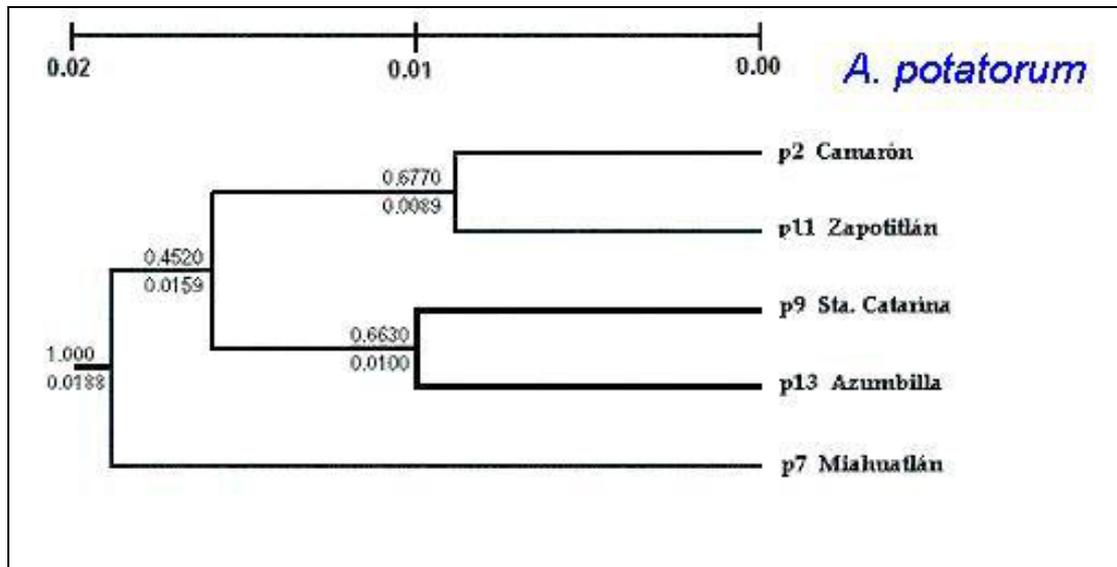


Fig. 3. Relaciones de similitud entre las poblaciones de *A. potatozum* con base en las distancias de Nei (1972). En la parte superior de cada nodo se muestran los valores de bootstrap (proporción) y en la inferior, la distancia genética.

Análisis conjunto

Dado que morfológicamente algunas poblaciones de las dos especies se parecen, y tomando en cuenta que los mismos loci se detectaron y leyeron para las dos especies, decidimos intentar un análisis conjunto usando el método del AMOVA de Excoffier *et al.* (1992), tal como está implementado en el paquete Arlequin Ver 2.0 (Schneider *et al.*, 2000). En este análisis se lleva a cabo una partición de la varianza genética a varios niveles, y como sólo se consideran los genotipos, no se hacen inferencias sobre la estructura genética ni se estiman frecuencias alélicas. Así el análisis es más robusto aún si hubiera desviaciones importantes a nivel Hardy-Weinberg (*i.e.*, altos niveles de endogamia). Encontramos que la Diferenciación de poblaciones dentro de especies (F_{sc}), da un valor de 0.17295, la diferenciación de las poblaciones con respecto al total de ambas especies (F_{st}) fue de 0.25447, mientras que la diferenciación debida exclusivamente al nivel de especies (F_{ct}) sólo explica el 0.09857 de la variación. Esto significa que hay en general una diferenciación relativamente alta entre las poblaciones, que representa el 25.4% de la variación genética total, y que el

componente de la variación genética debido exclusivamente a diferencias a nivel de especie es menor, de solo 9.9%. Todos estos valores resultan significativamente diferentes de 1,000 en pruebas de aleatorización a una P menor de 0.0001. Las estimaciones de F_{st} pareadas por población con este método son significativas en todos los casos, con una probabilidad (P) menor a 0.01, indicando que todas las poblaciones son diferentes entre si a nivel genético.

Considerando de manera simultánea las dos especies, se obtiene el UPGMA de la Figura 4. La figura indica que *A. potatorum* está formado por un grupo relativamente similar de poblaciones, mientras que *A. cupreata* como especie esta mucho más diferenciada como especie, ya que dos de sus poblaciones (Mesones y La Laguna) están muy relacionadas a *A. potatorum*, mientras que las poblaciones de Michoacán son las más diferentes de todas la demás.

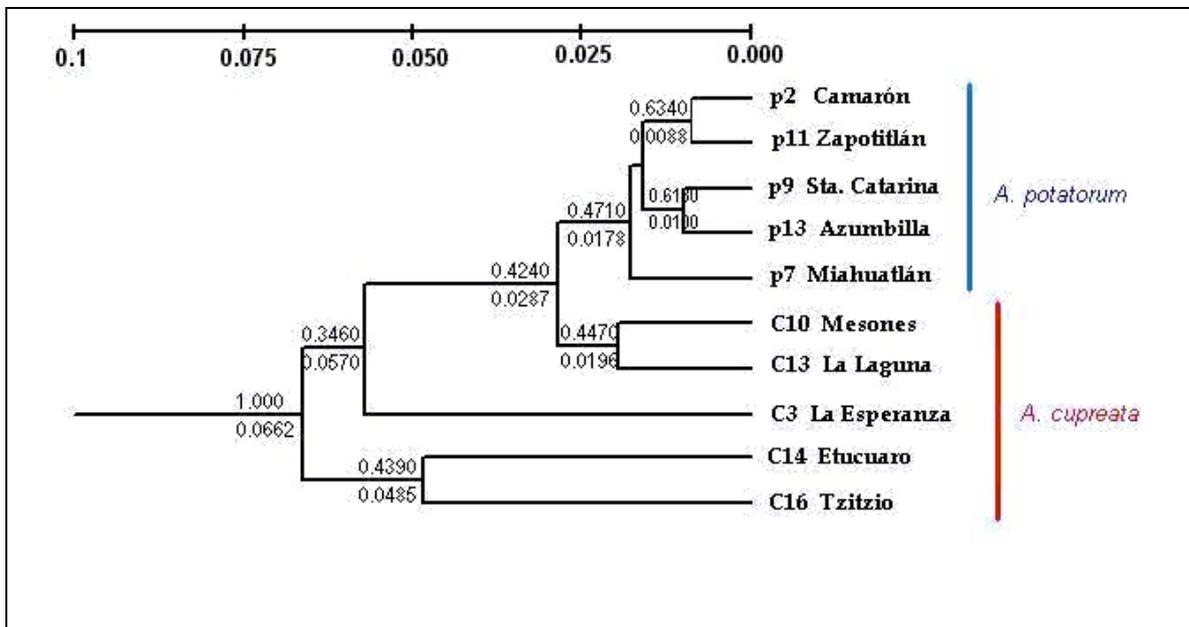
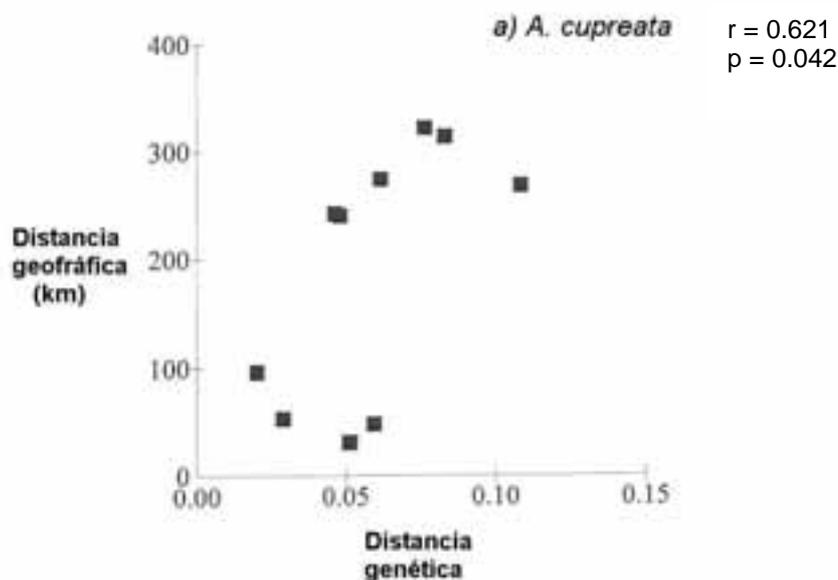


Fig. 4. Dendrograma con *A. cupreata* y *A. potatorum* en análisis conjunto. Sobre los nodos se indican los valores de bootstrap (proporción) y debajo, las distancias genéticas.

Aislamiento por distancia

Para analizar si existe algún patrón de aislamiento por distancia (Slatkin, 1994), realizamos pruebas de Mantel con el programa TFPGA (Miller, 1997) usando 1000 permutaciones para cada especie. La figura 5.a muestra el patrón para *A. potatozum*, en donde no hay una relación significativa de la distancia geográfica con respecto a la distancia genética. En contraste, en *A. cupreata* (Fig 5.b) la relación sí es significativa, con una $r = 0.6213$ y una $p = 0.0420$. Cuando se realiza el análisis global (Fig. 5.c), juntando las dos especies, obtenemos un $r = 0.4355$, con una $p = 0.012$, es decir, en total también existe una relación entre las distancias geográficas y genéticas, posiblemente debido a que las poblaciones más lejanas geográficamente, las de Michoacán, también son las más diferentes genéticamente.



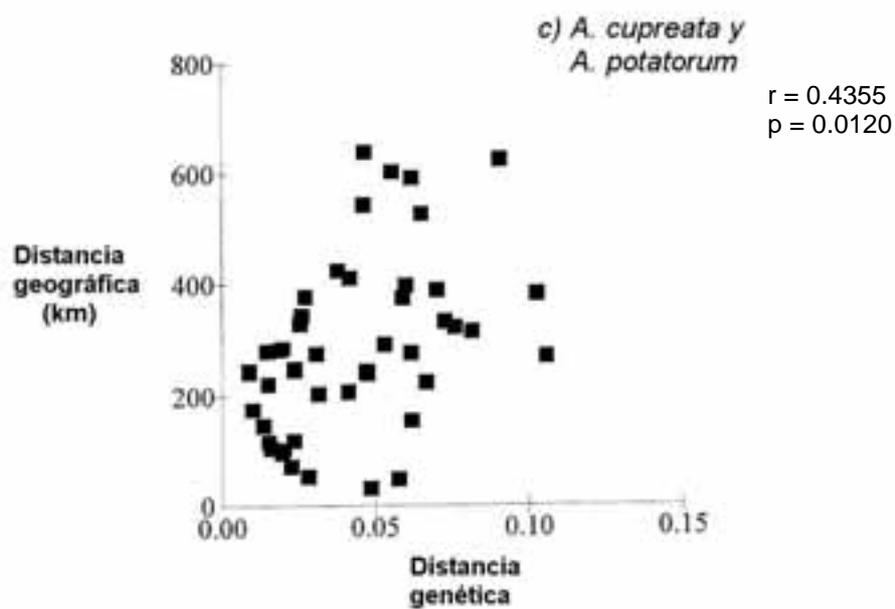
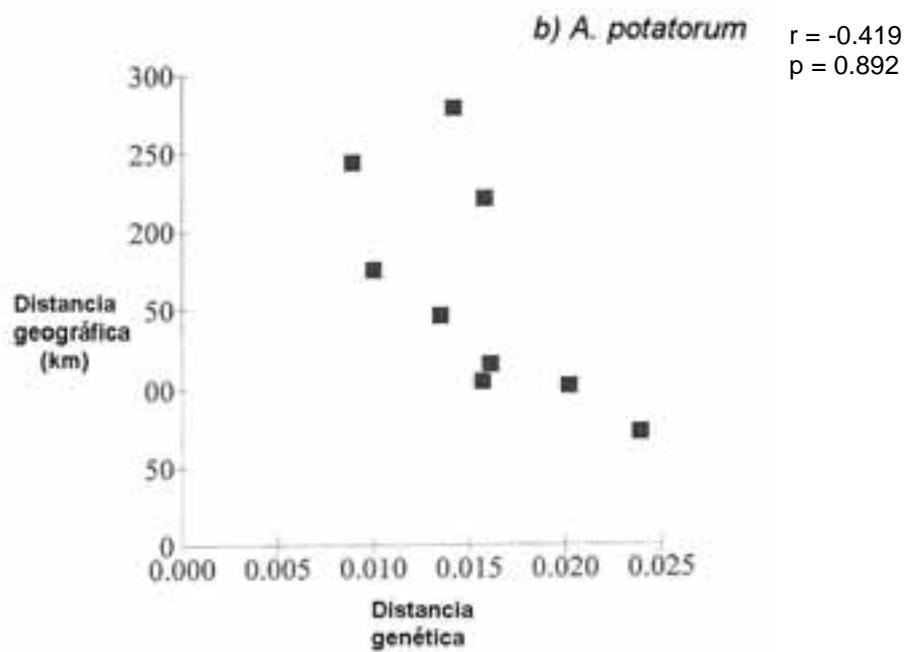


Fig. 5. Correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica. a) *A. cupreata*, sí es significativa; b) *A. potatozum*, no es significativa; c) ambas especies, sí es significativa.

DISCUSIÓN

Los niveles de variación genética, tanto en el nivel total por especie como a nivel poblacional son mayores en *A. cupreata* ($H_t = 0.25$, $H_s = 0.22$) que en *A. potatorum* ($H_t = 0.17$, $H_s = 0.16$). Del mismo modo, la diferenciación genética entre las poblaciones es mayor en *A. cupreata* ($A. cupreata F_{st} = 0.154$, $D promedio = 0.06$ *A. potatorum F_{st} = 0.068, $D promedio = 0.02$). Esta mayor diferenciación en *A. cupreata* se aprecia claramente en el largo de las ramas de los dendrogramas de las Figuras 2, 3 y 4.*

Los niveles de variación genética son similares a los que detectamos en las especies del complejo de *A. deserti* del desierto de Sonora, utilizando RAPDs (Navarro-Quezada *et al.*, 2003) (Tabla 5), que son marcadores molecularmente similares aunque menos reproducibles que los ISSRs. Por ejemplo promedio de heterocigosis que reportan Nybom y Bartish (2000) para 41 estudios con RAPDs en plantas es de $H_s = 0.214$, $SD = 0.117$, o sea que nuestras especies están alrededor de los valores promedios de variación genética.

Comparando la diferenciación genética, los valores de F_{st} son similares a los obtenidos en nuestro estudio del complejo *A. deserti* (Navarro-Quezada *et al.*, 2003) (rango de 0.084 a 0.135, Tabla 5). También resultan similares a los obtenidos en nuestro estudio con isoenzimas (que teóricamente podrían ser comparables) en *A. lechuguilla* ($F_{st} = 0.083$), pero son mucho más bajos que los reportados en *A. victoriae-reginae*, $F_{st} = 0.236$. Las distancias genéticas de los dendrogramas son congruentes con lo anterior: similares a las que encontramos en *A. deserti*, pero mucho menores que las que se encuentran dentro de *A. victoriae-reginae*.

Comparando con plantas de otros grupos taxonómicos, el promedio de F_{st} en 78 estudios según Nybom y Bartish (2000) fue de 0.35, y de G_{st} (un análogo que se calcula de manera ligeramente diferente) en 31 estudios fue 0.29, ambos superiores a los valores que encontramos en ambas especies. Por lo tanto, podemos concluir que la diferenciación en ellas es pequeña, lo cual es

congruente con su biología reproductiva. En ambos agaves 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 5).

Tabla 5. Datos de diversidad genética y diferenciación reportados para otras especies del género y de la familia, así como de otros grupos de plantas.

	H_s	P_s	F_{st}	Marcador	Referencia
<i>A. cupreata</i>	0,25	87,5	0,154	ISSRs	Este estudio
<i>A. potatorum</i>	0,17	68,75	0,0688	ISSRs	Este estudio
<i>A. subsimplex</i>	0,28	88	0,31	Isoenzimas	Eguiarte et al. (2000)
<i>A. subsimplex</i>	0,14	79	0,08	RAPDs	Navarro (1999)
<i>A. cerulata</i>	0,18	78	0,1	RAPDs	Navarro (1999)
<i>A. lechuguilla</i>	0,39	96	0,09	Isoenzimas	Silva y Eguiarte (2003b)
<i>A. victoriae-reginae</i>	0,33	83	0,24	Isoenzimas	Martínez-Palacios et al. (1999)
<i>Yucca filamentosa</i>	0,205	67,6	0,172	Isoenzimas	Massey y Hamrick (1998)
<i>Manfreda brachystachya</i>	0,48	100	0,03	Isoenzimas	Eguiarte et al. (2000)
Monocotiledóneas	0,190	----	0,38	RAPDs	Nybom y Bartish (2000)
Perenes de vida larga	0,242	----	0,25	RAPDs	Nybom y Bartish (2000)
Distribución regional	0,222	----	0,43	RAPDs	Nybom y Bartish (2000)

Los valores calculados de Nm dependen directamente de nuestra estimación de la F_{st} , pero es interesante tratar de interpretarlos. Nm es la multiplicación del tamaño efectivo, N_e por la tasa de migración, y nos habla del número de “migrantes efectivos” (ver Eguiarte, 1990, para una discusión más detallada y referencias). Diferentes estudios teóricos han demostrado que si Nm es menor de 1, las diferentes poblaciones están evolucionando de manera más o menos independientes (o sea domina la deriva génica), mientras que si Nm es mayor de 1, evolucionan de manera más o menos conjunta, y si Nm es mayor de 4, se comportan como una gran población (o sea, domina el flujo génico). Usualmente se dice que un solo migrante efectivo (Nm igual o mayor a 1) evita la divergencia por deriva génica de las poblaciones. El valor que estimamos de Nm en *A. cupreata* fue de 0.88, o sea, en promedio las poblaciones están divergiendo

entre sí por deriva génica, mientras que en *A. potatorum* la Nm fue más alta, de 2.16, que sugiere que hay flujo génico y la deriva génica es mínima en la divergencia entre las poblaciones. Podemos comparar nuestros valores con los obtenidos en el complejo *A. deserti* por Navarro-Quezada et al. (2003), donde encontramos un rango de 2.99 a 4.38 usando la F_{st} y un rango de 3.36 a 3.83 usando el método de los alelos raros de Slatkin (1994). Esto sugiere que hay mucho más flujo génico en el complejo *deserti* que en nuestras dos especies mezcaleras, especialmente en comparación con *A. cupreata*. Un problema de estos métodos es que suponen que ya se llegó a un equilibrio entre las fuerzas evolutivas, en particular entre deriva génica y migración. Sin embargo, también pueden parecerse las poblaciones si se separaron hace muy poco tiempo, aunque actualmente ya no exista flujo génico. Análisis más detallados con más marcadores nos ayudarían a avanzar en este punto.

Algunas poblaciones de *A. potatorum*, en particular Camarón y Azumbilla, presentan niveles de variación genética muy reducidos. Sería interesante evaluar si esto corresponde a menores tamaños históricos de población, a cuellos de botella, a que son poblaciones en el límite de su distribución y/o aisladas, o a que se ha reducido su diversidad debido a manejo ancestral (J. Larson, com. personal).

Los patrones de diferenciación genética total son interesantes. Indican que, aunque *A. potatorum* tiene diferencias genéticas estadísticamente significativas entre todas las poblaciones, es básicamente un conjunto homogéneo de poblaciones. En cambio, *A. cupreata* tiene mucha diferenciación y cuando menos dos grupos claramente diferenciados: el de Guerrero (Mesones y La Laguna por un lado, y por otro La Esperanza), y el de Michoacán, con ambas poblaciones muy diferentes entre sí.

Indudablemente se necesitan estudios ecológicos y morfológicos para evaluar mejor estos patrones de diferenciación y sus causas. Nuestro siguiente paso es evaluar, con nuestros propios recursos (*i.e.*, ya sin apoyo de la Conabio), otros marcadores genéticos y completar el análisis de todas las poblaciones colectadas. Esto nos permitirá explorar y entender mejor la

diferenciación, así como evaluar si todas estas poblaciones (junto con otras), constituyen una o dos especies, compartiendo alelos debido a que ha pasado muy poco tiempo desde su diferenciación y separación ecológica y genética, o comparten alelos por flujo génico en una poza génica común.

En relación a la genética de la conservación y para definir poblaciones interesantes (ya sea para colecta de germoplasma o para definir “denominaciones de origen”), el caso más sencillo de conservar y de sugerir “denominaciones” es *A. potatorum*, ya que como tiene menores niveles de variación genética se necesitan menos individuos para mantenerla, y como tiene menor diferenciación, con pocas poblaciones se tiene bien representado su acervo genético. De hecho, sólo parece ser realmente divergente la población de Miahuatlán de las demás. En cambio, *A. cupreata* es más difícil, ya que las poblaciones presentan mayor variación genética en promedio, por lo que se necesitarían más individuos, y las poblaciones son muy diferentes. Podemos señalar varios grupos: Mesones y La Laguna son relativamente parecidas entre si, pero la Esperanza es muy diferente y las dos de Michoacán no sólo son las más diferentes a todas las demás, sino que son muy distintas entre si. De hecho, la primera prioridad debería de ser estudiar mejor las poblaciones de Michoacán, debido a su diferenciación, y al nivel de deforestación y reducción de las poblaciones. Deberían ser objetivo de un esfuerzo especial por colectar su germoplasma y planear programas de reforestación similares a los que están operando en regiones de Guerrero.

En relación a los objetivos y tiempos señalados en el proyecto original, creemos que el presente reporte cumple bien con ellos, de hecho estamos analizando 16 loci en vez de los cinco sugeridos en nuestro proyecto original. No se analizaron las poblaciones cultivadas, ya que consideramos que era más importante tener primero un panorama claro de las poblaciones no manejadas. En el futuro las analizaremos, si conseguimos recursos económicos. El cambio de marcadores ya lo discutimos en nuestra correspondencia con la CONABIO. Consideramos que fue una buena decisión, ya que los ISSR son marcadores

muy robustos y confiables aunque significó un gran esfuerzo su montaje. Sobre las prorrogas que nos permitieron terminar el proyecto, sólo podemos decir que tuvimos una serie de graves problemas técnicos en relación con el PCR, que significó un gran esfuerzo de parte de todos los que colaboraron en el proyecto. Esto incluyó también los recursos económicos que se emplearon, ya que fueron cubiertos con el presupuesto operativo y de otros proyectos activos en el laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer al Biol. Jorge Larson por su apoyo y entusiasmo en todo el proyecto. A la Conabio por los recursos financieros. A la Biol. Cathy Isley y GEA por el gran apoyo brindado en los contactos y mapas de Guerrero. Al Dr. Abisaí García-Mendoza por su apoyo en la identificación de ejemplares y datos de colecta. A la cooperativa Mezcalera SANZEKAN TINEMI de Chilapa Gro., por su apoyo en el campo y en los viveros. Al Dr. Alejandro Martínez-Palacios y al Biol. José Reséndiz por su apoyo en la ubicación de las poblaciones en Michoacán. También queremos agradecer a la LIBB. Laura Espinosa por su valioso apoyo en el montaje de las técnicas de PCR. A los Drs. Jordan Golubov y Salvador Montes por la literatura sobre ISSRs y el diseño de los primer utilizados en este estudio. A la Dra. Valeria Souza en comentar este manuscrito y discusiones sobre todo el proyecto y las metodologías.

BIBLIOGRAFÍA

- Bornet B., Muller C., Paulus F. y Branchard M. (2002). Highly informative nature of inter simple sequence repeat (ISSR) sequences amplified using tri- and tetra-nucleotide primers from DNA of cauliflower (*Brassica oleracea* var. botrytis L.). *Genome* 45: 890-6.
- Cadaval N. , A. (1999) Estudio evolutivo de los azúcares del nectar de *Agave lechuguilla* en el desierto de Chihuahua. Tesis de licenciatura, Biólogo, 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. and K. Aoki. (1984). Group selection for a phylogenetic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of the National Academy of Science, USA.* 81: 6073-6077.

- Doyle, J.J. Y Doyle J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Eguiarte, L.E. (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.
- Excoffier L., Smouse P., Quattro J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491
- Gentry, H.S. (1982) *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona.
- Gil-Vega, K, M. Gonzalez-Chavira, O. Martínez de la Vega, J. Simpson, and G. Vandemark, (2001). Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. *Euphytica* 119: 335-341.
- Godwin I., Aitken E. Y Smith L. (1997). Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis* 18: 1524-1528.
- González Ch, R. (2000) Análsis de variación genética de *Agave deserti* en el desierto sonorense por medio de marcadores moleculares (RAPDs) Tesis de licenciatura, Biólogo, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Krebs, C. (1989). *Ecological Methodology*. Harper and Row, New York, NY, USA.
- Lynch, M. y B.G. Milligan (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3:91–99.

- 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.
- Miller, M. (1997) Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3. Computer software. Distributed by the author. Flagstaff, Arizona, USA.
- Molina-Freaner, F., and L. E. Eguiarte. (2003). The pollination biology of two paniculate agaves (Agavaceae) from northwestern Mexico: Contrasting roles of bats as pollinators. *American Journal of Botany*. 90: 1016-1024.
- Navarro Q, A. R. (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. Gonzalez-Chauvet, F. Molina-Freaner, and 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. and I. Bartish. (2000). Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology Evolution and Systematics*. 3: 93-114.
- Raymond, M.L. and F.Rousset. (1995). An exact test for population differentiation. *Evolution* 49:1280-1283.
- Schneider S., Roessli D., Excoffier L. (2000). Arlequin ver. 2000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Silva-Montellano, J. A. (2001) Ecología reproductiva y genética de poblaciones de *Agave lechuguilla* (Torr.) en un gradiente latitudinal. Tesis Doctoral. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, Distrito Federal. México.

- Silva-Montellano, A. and E. Eguiarte. (2003a) Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert: I. Floral characteristics, visitors and fecundity. *American Journal of Botany*. 90: 377-387.
- Silva-Montellano, A. and E. Eguiarte. (2003b) Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert: II. Genetic variation, differentiation and inbreeding estimates. *American Journal of Botany*. 90: 700-706.
- Slatkin, M. (1994) Gene flow and population structure. In L. Real [ed.], *Ecological genetics*, 4-17. Princeton University Press, New Jersey, USA.
- Weir, B. S., and C. Cockerham. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38: 1358-1370.
- Zietkiewicz E., Rafalski A. Y Labuda D. (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (ISSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

APENDICE 1

Extracción de ADN en *Agave*

- 1.- Moler en un mortero el tejido con nitrógeno líquido.
- 2.- Agregar 250 μ l de buffer CTAB y 750 μ l de STE, seguir moliendo hasta homogeneizar el tejido y desaparezcan los grumos. Recuperar en un tubo eppendorf de 1.5 ml y centrifugar a 10 000 rpm durante 8 minutos.
- 3.- Eliminar el sobrenadante y resuspender con 600 μ l de buffer CTAB-2x. Homogeneizar en el vortex. Centrifugar a 10 000 rpm durante 8 minutos, eliminar el sobrenadante. Escurrir en papel secante y mantener en hielo todo el tiempo.
- 4.- Agregar 8 μ l de RNAasa (7000 u/ml). Homogeneizar suavemente. Incubar a 37° por 20 minutos.
- 5.- Después agregar a cada tubo 40 μ l de proteinasa K (20 mg/ml) durante 20 minutos. Incubar a 65° durante 20 minutos.
- 6.- Agregar a cada tubo 600 μ l de cloroformo-octanol 21 :1, agitar hasta homogeneizar y centrifugar a 9 000 rpm durante 14 minutos.
- 7.- Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo (con una pipeta de 200 μ l) y precipitar el DNA con 2/3 partes del volumen final (600 μ l 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 μ l de H₂O ultra pura.

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