

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN
Y DESARROLLO, A. C.

Variabilidad genética del *Agave angustifolia* Haw.
silvestre en la sierra de Sonora determinada por AFLPs

Por

Alejandra Barraza Morales

Tesis aprobada por la

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito Parcial para Obtener
el grado de

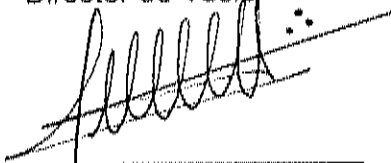
MAESTRIA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

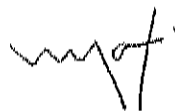
Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la I.B. Alejandra Barraza Morales, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



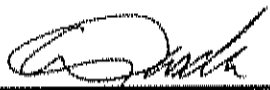
Dr. Martín Esqueda Valle
Director de Tesis



Dr. Lorenzo Felipe Sánchez Teyer
Co-director



Dra. María Auxiliadora Islas Osuna



Dr. Alfonso Gardea Béjar

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor siempre y cuando se le dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD).

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en ésta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director o directora de la tesis.



Dr. Alfonso Gardea Béjar
Director General

DEDICATORIA

A mis padres Eva y Emiliano, porque son las personas que más amo

A mi hermana Silvia

A mí

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por darme la fuerza para alcanzar mis metas y superar los obstáculos.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Posgrado.

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.** por permitirme desarrollarme en el camino de la investigación

Al **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.** por abrirme sus puertas y dar las facilidades para que este trabajo se llevara a cabo.

A **mis padres**, por su apoyo incondicional y por su cariño.

Al **Dr. Martín Esqueda Valle**, por la oportunidad de desarrollar esta investigación, por su confianza y apoyo constante.

Muy especialmente al **Dr. Felipe Sánchez**, por ser mi maestro, gracias por tu tiempo, enseñanzas, consejos, y por ayudar a mi formación en el campo de la investigación. Nunca dejaré de agradecerte.

Al **Dr. Manuel Robert** por la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo y por su apoyo.

A **Miguel Keb**, por su ayuda y conocimientos y sobre todo por la amistad que me brindaste, te quiero mucho.

A **Felipe Barredo** y **Andres Quijano**, por su amistad y apoyo. Los quiero mucho.

A **Ernesto Reyes**, por su ayuda y amistad.

A **Jaime Martínez**, por su valiosa colaboración para la realización de los análisis estadísticos y por su amistad.

A **Alfonso Sánchez**, por su ayuda en la recolección de las muestras.

A **Norma Ferrer**, por su ayuda y amistad.

A la **Dra. Mary Islas** por sus conocimientos y por sus consejos.

A todos mis amigos en Yucatán especialmente a **Darling, Ofelia, Fito y Jorge**.

A mis amigos en Hermosillo en especial a **Barbara, Bego, Carlos, Claudia, Erica, Lily, María José, Nidia, y Pablito**.

A quienes me han apoyado desde lejos con su amistad y cariño **Eloy, Fátima, Karla, Liza, Luisa, Luz del Alba, Raquel, Román y Omar**.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE APÉNDICES.....	xi
RESUMEN.....	xii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Generalidades de <i>Agave angustifolia</i> Haw.....	3
Clasificación y Descripción	3
Distribución y Ciclo de Vida	4
Variabilidad Genética en el Género <i>Agave</i>	4
Variabilidad Genética	5
Cuantificación de la Variabilidad Genética en las Poblaciones.....	6
Métodos para el Estudio de la Variabilidad Genética.....	10
<i>Agave angustifolia</i> Bacanora.....	15
Situación Actual de la Industria del Bacanora.....	16
Proyecto Bacanora	16
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	18
OBJETIVOS	19
Objetivo General	19
Objetivos Específicos	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Material Vegetal	20
Sitios de Muestreo	20
Descripción de Áreas.....	22
Estrategia Experimental	23
Extracción de ADN.....	25
Desarrollo de AFLPs.....	26
Análisis de Datos	29

RESULTADOS	34
Tinción con Nitrato de Plata	34
Evaluación de Individuos	34
Evaluación de Iniciadores	34
Marcaje Radiactivo	37
Polimorfismo Detectado por Combinación de Iniciadores.....	38
Índices de Similitud (NTSYS).....	38
Índices de Variación y Estructuración Genética (TFPGA).....	45
Distancia Genética	45
DISCUSIÓN	52
Variabilidad Intrapoblacional	52
Variabilidad Interpoblacional	55
Estructuración Genética	56
CONCLUSIONES.....	59
RECOMENDACIONES	60
BIBLIOGRAFÍA	61
APÉNDICES.....	71

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Comparación de métodos para estimar variabilidad genética.....	12
2. Coordenadas de puntos de muestreo.....	21
3. Cuantificación de bandas para diferentes combinaciones de iniciadores.	37
4. Cuantificación de bandas para 5 combinaciones de iniciadores.....	40
5. Índices de similitud intra e interpoblacional.....	42
6. Índices de variación genética.....	47
7. Distancias genéticas.....	48
8. Índices de diversidad y estructuración para diferentes especies.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Proporciones de Hardy-Weinberg.....	8
2. Diagrama del desarrollo de AFLPs.....	14
3. Etapas de la estrategia experimental.....	24
4. Gel con patrón de bandas de Nácori Chico.....	35
5. Gel con diferentes combinaciones de iniciadores.....	36
6. Geles obtenidos con marcaje radiactivo.....	41
7. Frecuencias de índices de similitud.....	43
8. Dendrograma basado en índices de similitud.....	44
9. Dendrograma basado en distancias genéticas.....	49
10. Gráfica de la prueba de Mantel para evaluar aislamiento por distancia...	50
11. Gráfica de la prueba de Mantel para evaluar aislamiento por altura.....	51

ÍNDICE DE APÉNDICES

Apéndice	Página
1. Índices de similitud para todos los individuos de las poblaciones.....	71
2. Distancias genéticas entre poblaciones y puntos de muestreo.....	83
3. Matrices generadas para las pruebas de mantel.....	84

RESUMEN

Agave angustifolia Haw. es la especie con la que se elabora el bacanora, bebida espirituosa en Sonora. Su creciente interés comercial conllevó a la realización de este estudio sobre la variabilidad genética de las plantas silvestres empleadas como materia prima. Se muestrearon tres sitios de la región serrana de Sonora donde por tradición se elabora el bacanora: Bacadéhuachi, Moctezuma y Nácori Chico, analizándose la variabilidad genética intra e interpoblacional de 30 individuos de cada área empleando marcadores de ADN AFLPs.

Se determinó el índice de similitud (SG), de variación (HE), estructuración (F_{st}) y distancia genética (DG), encontrándose que la mayoría de las plantas de las tres regiones analizadas tienen una SG que oscila en un rango de 0.787 a 0.828 con un promedio intra e interpoblacional de 0.814 y 0.765 respectivamente, siendo las plantas pertenecientes a una misma región más parecidas entre sí que con respecto a las otras áreas.

Los niveles de variabilidad intrapoblacional obtenidos fueron altos, con un valor promedio de 0.261, siendo Nácori Chico la población de agave más variable genéticamente ($HE = 0.295$) y la que presentó las mayores distancias genéticas entre sus puntos de muestreo (0.106 y 0.093) lo cual se asoció con la altitud y a sus microhábitats.

Los dendrogramas generados mostraron una agrupación entre los individuos pertenecientes a la misma región, no traslapándose ninguno a otra población, lo cual se refleja con el valor de estructuración encontrado ($F_{st} = 0.165$), siendo más alto que para la mayoría de los agaves silvestres estudiados. La diferenciación observada puede deberse a una reproducción asexual predominante, a diferentes épocas de floración o a una baja eficiencia de sus polinizadores, entre otros factores. Los resultados encontrados coadyuvarán en la planeación de futuras investigaciones encaminadas hacia el desarrollo de la industria del bacanora.

INTRODUCCIÓN

La elaboración de bacanora es una actividad antigua en Sonora. Sin embargo, como resultado de 80 años de explotación ilegal, su tecnología no sufrió cambios importantes. En 1992 se legalizó su producción y comercialización por lo que algunos productores decidieron incrementar sus operaciones, trayendo como consecuencia un aumento en la tasa de recolección de la planta empleada como materia prima (Núñez, 2001).

El agave preferido para la producción de bacanora es el *Agave angustifolia*, aunque también se aprovechan otras 10 especies para la elaboración de la bebida (Nobel, 1998). Algunos historiadores señalan que "El bacanora auténtico se obtiene de la cocción, fermentación y destilación del *Agave yaquiana* capón (*A. angustifolia*), por lo que la bebida obtenida de otra materia prima no debe llamarse bacanora" (<http://iscso.uson.mx/larevista/diez.htm>). Éste maguey se distribuye en 44 municipios del estado, siendo una planta de reproducción sexual y asexual, que presenta un largo ciclo de vida y al igual que otros agaves de valor económico tarda entre 6 a 7 años en llegar a su etapa productiva.

De ahí surgido el interés por llevar a cabo estudios de variabilidad genética en varias especies de agave silvestres y cultivados. En los primeros con la finalidad de evaluar la diversidad presente de manera natural, determinar la existencia de ecotipos y desarrollar programas de conservación y manejo. En los segundos, para establecer la variación generada por la reproducción asexual predominante en las plantaciones comerciales, así como otros métodos de cultivo *in vitro* que permitan mantener plantaciones homogéneas. Debido a lo anterior, en ésta tesis se estudió la variabilidad genética del *A. angustifolia* silvestre empleado en la elaboración de la bebida sonoreense

Para ello se utilizaron marcadores de ADN AFLPs, los cuales generan un gran número de bandas y se obtienen resultados representativos al examinar al azar todo el genoma, además de no estar influenciados por condiciones ambientales. A partir de estos conocimientos se podrá realizar una mejor selección de plantas para luego crear las líneas clonales requeridas para la producción de la bebida, contribuyendo así a mantener su calidad. Además de ser de utilidad para futuros estudios de mejoramiento genético y enriquecimiento de los bancos de germoplasma.

ANTECEDENTES

Generalidades de *Agave angustifolia* Haw.

Clasificación y Descripción

El género *Agave* es endémico del continente Americano y contiene aproximadamente 200 especies y 247 taxones, de los cuales 150 especies y 186 taxones se encuentran en México (García-Mendoza, 2002). Según Gentry (1982), el género *Agave* se divide en los subgéneros, *Agave* y *Litsea* con 82 y 54 especies respectivamente. El subgénero *Agave* y particularmente la sección *Rigidae*, en la cual se encuentra *Agave angustifolia* Haw., son de valor económico debido a que tienen varios usos, entre ellos la producción de fibra y la obtención de bebidas alcohólicas (Robert *et al.*, 1992).

Agave angustifolia tiene hojas con un tamaño aproximado de 60 a 120 cm de largo y de 3.5 a 10 cm de ancho, dispuestas radialmente formando una roseta con una coloración que va desde el verde claro al grisáceo y la espina terminal llega a medir entre 1.5 y 3.5 cm de largo. El tallo floral tiene un tamaño entre 3 y 5 m y sus flores son de color amarillo verdoso. Sus semillas presentan de 8 a 10 mm de largo, de color negro brillante, de forma oblicua, con amplias alas curvadas hacia fuera en el margen (Gentry, 1982).

Dentro de las principales formas de reproducción asexual que presenta el *Agave* están los rizomas, que son tallos subterráneos en cuyo ápice hay una yema que al emerger, produce una nueva planta conocida como vástago o hijuelo. De igual forma produce, a partir de yemas que se localizan debajo del pedúnculo floral, pequeñas plantas denominadas bulbilos (Eastmond *et al.*, 2000).

Palomino, (2004) determinó que *A. angustifolia* presente en Sonora es diploide, con un número cromosómico básico de $n= 30$ ($2n= 2x= 60$), que presenta un esquema de 5 pares de cromosomas largos y 25 cortos, y el tamaño del genoma varía de 4101 a 4166 Mpb.

Distribución y Ciclo de Vida

Agave angustifolia es el de más amplia distribución en Norteamérica, abarcando desde Costa Rica hasta llegar al Atlántico y a las costas del pacífico y desde Tamaulipas hasta el noreste de Sonora. Habita en ecosistemas diversos como la sabana tropical, el bosque espinoso, el bosque tropical deciduo y rara vez en altitudes mayores de 1500 m (Gentry, 1982).

En Sonora, la especie se distribuye en 44 municipios de la entidad y las poblaciones que se encuentran en la sierra baja y la zona costera central del estado, son las que presentan las mejores características morfológicas (Valdez-Aguayo, 2001). Su ciclo de vida es de 5 a 20 años, siendo semélparos es decir sólo tienen una floración, al cabo de la cual la planta muere (Granados-Sánchez, 1993).

Variabilidad Genética en el Género *Agave*

Algunos de los factores que dan origen a un genotipo extremadamente variable en el género agave son: a) Elevado número cromosómico, b) Poliploidismo (depende de la especie), c) Posibles cruzamientos inter o intraespecíficos y d) Apomixis (hijuelos y bulbilos).

Debido a lo anterior, el género *Agave* representa un problema desde el punto de vista taxonómico, por su gran variación genética y fenotípica, incluso dentro de una misma población y aún en una misma planta (Granados-Sánchez,

1993). Lo anterior ha sido demostrado en henequén (*Agave fourcroydes* Lem. Var. *Saac ki*) en donde se encontró un polimorfismo de 9.65%, al realizar estudios en diferentes hojas de una misma planta (Reyes, 2004).

Variabilidad Genética

Lewin (2000) define al polimorfismo genético como la coexistencia de alelos múltiples en un locus específico con relativa frecuencia de más de 1% en una población. El polimorfismo genético es generado por mutaciones en regiones del ADN, las cuales son originadas por sustitución de nucleótidos, inserciones, deleciones o recombinación entre otros; sin embargo la mayoría de ellas son eliminadas, mientras que una minoría se fijan en la población mediante selección positiva u otros mecanismos (Nei y Kumar, 2000). Las mutaciones que se conservan provocan cambios en la frecuencia de genes dentro de una población, cuyo proceso es el componente principal de la evolución (Futuyma, 1998).

El conocimiento del grado de variabilidad genética dentro y entre las poblaciones, así como entender qué tipo de variación es importante para formar nuevas especies, resulta parte esencial del estudio evolutivo (Nei y Kumar, 2000). Una de las diversas razones por las que el hombre estudia la genética de poblaciones, es para poder comprender las complejas interacciones entre las fuerzas evolutivas y los factores ecológicos y genéticos de las poblaciones (Hartl y Clark 1989, 1997). Entre los principales motivos del estudio de la variabilidad genética en plantas se pueden mencionar los siguientes: a) Investigar relaciones genéticas entre diferentes especies o cultivares de una planta (Gil-Vega et al., 2001; Miyashita *et al.*, 1999). b) Determinar los patrones de relación genética entre plantas de diferentes áreas geográficas y sistemas de reproducción (Kim *et al.*, 2002). c) Inferir sobre su ecología reproductiva (Silva-Montellano y Egularte, 2003).

Diversos autores (Chen *et al.*, 2004; Martínez-Palacios *et al.*, 1999; Ude *et al.*, 2002) han sugerido que lo anterior contribuye, principalmente a: 1) Mejorar la clasificación taxonómica de algunas plantas, 2) Identificar posibles ancestros, 3) Planear programas de mejoramiento genético y conservación ó 4) Determinar los factores que influyen en la variación fenotípica de algunas especies.

Cuantificación de la Variabilidad Genética en las Poblaciones

En las poblaciones naturales, para comprender cómo las fuerzas evolutivas actúan sobre el material genético disponible, es necesaria la estimación de los niveles de diversidad genética y su dinámica. La variación de los organismos refleja la enorme diversidad de la vida en términos de las diferencias que existen entre los individuos de una población, poblaciones de la misma especie y de diferentes especies. De hecho en el nivel genotípico, la variación es la regla y la uniformidad es la excepción, aunque ello no anula la uniformidad relativa que se observa en el fenotipo de los organismos (Mettler *et al.*, 1988).

Así, uno de los aspectos más importantes es la estructuración de la variación genética, ya que las especies o poblaciones no suelen formar unidades sencillas en donde los individuos se cruzan al azar. Éstas están subdivididas en entidades más pequeñas, que pueden ser grupos o regiones, divididos a su vez en unidades menores (Excoffier, 2001).

Principio de Hardy-Weinberg. Uno de los principios en los que se basa la genética de poblaciones de los organismos que se reproducen de manera sexual, es decir, gran parte de la teoría genética de la evolución, es el de Hardy-Weinberg (HW). Éste consiste en que la frecuencia genotípica de un locus, después de una generación que se aparee al azar, puede ser representada por una función binomial (con 2 alelos) o multinomial (con múltiples alelos) de las

frecuencias alélicas. Esto simplifica la descripción del contenido genético de las poblaciones, reduciendo el número de parámetros que tienen que ser considerados.

En ausencia de factores que cambien las frecuencias alélicas (selección, deriva génica, flujo génico y mutaciones) y con la presencia continua de apareamiento al azar, las proporciones genotípicas de HW no cambian con el tiempo (Hedrick, 2000). Es decir, después de una generación de apareamiento al azar, las frecuencias genotípicas están en la proporción $p^2, 2pq, q^2$ (Figura 1).

		Gametos femeninos (frecuencia)	
		A (p)	a (q)
Gametos masculinos (frecuencia)	A (p)	AA p^2	Aa pq
	a (q)	aA pq	aa q^2

Figura 1. Proporciones de Hardy-Weinberg generadas por unión al azar de los gametos.

Entre las principales premisas del principio HW están las siguientes: el apareamiento es al azar, la población es grande (considerada como infinita), sin flujo génico, los genes no cambian de un estado alélico a otro (no hay mutación) y carece de selección natural, entre otros.

Heterocigosis. La medida más común de variabilidad genética es el nivel de heterocigosidad. Debido a que los diploides son homocigos o heterocigos para un determinado locus, ésta representa una cantidad biológica útil para determinar el nivel de variación. Nei (1987) llamó a esta medida diversidad genética y sugirió que es particularmente útil porque es aplicable a genes de diferente niveles de ploidía y a organismos con varios sistemas reproductivos (Hedrick, 2000).

Proporción de loci polimórficos. Retomando el concepto de que el polimorfismo genético es la ocurrencia en una misma población de dos o más alelos en un locus, cada uno con una frecuencia específica, es necesario definir los límites para establecer la existencia de un polimorfismo. Una forma práctica de definirlo es asignando arbitrariamente el alelo más común, v.g. un loci es polimórfico cuando su frecuencia es menor de 0.99 ó 0.95 (Hedrick, 2000).

Flujo génico. Se define como la incorporación de genes de una población a otra (Futuyma, 1998). Cuando una población está subdividida, las partes pueden estar conectadas en diferente proporción, dependiendo principalmente de la cantidad del flujo génico presente entre las subpoblaciones. Con un valor alto, tiene como efecto la homogenización de la variación genética entre los grupos y cuando es bajo, la deriva génica, la selección o incluso la mutación pueden provocar diferenciación genética (Hedrick, 2000).

Similitud y distancia genética. Los índices de distancia y similitud genética se emplean para evaluar la cantidad de variación compartida entre grupos y ayudan a visualizar la relación entre ellos (Hedrick, 2000). Si todos los alelos de

todos los *loci* tienen la misma frecuencia en dos poblaciones entonces la distancia genética es cero y el índice de similitud es 1.

Métodos para el Estudio de la Variabilidad Genética

Se han desarrollado diversos métodos con la finalidad de evaluar la variabilidad genética y se pueden dividir en dos grandes grupos:

Marcadores Morfológicos. La diversidad se estima basándose en la expresión de algunas características entre genotipos. Sin embargo la expresión de ellas es frecuentemente influenciada por los factores ambientales y el estadio de desarrollo (Yee *et al.*, 1999).

Marcadores Moleculares. Basados en estudios de proteínas (isoenzimas) o de ácidos nucleicos (marcadores de ADN) (Hernández-Vera, 2003).

En este sentido los marcadores de ADN se han consolidado como una herramienta confiable, al utilizar las variaciones existentes en la secuencia del ADN como huellas genéticas únicas para cada individuo (Jones *et al.*, 1997). Este tipo de marcadores, debido a que se evalúan cambios directos a nivel de ADN, tienen la ventaja de no estar sujetos al ambiente en donde se desarrolla el organismo de estudio y no dependen del estado fisiológico del individuo.

Se pueden agrupar de manera convencional en dos categorías: 1) Hibridación de cadenas complementarias de ADN, tales como los RFLP y, 2) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) descritos más adelante (Valadez y Kahl, 2000).

Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs). Se basa en la digestión del ADN con enzimas de restricción y la transferencia de los fragmentos de ADN separados mediante electroforesis a una membrana, a la cual se hibridará un fragmento llamado sonda (gen de interés) de ADN marcado, mediante radiactividad o quimioluminiscencia (Brettschneider, 2001).

Polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPDs). Son generados por la amplificación de fragmentos de ADN, empleando iniciadores cortos (usualmente 10 nucleótidos) de secuencia arbitraria (al azar). Generalmente la amplificación por medio de PCR ocurre a bajas condiciones de selectividad (astringencia), lo que incrementa el apareamiento no específico y la creación de artefactos (Mueller y Wolfenbarger, 1999).

Secuencias simples repetidas (SSR). Se basa en la amplificación por medio de PCR de secuencias repetidas (de dos a seis nucleótidos) del ADN, empleando iniciadores que reconocen las bases que flanquean las regiones repetidas. El número de repeticiones de estas secuencias puede variar entre individuos (Mueller y Wolfenbarger, 1999).

Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP). Se basa en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción provenientes de la digestión del ADN genómico. Involucra tres pasos, el primero es la restricción del ADN y la ligación de adaptadores específicos a los fragmentos. El segundo es una amplificación selectiva mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Figura 2). Por último, una separación electroforética en un gel de poliacrilamida de los fragmentos amplificados y la obtención del perfil de bandas por autorradiografía, quimioluminiscencia o tinción con plata (Vos *et al.*, 1995).

Estas técnicas han sido ampliamente usadas para determinar las relaciones evolutivas entre organismos, así como para establecer si una muestra de tejido, aunque sea muy pequeña, procede de un determinado individuo (Madigan *et al.*, 1999). En plantas han sido muy útiles para la identificación varietal, para buscar eficientemente ciertos genes en poblaciones mejoradas, para análisis filogenéticos, para la determinación de diversidad genética y homologías del genoma entre especies cultivadas, entre otras (Valadez y Kahl, 2000), aunque algunas son cada vez menos empleadas y sustituidas por otras que como los AFLPs proporcionan mayor información (Cuadro 1).

Cuadro1. Comparación de algunos métodos empleados para estimar la diversidad genética.

Criterio	AFLP	RFLP	RAPD	SSR
Cantidad de información	alta	baja	alta	alta
Reproducibilidad	alta	alta	variable	alta
Resolución de diferencias genéticas	alta	alta	moderada	alta
Facilidad de uso y desarrollo	moderada	difícil	fácil	difícil
Tiempo de desarrollo	corto	largo	corto	Largo

Fuente: Mueller y Wolfenbarger, 1999.

En lo que respecta a la cantidad de información, los AFLPs pueden generar una gran cantidad de marcadores altamente reproducibles por cada reacción (Gimenes *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Miyashita *et al.*, 1999). En un experimento riguroso y cuidadoso, Jones *et al.* (1997) compararon la reproducibilidad de los marcadores AFLPs, empleando las mismas muestras y procesándolas en 8 diferentes laboratorios de Europa, encontrando solo una diferencia (ausencia de una banda de un total de 172), el error entre laboratorios fue menor del 0.6%.

Para realizar los análisis mediante AFLPs se requiere una mínima cantidad de ADN y se pueden usar muestras parcialmente degradadas. Este tipo de marcadores pueden ser generados en un corto tiempo, ya que se obtienen cientos o hasta miles de marcadores por reacción de PCR empleando diferentes combinaciones de iniciadores las cuales presentan como mínimo un 30% de polimorfismo (Mackill , 1996).

Además, esta técnica es útil para detectar diferencias genéticas mínimas entre grupos de organismos. El cambio de un solo nucleótido puede ser detectado en geles de poliacrilamida. Es por esto que se ha utilizado ampliamente para el análisis de muchas especies vegetales, principalmente de cultivos como caña, papaya, trigo, etc. (Lima *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Soleimani *et al.*, 2002).

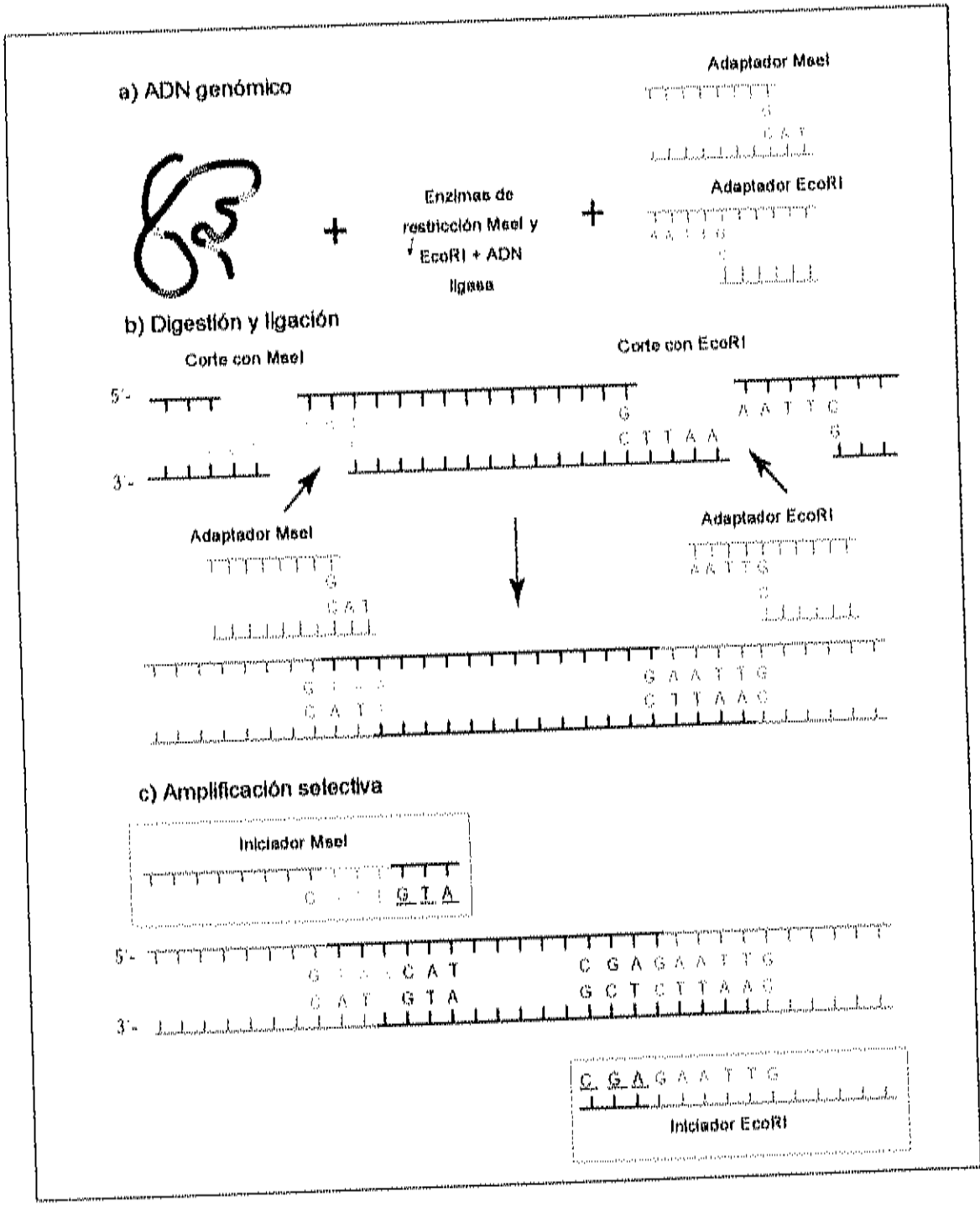


Figura 2. Diagrama del desarrollo de AFLP hasta el paso de amplificación selectiva.

Agave angustifolia Bacanora

Sonora es particularmente reconocido por su bacanora, mezcal fabricado y embotellado en la región de Bacanora y otros municipios del estado (Granados-Sánchez, 1993). El aprovechamiento del agave para su fabricación es la tercera actividad económica del municipio (www.sonora.gob.mx) constituyendo una de las prácticas económicas y culturales de más arraigo en la región (Salazar, 2001).

La bebida se obtiene principalmente de las poblaciones silvestres de *A. angustifolia* y con su legalización aumentó la recolección de la planta (Barceló-Gómez, 2001). En la actualidad ya es evidente su escasez en lugares como Bacanora, San Pedro de la Cueva, Cumpas, Moctezuma, Sahuaripa y pueblos localizados al margen del río Sonora. Esto representa una restricción importante para los productores, ya que no disponen de un suministro confiable de agave (Núñez, 2001).

Lo mismo ha ocurrido con algunas variedades de *A. tequilana* Weber, utilizadas para la elaboración de tequila, ya que a excepción de la variedad Azul, de la cual se cultivan cientos de hectáreas, las variedades Chato, Moraleño y Sigüín son escasamente encontradas (Palomino *et al.*, 2003). De igual manera, la diversidad del henequén disminuyó dramáticamente al empezar el siglo XX, debido al gran auge que tuvo la comercialización de fibra natural obtenida a partir de algunas especies de henequén, actualmente únicamente tres de las siete variedades silvestres han sido encontradas (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1996).

Por lo anterior y otras malas prácticas como la utilización de tierras para la agricultura y la ganadería las poblaciones silvestres de algunas especies de agave han sucumbido en México, como resultado de ello, al menos 14 especies nunca serán vistas en su estado silvestre, lo cual representa un 10 % del género

(Fish *et al.*, 1985). Esto tiene consecuencias ecológicas severas, ya que se acentúan problemas como la erosión y desertificación (Núñez, 2001).

Situación Actual de la Industria del Bacanora

Usualmente el bacanora es vendido por el productor directamente a los consumidores y en algunos casos lo elaboran para autoconsumo (Granados-Sánchez, 1993) mientras que otros lo venden a algunas vinateras de la región. Actualmente el mercado del bacanora es en gran parte informal, y en lo que respecta al comercio formal, sólo hay tres productores que cumplen con los permisos requeridos, cuya producción se comercializa en algunos expendios de Hermosillo, principalmente en botellas de 750 ml (Núñez y Esqueda, 2002).

Actualmente la industria del bacanora presenta las siguientes fortalezas que pudieran llevarla a consolidarse: 1) Obtención de Denominación de origen, 2) Posicionamiento de los mezcales en los mercados internacionales, 3) Demanda local consolidada, 4) Práctica cultural arraigada a las tradiciones regionales, 5) Infraestructura de investigación y apoyo tecnológico en desarrollo, y 6) Respuesta positiva de la comunidad científica, productores y gobierno en el impulso de la industria del Bacanora (Núñez, 2001).

Proyecto Bacanora

Al legalizarse la fabricación, envasado, distribución y venta del bacanora se despertó el interés por el desarrollo de nuevos proyectos productivos, de investigación y comercialización del bacanora. En este sentido se han implementado en el IMADES (Instituto del Medio Ambiente y el Desarrollo Sustentable del Estado de Sonora), algunos proyectos de tipo agronómico e industrial con el propósito de generar la información técnico-económica que

permita el desarrollo de esta incipiente pero importante agroindustria (Moreno, 1998).

Actualmente los dos proyectos que se están desarrollando en IMADES son distribución y análisis de las poblaciones silvestres de *Agave angustifolia* y ferti-irrigación de *A. angustifolia*, todo esto como una alternativa de desarrollo sustentable para las comunidades serranas de Sonora (www.imades.org/desarrollo_proyectos.htm). Así mismo la Fundación Produce Sonora cuenta con algunos proyectos, entre ellos se puede destacar el establecimiento de un banco estatal de germoplasma *ex-situ* para el estudio de la diversidad genética del agave bacanora (www.produce.org.mx/hermosillo.pdf).

JUSTIFICACIÓN

Actualmente el *Agave angustifolia* que se recolecta para la elaboración de bacanora es silvestre y al ser seleccionado de manera empírica se obtienen bebidas con diferente calidad. Por otro lado, de llevarse a cabo la consolidación de la industria del bacanora, se requerirá de plantaciones que aseguren una fuente de materia prima homogénea. El estudio de su variabilidad permitirá la generación de conocimiento sobre las especies con que se elabora el bacanora y coadyuvará al establecimiento de plantaciones de maguey, además de sentar las bases para futuros programas de conservación.

HIPÓTESIS

Debido a que la dispersión de *Agave angustifolia* silvestre se genera en gran medida a través de semilla (sexual) y la reproducción predominante en una misma población es asexual (hijuelos y bulbilos), la variabilidad genética interpoblacional incrementa a medida que las poblaciones se separan geográficamente, manteniendo niveles similares a nivel intrapoblacional.

OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar el nivel de variación genética en *Agave angustifolia* silvestre de tres regiones de la sierra de Sonora a través de AFLPs para coadyuvar en el establecimiento de plantaciones comerciales.

Objetivos Específicos

1. Obtener ADN genómico del maguey silvestre distribuido en la sierra sonorense.
2. Determinar la variabilidad genética intra e interpoblacional de *Agave angustifolia* en Bacadéhuachi, Moctezuma y Nácori Chico.
3. Esclarecer sus relaciones de similitud y obtener las distancias genéticas que separan a las poblaciones.
4. Correlacionar la distancia genética de *Agave angustifolia* con la distancia geográfica y la altitud.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Para la colecta se seleccionaron los municipios de Moctezuma, Bacadéhuachi y Nácori Chico. En cada municipio se fijaron tres sitios de muestreo. La distancia aproximada en línea recta de Moctezuma a Bacadéhuachi, Bacadéhuachi a Nácori Chico y Nácori Chico a Moctezuma es de 70, 30 y 90, km respectivamente. Los puntos georeferenciados, así como las altitudes se presentan en el Cuadro 2. Los criterios para la selección de las plantas fueron: a) Agaves aparentemente sanos, b) Entre 20 y 50 cm de alto y d) Que no provinieran de una misma planta madre.

Sitios de Muestreo

Se colectaron 10 plantas en cada uno de los tres sitios de muestreo por municipio, teniendo un total de 90 individuos. Para efectos de la presente tesis, se consideró como una población a cada municipio seleccionado, la cual se define como un grupo de organismos que ocupan un área geográfica más o menos definida y que exhiben reproducción continua de generación en generación. Las interacciones ecológicas y reproductivas son más frecuentes entre los individuos que la componen que los miembros de otras poblaciones de la misma especie (Futuyma, 1998).

Cuadro 2. Coordenadas de cada punto de muestreo de las tres poblaciones en estudio.

Localidad	Puntos	Coordenadas	Altitud (msnm)
Bacadéhuachi	B1	29° 55' 60'' N 109° 07' 51'' W	903
	B2	29° 55' 95'' N 109° 07' 34'' W	951
	B3	29° 56' 09'' N 109° 07' 15'' W	958
Moctezuma	M1	29° 43' 94'' N 109° 31' 12'' W	786
	M2	29° 44' 06'' N 109° 32' 05'' W	786
	M3	29° 44' 38'' N 109° 32' 33'' W	759
Nácori Chico	C1	29° 41' 08'' N 108° 56' 09'' W	1000
	C2	29° 45' 09'' N 109° 00' 01'' W	901
	C3	29° 41' 73'' N 108° 56' 09'' W	907

Descripción de Áreas

Bacadéhuachi. La zona está compuesta por pastizal natural y matorral subtropical. La fisiografía es de lomeríos medianos y altos localizados a una altitud promedio de 946 m, con la facultad de sostener cualquier tipo de vegetación, ya que la asociación de plantas se determina más por el clima que por el tipo de suelo. Presenta una pedregosidad de un 53 a 57%. El clima es seco, semiseco del subtipo semicálido, con lluvias en verano. La temperatura y precipitación media anuales son de 18 a 20°C y de 400 a 500 mm, respectivamente. En estas áreas el mezquite alcanza grandes dimensiones, lo que crea un ambiente donde la temperatura es menor y aumenta la retención de agua. *Agave angustifolia* figura entre las plantas más desarrolladas y de mayor cobertura (Armenta, 2002).

Moctezuma. En esta localidad *A. angustifolia* se desarrolla en asociaciones vegetales como matorral subtropical y mezquital. El primero se presenta en una zona de transición ecológica entre la selva baja caducifolia, bosques templados y matorrales de condiciones más secas. Éstos pierden su follaje durante largos periodos en el año, formando así áreas despejadas y ocupadas por pastos debido a una alta perturbación. Por el contrario, en temporada de lluvia se puede observar una vegetación densa y compacta. En el caso de los mezquiales, se desarrollan con frecuencia en suelos profundos o con cierta deficiencia de drenaje, predominando *Prosopis* spp. acompañado de *Acacia* spp. (huizaches) y *Cercidium* spp. (palo verde). Comprende planicies hasta lomeríos suaves, bajos y medianos, con pendientes entre 2 y 5°.

La pedregosidad va de un 44 a 59% y el coeficiente de escurrimiento es del 5 al 10%, presentándose una erosión hídrica laminar. El clima es seco con lluvias en verano y escasas durante el resto del año, con una temperatura y precipitación media anual de 20 a 22°C y de 400 a 500 mm, respectivamente. La presencia de árboles y arbustos frondosos es especialmente importante en la

comunidad, ya que por su cobertura ofrecen un ambiente favorable para el desarrollo del *Agave angustifolia* (Armenta, 2002).

Nácori Chico. Aunque en esta región se observa la mayor diversidad de vegetación, predomina el matorral subtropical, el resto está descrito como mezquital, bosque bajo abierto y matorral sarcocrasicaule. El primero es una zona de transición ecológica entre la selva baja caducifolia, bosques templados y matorrales de condiciones más secas. El bosque bajo abierto es sinónimo de bosque caducifolio y espinoso habitado por árboles bajos y gramíneas. El mezquital está representado por especies de *Prosopis*, *Acacia* y *Cercidium*. El matorral sarcocrasicaule es una comunidad en la que destacan especies carnosas, de tallo grueso y suculentas.

Esta localidad comprende lomeríos medianos, altos y laderas de la sierra; de topografía compleja, con pendientes que varían de 2 a 17°. Tiene un porcentaje de pedregosidad menor que Bacadéhuachi y Moctezuma, oscilando entre 16 y 55%. El clima predominante es del tipo seco a semiseco con lluvias en verano, con una temperatura y precipitación media anual de 18 a 20°C y de 500 a 600 mm, respectivamente (Armenta, 2002).

Estrategia Experimental

Para llevar a cabo de manera satisfactoria los experimentos planteados para este trabajo, se diseñó una estrategia la cual permitiera desarrollar los AFLPs de una forma rápida y segura. Para ello los experimentos se dividieron en dos partes, en la primera se empleó tinción con plata, siendo una etapa de selección cuyos objetivos se describen más adelante. En la segunda fase se usó radiactividad para realizar el análisis completo de las poblaciones de *Agave angustifolia* (Figura 3).

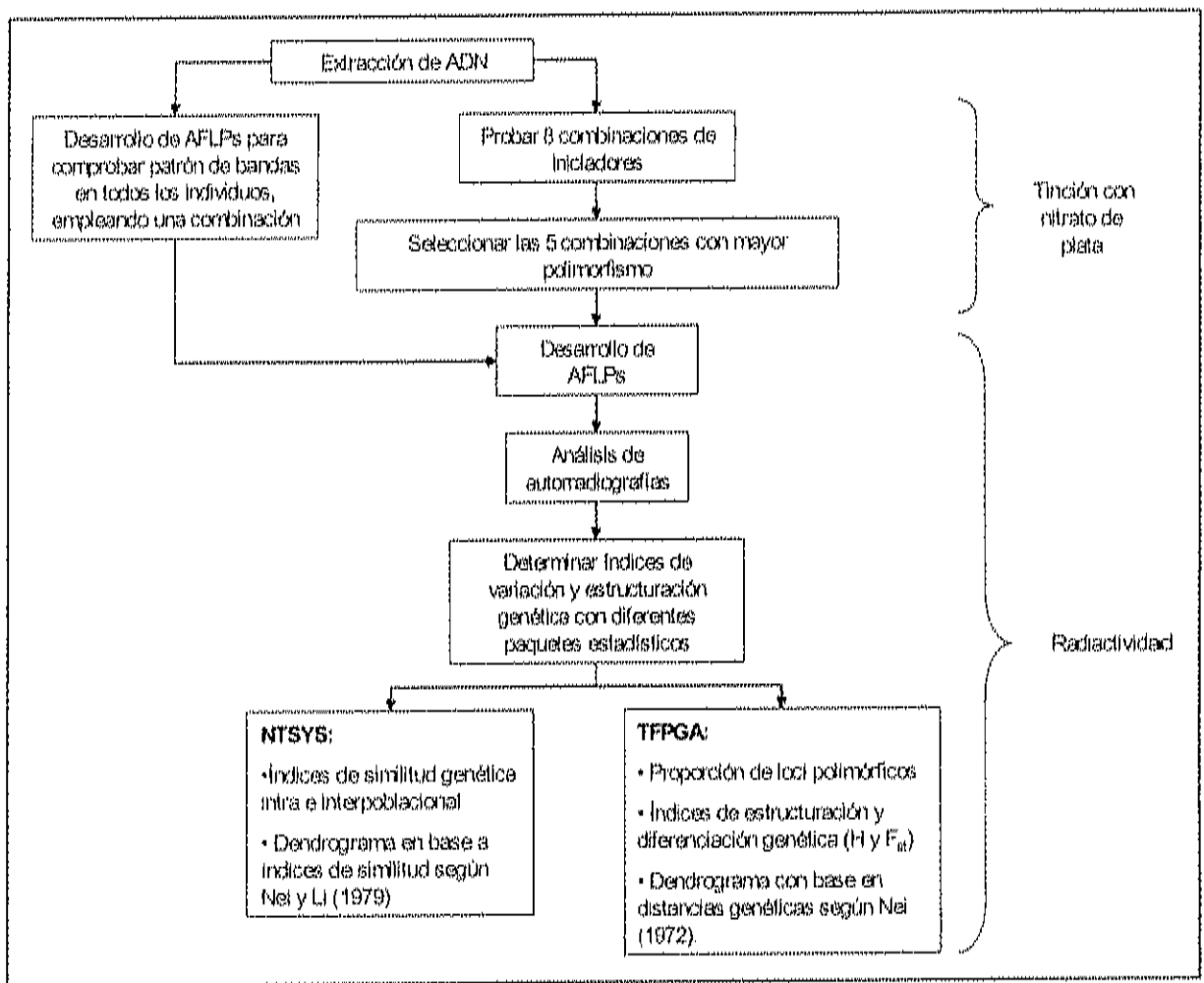


Figura 3. Etapas de la estrategia experimental.

Extracción de ADN

El ADN se extrajo por medio de un método modificado a partir de Rogers y Bendich (1994) y De la Cruz *et al.* (1995). Se maceraron 0.5 g de hoja en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, que fue depositado en un tubo eppendorf de 2ml y se le adicionaron 500 μ l de buffer CTAB 2 %, 500 μ l de buffer de la Porta (100 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA pH 8 y 500 mM NaCl) y 200 μ l de SDS al 20 %. La mezcla se incubó a 65°C durante 2 horas y posteriormente se agregaron 400 μ l de acetato de potasio 5M. Se centrifugó a 13400 x g durante 20 min a 4 °C y se transfirió 1 ml del sobrenadante a otro tubo eppendorf que contenía 600 μ l de isopropanol (a -20°C) y se incubó una hora a -20°C.

Posteriormente se centrifugó a 13400 x g durante 20 minutos y se decantó el sobrenadante para después resuspender en 600 μ l de TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 0.1 mM EDTA) e incubar durante 10 minutos a 65°C, seguido de una centrifugación a 13400 x g durante 5 min a 4°C; se transfirió el sobrenadante a otro tubo eppendorf y se agregaron 600 μ l de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y se repitió la centrifugación a 13400 x g por 5 min (este paso se realizó dos veces más), se transfirió la fase superior a otro tubo y se añadieron 5 μ l de ARNasa incubándose por una hora a 37°C.

Se agregaron 600 μ l de isopropanol (-20°C) y 60 μ l de acetato de sodio 3M para después incubar durante 1 hora a -20°C. Luego se centrifugó a 13400 x g por 20 min, se decantó el sobrenadante y se invirtieron los tubos. Por último se realizaron dos lavados con etanol al 70 %, centrifugando a 13400 x g durante 5 min después de cada lavado y finalmente se dejó evaporar el alcohol y se rehidrataron las pastillas en 50 μ l de TE. El ADN genómico total fue cuantificado a 260 nm utilizando un espectrofotómetro Beckman DU6. Cabe mencionar que 3

individuos (1 de Bacadéhuachi y 2 de Moctezuma) no sobrevivieron, por lo cual no se realizó su extracción.

Desarrollo de AFLP

El protocolo desarrollado en esta tesis fue el descrito por Vos *et al.* (1995) en donde aproximadamente 250 ng del ADN total de cada muestra fue digerido con enzimas de restricción *Eco RI* y *Mse I* y ligado con adaptadores *Eco RI* (5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3', 5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3') y *Mse I* (5'-GACGATGAGTCCTGAG-3', 5-TACTCAGGACTCAT-3'), los cuales fueron ligados con la enzima T4 DNA ligasa (invitrogen). Los fragmentos ligados fueron los moldes para la amplificación mediante PCR. Al terminar la ligación la mezcla se diluyó en solución amortiguadora TE en una relación 1:10.

En la reacción de preamplificación selectiva se utilizaron iniciadores con un nucleótido selectivo, para *Eco RI* (+A) 5'-GACTGCGTACCAATTCA-3', para *Mse I* (+C) 5'-GACTGCGGAGTCCTGAGTAAC-3' y Taq DNA polimerasa. Las condiciones de amplificación fueron de 94°C por 30 s, 20 ciclos que consisten en 94°C por 30 s, 56°C por 1 min y 72°C por 1 min. Finalmente se realizó una dilución de la muestra 1:50 en TE.

En la amplificación selectiva se utilizaron los iniciadores *Eco RI* 5'-GACTGCGTACCAATTC-3'+ XXX y *Mse I* 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3'+ YYY, en donde "X" y "Y" puede ser alguno de los siguientes nucleótidos:

	X/Y
Nucleótidos selectivos empleados en pruebas preliminares realizadas mediante tinción con plata	<ul style="list-style-type: none"> ACA/CAC ACA/CAT AAC/CAC ACG/CAC ACG/CTT AAC/CAT AAC/CTT ACA/CTT
Nucleótidos selectivos que detectaron mayor polimorfismo y que fueron empleados en los experimentos realizados	<ul style="list-style-type: none"> ACA/CAC ACA/CAT AAC/CAC ACG/CAC ACG/CTT

El volumen final de la reacción fue de 10 μL [buffer PCR 1X, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl_2 , 1.5 ng/ μL de iniciador *Mse*, 0.25 ng/ μL de iniciador *Eco*, 0.5 μL de taq ADN polimerasa (invitrogen)]. En el caso de la detección por medio de radiactividad, los iniciadores *Eco* RI + XXX fueron marcados en el extremo 5' con [^{33}P - γ]-ATP. La PCR fue desarrollada en un termociclador Perkin-Elmer GeneAmp 9700 con las siguientes condiciones, 94°C por 30 s, 13 ciclos a 94°C por 30 s, 65°C por 30 s (disminuyendo 0.7°C por ciclo), 72°C por 1 min, después 23 ciclos a 94°C por 30 s, 56°C por 30 s, 72°C por un min y finalmente 72°C por 7 min. Después a las muestras se le adicionó un volumen de solución desnaturante (formamida al 95%, 0.025% de bromofenol y 0.025% de xilen cianol) y fueron desnaturadas a 95°C durante 5 min e inmediatamente después enfriadas a 4°C.

Posteriormente los fragmentos amplificados fueron separados en geles desnaturantes de poliacrilamida al 6% (Urea 8M, TBE 1X, poliacrilamida al 40%), bajo las siguientes condiciones de electroforesis: 1870 V, 40 mA y 70 W

durante 2 h. En el caso de radiactividad los geles fueron secados durante 2 h y expuestos a una película de rayos X (kodak-omat) durante 2 días y después se reveló para visualizar las bandas.

Tinción con nitrato de plata. Para el desarrollo de AFLPs y su revelado por medio de la tinción con plata, la amplificación selectiva se realizó con el iniciador E-XXX sin marcaje radiactivo. El empleo de la técnica de tinción con plata tuvo dos objetivos fundamentales: 1) Verificar que el patrón de bandas obtenido en el total de los individuos sea correcto para su análisis. En caso contrario repetir el proceso. 2) Evaluar los patrones de bandas de diversas combinaciones de iniciadores, seleccionando las de mayor polimorfismo.

El protocolo de tinción con nitrato de plata fue con base en Bassam *et al.* (1991) que consiste en:

1. Fijación del gel de poliacrilamida que contiene los fragmentos de ADN, en una solución de ácido acético glacial al 10% por 20 min.
2. Tres lavados de 2 min con abundante agua bidestilada.
3. Incubación en una solución de plata al 0.1% durante 30 minutos.
4. Un lavado de 20 s con abundante agua.
5. Revelado con una solución de carbonato de sodio al 3 % más 1.5 mL de formaldehído al 37% y 2 mg/mL de tiosulfato de sodio
6. Detener la reacción con ácido acético al 10% durante 5 min.
7. Lavar durante 5 min con agua bidestilada.

En el primer caso, se obtuvieron los patrones de bandas de los 87 individuos representativos de las tres poblaciones, determinando los que

presentaban un patrón de bandas homogéneo a lo largo del gel, que indicara su correcto procesamiento. Para realizar el segundo objetivo se obtuvieron los patrones de bandas de 3 individuos seleccionados al azar provenientes de cada población, empleando 8 combinaciones de iniciadores y se cuantificó el número de bandas totales y polimórficas. Para realizar las pruebas de reproducibilidad se extrajo ADN de dos muestras seleccionadas al azar de la población de Nácori Chico; la extracción se llevó a cabo en tiempos diferentes y después se desarrolló el protocolo de AFLPs (independiente de los demás experimentos) y se probó con dos combinaciones de iniciadores.

Análisis de Datos

Los geles revelados con plata se analizaron visualmente tomando como referencia el marcador de peso molecular de 1 Kb plus (Invitrogen) y se realizó el conteo de bandas totales, mono y polimórficas. Las autorradiografías obtenidas del marcaje radiactivo fueron también analizadas visualmente, considerándose los fragmentos con un nivel de intensidad que no fuera ambiguo. El rango de tamaño que se estableció fue de 100 a 400 pb tomando como referencia el marcador de 30 a 330 pb (Invitrogen) y se identificaron para cada combinación bandas intensas presentes en todas las poblaciones como marcadores que facilitaran el seguimiento de las bandas. Una vez examinadas todas las combinaciones se procedió a elaborar las matrices binarias y se cuantificó el número de bandas mono y polimórficas para cada par de iniciadores. Para los fines de esta tesis se consideró un loci polimórfico cuando al menos un locus (banda) estaba ausente en un individuo.

Índices de similitud genética. En la matriz binaria que se generó para realizar estos cálculos se le asignó el valor de 1 para la presencia y 0 para la ausencia de bandas. El análisis se realizó en el programa NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analyses System) versión 2.02 (Rohlf, 1993) para

estimar los coeficientes de similitud para cada par de muestras mediante el Índice de Nei y Li (1979) cuya fórmula es la siguiente:

$$S_{ij} = 2a/(2a+b+c)$$

en donde:

S_{ij} = similitud entre dos individuos i y j

a = número de bandas presentes en los dos individuos i y j

b = número de bandas presentes en i pero ausentes en j

c = número de bandas presentes en j pero ausentes en i

Con base en los índices generados se calculó la similitud para cada población y entre poblaciones. Para obtener el dendograma se utilizó el método de agrupación de pares no ponderado con media aritmética (UPGMA), empleando el programa estadístico SAHN (Sequential Agglomerative Hierarical Nested Cluster Analyses) dentro del programa NTSYS .

Índices de variación, estructuración y distancia genética. Para obtener estos índices se generó otra matriz en donde a las bandas presentes y ausentes se les asignó el valor de 1 y 2, respectivamente. Esta matriz fue analizada en el programa Tools For Population Genetic Analyses (TFPGA) versión 1.3 (Miller, 1997) para obtener la variación y estructuración P , H y F_{st} de las poblaciones de *Agave angustifolia*.

Debido a que la técnica de AFLPs genera marcadores dominantes, los heterócigos no se pueden distinguir, por lo cual cada banda corresponde a un locus. La presencia de la banda representa el genotipo dominante mientras que la ausencia representa el genotipo homócigo recesivo, lo que significa que solo hay dos alelos por locus (Miller, 1997).

La variación genética fue estimada utilizando la heterocigosis esperada en el equilibrio HW y con la proporción de *loci* polimórficos. La heterocigosis esperada en un locus en particular para una población se obtiene con la fórmula:

$$H_E = 2pq$$

o el equivalente

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

Donde:

q= frecuencia del alelo recesivo.

p= frecuencia del alelo dominante

p²= frecuencia del genotipo homocigoto para el alelo *i*.

En este punto se utilizó la corrección para marcadores dominantes sugerida por Lynch y Milligan (1994). Cuando se analizan simultáneamente varios loci, la heterocigosis estimada en la población es:

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

Donde H_j es la heterocigosis del locus *j* y *m* es el número total de loci.

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

$$P = x/m$$

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

En el caso de la estructuración, el índice más importante para estimar la diferenciación en las subdivisiones de una población es el coeficiente F . Es un valor de correlación y es diferente al estadístico F usado en los análisis de varianza. Fue desarrollado por Wright (1965) y representa la correlación entre genes homólogos, tomados de un nivel de la subdivisión respecto a cualquier otro estrato superior (Aguirre, 2004).

La correlación entre los genes dentro de los individuos (I) en relación con los genes de la población total (T) es representada por F_{IT} . Los genes dentro de los individuos con respecto a los de la subdivisión (S) es representada por F_{IS} , mientras que la de los genes de la subdivisión con los de la población total esta representada por F_{ST} . En este caso se estimó F_{ST} , también denominada θ , según Weir (1990,1996), para la diferenciación entre poblaciones (θp). Ésta se obtiene a partir de H_T y H_S , donde H_S es la proporción de heterocigos esperada promedio a nivel de población y H_T es la proporción de heterocigos esperada a nivel global, con equilibrio de HW: $F_{ST} = H_T - H_S / H_T$. Si F_{ST} es igual a cero significa que la población total está bajo equilibrio HW, es decir no hay diferenciación, mientras que si es igual a uno todas las poblaciones son diferentes entre sí, lo cual se explicaría si cada una de las poblaciones está fija para un alelo dado.

El flujo génico ($Nm =$ número de migrantes) se calculó de la siguiente manera: $Nm = 0.5 (1 - F_{ST}) / F_{ST}$. Para determinar la distancia genética (DG), la medida más utilizada es la Identidad de Nei, denominada I (Nei, 1972), que evalúa la diferencia entre las frecuencias alélicas entre poblaciones y se calcula de la siguiente manera para un solo locus con n alelos:

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

$$J_{xy} = \sum_{i=1}^n p_{ix} p_{iy} \quad J_x = \sum_{i=1}^n p_{ix}^2 \quad J_y = \sum_{i=1}^n p_{iy}^2$$

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

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

El valor de I puede ir de cero, cuando no se comparten alelos entre las poblaciones, hasta uno, cuando las dos poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas. D es cero para los grupos con frecuencias iguales y hasta infinito, cuando éstos no comparten ningún alelo. En el presente trabajo se generó una matriz con las distancias entre cada uno de los puntos de muestreo, de cada una de las poblaciones analizadas, y a partir de estas distancias se construyó un dendograma tipo UPGMA para visualizar las distancias entre puntos.

Para evaluar la correlación que existe entre dos matrices se realizó la prueba de Mantel (Mantel, 1967), considerándose en éste trabajo las matrices de distancia genética, distancia geográfica y altitud. Cuando la correlación es positiva y posee una $p < 0.05$, se considera que es significativa, entonces se dice que hay un aislamiento por distancia o por altura.

RESULTADOS

Tinción con Nitrato de Plata

Evaluación de Individuos

Debido al costo y cuidados del trabajo con radiactividad fue necesario determinar que todas las muestras estaban correctamente procesadas empleando la tinción con plata como método alternativo. Se obtuvieron los patrones de bandas del total de individuos incluidos en el análisis, usando una combinación de iniciadores (ACA/CAC) presentando todos un patrón típico del proceso de AFLPs (Figura 4).

Evaluación de Iniciadores

En lo que respecta a las 8 combinaciones de iniciadores analizadas, se obtuvieron los patrones de cada una de ellas (Figura 5), a partir de los cuales se determinó el número de bandas totales mono y polimórficas y porcentaje de polimorfismo para un total de tres individuos. Como se observa en el cuadro 3 las combinaciones que presentaron un mayor polimorfismo fueron 1, 2, 3, 4, y 5 que fueron seleccionadas para realizar los análisis posteriores. Con base en lo anterior se comenzó el análisis de todas las muestras, empleando marcaje radiactivo amplificando con las combinaciones de iniciadores seleccionadas.

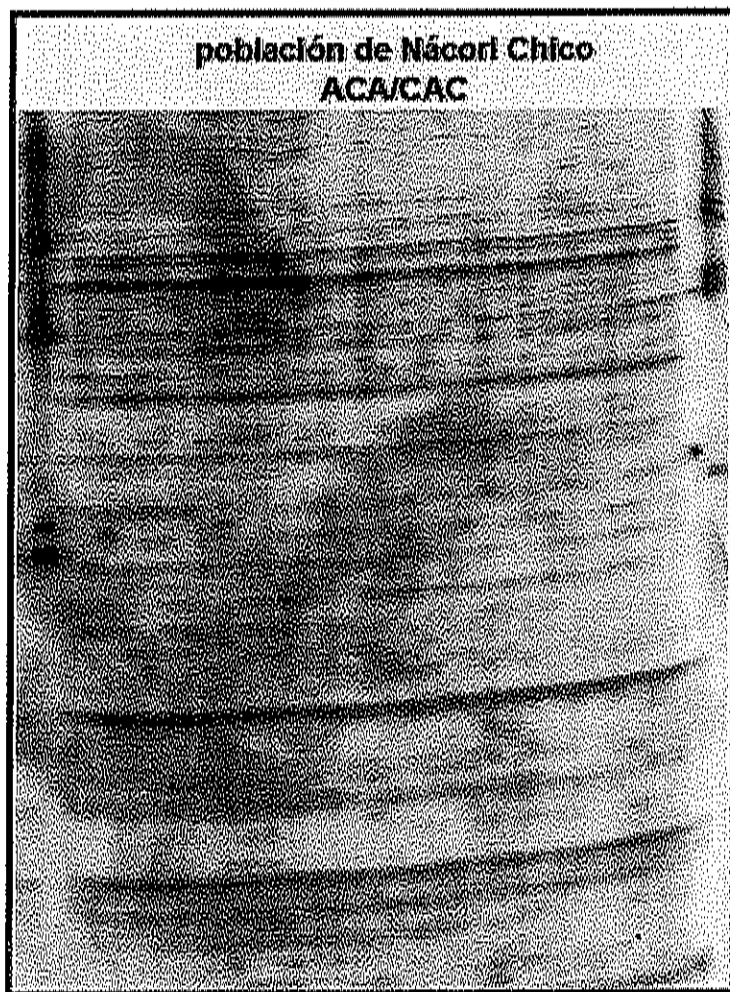


Figura 4. Gel representativo del patrón de bandas obtenido con una combinación para la población de Nácori Chico, empleando tinción con nitrato de plata.

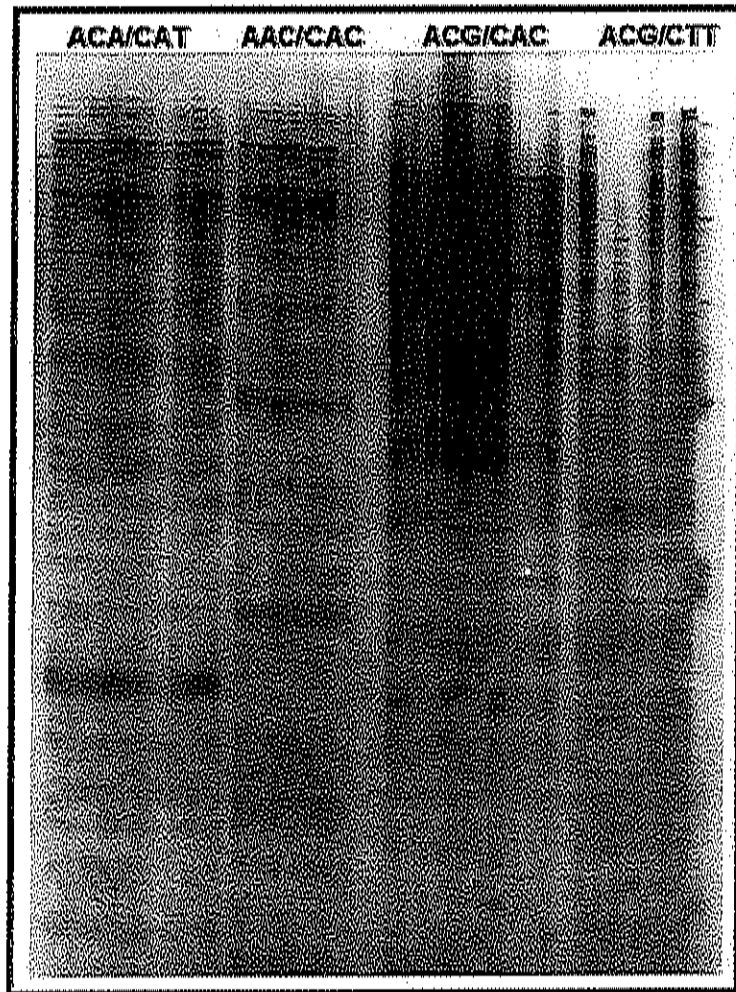


Figura 5. Gel representativo de los patrones de bandas de AFLPs de diferentes combinaciones de iniciadores, obtenido mediante tinción con nitrato de plata.

Cuadro 3. Bandas totales, polimórficas y porcentaje de polimorfismo obtenido con diferentes combinaciones de iniciadores empleando revelado con nitrato de plata.

Combinación E/M	Bandas Totales	Bandas Polimórficas	Porcentaje de Polimorfismo
1. ACA/CAC	52	41	79
2. ACA/CAT	51	33	65
3. AAC/CAC	46	36	78
4. ACG/CAC	50	40	80
5. ACG/CTT	45	35	78
6. AAC/CAT	30	17	57
7. AAC/CTT	47	28	60
8. ACA/CTT	51	32	63

Marcaje Radiactivo

Polimorfismo Detectado por Combinación de Iniciadores

Como resultado de la amplificación con 5 combinaciones de iniciadores seleccionados (ACA/CAC, ACA/CAT, AAC/CAC, ACG/CAC, ACG/CTT), se obtuvo un total de 393 marcadores, de los cuales 353 (83%) fueron polimórficos generando en promedio 79 marcadores por combinación (Cuadro 4). El mayor polimorfismo se detectó con ACG/CTT con 78 bandas totales y un 96 % de polimorfismo. En contraste, se obtuvieron 78 bandas totales y un polimorfismo de 83 % con ACA/CAT. La reproducibilidad fue del 97% (ver materiales y métodos). Los patrones de bandas obtenidos con radiactividad tuvieron la resolución necesaria para analizarlos sin problema. Algunos patrones de bandas representativos se muestran en la figura 5.

Índices de Similitud (NTSYS)

Intrapoblacional. Después de generar la matriz binaria y obtener los índices para cada población, se observó que la similitud intrapoblacional promedio fue mayor que la interpoblacional (Cuadro 5). Lo que sugiere que los individuos de una misma población son más parecidos entre sí que con individuos de otras poblaciones.

Interpoblacional. Al comparar a todos los individuos de cada región, se observó que Moctezuma con respecto a Bacadéhuachi (0.786) presenta el mayor índice de similitud, seguido por Nacori Chico vs Bacadéhuachi (0.761) y después por Moctezuma vs Nacori Chico (0.749). Para evaluar la distribución de la similitud entre las tres regiones, se establecieron rangos arbitrarios de los índices de similitud y se graficó la frecuencia obtenida. Se observó que en las

tres poblaciones la mayoría de los individuos tienen una similitud genética en el rango de 0.788 a 0.828 (Figura 7).

Al realizar el análisis de agrupamiento con los índices de similitud, en el dendograma obtenido (Figura 8) se observan tres grandes grupos que corresponden a cada población analizada. El primer grupo pertenece a la población de Bacadéhuachi, el segundo a Moctezuma y el tercero a Nácori Chico.

En el primer grupo se observan 6 subgrupos, el primero de ellos está formado exclusivamente por individuos que pertenecen al punto uno de muestreo en Bacadéhuachi. El segundo reúne seis individuos del punto 2; el tercero individuos del punto 2 y 3. El cuarto, quinto y sexto subgrupo están separados del resto y cada uno de ellos está formado por sólo dos individuos, siendo el individuo B34 el más lejano del grupo.

En el segundo grupo se forman 6 subgrupos, el primero está constituido por 2 individuos pertenecientes a los puntos 2 y 3 de muestreo. El segundo por individuos del punto 2; el tercero predominantemente por los del punto 3, el cuarto y quinto por individuos del punto 1 en su mayoría y el sexto por 2 del punto 1. Dos individuos M10 y M22 no se subagruparon.

En el tercer grupo se presentaron cuatro subgrupos, el primero compuesto por individuos del punto 1; el segundo por los del punto 2, el tercero y el cuarto mayormente por los del punto 3. C21 y C3 no se subagruparon. Estos resultados muestran que existen diferencias a nivel de ADN suficientes para agrupar específicamente a las poblaciones. Sin embargo, éstas son menos evidentes cuando se comparan los individuos de los diferentes puntos de muestreo, permitiendo la sobreposición entre los subgrupos.

Cuadro 4. Bandas totales, monomórficas, polimórficas y porcentaje de polimorfismo obtenido en cada combinación de iniciadores.

Combinación E/M	Bandas totales	Bandas Monomórficas	Bandas Polimórficas	Porcentaje de Polimorfismo
ACA/CAC	74	7	67	90
ACA/CAT	78	13	65	83
AAC/CAC	93	12	81	87
ACG/CAC	70	5	65	93
ACG/CTT	78	3	75	96
Total	393	40	353	90

Promedio de marcadores por combinación = 79

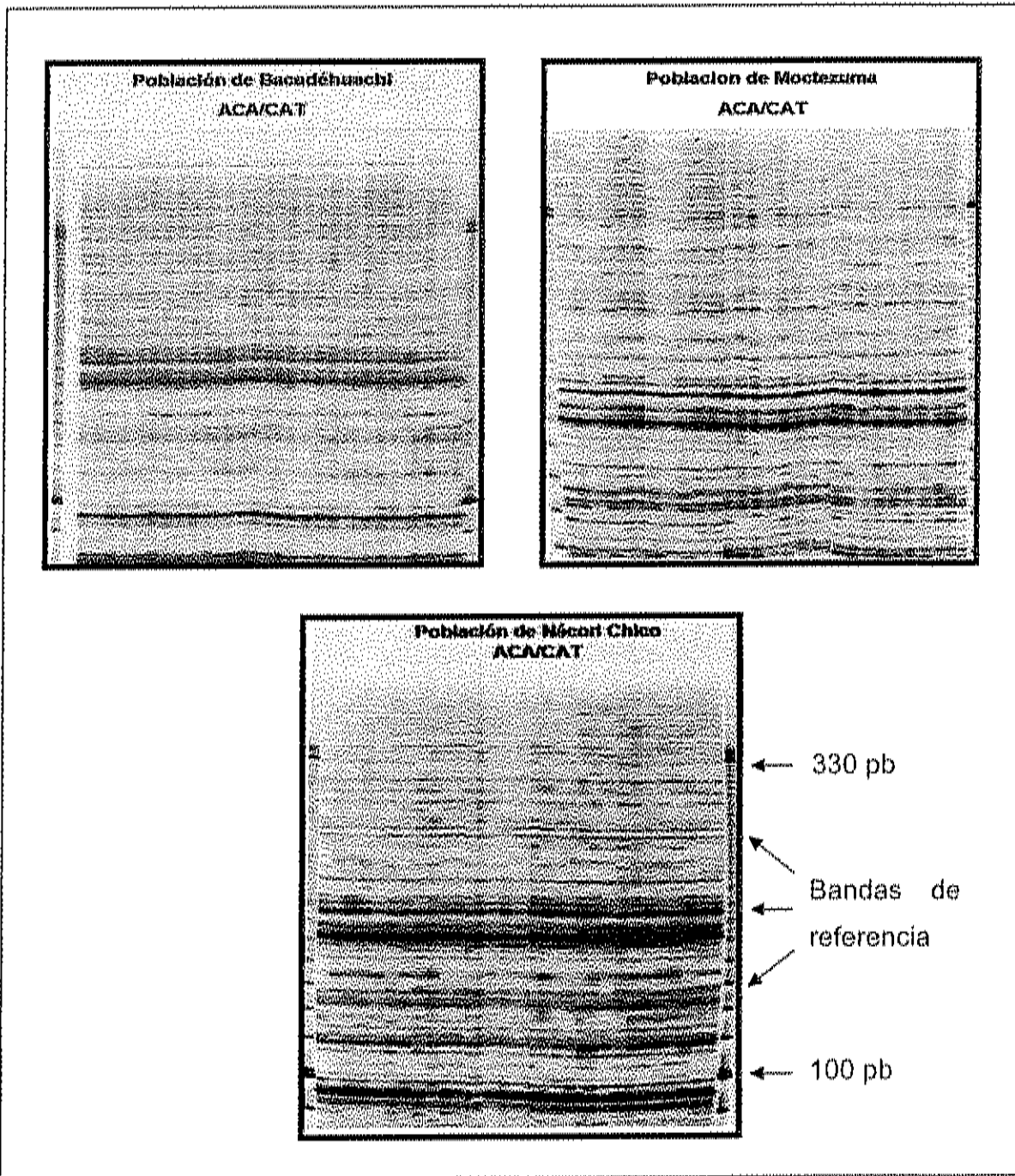


Figura 6. Geles obtenidos con marcaje radiactivo para las diferentes poblaciones estudiadas. En la última imagen se señala el marcador de tamaño molecular y las bandas consideradas como referencia para realizar un mejor análisis.

Cuadro 5. Índices de similitud intrapoblacional (negritas) e interpoblacional

	Bacadéhuachi	Moctezuma	Nácori Chico
Bacadéhuachi	0.827		
Moctezuma	0.786	0.814	
Nácori Chico	0.761	0.749	0.800
Promedio intrapoblacional= 0.814			
Promedio interpoblacional= 0.765			

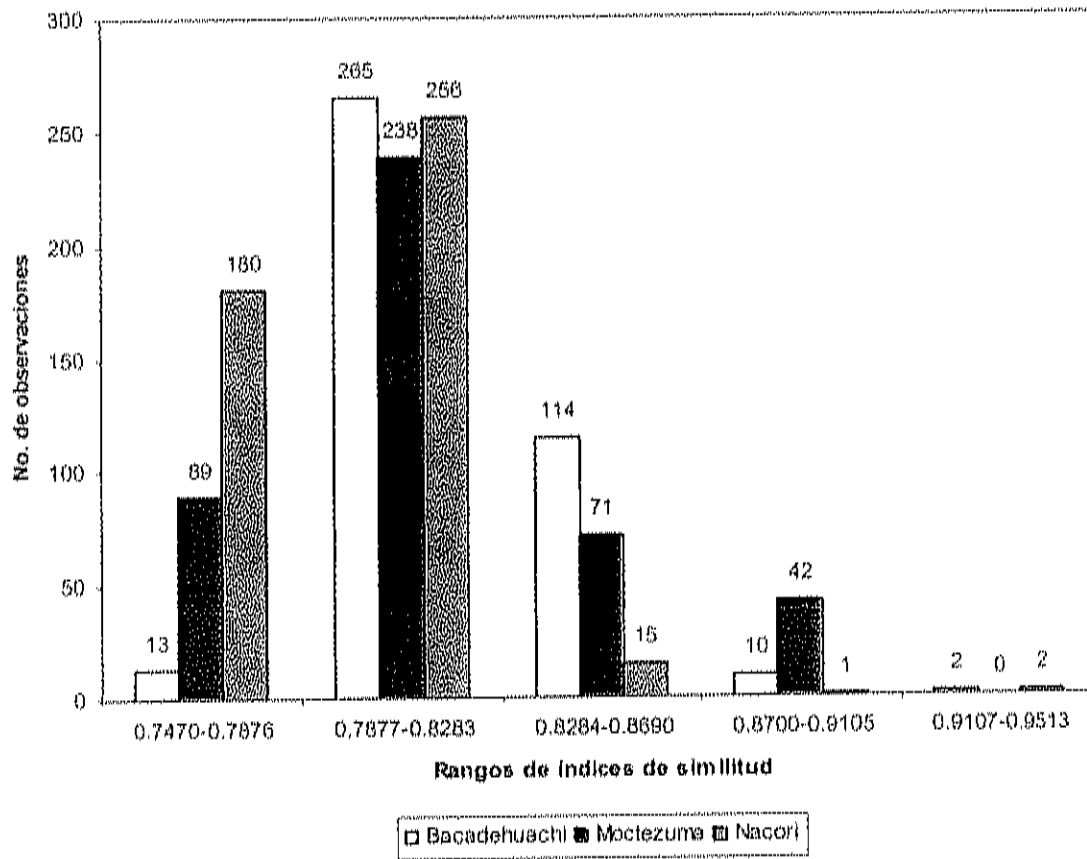


Figura 7. Frecuencia de índices de similitud en las diferentes poblaciones.

Agave angustifolia Haw.

Sierra de Sonora

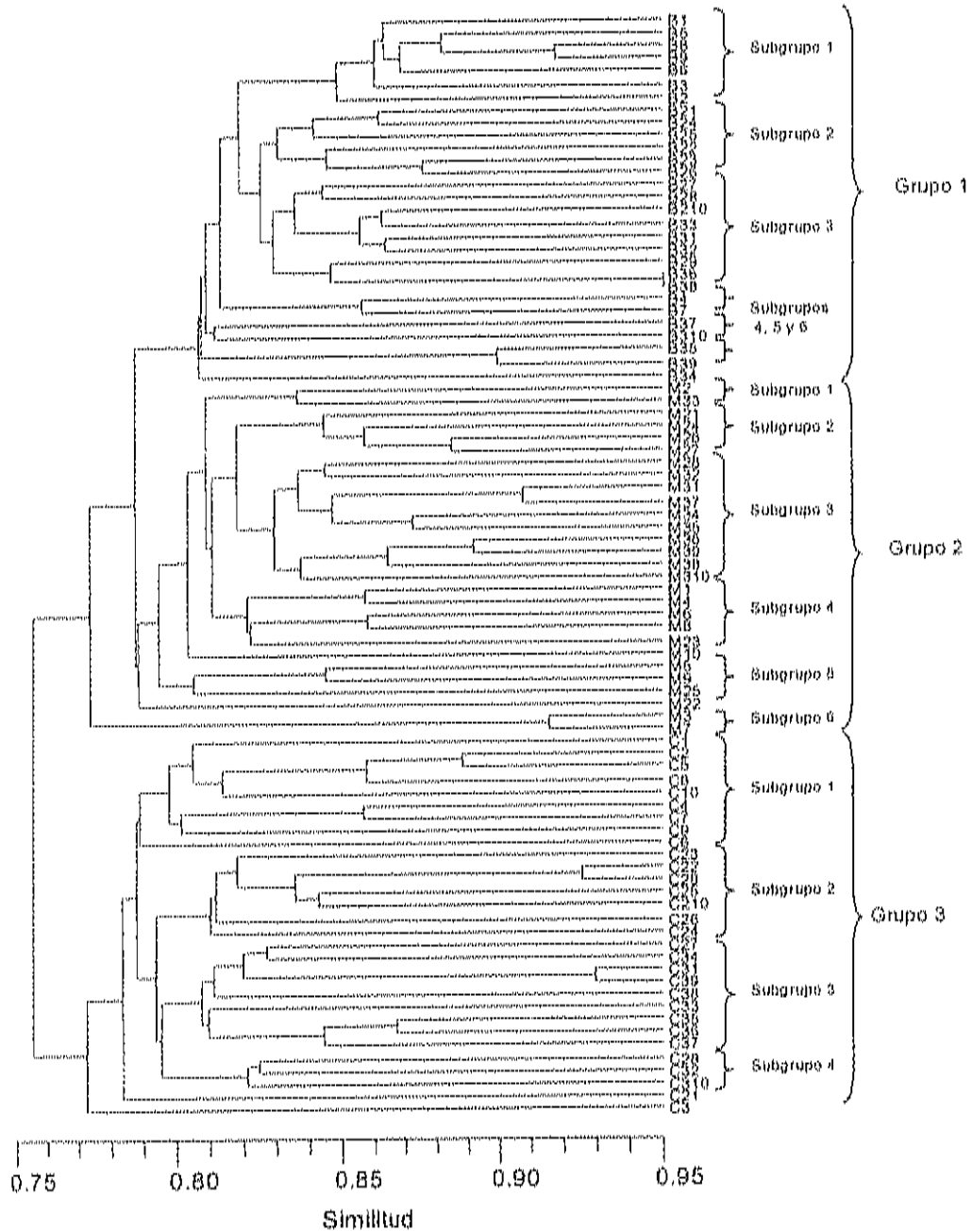


Figura 8. Dendrograma obtenido de tres poblaciones de *Agave angustifolia* basado en índices de similitud.

Índices de Variación y Estructuración Genética (TFPGA)

Con los mismos patrones de bandas se generó otra matriz binaria (ver materiales y métodos) para analizar los datos desde un punto de vista de variación y estructuración genética. La heterocigosis esperada y la proporción de *loci* polimórficos se calcularon para cada población, así como para la especie en conjunto. Como resultado de este análisis se observó una mayor variabilidad genética en la población de agave presente en Nácori Chico, ya que tanto la heterocigosis como la proporción de *loci* polimórficos fue mayor que en Bacadéhuachi y Moctezuma (Cuadro 6).

En lo que respecta a la estructuración se obtuvo un valor de $F_{st} = 0.165$ entre poblaciones realizando 1000 réplicas de bootstrap para obtener un intervalo de confianza del 95% con un límite mínimo y máximo de 0.163 y 0.245, respectivamente. Este valor de estructuración indica que existe diferenciación entre las poblaciones analizadas, y que no son poblaciones panmícticas, es decir, sugiere que no hay apareamiento al azar entre las poblaciones.

Distancia Genética

Se calcularon los valores de distancia genética entre todos los puntos de muestreo que integran cada población encontrándose en Nácori Chico las mayores distancias genéticas (Cuadro 7). Al realizar el análisis de agrupamiento con los valores de distancia genética (Figura 9) se observó nuevamente una diferenciación entre cada población, estando más relacionada Bacadéhuachi con Moctezuma y menos con Nácori Chico. Hacia el interior de cada población es interesante notar que la topología del árbol es similar en todas las subpoblaciones, es decir, que se agrupan el punto dos y tres y se discrimina el punto uno.

A excepción del nodo que une al punto dos con el tres en la población de Moctezuma (0.72), todos los nodos muestran un valor de bootstrap cercano a 1, lo cual significa que esa topología es correcta con un 95% de confianza. Por otro lado, al realizar las pruebas de mantel se observó que no había correlación entre distancia genética y geográfica (Figura 10) como tampoco con respecto a la altitud (Figura 11).

A excepción del nodo que une al punto dos con el tres en la población de Moctezuma (0.72), todos los nodos muestran un valor de bootstrap cercano a 1, lo cual significa que esa topología es correcta con un 95% de confianza. Por otro lado, al realizar las pruebas de mantel se observó que no había correlación entre distancia genética y geográfica (Figura 10) como tampoco con respecto a la altitud (Figura 11).

Cuadro 6. Índices de variación genética en cada población y para la especie.

Población	N	H _E	P
Bacadéhuachi	29	0.249	61.57
Moctezuma	28	0.253	65.40
Nácori Chico	30	0.295	68.53
		H _s = 0.2615 (\pm 0.023)	P= 65.16
Especie		H _T = 0.313 (\pm 0.037)	P= 65.16

N= número de individuos en la muestra H_E= heterocigosis esperada,
P= proporción de loci polimórficos H_s= heterocigosis esperada promedio
a nivel de poblaciones, H_T= heterocigosis total.

Cuadro 7. Distancias genéticas obtenidas entre cada uno de los puntos que integran las diferentes poblaciones estudiadas.

Puntos de muestreo	Bacadéhuachi	Moctezuma	Nácori Chico
1 vs 2	0.078	0.067	0.106
1 vs 3	0.078	0.070	0.093
2 vs 3	0.050	0.060	0.070

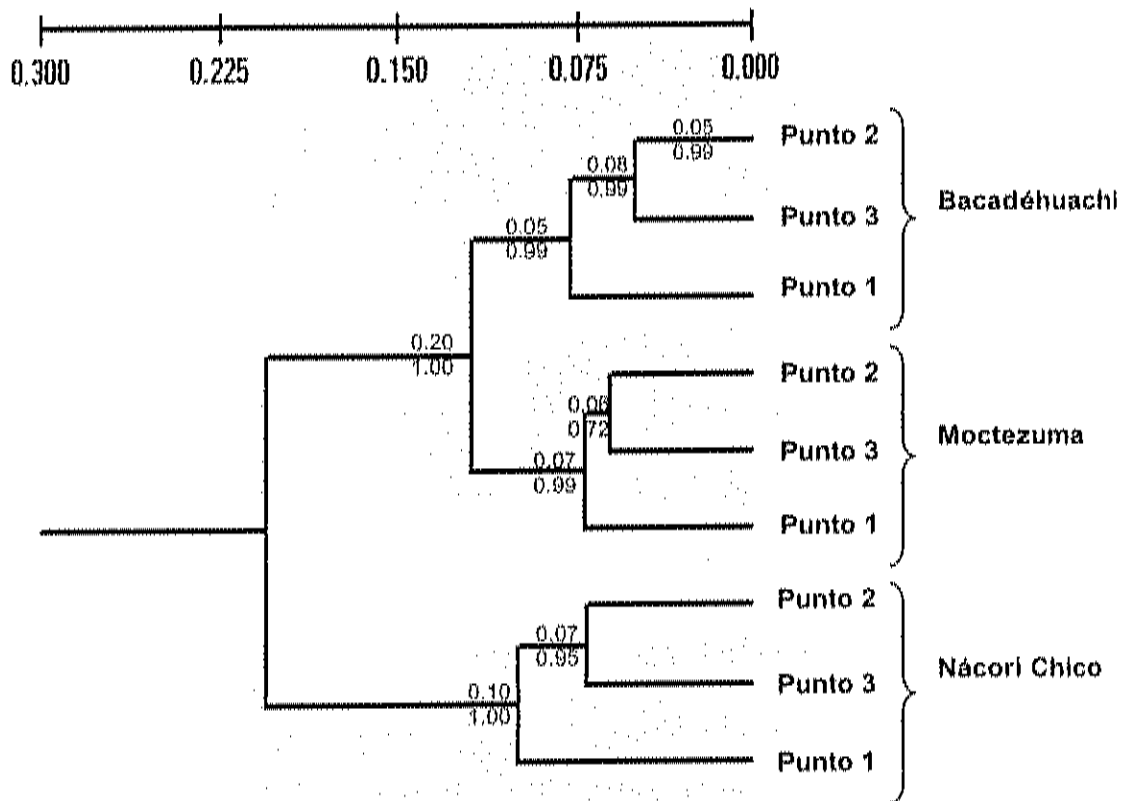


Figura 9. Dendrograma obtenido con distancias genéticas (Nei, 1972). Los valores en la parte superior de la línea son de DG y los de la parte inferior son los valores del bootstrap.

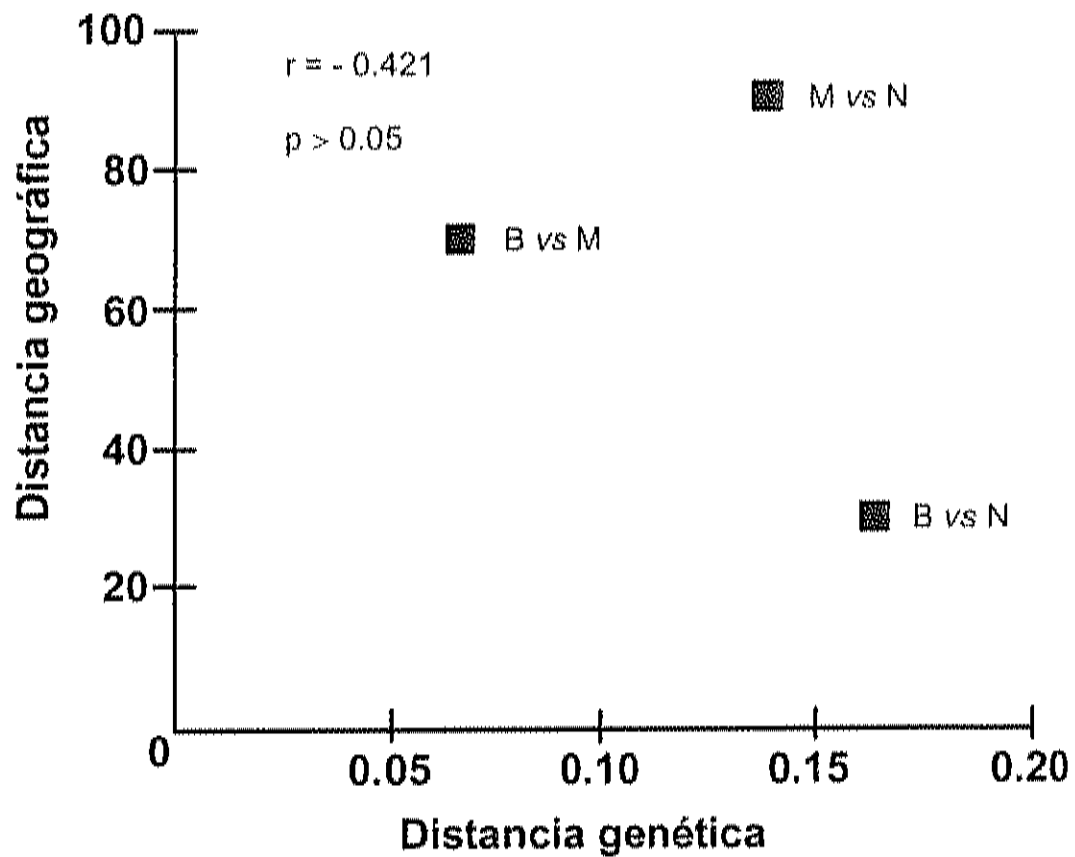


Figura 10. Prueba de Mantel para evaluar aislamiento por distancia. B= Bacadéhuachi, M= Moctezuma y N= Nácori Chico.

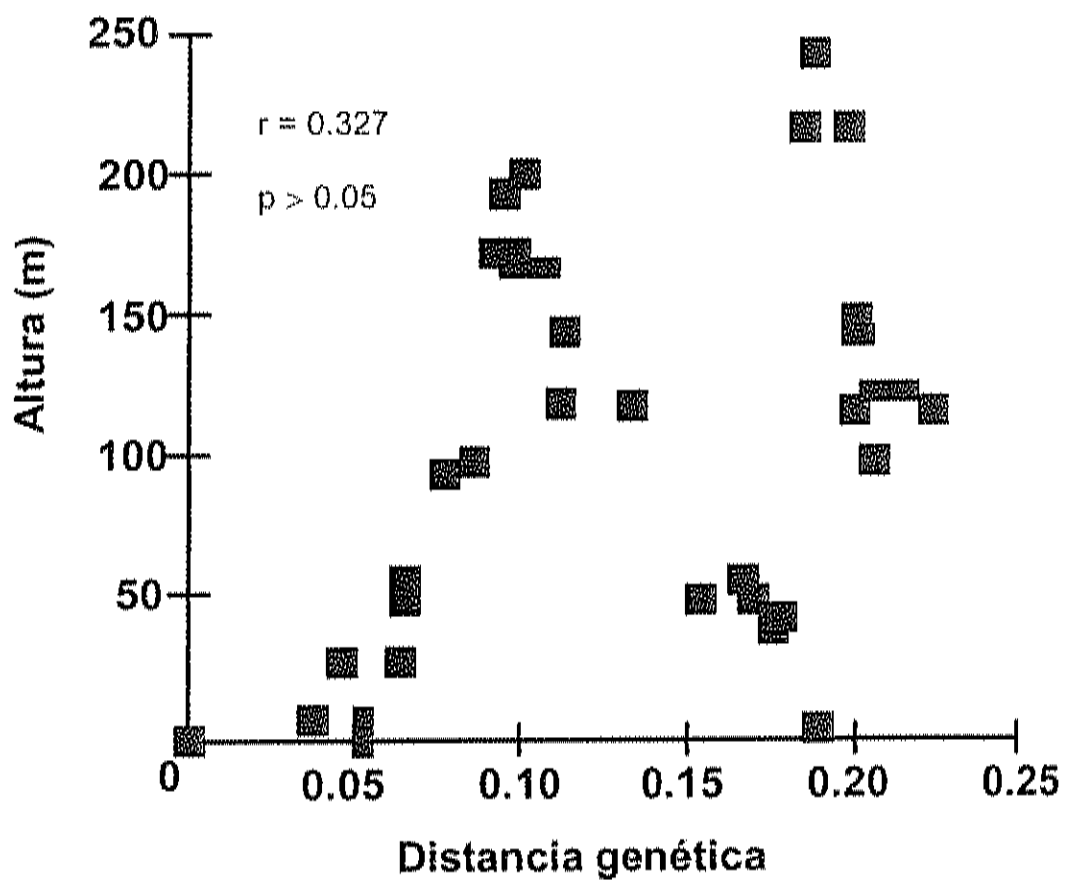


Figura 11. Prueba de Mantel para evaluar aislamiento por altitud. Cada cuadro representa la distancia genética entre dos puntos de muestreo y su respectiva diferencia en altura (Cuadro 2 y 7).

DISCUSIÓN

El presente trabajo tiene como finalidad generar conocimiento para el establecimiento a mediano plazo de plantaciones de *Agave angustifolia* seleccionadas, es decir que cumplan con las características necesarias para la elaboración del bacanora. En este sentido el presente estudio permite conocer la estructuración y variabilidad genética intra e interpoblacional de tres regiones de *Agave angustifolia* silvestre que se han aprovechado para la elaboración el bacanora.

Variabilidad Intrapoblacional

El índice de similitud promedio para las poblaciones de *Agave angustifolia* analizadas en el presente trabajo fue de 0.81, siendo menor en comparación con *Agave fourcroydes* (henequén), cuyo índice promedio para individuos pertenecientes a diversas plantaciones del estado de Yucatán fue de 0.95 (Infante *et al.*, 2003). Sin embargo en otros estudios realizados en ésta misma especie, pero con plantas provenientes de Cuba, se obtuvo un índice en el rango de 0.74 a 0.97 (González *et al.*, 2003). Cabe señalar que en los dos casos las plantas provenían de rizoma.

Por otra parte, en plantas originadas de semilla, Reyes (2004) encontró un índice de similitud promedio de 0.88, de tal forma que estos resultados no permiten determinar el mecanismo de reproducción predominante en *Agave angustifolia*, ya que también la vía asexual genera variabilidad. De igual forma en *Lohocereus schottii*, cactus de reproducción sexual y asexual, se observaron valores que varían de 0.78 a 0.88, que son similares a los obtenidos en *A. angustifolia*.

Cabe señalar que aunque las condiciones climáticas de la zona estudiada no son las más adecuadas para la germinación, las plantas de *Agave angustifolia* tienden a crecer en asociación con otros árboles, ya que es ahí donde las semillas encuentran las condiciones óptimas para germinar. Estas asociaciones se observaron comúnmente durante la colecta de las muestras.

Tomando en cuenta el índice de similitud (Cuadro 6) y los índices de H_E y P (Cuadro 7) obtenidos para cada población, Nácori Chico es la más variable genéticamente, seguida por Moctezuma y Bacadéhuachi. En promedio, (al comparar los valores de H_E) estas tres regiones presentan una menor variabilidad genética que las poblaciones de *A. lechuguilla* y *A. victoriae reginae*, (Silva-Montellano y Eguiarte, 2003; Martínez-Palacios *et al.*, 1999). Sin embargo es mayor respecto a *A. potatorum*, *A. cupreata*, *A. cerulata*, *A. deserti* y *A. subsimplex* (Aguirre, 2004; Navarro-Quezada *et al.*, 2003).

La proporción de *loci* polimórficos o polimorfismo promedio obtenido en las poblaciones *A. angustifolia* es menor en comparación con otras especies de agave (Cuadro 7). Cabe mencionar que estos estudios se realizaron con otras técnicas, en donde el número de marcadores es menor al obtenido con AFLPs.

Lo contrario ocurre con henequén, ya que su polimorfismo promedio fue de 18 % en plantaciones ubicadas en el estado de Yucatán (Reyes, 2004) y 25 % en Cuba (González *et al.*, 2003). Esto es tres veces menor que el valor obtenido para *A. angustifolia*, sin embargo hay que tomar en cuenta que los muestreos de henequén se realizaron en plantaciones donde se propagan individuos generalmente reproducidos a través de hijuelos.

Cuadro 8. Índices de diversidad y estructuración genética de algunos miembros de la familia *Agavaceae* y *Lophocereus schottii* (dicotiledonea de reproducción sexual/asexual).

Especie	P	H _s	F _{st} o G _{st}	Nm	Técnica	Referencia
<i>Agave angustifolia</i>	65	0.261	0.165	2.53	AFLPs	Reyes, E. (2004)
<i>A. fourcroydes</i>	18 25	nd	nd	nd	AFLPs	
<i>A. cupreata</i>	89	0.257	0.145	1.49	ISSRs	
<i>A. potatorum</i>	83	0.246	0.084	2.99	ISSRs	
<i>A. subsimplex</i>	76	0.144	0.084	6.14	RAPDs	Navarro-Quezada <i>et al.</i> (2003)
<i>A. cerulata</i>	90	0.237	0.095	4.38	RAPDs	
<i>A. deserti</i>	78	0.186	0.135	2.99	RAPDs	
<i>A. lechuguilla</i>	96	0.394	0.083	2.28	Isoenzimas	Silva-Montellano y Eguiarte (2003)
<i>A. victoriae-reginae</i>	83	0.330	0.236	0.655	Isoenzimas	Martínez-Palacios <i>et al.</i> (1999)
<i>Yucca</i>	68	0.205	0.172	>1.2	Isoenzimas	Massey y Hamrick (1998)
<i>Lophocereus schottii</i>	34	0.276	0.130		Isoenzimas	Parker y Hamrick (1992)

P= Proporción de loci polimórficos, H_s= Diversidad genética dentro de cada población, F_{st} o G_{st}= Diversidad genética entre poblaciones, Nm= Flujo génico, nd= No determinado.

Aunque no se encontró una correlación significativa entre variabilidad genética y altitud (Figura 11), una posible explicación al incremento observado de la variabilidad en la población de Nácori Chico es que tanto la elevación como el hábitat influyen sobre el crecimiento y la reproducción de las plantas, generando un ambiente propicio que favorece una mayor germinación, permitiendo el establecimiento de genotipos que no se adaptan en las otras dos poblaciones, lo cual concuerda con lo indicado por Nuñez (2001). Este autor señala que estudios realizados con *A. angustifolia* en regiones cercanas a Hermosillo, las plantas más grandes y vigorosas se encontraron en sitios cuyo rango de elevación es de 800 a 1200 m. De igual forma Nobel (1998) indicó que *Agave deserti* en Sonora crece mejor conforme se incrementa la altitud (particularmente durante el verano), dado que en estas regiones las precipitaciones son mayores y las temperaturas más favorables para la germinación y el desarrollo de las plantas.

Por otro lado, Massey y Hamrick (1998) señalan que la magnitud del movimiento genético entre las especies, depende entre otros factores, de los hábitats que ocupan, así que la mayor variabilidad encontrada en Nácori Chico puede ser explicada, cuando menos parcialmente debido a que está compuesta por una vegetación más diversa que puede provocar la formación de subpoblaciones separadas una de otra y genéticamente diferenciadas. Lo anterior se refleja en los valores de distancia genética entre los puntos de muestreo de Nácori Chico, ya que presentan una mayor distancia genética que en las otras poblaciones, siendo éstas las causas más probables de su variabilidad.

Variabilidad Interpoblacional

La hipótesis propuesta establece que la variabilidad genética interpoblacional se incrementara a medida que las poblaciones se separan

geográficamente, manteniendo niveles similares de variabilidad entre los individuos de una misma población (Intrapoblacional). Los resultados demuestran que el primero de los supuestos de la hipótesis no se cumple, ya que se esperaba que Bacadéhuachi y Nácori Chico, presentaran el mayor índice de similitud por ser las poblaciones más cercanas geográficamente (situadas a 30 km de distancia). Sin embargo, la mayor similitud genética se encontró entre Bacadéhuachi y Moctezuma ($SG=0.7858$), cuya distancia geográfica es de 70 km. Por otra parte, las poblaciones más alejadas genéticamente fueron Moctezuma y Nácori Chico localidades a una distancia de 90 km.

Los valores de similitud entre las diferentes poblaciones de *A. angustifolia* y la agrupación obtenida en los dendrograma sugieren que hay diferenciación entre ellas. Lo anterior se reafirma al comparar el promedio de similitud obtenido en las tres poblaciones (0.765) con el obtenido para diferentes especies de Agave (0.858) (Reyes, 2004).

Estructuración Genética

Entre las poblaciones de *A. angustifolia* existe una estructuración mayor que para la mayoría de las agavaceas ($F_{st}=0.165$), ya que únicamente *A. victoriae reginae* presenta un valor mayor (0.236). Las demás especies de Agave, presentan índices que van de 0.084 a 0.145 (cuadro 7), siendo la de menor valor, la menos diferenciada y estructurada.

Los valores de F_{st} encontrados en este estudio corresponden a los de monocotiledóneas con semillas dispersadas por gravedad (Hamrick y Godt, 1996) aunque en otras monocotiledóneas y plantas perennes longevas se han encontrado valores de 0.38 y 0.25, respectivamente (Cuadro 7) siendo mayores que en los agaves, incluyendo *A. angustifolia*. Esto aunado a un limitado flujo

génico mantiene diferenciadas genéticamente las tres poblaciones analizadas.

Se ha sugerido en especies como *Yucca filamentosa* (Agavaceae) que la diferenciación genética, se debe a una limitada dispersión de los polinizadores (Massey y Hamrick, 1998). Al respecto, *Eguiarte et al.* (2000) señalan que los principales polinizadores de los agaves en México son los murciélagos, pero que en el norte de México no necesariamente es así, ya que también son importantes los esfíngidos y las abejas. Indica que las especies del subgénero *Agave* (al cual pertenece *A. angustifolia*) están limitadas en su fecundidad por polinizadores. De igual forma señala que generalmente las poblaciones intercambian pocos genes entre ellas. Lo cual puede ser una de las causas de la diferenciación que se presenta en las poblaciones de *A. angustifolia*.

Sin embargo se observó al realizar los muestreos que las plantas de algunas regiones ya habían pasado por la etapa de floración, mientras que otras estaban desarrollando el tallo floral, lo cual influye para que las poblaciones no se homogenicen ya que hay poca sincronización entre épocas de floración aunque también influye la poca dispersión de las semillas y la baja probabilidad de que éstas germinen, tomando en cuenta las condiciones ambientales y climáticas en el estado. Sólo aquellas que encuentran un ambiente adecuado, por ejemplo bajo la sombra de algún árbol tienen mayores posibilidades de sobrevivir. Algunas de éstas asociaciones fueron observadas durante los muestreos. En este sentido, sería más factible el hecho de que las poblaciones silvestres se reprodujeran por vía asexual, ya que aparte de presentar ventajas adaptativas, explicaría la diferenciación encontrada ya que los individuos serían más parecidos entre sí que con los de otras regiones, debido a que al propagarse vegetativamente no hay intercambio genético.

Tomando en cuenta lo anterior y aunque *Agave angustifolia* presenta altos niveles de variabilidad, no podemos concluir acerca de un mecanismo de reproducción predominante, aunque sin duda se llevan a cabo tanto la

reproducción asexual como sexual. Por otro lado, sería de gran utilidad el determinar los niveles de variación que presentan las plantas silvestres provenientes de rizoma y bulbilo, así como de semilla para realizar una comparación más directa.

Por último cabe señalar que los resultados obtenidos nos dan una visión general acerca de las poblaciones silvestres de agave con las que se elabora el bacanora, además nos sirve como base para la toma de decisiones. Desde ese punto de vista y partiendo de que contamos con poblaciones diferenciadas genéticamente sería interesante realizar estudios en esas mismas poblaciones para identificar aquellas que sean adecuadas para la elaboración de Bacanora. El hecho de encontrar diferenciación entre poblaciones nos permite hasta cierto punto elaborar un plan en cuanto a las estrategias que se deben seguir en estudios a futuro que permitan hacer la selección adecuada de individuos élite, para el establecimiento de plantaciones genéticamente homogéneas.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en los índices de similitud, distancia genética, valores de variación y estructura genética para las poblaciones silvestres de *Agave angustifolia* Haw. de la región serrana de Sonora se concluye que:

Presenta altos niveles de variabilidad genética dentro de sus poblaciones, de 0.249 a 0.295, similar al obtenido en otras especies agaves silvestres cuyo rango es de 0.144 a 0.394.

El valor más alto de variabilidad (0.295) corresponde a Nácori Chico. De igual forma ésta población fue la más lejana genéticamente presentando una distancia de 0.1, siendo dos veces mayor a la que separa a Bacadéhuachi de Moctezuma. Hacia el interior de las poblaciones los puntos 1-3 y 1-2 de Nácori Chico presentaron la mayor distancia con valores de 0.093 y 0.106, respectivamente.

Aunque se encontró una estructuración baja (0.165), resultó más alta que para la mayoría de las agaváceas estudiadas (0.083 a 0.145), sin relación con la distancia entre las regiones ($r=-0.421$, $p>0.05$) ni con la altitud ($r=0.327$, $p>0.05$). El valor obtenido correspondió a monocotiledóneas con semillas dispersadas por gravedad.

RECOMENDACIONES

Realizar un estudio más amplio de las poblaciones silvestres de *Agave angustifolia* en Sonora, aumentando el número de regiones y el tamaño de muestra, así como investigar sobre su ecología reproductiva.

Correlacionar estudios morfológicos con la variabilidad genética, haciendo hincapié en aquellas características de interés para la industria del bacanora.

Crear un banco de germoplasma *in situ* que sea de utilidad para los futuros programas de mejoramiento genético.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, D.X. 2004. Genética de poblaciones de *Agave cupreata* y *Agave potatorum*: Aportaciones para el manejo y conservación de dos especies mezcaleras. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de México, Facultad de Ciencias, México D.F. pp. 9-10,30-47.
- Armenta, C.A. 2002. Hongos micorrizicos y filamentosos asociados con *Agave angustifolia* Haw. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México. pp. 25-36.
- Barceló-Gómez, A. 2001. Experiencias en la siembra de maguey. Rancho, Revista Técnico Informativa de PATROCIPES. pp. 26-27.
- Bassam, B.J., Caetano, A. Gresshoff P.M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 196: 80-83.
- Brettschneider, R. 2001. RFLP analysis. In: Karp A., Isaac P. and Ingram D.(eds.) *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands pp. 85.
- Colunga-GarcíaMarín, P., Estrada-Loera, E., May-Pat, F. 1996. Patterns of morphological variation, diversity, and domestication of wild and cultivated populations of *Agave* in Yucatán, Mexico. *American Journal of Botany* 83:1069-1082.

- Chen, J., Devanand P.S., Norman D.J., Henny R.J., Chao C. 2004. Genetic Relationships of *Aglaonema* species and cultivars inferred from AFLP markers. *Annals of Botany* 93: 157-166.
- De la Cruz, M. Whitkus, R., Mota-Bravo, L. 1995. Tropical tree DNA isolation and amplification. *Molecular Ecology* 4: 787-789.
- Eastmond, A., Herrera, J.L., Robert, M.L. 2000. La biotecnología aplicada al henequén: Alternativas para el futuro. Centro de investigación Científica de Yucatán. Yucatán, México. pp. 18-20.
- Eguiarte, L.E., Souza V., Silva-Montellano, A. 2000. Evolución de la familia *Agavaceae*: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 66: 131-150.
- Excoffier, L. 2001. Análisis of population subdivisión. In: Balding, D.J., Bishop, M. y Cannings, L. (eds). *Handbook of statical genetics*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Fish, S.K., Fish, P.R., Miksicek, C., Madsen, J. 1985. Prehistoric Agave Cultivation in Southern Arizona. In: Pinkava, D.J. and Gentry, H.S. (eds.) *Desert Plants*. University of Arizona Press, Tucson, Arizona. pp.107.
- Futuyma, J.D. 1998. *Evolutionary Biology*. 3a ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.

- García Mendoza, A. 2002. Distribution of Agave (Agavaceae) in Mexico. *Cactus and Succulent Journal* 4 (74): 177-188.
- Gentry, H.S. 1982. *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press. Tucson, Arizona. pp. 559-563.
- Gil-Vega, K., González-Chavira, M., Martínez de la Vega, O., Simpson, J., Vandemark G. 2001. Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. *Euphytica* 119: 335-341.
- Jimenes, M.A., Lopes, C.R., Valls, J.F.M. 2002. Genetic relationships among *Arachis* species based on AFLP. *Genetics and Molecular Biology* 25:349-353.
- González, G., Alemán, S., Infante, D. 2003. Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes* II: selection among individuals in a clonally propagated population. *Plant Science* 165:595-601.
- Granados-Sánchez, D. 1993. *Los Agaves en México*. Universidad Autónoma de Chapingo. México, pp. 39-43, 50-55, 115,137.
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Proceedings of the Royal Society of London B* 351:1291-1298.

- Hartl, D.L., Clark, A.G. 1989. *Principles of population genetics*. 2a ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Hartl, D.L., Clark A.G. 1997. *Principles of population genetics*. 3a ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland Massachusetts
- Hernández Vera, G. 2003. Inventario de especies silvestres del género *Agave* en el estado de Jalisco y relaciones genéticas inferidas mediante marcadores AFLP. Tesis de Maestría. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México. pp. 15.
- Hedrick, P.W. 2000. *Genetic of populations*. 2a ed. Jones and Bartlett publishers Inc. Arizona State University. pp. 57-79.
- Infante, D., González, G., Peraza-Echeverría, L., Keb-Llanes, M. 2003. Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes*. *Plant Science* 164: 223-230.
- Jones, N. H., Ougham., Thomas, H. 1997. Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytologist* 137: 165-177.
- Kim, M. S., Moore, P.H., Zee, F., Fitch, M.M.M., Steiger, D.L., Manshardt, R.M., Paull, R.E., Drew, R.A, Sekloka, T., Ming, R. 2002. Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers. *Genome* 45:503-512.

- Lewin, B. 2000. *Genes VII*. Oxford University Press Inc. New York. pp. 41.
- Lima, M.L.A., Garcia, A.A.F., Oliveira, K.M., Matsuoka, S. Arizono, H. De Sousa, Jr. C.L., De Sousa, A.P. 2002. Analyses of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugar cane (*Saccharum spp.*) *Theoretical Applied Genetics* 104: 30-38.
- Lynch, M., Milligan, B.G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.
- Mackill, D.J. 1996. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome* 39: 969-977.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 1999. *Biología de los Microorganismos*. 8 ed. Prentice Hall Iberia, Madrid, España. pp.376.
- Mantel, B.F.J., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27:209-232.
- Martínez-Palacios, A., Egularte, L., Furnier, G. 1999. Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. *American Journal of Botany* 86: 1093-1098.

- Massey, L.K. and Hamrick, J. L. 1998. Genetic diversity and population structure of *yucca filamentosa* (Agavaceae). *American Journal of Botany* 85 (3): 340-345.
- Mettler, L.E., Greg, T.G., Shaffer, H.E. 1988. *Population genetics and evolution*. 2a ed. Prentice Hall. Englewood, NJ.
- Miller, M.P. 1997. Tools for population genetic análisis (TFPGA) 1:3: A windows program for the analyses of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.
- Miyashita, N.T., Kawabe, A., Innan, H. 1999. DNA variation in the wild plant *Arabidopsis thaliana* revealed by amplified fragment length polymorphism analysis. *Genetics* 152:1723-1731.
- Moreno, S. 1998. *Agave angustifolia*. Revista Entorno, Instituto del Medio Ambiente y Desarrollo Sustentable de Sonora. No.2
- Mueller, U.G., Wolfenbarger, L.L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution* 14:389-394.
- Navarro-Quezada, A., González-Chauvet, R., Molina-Freaner, F., Eguiarte L.E. 2003. Genetic differentiation in the *Agave deserti* (Agavaceae) complex of the Sonoran desert. *Heredity* 90:220-227.

Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106 (949): 283-292.

Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York.

Nei, M., Li, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76:5269-5273.

Nei M. y Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press Inc. New York. pp.231

Nobel, P.S. 1998. *Los incomparables agaves y cactus*. 1a ed. Trillas. México, D.F. pp. 47-48,189.

Núñez Noriega, L. 2001. La producción de mezcal bacanora: una oportunidad económica para Sonora. Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México. pp. 134-137.

Núñez L., Esqueda, M. 2002. Al recate del tradicional bacanora sonorense. *Cuadernos de Nutrición* 25: 209-211.

Palomino, G., Dolezel, J., Méndez, I., Rubluo, A. 2003. Nuclear genome size of *Agave tequilana* Weber. *Caryología* 56: 37-46.

- Palomino, G. 2004. Citotipos en *Agave angustifolia* y *Agave cupreata* determinados por citometría de flujo y análisis de sus cariotipos. Memorias del IV Simposio Internacional sobre Agavaceae y Nolinaceae. Mérida, Yucatán, México. pp. 46.
- Parker, K.C., Hamrick, J.L. 1992. Genetic diversity and clonal structure in a columnar cactus *Lophocereus shottii*. *American Journal of Botany* 79(1):86-96.
- Reyes, C.E. 2004. Estudio de la variabilidad genética de *Henequén* (*Agave fourcroydes* Lem.) con marcadores moleculares (AFLP) y su posible origen. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida, Yucatán, México.
- Robert, M.L., Herrera, J.L., Chan, J.L., Contreras, F. 1992. Micropropagation of *Agave* spp. In: Y.P.S. Bajaj (ed.) *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol.19, High-tech and micropropagation III, 306-309. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Rogers, S.O. Bendich, A.J. 1994. Extraction of total cellular DNA from plants, algae and fungi. *Plant Molecular Biology Manual* D1:1-8.
- Rohlf, F. J. 1993. NTSYS-pc. *Numerical taxonomy and multivariate analyses system*. Version 2.02i. Applied Biostatistics, Inc. New York.

- Salazar, S.V. 2001. El comercio regional del bacanora y sus mercados potenciales. *Boletín CIAD* 10: 4-5.
- Silva-Montellano, A. Eguiarte, L. 2003. Geographics 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.
- Soleimani, V.D., Baum, B.R., Johnson, D.A. 2002. AFLP and pedigree-based genetic diversity estimates in modern cultivars of durum wheat [*Triticum turgidum* L. subsp. Durum (Desf.) Husn.] *Theoretical Applied Genetics* 104:350-357.
- Ude, G., Pillay, M., Nwakanma, D., Tenkouano, A. 2002. Analysis of genetic diversity and sectional relationships in *Musa* using AFLP markers. *Theoretical Applied Genetics* 104:1239-1245.
- Valadez, M. E., Kahl, G. 2000. *Huellas de AND en genomas de plantas*. Mundi prensa México, S.A de C.V., México. pp.30
- Valdez-Aguayo, H. 2001. El agave una diversificación productiva. Rancho, Revista Técnico Informativa de PATROCIPES. pp.7-10.
- Vos P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van der Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., kuiper, M., Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23: 4407-4414.

Weir, B.S. 1990. *Genetic Data Analysis: Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. pp. 377.

Weir B.S. 1996. *Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. pp 445.

Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19:395-420.

Yee, E., Kidwell, K.K., Sills, G.R. Lumpkin, T.A. 1999. Diversity among selected *Vigna angularis* (Azuki) accessions on the basis of RAPD and AFLP markers. *Crop Science* 39:268-275.

APÉNDICES

Apéndice 1. Índices de similitud genética para todos los individuos de las diferentes poblaciones.

Output: NTSYSpc 2.02i, (C) 1986-1998, Applied Biostatistics Inc.

Date & time: 15/10/2003 08:35:37 a.m.

Input parameters

Read input from file: C:\Documents and Settings\Alejandra Barraza.TOSHIBA-USER.000\My Documents\matriz2similaridad

Format: width=9 decimals=4

Page width: 80

Field width: 9

Decimal places: 4

Page width: 80

Comments:

SIMQUAL: input=C:\Documents and Settings\Alejandra Barraza.TOSHIBA-USER.000\My Documents\matriz2.NTS, coeff=DICE

by Cols, += 1.00000, -= 0.00000

Matrix type =3, size =87 by 87, missing value code ="none" (similarity)

	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	

B1		1.0000							
B2		0.8399	1.0000						
B3		0.8613	0.8446	1.0000					
B4		0.8071	0.7935	0.8220	1.0000				
B5		0.8500	0.8406	0.8404	0.8182	1.0000			
B6		0.8597	0.8392	0.8464	0.8089	0.8460	1.0000		
B7		0.8037	0.8045	0.8113	0.8561	0.8299	0.8053	1.0000	
B8		0.8652	0.8669	0.8780	0.8159	0.8809	0.8877	0.8089	1.0000
B9		0.8773	0.8577	0.8742	0.8223	0.8622	0.8726	0.8414	0.9175
B21		0.8233	0.8244	0.8094	0.8058	0.8165	0.7890	0.8244	0.8179
B22		0.8286	0.8080	0.8183	0.8109	0.8218	0.8163	0.8037	0.8231
B23		0.8193	0.8058	0.8272	0.8015	0.8051	0.7918	0.8015	0.7993
B24		0.8257	0.8104	0.8226	0.8052	0.8202	0.7962	0.8208	0.8386
B25		0.8218	0.8155	0.8224	0.8037	0.8111	0.7902	0.8305	0.8125
B26		0.8233	0.7957	0.8058	0.7986	0.8022	0.8037	0.8170	0.8036
B27		0.8339	0.7849	0.8094	0.8094	0.8022	0.8110	0.8096	0.8071
B28		0.8093	0.7884	0.8059	0.8022	0.8167	0.8000	0.8134	0.8072
B29		0.8507	0.8169	0.8235	0.8127	0.8127	0.8360	0.8022	0.8140
B210		0.8292	0.8046	0.8141	0.8169	0.8224	0.8441	0.8370	0.8284
B31		0.8276	0.8066	0.8172	0.7985	0.8244	0.8151	0.8137	0.8183
B32		0.8348	0.7964	0.7993	0.7993	0.8065	0.8007	0.8141	0.8259
B33		0.8283	0.8043	0.8145	0.8288	0.8108	0.8162	0.8296	0.8193

B34		0.7934	0.7941	0.7857	0.8045	0.7933	0.7833	0.8008	0.8059
B35		0.8175	0.8074	0.7917	0.7955	0.7993	0.8008	0.7878	0.8229
B36		0.8127	0.8172	0.8094	0.8165	0.8094	0.8037	0.8133	0.8036
B37		0.8404	0.8268	0.8000	0.7888	0.7925	0.8168	0.8038	0.8015
B38		0.8169	0.8214	0.8029	0.8280	0.8208	0.8117	0.8103	0.8078
B39		0.8120	0.8128	0.7942	0.7800	0.8014	0.8029	0.7868	0.8206
B310		0.8180	0.7898	0.8074	0.8037	0.8073	0.7603	0.8189	0.7869
M1		0.8195	0.7678	0.8000	0.7904	0.7831	0.7903	0.7887	0.7883
M2		0.8235	0.7970	0.7962	0.7903	0.7753	0.7748	0.8000	0.7844
M3		0.7894	0.7577	0.7563	0.7544	0.7544	0.7456	0.7753	0.7754
M4		0.8071	0.7812	0.7839	0.7891	0.7782	0.7704	0.7910	0.7870
M5		0.7839	0.7607	0.7744	0.7873	0.7649	0.7605	0.7969	0.7741
M6		0.8270	0.7970	0.7888	0.7792	0.7904	0.7826	0.7962	0.7882
M7		0.7992	0.7601	0.7704	0.7645	0.7645	0.7480	0.7897	0.7816
M8		0.8029	0.7766	0.7978	0.7882	0.7698	0.7467	0.7750	0.7751
M9		0.7358	0.7327	0.7324	0.7520	0.7381	0.7221	0.7541	0.7391
M10		0.7695	0.7722	0.7632	0.7845	0.7650	0.7366	0.7745	0.7869
M21		0.8116	0.7890	0.8030	0.7712	0.7860	0.7820	0.7689	0.7949
M22		0.7575	0.7675	0.7395	0.7529	0.7567	0.7481	0.7539	0.7509
M23		0.7767	0.7795	0.7630	0.7878	0.7878	0.7797	0.7780	0.7932
M24		0.7934	0.7589	0.7992	0.7669	0.7519	0.7701	0.7761	0.7836
M25		0.8030	0.7872	0.7863	0.7917	0.7689	0.7761	0.7899	0.7707
M26		0.7836	0.7448	0.7893	0.7529	0.7643	0.7558	0.7578	0.7623
M27		0.7575	0.7561	0.7625	0.7643	0.7605	0.7558	0.7695	0.7736
M28		0.7770	0.7797	0.7786	0.7576	0.7462	0.7568	0.7743	0.7519
M31		0.7919	0.7724	0.7675	0.7730	0.7767	0.7610	0.7861	0.7821
M32		0.7794	0.7784	0.7774	0.7790	0.7603	0.7595	0.7692	0.7546
M33		0.7845	0.7836	0.7599	0.7767	0.7730	0.7380	0.7746	0.7672
M34		0.7706	0.7546	0.7648	0.7813	0.7664	0.7543	0.7716	0.7681
M35		0.8248	0.7910	0.7846	0.7857	0.7849	0.7836	0.7865	0.7813
M36		0.8279	0.7859	0.7973	0.7939	0.7930	0.7875	0.8168	0.7719
M37		0.8391	0.8018	0.8044	0.8053	0.8130	0.7902	0.8106	0.8184
M38		0.7842	0.7643	0.7654	0.7739	0.7771	0.7588	0.7710	0.7719
M39		0.8375	0.7943	0.8043	0.7842	0.8022	0.7875	0.7970	0.7964
M310		0.7774	0.7648	0.7636	0.7462	0.7615	0.7529	0.7787	0.7519
C1		0.7963	0.7857	0.7619	0.7774	0.7660	0.7553	0.7534	0.7753
C2		0.7893	0.7935	0.7633	0.7709	0.7818	0.7607	0.7701	0.7798
C3		0.7452	0.7297	0.7554	0.7326	0.7597	0.7168	0.7345	0.7231
C4		0.7717	0.7500	0.7561	0.7675	0.7491	0.7345	0.7514	0.7619
C5		0.7884	0.7670	0.7695	0.7808	0.7735	0.7632	0.7614	0.7788
C6		0.7495	0.7456	0.7400	0.7208	0.7564	0.7247	0.7510	0.7230
C7		0.7718	0.7571	0.7519	0.7599	0.7434	0.7259	0.7471	0.7505
C8		0.7566	0.7490	0.7322	0.7405	0.7352	0.7096	0.7387	0.7311
C9		0.7834	0.7495	0.7481	0.7294	0.7395	0.7412	0.7312	0.7543
C10		0.7476	0.7500	0.7371	0.7674	0.7409	0.7556	0.7431	0.7379
C21		0.7519	0.7218	0.7505	0.7283	0.7434	0.7129	0.7379	0.7416
C22		0.8144	0.7824	0.7926	0.7706	0.7890	0.7790	0.7887	0.7978

C23		0.7664	0.7514	0.7692	0.7657	0.7771	0.7354	0.7686	0.7599
C24		0.7519	0.7214	0.7350	0.7280	0.7510	0.7202	0.7416	0.7186
C25		0.7681	0.7608	0.7519	0.7599	0.7637	0.7490	0.7743	0.7467
C26		0.7624	0.7450	0.7366	0.7232	0.7406	0.7249	0.7481	0.7121
C27		0.7742	0.7581	0.7363	0.7657	0.7447	0.7542	0.7663	0.7512
C28		0.7935	0.7831	0.7933	0.7970	0.7970	0.7721	0.7780	0.7912
C29		0.7881	0.7660	0.7648	0.7462	0.7576	0.7427	0.7485	0.7444
C210		0.7635	0.7637	0.7356	0.7400	0.7514	0.7364	0.7695	0.7382
C31		0.7664	0.7628	0.7500	0.7505	0.7467	0.7588	0.7882	0.7372
C32		0.7556	0.7820	0.7390	0.7321	0.7623	0.7553	0.7456	0.7528
C33		0.7707	0.7710	0.7582	0.7739	0.7625	0.7397	0.7574	0.7529
C34		0.7491	0.7715	0.7400	0.7594	0.7744	0.7447	0.7814	0.7500
C35		0.7500	0.7231	0.7290	0.7529	0.7259	0.7101	0.7634	0.7280
C36		0.7695	0.7509	0.7419	0.7765	0.7614	0.7234	0.7641	0.7481
C37		0.7514	0.7173	0.7346	0.7657	0.7314	0.7004	0.7451	0.7108
C38		0.7858	0.7750	0.7586	0.7514	0.7476	0.7442	0.7578	0.7458
C39		0.7669	0.7557	0.7544	0.7739	0.7548	0.7515	0.7850	0.7490
C310		0.7609	0.7500	0.7449	0.7823	0.7601	0.7458	0.7590	0.7582

B9 B21 B22 B23 B24 B25 B26 B27

B9		1.0000							
B21		0.8535	1.0000						
B22		0.8426	0.8489	1.0000					
B23		0.8401	0.8180	0.8342	1.0000				
B24		0.8620	0.8614	0.8390	0.8090	1.0000			
B25		0.8322	0.8388	0.8370	0.8200	0.8435	1.0000		
B26		0.8421	0.8363	0.8561	0.8757	0.8207	0.8425	1.0000	
B27		0.8323	0.8434	0.8309	0.8144	0.8312	0.8278	0.8292	1.0000
B28		0.8351	0.8402	0.8240	0.8145	0.8127	0.8355	0.8294	0.8438
B29		0.8361	0.8252	0.8304	0.8425	0.8297	0.7950	0.8357	0.8427
B210		0.8621	0.8176	0.8349	0.8411	0.8454	0.8210	0.8565	0.8453
B31		0.8894	0.8154	0.8318	0.8407	0.8289	0.8286	0.8373	0.8336
B32		0.8452	0.8229	0.8246	0.8080	0.8119	0.8214	0.8229	0.8229
B33		0.8685	0.8449	0.8396	0.8195	0.8244	0.8294	0.8378	0.8378
B34		0.8200	0.8177	0.7821	0.8172	0.8145	0.8083	0.7993	0.8214
B35		0.8341	0.8088	0.7918	0.8045	0.8138	0.8220	0.7978	0.8456
B36		0.8414	0.8221	0.7986	0.8360	0.7934	0.8095	0.8007	0.8114
B37		0.8503	0.8133	0.7925	0.7790	0.8077	0.8000	0.8170	0.7985
B38		0.8397	0.8121	0.8136	0.8402	0.7904	0.8248	0.8085	0.8121
B39		0.8326	0.8071	0.7979	0.8208	0.8029	0.8087	0.8142	0.8248
B310		0.8207	0.8276	0.8037	0.7941	0.7864	0.8075	0.8094	0.8203
M1		0.8128	0.8058	0.8000	0.8066	0.8098	0.7776	0.8109	0.7855
M2		0.8217	0.8244	0.8112	0.7992	0.8192	0.8152	0.8074	0.8037
M3		0.7836	0.7748	0.7645	0.7713	0.7659	0.7677	0.7610	0.7419
M4		0.8051	0.7899	0.7804	0.8015	0.7910	0.7948	0.7950	0.7842
M5		0.7800	0.7993	0.7858	0.7701	0.7946	0.7894	0.7897	0.7897

M6		0.8197	0.7985	0.7815	0.7844	0.7848	0.7849	0.8037	0.7743
M7		0.7946	0.7771	0.7746	0.7776	0.7881	0.7741	0.7786	0.7557
M8		0.8077	0.7927	0.7684	0.8007	0.7962	0.8015	0.7942	0.7869
M9		0.7341	0.7819	0.7555	0.7585	0.7639	0.7505	0.7756	0.7441
M10		0.8125	0.7663	0.7481	0.7743	0.7800	0.7510	0.7678	0.7486
M21		0.8188	0.7978	0.7993	0.8133	0.8008	0.8143	0.8321	0.7956
M22		0.7991	0.7692	0.7628	0.7771	0.7539	0.7660	0.7895	0.7669
M23		0.8256	0.7849	0.7786	0.7931	0.8071	0.7704	0.8091	0.7750
M24		0.8077	0.7792	0.7842	0.7947	0.7838	0.7725	0.7918	0.7732
M25		0.7991	0.8000	0.7940	0.8083	0.8054	0.8092	0.8090	0.7715
M26		0.8069	0.7880	0.7742	0.7962	0.7813	0.8008	0.8008	0.7632
M27		0.7965	0.7730	0.7666	0.7886	0.7813	0.7814	0.7820	0.7707
M28		0.8026	0.7850	0.7637	0.7970	0.7860	0.7861	0.7903	0.7790
M31		0.8095	0.7889	0.8090	0.7744	0.7930	0.7863	0.7904	0.7866
M32		0.7983	0.7800	0.7738	0.7992	0.7923	0.7886	0.8000	0.7815
M33		0.8166	0.7889	0.7828	0.7707	0.8069	0.7786	0.7666	0.7829
M34		0.7817	0.8044	0.7948	0.7828	0.7808	0.7757	0.8096	0.7763
M35		0.8213	0.8069	0.7991	0.8027	0.7927	0.8036	0.8069	0.7921
M36		0.8391	0.8188	0.8026	0.8148	0.8143	0.8026	0.8358	0.8043
M37		0.8535	0.8213	0.8355	0.8174	0.8386	0.8096	0.8426	0.8326
M38		0.7928	0.8158	0.7771	0.8008	0.7992	0.7791	0.8038	0.7759
M39		0.8333	0.8277	0.8223	0.8324	0.8207	0.8080	0.8363	0.8292
M310		0.7885	0.7818	0.7831	0.7861	0.8024	0.8102	0.7833	0.7947
C1		0.7921	0.7873	0.7962	0.7788	0.7767	0.7692	0.7948	0.7761
C2		0.8134	0.7914	0.7855	0.7760	0.8037	0.7889	0.8022	0.7914
C3		0.7371	0.7280	0.7519	0.7456	0.7505	0.7628	0.7548	0.7395
C4		0.7666	0.7555	0.7528	0.7579	0.7567	0.7594	0.7664	0.7518
C5		0.8017	0.7942	0.7845	0.7749	0.7955	0.7965	0.7869	0.7942
C6		0.7534	0.7554	0.7525	0.7659	0.7510	0.7636	0.7632	0.7632
C7		0.7682	0.7589	0.7372	0.7576	0.7471	0.7283	0.7626	0.7514
C8		0.7545	0.7585	0.7634	0.7648	0.7559	0.7665	0.7660	0.7434
C9		0.7736	0.7628	0.7601	0.7731	0.7589	0.7476	0.7666	0.7552
C10		0.7715	0.7729	0.7554	0.7554	0.7576	0.7833	0.7482	0.7566
C21		0.7489	0.7425	0.7509	0.7221	0.7495	0.7346	0.7463	0.7463
C22		0.8238	0.7913	0.7963	0.8015	0.7985	0.8075	0.7877	0.8022
C23		0.7876	0.7910	0.7733	0.7557	0.7843	0.7728	0.7533	0.7646
C24		0.7466	0.7689	0.7471	0.7370	0.7470	0.7500	0.7386	0.7462
C25		0.7788	0.7925	0.8015	0.7917	0.7836	0.7669	0.7888	0.7738
C26		0.7781	0.7236	0.7607	0.7557	0.7454	0.7385	0.7631	0.7669
C27		0.7831	0.7523	0.7869	0.7728	0.7561	0.7524	0.7889	0.7552
C28		0.8008	0.8102	0.8118	0.7985	0.8159	0.8083	0.8066	0.8102
C29		0.8000	0.7640	0.7652	0.7818	0.7641	0.7876	0.7790	0.7978
C210		0.7904	0.7767	0.7742	0.7757	0.7524	0.7737	0.7992	0.7617
C31		0.7805	0.7608	0.7810	0.7786	0.7623	0.7728	0.7684	0.7759
C32		0.7852	0.7612	0.7660	0.7637	0.7612	0.7692	0.7761	0.7612
C33		0.7785	0.7576	0.7395	0.7486	0.7668	0.7500	0.7424	0.7614
C34		0.7913	0.7509	0.7331	0.7721	0.7427	0.7625	0.7658	0.7509

C35	0.7606	0.7519	0.7529	0.7621	0.7515	0.7441	0.7634	0.7519
C36	0.7877	0.7603	0.7614	0.7780	0.7773	0.7722	0.7715	0.7678
C37	0.7500	0.7458	0.7429	0.7405	0.7593	0.7417	0.7571	0.7533
C38	0.7632	0.7655	0.7438	0.7414	0.7617	0.7621	0.7467	0.7617
C39	0.7578	0.7689	0.7854	0.7831	0.7628	0.7734	0.7765	0.7765
C310	0.7742	0.7774	0.7823	0.7800	0.7657	0.7632	0.7883	0.7920

B28 B29 B210 B31 B32 B33 B34 B35

B28	1.0000							
B29	0.8254	1.0000						
B210	0.8431	0.8493	1.0000					
B31	0.8339	0.8402	0.8619	1.0000				
B32	0.8267	0.8260	0.8531	0.8640	1.0000			
B33	0.8417	0.8441	0.8625	0.8608	0.8459	1.0000		
B34	0.8067	0.8246	0.8325	0.8030	0.8222	0.8339	1.0000	
B35	0.8015	0.7834	0.8263	0.8015	0.8133	0.8177	0.8114	1.0000
B36	0.8294	0.8427	0.8252	0.8154	0.8193	0.8414	0.8177	0.8088
B37	0.7948	0.8167	0.8341	0.8327	0.8253	0.8148	0.8008	0.7878
B38	0.8301	0.8502	0.8345	0.8233	0.8093	0.8419	0.8220	0.7985
B39	0.8000	0.8035	0.8056	0.8000	0.8114	0.8191	0.7839	0.8995
B310	0.8388	0.8021	0.7906	0.8209	0.8358	0.8218	0.7857	0.7992
M1	0.7927	0.8093	0.8125	0.8097	0.8029	0.8051	0.7759	0.7707
M2	0.8112	0.8094	0.8175	0.8023	0.7918	0.8163	0.7831	0.8008
M3	0.7645	0.7603	0.7500	0.7544	0.7447	0.7931	0.7381	0.7525
M4	0.7840	0.7972	0.8180	0.7970	0.8087	0.8000	0.7821	0.8030
M5	0.7858	0.7740	0.7904	0.7841	0.7963	0.7763	0.7725	0.7939
M6	0.8074	0.7878	0.8146	0.7872	0.8029	0.8051	0.7643	0.7628
M7	0.7746	0.7963	0.7817	0.7804	0.7625	0.8069	0.7485	0.7589
M8	0.7941	0.8000	0.8230	0.8000	0.7971	0.8029	0.7925	0.7910
M9	0.7500	0.7606	0.7664	0.7642	0.7659	0.7549	0.7280	0.7592
M10	0.7713	0.7707	0.7609	0.7732	0.7437	0.7846	0.7450	0.7435
M21	0.8177	0.8050	0.8418	0.8127	0.8095	0.8336	0.7788	0.7585
M22	0.7818	0.7698	0.8170	0.7954	0.7736	0.7910	0.7446	0.7471
M23	0.7977	0.7963	0.8191	0.8000	0.7894	0.8030	0.7725	0.7828
M24	0.7955	0.7942	0.7990	0.7824	0.7873	0.8194	0.7861	0.7692
M25	0.8015	0.8037	0.8050	0.7808	0.8233	0.7992	0.7806	0.7791
M26	0.7856	0.8029	0.7950	0.8069	0.7811	0.7947	0.7719	0.7510
M27	0.7818	0.7993	0.7859	0.7992	0.7849	0.8060	0.7602	0.7315
M28	0.7940	0.8110	0.8168	0.8038	0.8045	0.8105	0.7922	0.7481
M31	0.8015	0.7927	0.7901	0.7962	0.8007	0.8067	0.7692	0.7831
M32	0.8000	0.8058	0.7921	0.8137	0.7918	0.8200	0.7908	0.7395
M33	0.7865	0.7855	0.7866	0.8114	0.7896	0.7918	0.7500	0.7601
M34	0.7948	0.7971	0.7882	0.7932	0.7904	0.7889	0.7778	0.7495
M35	0.8044	0.8279	0.8086	0.7865	0.8186	0.8114	0.7790	0.7621
M36	0.8294	0.8394	0.8408	0.8124	0.8130	0.8491	0.7830	0.7664
M37	0.8276	0.8419	0.8494	0.8326	0.8416	0.8301	0.7902	0.8190

M38	0.8168	0.7918	0.8321	0.7899	0.7894	0.8053	0.7505	0.7500
M39	0.8294	0.8412	0.8364	0.8248	0.8214	0.8200	0.7956	0.7868
M310	0.7793	0.7821	0.8060	0.7969	0.7863	0.8114	0.7535	0.7638
C1	0.7721	0.7656	0.8286	0.7793	0.7805	0.8037	0.7582	0.7799
C2	0.8022	0.8092	0.8038	0.7763	0.7957	0.8216	0.7635	0.7844
C3	0.7350	0.7481	0.7417	0.7298	0.7399	0.7601	0.7157	0.7262
C4	0.7514	0.7742	0.7596	0.7655	0.7596	0.7678	0.7372	0.7208
C5	0.7941	0.7907	0.7874	0.7715	0.7875	0.7956	0.7736	0.7834
C6	0.7905	0.7716	0.7377	0.7661	0.7559	0.7608	0.7398	0.7221
C7	0.7698	0.7633	0.7600	0.7462	0.7519	0.7678	0.7364	0.7234
C8	0.7619	0.7778	0.7781	0.7495	0.7666	0.7486	0.7241	0.7383
C9	0.7816	0.7709	0.7619	0.7500	0.7366	0.7376	0.7441	0.7426
C10	0.7990	0.7739	0.7629	0.7494	0.7343	0.7692	0.7519	0.7574
C21	0.7533	0.7363	0.7363	0.7217	0.7280	0.7439	0.7350	0.7143
C22	0.8059	0.8057	0.7904	0.8209	0.7883	0.8182	0.7782	0.7692
C23	0.7757	0.7726	0.7685	0.7791	0.7576	0.7925	0.7656	0.7485
C24	0.7610	0.7435	0.7419	0.7329	0.7200	0.7742	0.7269	0.7294
C25	0.7698	0.7743	0.7824	0.7654	0.7594	0.7903	0.7326	0.7505
C26	0.7506	0.7603	0.7527	0.7752	0.7286	0.7900	0.6997	0.7062
C27	0.7728	0.7901	0.7708	0.7578	0.7804	0.7721	0.7264	0.7560
C28	0.7956	0.7993	0.8096	0.7805	0.7853	0.8007	0.7826	0.7736
C29	0.7675	0.7831	0.7681	0.7900	0.7533	0.7880	0.7495	0.7364
C210	0.7614	0.7661	0.7631	0.7529	0.7585	0.7867	0.7276	0.7379
C31	0.7909	0.7689	0.7930	0.7829	0.7917	0.7774	0.7461	0.7602
C32	0.7759	0.7509	0.7742	0.7486	0.7730	0.7813	0.7582	0.7606
C33	0.7533	0.7770	0.7662	0.7524	0.7352	0.7704	0.7466	0.7333
C34	0.7692	0.7518	0.7742	0.7610	0.7664	0.7784	0.7514	0.7231
C35	0.7553	0.7491	0.7700	0.7544	0.7447	0.7878	0.7168	0.7154
C36	0.7561	0.7500	0.7883	0.7707	0.7646	0.8143	0.7573	0.7519
C37	0.7567	0.7468	0.7550	0.7558	0.7462	0.7811	0.7422	0.7251
C38	0.7689	0.7698	0.7723	0.7568	0.7623	0.7669	0.7315	0.7417
C39	0.7878	0.7732	0.7700	0.7758	0.7810	0.7856	0.7583	0.7608
C310	0.7772	0.7849	0.7561	0.7692	0.7560	0.7788	0.7486	0.7698

B36 B37 B38 B39 B310 M1 M2 M3

B36	1.0000							
B37	0.7985	1.0000						
B38	0.9504	0.8029	1.0000					
B39	0.8142	0.8015	0.8113	1.0000				
B310	0.7913	0.8113	0.7993	0.8159	1.0000			
M1	0.7840	0.7887	0.7993	0.7884	0.7778	1.0000		
M2	0.7911	0.8038	0.7919	0.7919	0.7887	0.8377	1.0000	
M3	0.7481	0.7674	0.7490	0.7490	0.7563	0.8031	0.8111	1.0000
M4	0.7756	0.8022	0.7943	0.8050	0.8059	0.8571	0.8246	0.7900
M5	0.7698	0.7739	0.7706	0.7743	0.7820	0.8383	0.8314	0.7683
M6	0.7839	0.7810	0.7920	0.7883	0.7850	0.8075	0.8114	0.7677

M7		0.7314	0.7540	0.7476	0.7514	0.7704	0.8054	0.8214	0.9158
M8		0.7927	0.7864	0.7971	0.7899	0.7904	0.8052	0.8280	0.7891
M9		0.7490	0.7541	0.7554	0.7466	0.7430	0.7912	0.7901	0.7473
M10		0.7701	0.7505	0.7863	0.7443	0.7554	0.7828	0.7824	0.7851
M21		0.7905	0.7841	0.7985	0.7913	0.7918	0.8327	0.8333	0.7750
M22		0.7917	0.7539	0.7888	0.7477	0.7433	0.7739	0.7891	0.7595
M23		0.7962	0.7780	0.8008	0.7970	0.7592	0.8285	0.7976	0.7764
M24		0.7941	0.7954	0.7911	0.7689	0.7803	0.7841	0.8147	0.7784
M25		0.8037	0.7782	0.7858	0.7747	0.7824	0.8015	0.8210	0.7646
M26		0.7805	0.7813	0.7776	0.7589	0.7548	0.8008	0.8164	0.7677
M27		0.7805	0.7656	0.7776	0.7477	0.7471	0.7969	0.7969	0.7717
M28		0.7850	0.7899	0.8045	0.7709	0.7786	0.7977	0.7977	0.7525
M31		0.7852	0.7707	0.7934	0.7934	0.7788	0.7826	0.7861	0.7570
M32		0.8022	0.7962	0.8103	0.7587	0.7660	0.7811	0.8077	0.7634
M33		0.7667	0.7823	0.7675	0.7491	0.7750	0.7940	0.8362	0.7570
M34		0.7749	0.7869	0.7904	0.7537	0.7721	0.7985	0.7908	0.7698
M35		0.8217	0.7891	0.8268	0.7797	0.8009	0.8282	0.8119	0.7714
M36		0.8162	0.7929	0.8128	0.7879	0.8132	0.8225	0.8153	0.7944
M37		0.8188	0.8133	0.8238	0.8337	0.8246	0.8294	0.8404	0.7786
M38		0.8023	0.7765	0.8023	0.7533	0.7654	0.8154	0.7992	0.7439
M39		0.8171	0.7970	0.8142	0.8000	0.8043	0.8225	0.8339	0.7543
M310		0.7780	0.7787	0.7750	0.7637	0.7674	0.8023	0.8221	0.7812
C1		0.7575	0.7728	0.7844	0.7644	0.7924	0.7786	0.7899	0.7445
C2		0.7806	0.7888	0.7778	0.7943	0.7743	0.7978	0.8052	0.7505
C3		0.7356	0.7226	0.7366	0.7238	0.7436	0.7412	0.7200	0.7288
C4		0.7518	0.7628	0.7600	0.7405	0.7747	0.7635	0.7666	0.7373
C5		0.7723	0.7879	0.7731	0.7826	0.7807	0.7821	0.7894	0.7412
C6		0.7515	0.7347	0.7680	0.7432	0.7640	0.7655	0.7444	0.7203
C7		0.7477	0.7704	0.7635	0.7361	0.7595	0.7595	0.7510	0.7284
C8		0.7396	0.7466	0.7556	0.7430	0.7630	0.7746	0.7623	0.7317
C9		0.7362	0.7589	0.7372	0.7547	0.7519	0.7597	0.7589	0.7117
C10		0.7476	0.7593	0.7536	0.7707	0.7518	0.7605	0.7681	0.7462
C21		0.7276	0.7184	0.7323	0.7124	0.7429	0.7162	0.7107	0.7108
C22		0.7949	0.7623	0.8065	0.8014	0.7926	0.7926	0.8000	0.7524
C23		0.7458	0.7569	0.7580	0.7528	0.7808	0.7500	0.7569	0.7221
C24		0.7311	0.7061	0.7321	0.7232	0.7466	0.7427	0.7377	0.7224
C25		0.7738	0.7393	0.7784	0.7584	0.7710	0.7786	0.7704	0.7445
C26		0.7426	0.7390	0.7537	0.7273	0.7263	0.7506	0.7429	0.7460
C27		0.7465	0.7626	0.7615	0.7414	0.7601	0.7733	0.7711	0.7255
C28		0.7993	0.7856	0.8036	0.7695	0.7933	0.8022	0.7795	0.7583
C29		0.7753	0.7446	0.7761	0.7635	0.7648	0.7533	0.7719	0.7298
C210		0.7730	0.7266	0.7738	0.7687	0.7548	0.7663	0.7656	0.7556
C31		0.7458	0.7569	0.7505	0.7678	0.7962	0.7846	0.7843	0.7546
C32		0.7649	0.7728	0.7584	0.7644	0.7619	0.7519	0.7432	0.7243
C33		0.7689	0.7456	0.7849	0.7495	0.7389	0.7544	0.7535	0.7184
C34		0.7695	0.7466	0.7667	0.7505	0.7590	0.7833	0.7558	0.7335
C35		0.7214	0.7237	0.7338	0.7211	0.7641	0.7446	0.7555	0.7119

C36	0.7416	0.7446	0.7575	0.7412	0.7572	0.7548	0.7930	0.7475
C37	0.7194	0.7373	0.7392	0.7341	0.7654	0.7538	0.7725	0.7221
C38	0.7467	0.7578	0.7477	0.7500	0.7663	0.7447	0.7671	0.7287
C39	0.7424	0.7535	0.7434	0.7759	0.8046	0.7791	0.7787	0.7485
C310	0.7664	0.7476	0.7673	0.7623	0.7933	0.7561	0.7590	0.7294

M4 M5 M6 M7 M8 M9 M10 M21

M4	1.0000							
M5	0.8327	1.0000						
M6	0.8355	0.7970	1.0000					
M7	0.8115	0.7945	0.7898	1.0000				
M8	0.8367	0.8098	0.8577	0.8070	1.0000			
M9	0.7809	0.8449	0.7602	0.7754	0.8040	1.0000		
M10	0.7930	0.7913	0.8221	0.8000	0.8196	0.7949	1.0000	
M21	0.8199	0.8038	0.8255	0.7891	0.8194	0.7717	0.8016	1.0000
M22	0.7727	0.7743	0.7892	0.7581	0.8100	0.7734	0.7992	0.7885
M23	0.8114	0.7906	0.8327	0.7830	0.8108	0.7992	0.8204	0.8240
M24	0.7978	0.7731	0.8184	0.8008	0.8387	0.7753	0.8056	0.8403
M25	0.8038	0.8295	0.7900	0.7831	0.8107	0.7801	0.7960	0.7931
M26	0.7955	0.7782	0.7969	0.7863	0.8138	0.7625	0.7911	0.8615
M27	0.7917	0.7860	0.7930	0.7742	0.8100	0.7625	0.8073	0.8308
M28	0.8000	0.8023	0.8131	0.7791	0.8298	0.7651	0.8202	0.8276
M31	0.7850	0.7869	0.8168	0.7714	0.8182	0.7721	0.8040	0.8235
M32	0.7910	0.7701	0.7886	0.7857	0.7977	0.7474	0.7864	0.8182
M33	0.7888	0.7985	0.7786	0.7913	0.7992	0.7762	0.8040	0.7970
M34	0.8045	0.7916	0.8023	0.7683	0.8075	0.7853	0.7968	0.8129
M35	0.8212	0.8073	0.8225	0.7962	0.8163	0.7887	0.7972	0.8256
M36	0.8113	0.8196	0.8079	0.8233	0.8151	0.7926	0.8148	0.8547
M37	0.8312	0.8044	0.8326	0.8074	0.8311	0.8092	0.8083	0.8528
M38	0.8053	0.7758	0.8047	0.7748	0.7883	0.7900	0.8016	0.8240
M39	0.8315	0.8125	0.8263	0.7833	0.8094	0.7780	0.8031	0.8436
M310	0.8123	0.8031	0.7710	0.7959	0.8039	0.7696	0.8008	0.8171
C1	0.7698	0.7519	0.7553	0.7510	0.7419	0.7137	0.7313	0.7510
C2	0.7891	0.7537	0.7644	0.7761	0.7698	0.7251	0.7379	0.7860
C3	0.7326	0.7052	0.7525	0.7314	0.7583	0.7021	0.7360	0.7520
C4	0.7735	0.7259	0.7556	0.7358	0.7687	0.7033	0.7598	0.7813
C5	0.7919	0.7561	0.7444	0.7476	0.7612	0.7273	0.7520	0.7626
C6	0.7446	0.7251	0.7449	0.7400	0.7510	0.7352	0.7532	0.7686
C7	0.7623	0.7118	0.7538	0.7390	0.7725	0.7178	0.7500	0.7625
C8	0.7657	0.7227	0.7495	0.7424	0.7645	0.7254	0.7332	0.7544
C9	0.7548	0.7387	0.7422	0.7388	0.7573	0.7017	0.7295	0.7471
C10	0.7518	0.7318	0.7640	0.7519	0.7847	0.7056	0.7379	0.7518
C21	0.7232	0.7234	0.7462	0.7134	0.7519	0.6971	0.7016	0.7113
C22	0.7766	0.7669	0.7888	0.7860	0.7904	0.7339	0.7632	0.8067
C23	0.7529	0.7500	0.7456	0.7530	0.7553	0.7002	0.7251	0.7452
C24	0.7380	0.7191	0.7344	0.7128	0.7287	0.6905	0.7377	0.7417

C25	0.7396	0.7597	0.7437	0.7590	0.7419	0.7329	0.7636	0.7625
C26	0.7068	0.7258	0.7241	0.7573	0.7413	0.7147	0.7427	0.7366
C27	0.7646	0.7264	0.7718	0.7457	0.7593	0.7128	0.7371	0.7316
C28	0.7823	0.7765	0.7571	0.7569	0.7701	0.7434	0.7535	0.7790
C29	0.7448	0.7301	0.7645	0.7606	0.7701	0.7208	0.7449	0.7716
C210	0.7348	0.7354	0.7621	0.7661	0.7562	0.7167	0.7546	0.7500
C31	0.7719	0.7734	0.7806	0.7611	0.7553	0.7182	0.7291	0.7761
C32	0.7585	0.7403	0.7437	0.7309	0.7457	0.6860	0.7111	0.7663
C33	0.7266	0.7269	0.7305	0.7373	0.7403	0.6905	0.7254	0.7146
C34	0.7632	0.7259	0.7831	0.7240	0.7505	0.6901	0.7525	0.7634
C35	0.7399	0.7089	0.7283	0.7392	0.7422	0.7021	0.7025	0.7436
C36	0.7652	0.7393	0.7660	0.7621	0.7524	0.7015	0.7383	0.7615
C37	0.7452	0.7266	0.7340	0.7368	0.7592	0.7101	0.7210	0.7452
C38	0.7249	0.7173	0.7558	0.7394	0.7308	0.6862	0.7073	0.7476
C39	0.7586	0.7717	0.7593	0.7510	0.7573	0.7200	0.7269	0.7665
C310	0.7551	0.7524	0.7594	0.7554	0.7649	0.7273	0.7559	0.7626

M22 M23 M24 M25 M26 M27 M28 M31

M22	1.0000							
M23	0.7984	1.0000						
M24	0.7608	0.8166	1.0000					
M25	0.7747	0.7913	0.8047	1.0000				
M26	0.7659	0.8224	0.8745	0.7708	1.0000			
M27	0.7857	0.8144	0.8392	0.7747	0.8849	1.0000		
M28	0.7866	0.8111	0.8203	0.8228	0.8261	0.8458	1.0000	
M31	0.7867	0.8189	0.8124	0.8226	0.7906	0.7867	0.8187	1.0000
M32	0.7734	0.7898	0.8185	0.8171	0.8086	0.7930	0.8444	0.8362
M33	0.7867	0.7913	0.7853	0.7914	0.7867	0.7867	0.8031	0.7915
M34	0.8031	0.8157	0.7977	0.7883	0.7953	0.8070	0.8427	0.8308
M35	0.8192	0.8217	0.8387	0.8194	0.8146	0.8209	0.8486	0.8584
M36	0.8180	0.8160	0.8281	0.8136	0.8135	0.8330	0.8423	0.8300
M37	0.8161	0.8540	0.8488	0.8390	0.8296	0.8178	0.8270	0.9075
M38	0.7824	0.8160	0.8063	0.7921	0.7904	0.8120	0.8167	0.7913
M39	0.7940	0.8173	0.7963	0.8134	0.8240	0.8127	0.8470	0.8318
M310	0.7831	0.7960	0.8056	0.7960	0.8112	0.8153	0.8320	0.8000
C1	0.7273	0.7634	0.7422	0.7402	0.7352	0.7233	0.7480	0.7368
C2	0.7338	0.7686	0.7744	0.7727	0.7795	0.7529	0.7689	0.7542
C3	0.7033	0.7362	0.7510	0.7328	0.7439	0.7317	0.7328	0.7335
C4	0.7437	0.7519	0.7733	0.7102	0.7784	0.7669	0.7409	0.7224
C5	0.7399	0.7481	0.7581	0.7601	0.7707	0.7437	0.7524	0.7490
C6	0.7027	0.7573	0.7351	0.7205	0.7651	0.7484	0.7536	0.7377
C7	0.7391	0.7540	0.7500	0.7205	0.7510	0.7391	0.7323	0.7329
C8	0.7146	0.7335	0.7653	0.7197	0.7625	0.7465	0.7356	0.7362
C9	0.7189	0.7379	0.7540	0.7400	0.7550	0.7269	0.7320	0.7327
C10	0.7114	0.7513	0.7669	0.7323	0.7481	0.7273	0.7368	0.7200
C21	0.7022	0.7063	0.7368	0.7151	0.7219	0.7022	0.7230	0.7276

C22	0.7586	0.7669	0.7841	0.7672	0.7931	0.7701	0.7748	0.7788
C23	0.7092	0.7295	0.7480	0.7222	0.7490	0.7251	0.7341	0.7269
C24	0.7054	0.6935	0.7327	0.7226	0.7214	0.7094	0.7146	0.7036
C25	0.7352	0.7515	0.7617	0.7559	0.7747	0.7431	0.7559	0.7641
C26	0.7409	0.7196	0.7154	0.7158	0.7374	0.7316	0.7311	0.7292
C27	0.7404	0.7647	0.7361	0.7220	0.7420	0.7415	0.7409	0.7295
C28	0.7529	0.7728	0.7824	0.7808	0.7761	0.7722	0.7846	0.7771
C29	0.7366	0.7490	0.7554	0.7574	0.7564	0.7446	0.7574	0.7500
C210	0.7381	0.7585	0.7569	0.7589	0.7579	0.7540	0.7549	0.7632
C31	0.7450	0.7655	0.7402	0.7579	0.7530	0.7530	0.7698	0.7544
C32	0.7312	0.7396	0.7422	0.7559	0.7470	0.7233	0.7638	0.7251
C33	0.7255	0.7258	0.7287	0.7425	0.7214	0.7134	0.7425	0.7273
C34	0.7559	0.7762	0.7432	0.7412	0.7323	0.7323	0.7529	0.7456
C35	0.7152	0.7154	0.7465	0.7203	0.7313	0.7192	0.7203	0.7410
C36	0.7341	0.7505	0.7490	0.7470	0.7579	0.7222	0.7431	0.7515
C37	0.7331	0.7094	0.7441	0.7183	0.7450	0.7211	0.7381	0.7269
C38	0.7435	0.7480	0.7348	0.7208	0.7197	0.7038	0.7366	0.7529
C39	0.7470	0.7596	0.7500	0.7520	0.7470	0.7510	0.7560	0.7485
C310	0.7322	0.7364	0.7657	0.7409	0.7437	0.7437	0.7486	0.7605

M32 M33 M34 M35 M36 M37 M38 M39

M32	1.0000							
M33	0.8208	1.0000						
M34	0.8177	0.8192	1.0000					
M35	0.8707	0.8341	0.8725	1.0000				
M36	0.8241	0.8371	0.8308	0.8356	1.0000			
M37	0.8311	0.8352	0.8465	0.8514	0.8453	1.0000		
M38	0.8000	0.7795	0.8157	0.8433	0.8633	0.8442	1.0000	
M39	0.8155	0.8170	0.8214	0.8553	0.8917	0.8814	0.8658	1.0000
M310	0.8182	0.8158	0.8047	0.8453	0.8299	0.8326	0.8259	0.8561
C1	0.7432	0.7563	0.7456	0.7518	0.7610	0.7685	0.7475	0.7649
C2	0.8015	0.7730	0.7477	0.7910	0.7947	0.8194	0.7946	0.8094
C3	0.7360	0.7134	0.7226	0.7368	0.7512	0.7447	0.7347	0.7471
C4	0.7476	0.7643	0.7500	0.7551	0.7685	0.7803	0.7485	0.7650
C5	0.7856	0.7719	0.7652	0.7846	0.7661	0.7911	0.7821	0.7905
C6	0.7566	0.7295	0.7388	0.7488	0.7814	0.7842	0.7641	0.7671
C7	0.7510	0.7524	0.7456	0.7442	0.7671	0.7517	0.7490	0.7612
C8	0.7583	0.7480	0.7529	0.7664	0.7615	0.7872	0.7742	0.7646
C9	0.7549	0.7406	0.7258	0.7518	0.7518	0.7877	0.7313	0.7766
C10	0.7413	0.7196	0.7451	0.7484	0.7391	0.7562	0.7641	0.7452
C21	0.7495	0.7198	0.7442	0.7506	0.7368	0.7489	0.7197	0.7523
C22	0.8113	0.7788	0.7684	0.7964	0.8044	0.8070	0.7636	0.8188
C23	0.7412	0.7544	0.7397	0.7423	0.7657	0.7639	0.7485	0.7820
C24	0.7179	0.7194	0.7165	0.7156	0.7581	0.7285	0.7082	0.7448
C25	0.7626	0.7563	0.7612	0.7650	0.7738	0.7856	0.7579	0.7836
C26	0.7461	0.7442	0.7296	0.7362	0.7653	0.7443	0.7059	0.7500

C27		0.7500	0.7290	0.7536	0.7758	0.7425	0.7711	0.7512	0.7767
C28		0.7909	0.7467	0.7818	0.7793	0.7788	0.8124	0.7650	0.7920
C29		0.7797	0.7539	0.7393	0.7806	0.7619	0.7828	0.7385	0.8000
C210		0.7656	0.7476	0.7446	0.7907	0.7717	0.8109	0.7570	0.7903
C31		0.7686	0.7662	0.7476	0.7639	0.7864	0.7846	0.7295	0.7895
C32		0.7704	0.7173	0.7496	0.7635	0.7724	0.7752	0.7485	0.7575
C33		0.7377	0.7194	0.7244	0.7518	0.7425	0.7778	0.7298	0.7448
C34		0.7597	0.7417	0.7427	0.7551	0.7685	0.7848	0.7698	0.7695
C35		0.7396	0.7331	0.7222	0.7303	0.7588	0.7897	0.7347	0.7505
C36		0.7578	0.7710	0.7329	0.7388	0.7852	0.8065	0.7615	0.7865
C37		0.7451	0.7466	0.7202	0.7583	0.7814	0.7889	0.7379	0.7707
C38		0.7436	0.7412	0.7266	0.7388	0.7483	0.7696	0.7455	0.7580
C39		0.7470	0.7604	0.7535	0.7506	0.7735	0.7763	0.7394	0.7689
C310		0.7514	0.7376	0.7689	0.7689	0.7506	0.7892	0.7495	0.7832

M310 C1 C2 C3 C4 C5 C6 C7

M310		1.0000							
C1		0.7400	1.0000						
C2		0.7808	0.8383	1.0000					
C3		0.7284	0.7470	0.7915	1.0000				
C4		0.7524	0.7786	0.8088	0.8078	1.0000			
C5		0.7875	0.8076	0.8881	0.8102	0.8268	1.0000		
C6		0.7821	0.7556	0.7968	0.7780	0.7816	0.8120	1.0000	
C7		0.7440	0.7867	0.7797	0.7615	0.8566	0.7939	0.7901	1.0000
C8		0.7556	0.7905	0.8517	0.8138	0.8108	0.8632	0.8025	0.7937
C9		0.7276	0.7952	0.7878	0.7536	0.7922	0.8101	0.7657	0.8103
C10		0.7379	0.7817	0.8221	0.7646	0.7971	0.8184	0.8032	0.7971
C21		0.7186	0.7773	0.7857	0.7751	0.7748	0.7848	0.7515	0.7617
C22		0.7946	0.7932	0.8263	0.7836	0.8200	0.8222	0.8088	0.7947
C23		0.7379	0.7850	0.8083	0.7505	0.7823	0.7962	0.8091	0.8024
C24		0.7343	0.7738	0.7519	0.7673	0.7674	0.7853	0.7599	0.7619
C25		0.7680	0.8063	0.8060	0.7887	0.7763	0.7901	0.7901	0.7804
C26		0.7374	0.7672	0.7650	0.7916	0.7643	0.7859	0.8113	0.7888
C27		0.7715	0.8088	0.8233	0.7824	0.7898	0.8150	0.7896	0.8180
C28		0.7734	0.7977	0.8015	0.7686	0.7836	0.8156	0.7976	0.7992
C29		0.7575	0.7725	0.8151	0.7702	0.7969	0.7878	0.7835	0.7780
C210		0.7791	0.7976	0.7977	0.7596	0.7793	0.7739	0.7810	0.7835
C31		0.7702	0.7890	0.8083	0.7748	0.7746	0.8115	0.7884	0.7787
C32		0.7480	0.7656	0.8158	0.7510	0.7481	0.7886	0.7803	0.7554
C33		0.7181	0.7738	0.7824	0.7510	0.7713	0.8008	0.7724	0.7714
C34		0.7570	0.7938	0.8052	0.7800	0.7757	0.7970	0.7894	0.7719
C35		0.7444	0.7840	0.8038	0.7449	0.7813	0.7836	0.7705	0.7896
C36		0.7751	0.8275	0.8264	0.7581	0.7701	0.8184	0.7753	0.7819
C37		0.7540	0.7692	0.7970	0.7586	0.7784	0.8000	0.7676	0.7747
C38		0.7243	0.7662	0.7902	0.7434	0.7562	0.8046	0.7355	0.7677
C39		0.7602	0.7937	0.7977	0.7878	0.7907	0.8085	0.7975	0.7833

C310 | 0.7446 0.7786 0.8199 0.7804 0.8172 0.7896 0.7615 0.7839

C8 C9 C10 C21 C22 C23 C24 C25

C8 | 1.0000
C9 | 0.8024 1.0000
C10 | 0.8000 0.7960 1.0000
C21 | 0.8047 0.7738 0.7610 1.0000
C22 | 0.7985 0.7992 0.8010 0.8121 1.0000
C23 | 0.7824 0.7711 0.8173 0.8087 0.8314 1.0000
C24 | 0.7575 0.7823 0.7861 0.7738 0.8170 0.8056 1.0000
C25 | 0.7881 0.7769 0.7809 0.7750 0.8441 0.8300 0.8350 1.0000
C26 | 0.7918 0.7979 0.7824 0.7868 0.8232 0.7884 0.8031 0.8084
C27 | 0.8305 0.8221 0.8029 0.8113 0.8169 0.7941 0.7788 0.7932
C28 | 0.7954 0.8000 0.7852 0.7786 0.8015 0.8092 0.7829 0.8222
C29 | 0.7738 0.7824 0.7980 0.7961 0.9257 0.8198 0.8048 0.8251
C210 | 0.7714 0.7760 0.8000 0.7859 0.8321 0.7897 0.7944 0.8425
C31 | 0.7944 0.7831 0.7828 0.8008 0.8238 0.7968 0.7776 0.8024
C32 | 0.7708 0.7793 0.7960 0.7617 0.7780 0.7811 0.7619 0.7789
C33 | 0.7791 0.7879 0.7786 0.7619 0.8054 0.7936 0.7782 0.8032
C34 | 0.7953 0.7683 0.7960 0.7860 0.7977 0.7937 0.7905 0.7992
C35 | 0.7935 0.7821 0.7614 0.7920 0.8155 0.7960 0.7846 0.8096
C36 | 0.7897 0.7784 0.7607 0.7843 0.8076 0.8000 0.7610 0.7898
C37 | 0.7705 0.7671 0.7612 0.7850 0.8161 0.7928 0.7816 0.7826
C38 | 0.7674 0.7760 0.7650 0.7544 0.8053 0.7897 0.7625 0.7795
C39 | 0.8032 0.7758 0.7959 0.7976 0.8131 0.8016 0.7621 0.8111
C310 | 0.7915 0.7728 0.8076 0.8015 0.8052 0.8015 0.7636 0.7992

C26 C27 C28 C29 C210 C31 C32 C33

C26 | 1.0000
C27 | 0.8150 1.0000
C28 | 0.7969 0.8115 1.0000
C29 | 0.8208 0.8048 0.8123 1.0000
C210 | 0.8177 0.8068 0.8177 0.8402 1.0000
C31 | 0.7895 0.8195 0.8054 0.8000 0.8095 1.0000
C32 | 0.7617 0.7933 0.8244 0.8039 0.7898 0.8205 1.0000
C33 | 0.7905 0.8010 0.7907 0.8008 0.8024 0.8056 0.7817 1.0000
C34 | 0.7668 0.8269 0.8213 0.8008 0.8023 0.8330 0.8210 0.8261
C35 | 0.7989 0.8186 0.7891 0.8112 0.7847 0.8000 0.7840 0.8089
C36 | 0.7769 0.7981 0.7931 0.7913 0.7613 0.8198 0.7882 0.8127
C37 | 0.7979 0.8221 0.7900 0.7921 0.7778 0.8008 0.7811 0.8056
C38 | 0.7552 0.8019 0.7831 0.7968 0.7628 0.8056 0.7701 0.8024
C39 | 0.8032 0.8079 0.8101 0.7809 0.7944 0.8299 0.8016 0.7944
C310 | 0.7802 0.8230 0.8172 0.8123 0.8061 0.8015 0.8244 0.7752

C34 C35 C36 C37 C38 C39 C310

C34		1.0000								
C35		0.8167	1.0000							
C36		0.8242	0.8675	1.0000						
C37		0.7859	0.8525	0.8356	1.0000					
C38		0.8258	0.8008	0.8126	0.7897	1.0000				
C39		0.8182	0.8089	0.8127	0.8016	0.8104	1.0000			
C310		0.7833	0.7891	0.7663	0.7938	0.7831	0.8217	1.0000		

Apéndice 2. Índices de Distancia genética de Nei 1972.

1= Bacadéhuachi, 2= Moctezuma, 3= Nácóricó chico.

1,2 y 3 después del guión son los diferentes puntos de muestreo.

24/11/2003 11:54:35 p.m.

Analysis of
 C:\DOCUME~1\ALEJAN~1\000\MYDOCU~1\ALEJAN~1\TFPGA\DATOSA~1\DI
 STGEN.DAT

Data set contains genotypes of individuals sampled from
 subpopulations within populations.

Organism Type: Diploid

Marker Type: Dominant

H-W Equilibrium Assumed.

Allele frequencies estimated based on Lynch and

Milligan's (1994) Taylor expansion estimate.

GENETIC DISTANCES

Nei's original (1972) distance

Population 1 2 3

1	*****		
2	0.0725	*****	
3	0.1452	0.1697	*****

Nei's original (1972) distance

Subpop	1-1	1-2	1-3	2-1	2-2	2-3	3-1	3-2	3-3
1-1	*****								
1-2	0.0783	*****							
1-3	0.0781	0.0503	*****						
2-1	0.1259	0.1190	0.1102	*****					
2-2	0.1481	0.1133	0.1068	0.0672	*****				
2-3	0.1270	0.1074	0.1139	0.0764	0.0608	*****			
3-1	0.2205	0.1886	0.1905	0.2005	0.2147	0.2026	*****		
3-2	0.2058	0.1687	0.1822	0.2168	0.2404	0.2163	0.1062	*****	
3-3	0.2043	0.1925	0.1860	0.2229	0.2309	0.2157	0.0938	0.0709	*****

Apéndice 3. Matrices generadas para realizar las pruebas de mantel.

a) Distancia genética contra distancia geográfica.

1,2 0.0663 70

1,3 0.1385 90

2,3 0.1629 30

b) Distancia genética contra altura

1,2 0.0642 48

1,3 0.0644 55

1,4 0.1118 117

1,5 0.1329 117

1,6 0.1134 144

1,7 0.2050 97

1,8 0.1907 2

1,9 0.1894 4

2,3 0.0363 7

2,4 0.1047 165

2,5 0.0979 165

2,6 0.0936 192

2,7 0.1729 49

2,8 0.1535 50

2,7 0.1773 44

3,4 0.0962 172

3,5 0.0916 172

3,6 0.1004 199

3,7 0.1751 42

3,8 0.1672 57

3,9 0.1711 51

4,5 0.0516 0

4,6 0.0625 27
4,7 0.1848 214
4,8 0.2014 115
4,9 0.2077 121
5,6 0.0458 27
5,7 0.1978 214
5,8 0.2239 115
5,9 0.2146 121
6,7 0.1874 241
6,8 0.2014 142
6,9 0.2010 148
7,8 0.085 99
7,9 0.0772 93
8,9 0.0517 6