



ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE AGAVES MEZCALEROS DEL CENTRO DE MÉXICO

ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY OF MEZCALERO AGAVES FROM CENTRAL MÉXICO

José P. Lara-Ávila¹ y Ángel G. Alpuche-Solís^{2*}

¹Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Km. 14.5 Carr. San Luis Potosí-Matehuala. Apartado Postal 32, Ejido Palma de la Cruz. 78321, Soledad de Graciano Sánchez. S. L. P. México. ²División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C. Camino a la Presa San José 2055, Apartado Postal 78216, Lomas 4ta. Sección, San Luis Potosí, S.L.P. México. Tel. +52 (444) 8 34 20 00.

*Autor de correspondencia (alpuche@ipicyt.edu.mx)

RESUMEN

En el Altiplano Potosino, un ecosistema árido y semiárido, *Agave salmiana* Otto Salm Dick ssp. *crassispina* (Trel Gentry) es una especie utilizada para la recolección de insectos comestibles y para producción de mezcal, bebida alcohólica tradicional con denominación de origen. El aprovechamiento para producción de mezcal de las poblaciones silvestres de *Agave salmiana* ssp. *crassispina* carece de un sistema de explotación basado en el conocimiento biológico de la especie. Esto tiene efectos demográficos, y a su vez podría causar el deterioro de sus recursos fitogenéticos y colocar a la especie en situación de riesgo. Este trabajo analizó diversidad genética y estructura poblacional de tres poblaciones silvestres de *Agave salmiana* ssp. *crassispina* en San Luis Potosí, México, mediante polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados, AFLP. La evidencia mostró un alto nivel de diversidad genética dentro de las poblaciones analizadas y un bajo nivel de diferenciación entre ellas, probablemente debido a una fragmentación del hábitat producida por actividades antropogénicas. Postulamos que la diversidad genética en las poblaciones analizadas, a pesar de la constante explotación, se origina por el sinergismo entre la polinización cruzada y la actividad de elementos genéticos transponibles. El alto grado de diversidad genética encontrado en las poblaciones silvestres analizadas en San Luis Potosí demuestra la importancia agroecológica de *Agave salmiana* ssp. *crassispina* en el Altiplano Mexicano, una región geográfica que abarca casi la mitad del territorio mexicano. Sin embargo, uso descontrolado y manejo inapropiado de las magueyerías silvestres podría arriesgar los recursos fitogenéticos de *Agave salmiana* ssp. *crassispina*.

Palabras clave: *Agave salmiana* ssp. *crassispina*, diversidad genética, ecosistemas áridos, marcadores moleculares.

SUMMARY

The Potosino Upland Plateau is an arid and semiarid ecosystem. *Agave salmiana* Otto Salm Dick ssp. *crassispina* (Trel Gentry), which grows in this environment, is a species used for gathering of edible insects and for production of mezcal. Mezcal is a Mexican alcoholic beverage with denomination of origin. Production of mezcal with wild populations of *Agave salmiana* ssp. *crassispina* lacks an exploitation system based on biological knowledge of the species. The lack of organized use has demographic effects, which leads to degradation of genetic resources and risks to this species. This study analyzed genetic diversity and population structure of three wild populations of *Agave salmiana* ssp. *crassispina* from San Luis Potosí, Mexico by AFLP's (amplified fragment length polymorphism). The evidence showed a high level of genetic diversity within populations and low level of genetic differentiation among populations, probably as a result of habitat fragmentation produced by anthropogenic activities. We postulate that the genetic diversity in the wild populations analyzed, despite their constant exploitation, is originated by the

synergism between cross-pollination and the activity of transposable genetic elements. The high level of genetic diversity found in the wild populations in San Luis Potosí shows agro-ecological relevance of *Agave salmiana* ssp. *crassispina* in the Mexican upland plateau. However, uncontrolled use and inappropriate management of wild populations could risk the genetic resources of *Agave salmiana* ssp. *crassispina*.

Index words: *Agave salmiana* ssp. *crassispina*, genetic diversity, arid environment, molecular markers.

INTRODUCCIÓN

El género *Agave* es un habitante típico de los ecosistemas áridos y semiáridos de México, y posee un alto grado de endemismo. Aproximadamente 75 % de las especies de *Agave* son endémicas, y algunas de ellas tienen relevancia antropogénica desde la época prehispánica (Aguirre-Rivera *et al.*, 2001; Gentry, 1982; Parker *et al.*, 2010; Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2013). La riqueza actual de especies en *Agave* se puede explicar en función del desarrollo de adaptaciones fisiológicas, morfológicas y ecológicas ocurridas hace 8 a 10 millones de años y que favorecieron que las nuevas especies de *Agave* colonizaran las recién formadas zonas áridas que corresponden al actual Altiplano Central Mexicano (Good-Avila *et al.*, 2006; Gross *et al.*, 2013; Shakeel *et al.*, 2013).

Por otro lado, la relación *Agave*-Ser Humano permitió la aparición de otras especies y variantes con significancia socio-cultural (Aguirre-Rivera *et al.*, 2001; Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1996; Parker *et al.*, 2010). *Agave salmiana* Otto Salm Dick ssp. *crassispina* (Trel Gentry) es una de las especies adaptadas a hábitats áridos y semiáridos del Altiplano Mexicano. Las poblaciones silvestres de *A. salmiana* ssp. *crassispina* han sido utilizadas tradicionalmente para la elaboración de mezcal en Durango, San Luis Potosí y Zacatecas (Aguirre-Rivera *et al.*, 2001; CONABIO, 2006; Martínez-Salvador *et al.*, 2005; Martínez-Salvador *et al.*, 2007), y para la recolección de insectos comestibles como el gusano blanco (*Acentrocne hesperiaris*), gusano rojo

(*Comadia redtenbacheri*) y escamoles (larvas de *Liometopum apiculatum*) (Esparza-Frausto *et al.*, 2008).

En este contexto, la producción de mezcal requiere cosechar individuos en propagación vegetativa (Aguirre-Rivera *et al.*, 2001; Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2013), lo cual limita la probabilidad de que se lleve a cabo la reproducción sexual, reduce la tasa de reproducción vegetativa (producción de hijuelos), y reduce el tamaño de poblaciones, lo cual se traduce en impactos negativos a nivel demográfico, ambiental y probablemente genético (Aguirre-Dugua y Eguiarte, 2013; Martínez-Salvador *et al.*, 2005; Martínez-Salvador *et al.*, 2007; Sánchez-Teyer *et al.*, 2009). Actualmente algunas especies de *Agave* están consideradas en riesgo (Eguiarte *et al.*, 2013).

La pérdida de la biodiversidad ocurre a través de la pérdida de especies y alelos. La disminución de la diversidad genética en las especies reduce los procesos de adaptación a cambios ambientales y afecta su supervivencia a largo plazo, lo cual incrementa el riesgo de extinción (Bourguiba *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2009). Por ello los estudios de diversidad genética son fundamentales para el desarrollo de estrategias de aprovechamiento sustentable de las especies con interés económico (Huang *et al.*, 2009; Zizumbo-Villarreal *et al.*, 2013).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la diversidad genética de *A. salmiana* ssp. *crassispina*, en tres poblaciones silvestres bajo explotación para la producción de mezcal en el Altiplano Potosino, mediante el análisis de la huella genética generada por marcadores moleculares AFLP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se colectaron muestras de hoja de 19, 23 y 24 individuos de *A. salmiana* ssp. *crassispina* en tres poblaciones silvestres: Aquiles Serdán (AqS) (23° 16' 52.74" N, 100° 55' 12.08" O), El Cuervo (EC) (23° 14' 59.81" N, 100° 55' 39.94" O), ambas localizadas en el municipio de Charcas, San Luis Potosí; e Ipiña (Ipi) (22° 26' N, 101° 19' 30" O) en el municipio de Aqualulco, San Luis Potosí. Las tres poblaciones muestreadas son explotadas para la producción de mezcal. La distancia entre los sitios Aquiles Serdán y El Cuervo es 1.5 km, y ambos sitios están ubicados a 101 km aproximadamente de Ipiña.

Extracción de ADN

El ADN genómico se extrajo con el siguiente protocolo. Se utilizaron 0.5 g de muestra de hoja y se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido. La muestra se trituró en

mortero hasta obtener un polvo fino, al cual se agregaron 500 µL de buffer de extracción (D-sorbitol 0.14 M; Tris HCl 0.22 M; EDTA 0.022 M; NaCl 0.8 M; CTAB 0.8 %; n-lauril sarcosina 1 %; pH 8) en un tubo de 1.5 mL con agitación en vórtex. El tubo se incubó a 65 °C por 30 min con agitación constante. Posteriormente, el tubo se centrifugó durante 10 min a 8510 Xg (MiniSpin®, Eppendorf, USA). El sobrenadante se separó y transfirió a un tubo nuevo.

A este tubo se adicionó un volumen igual de fenol/cloroformo/isoamílico (25/24/1), se mezcló en vórtex, y se centrifugó durante 10 min a 8510 Xg (MiniSpin, Eppendorf, USA). La fase acuosa se separó con pipeta y transfirió a un tubo nuevo de 1.5 mL. La extracción con fenol/cloroformo/isoamílico (25/24/1) se repitió con el sobrenadante. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo con 1 µL de RNAasa (1 µg mL⁻¹) e incubada a 37 °C por 45 min. El ADN se precipitó con un volumen igual de isopropanol frío, y el tubo se incubó en hielo por 5 min. Posteriormente, el tubo se centrifugó durante 5 min a 8510 Xg, y el sobrenadante se eliminó por decantación. La pastilla de ADN se lavó gentilmente con etanol 70 %, seguido de un paso de centrifugación por 5 min a 8510 Xg. El etanol se eliminó con pipeta. La pastilla de ADN se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 µL de agua Milli Q estéril.

Marcadores moleculares AFLP

El protocolo de marcadores moleculares AFLP se basó en Vos *et al.* (1995). Aproximadamente 250 ng de ADN se digirieron simultáneamente con las enzimas de restricción *EcoRI* y *MseI*, seguido de una ligación de adaptadores específicos con T4 ADN ligasa (Invitrogen). Los fragmentos ligados fueron utilizados como templates para una pre-amplificación con los oligonucleótidos preseleccionados *EcoRI* + A (5'-AGA CTG CGT ACC AAT TCA-3') y *MseI* + C (5'-GAC GAT TCC TGA GTA AC-3'). Para la amplificación selectiva se utilizó la combinación de oligonucleótidos *MseI* + CTG (5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA ACT G-3') y *EcoRI* + ACA (5'-AGA CTG CGT ACC AAT TCA CA-3'). El oligonucleótido *EcoRI* + ACA se etiquetó con fluorescencia (IRDye 800). Los marcadores moleculares AFLP se separaron en un gel de poliácridamida en condiciones desnaturizantes (PAGE 6 %) en un secuenciador automático LiCor 4200L (LI-COR® Biosciences; Lincoln, NE, USA).

Análisis de datos

Los marcadores moleculares AFLP se analizaron asumiendo que: i) las bandas de ADN correspondieron a un locus genético y que los alelos marcadores de diferentes loci no co-emigran a la misma posición en el gel de electroforesis; ii) que cada locus puede ser tratado como un sistema de dos alelos, y se trata de un alelo amplificable

por PCR; y iii) que las poblaciones están en el equilibrio de Hardy-Weinberg (Lynch y Milligan, 1994). La diversidad genética se midió mediante el cálculo de medidas basadas en distancia y en frecuencias alélicas, dentro de cada población y entre ellas, a partir de la matriz binaria de presencia / ausencia de bandas-alelos (1 / 0) (Bonin *et al.*, 2007). La matriz binaria se obtuvo a partir del patrón de bandeo del gel de AFLP mediante el "software" Cross Checker V2.9 (Buntjer y Otsen, 1999).

Los marcadores moleculares dominantes pueden tener una sobreestimación de aproximadamente 5 % en los parámetros de diversidad, principalmente en aquellos donde el número de muestras es relativamente pequeño (Lynch y Milligan, 1994), por lo cual se eliminaron aquellos loci con frecuencia de banda mayor que $1 - (3 / N)$, donde N = número de individuos muestreados. La frecuencia de cada banda-alelo se calculó con el "software" GenALEX versión 6.5 (Peakell y Smouse, 2012) para cada población. El cálculo de los parámetros de diversidad se realizó con el conjunto de los datos completos y los corregidos. Los datos obtenidos con la corrección de Lynch y Milligan (1994) se reportan en el presente trabajo.

La diversidad genética a nivel de poblaciones individuales se midió mediante el cálculo del número de alelos (n_a), el número efectivo de alelos (n_e) (Kimura y Crow, 1964), la diversidad genética no sesgada de Nei (Nei, 1978; Nei, 1987) (uHe) y el índice de Shannon (I) (Lewontin, 1972) mediante el "software" Popgene 1.32 (Yeh *et al.*, 1999) y GenALEX versión 6.5 (Peakell y Smouse, 2012). A nivel de grupo de poblaciones, el parámetro diversidad genética total en todas las poblaciones (Ht), media de diversidad genética dentro de las poblaciones (Hs), diferenciación de poblaciones (Gst) y el estimado de flujo génico (Nm), se calcularon con el "software" Popgene 1.32 al considerar un grupo con tres poblaciones (Aguiles Serdán, El Cuervo, Ipiña) y un grupo con dos poblaciones (Aguiles Serdán, El Cuervo).

Un dendrograma basado en el coeficiente de Jaccard con

el método UPGMA con 1000 permutaciones de "bootstrap" (técnica de remuestreo no paramétrico), se calculó con el "software" FreeTree (Bonin *et al.*, 2007; Hampl *et al.*, 2001). La partición de la variación en dos niveles, entre poblaciones y dentro de poblaciones, mediante el análisis molecular de varianza (AMOVA), se calculó con base en una matriz de distancia euclidiana con el "software" Arlequin v3.5 (Excoffier *et al.*, 2010). La significancia de los componentes de varianza se probó con 1000 permutaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La combinación de oligonucleótidos *EcoRI*+*ACA* y *MseI*+*CTG*, generó un patrón de 91 loci en 66 individuos muestreados de *A. salmiana* ssp. *crassispina*. Al aplicar la corrección de Lynch y Milligan (1994), el porcentaje de loci polimórficos dentro de cada población fue 96.7 %, 98.9 % y 78.02 % (Cuadro 1).

Diversidad, diferenciación y estructura genética en poblaciones silvestres de *A. salmiana* ssp. *crassispina* en el Altiplano Potosino

Los resultados de diversidad genética no sesgada (uHe) mostraron valores similares entre las poblaciones AqS y EC (0.448 ± 0.012 ; 0.42 ± 0.011), mientras que la población Ipi mostró niveles más bajos (0.34 ± 0.02). Al formar un grupo con las poblaciones AqS + EC, en función de su cercanía geográfica y considerarla como una única población, y otro grupo considerando las tres poblaciones AqS + EC + Ipi, los valores de uHe mostraron diferencias (0.434 ± 0.008 ; 0.403 ± 0.0092) entre los grupos formados.

Sin embargo, el índice de información de Shannon (I) mostró valores similares a nivel de poblaciones individuales y a nivel de grupos. La diferencia entre estos parámetros radica en que uHe es una métrica basada en el cálculo de frecuencias alélicas aplicable a una muestra de tamaño reducido, mientras que I es una métrica basada en la comparación apareada del perfil de bandeo entre individuos (Bonin *et al.*, 2007). La información que brinda I es por lo

Cuadro 1. Parámetros de diversidad genética al interior de las poblaciones de *A. salmiana* ssp. *crassispina*.

Población	Tamaño	n_a	n_e	uHe	I	% LP
AqS	19	2	1.8469 ± 0.1973	0.448 ± 0.012	0.6401 ± 0.0885	96.7
EC	23	2	1.7451 ± 0.2289	0.420 ± 0.011	0.6023 ± 0.1017	98.9
Ipi	24	2	1.7725 ± 0.2049	0.340 ± 0.020	0.6158 ± 0.0848	78.0
AqS+EC	41	2	1.8708 ± 0.1367	0.434 ± 0.008	0.6543 ± 0.0451	100
AqS+EC+Ipi	60	2	1.8740 ± 0.1368	0.403 ± 0.009	0.6552 ± 0.0454	100

n_a = número observado de alelos; n_e = número efectivo de alelos (Kimura y Crow, 1964); uHe = diversidad genética no sesgada de Nei (Nei, 1978; Nei, 1983); I = índice de información de Shannon (Lewontin, 1972); % LP = porcentaje de loci polimórficos.

tanto de carácter fenotípico al considerar que los patrones de bandeo obtenidos por AFLP corresponden a un fenotipo molecular, mientras que *uHe* brinda información acerca del genotipo de la especie. Entonces, los resultados sugieren que las tres poblaciones de *A. salmiana* ssp. *crassispina* ubicadas en el Altiplano Potosino poseen diferencias en los niveles de diversidad genética, incluso entre las dos poblaciones cercanas geográficamente (Cuadro 1).

A nivel de grupo de poblaciones, los valores de *Ht* mostraron diferencias significativas al formar los grupos AqS + EC + IP y AqS + EC (0.2598 ± 0.1129 ; 0.3827 ± 0.1455). Los valores de *Hs* fueron diferentes entre los dos grupos (0.3934 ± 0.0043 ; 0.4235 ± 0.0044). Por otro lado, los valores de diferenciación de poblaciones (*Gst*) fueron negativos al conjuntar las tres poblaciones (-0.5142) y al conjuntar dos poblaciones (-0.1067), y éstas deben considerarse como cero (Cuadro 2). Al respecto, el valor del estimado de flujo génico (*Nm*), calculado a partir de *Gst*, tiende al infinito, lo cual sugiere una tasa de migración entre las poblaciones analizadas. Los resultados sugieren que entre las tres poblaciones de *A. salmiana* ssp. *crassispina* ubicadas en el Altiplano Potosino no hay diferenciación génica, aun cuando están separadas geográficamente.

Estructura genética de las poblaciones silvestres analizadas de *A. salmiana* ssp. *crassispina* en el Altiplano Potosino

Para visualizar las relaciones genéticas entre las poblaciones se calculó un dendrograma con el coeficiente de Jaccard mediante el método UPGMA y con 1000 permutaciones de "bootstrap" para estimar su robustez estadística (Bonin *et al.*, 2007). El dendrograma mostró la tendencia de agrupar a los individuos de acuerdo con su origen geográfico: la población de Ipiña tuvo dos subgrupos, mientras que las poblaciones Aquiles Serdán y El Cuervo tuvieron cuatro subgrupos con diferente número de individuos en cada uno. Los subgrupos se distribuyeron en todo el dendrograma.

Algunos nodos del dendrograma muestran valores significativamente altos de "bootstrap", mientras que otros no

mostraron valores bajos. Esto puede explicarse por el alto grado de polimorfismo de los marcadores que apoyan la aparición de esos nodos con bajo valor de "bootstrap" en las tres poblaciones de *A. salmiana* ssp. *crassispina*; sin embargo, la topología general del árbol es más informativa que una rama en particular (Figura 1) (Mohammadi y Prassana, 2003).

Para cuantificar la diversidad genética revelada a nivel entre poblaciones y entre individuos al interior de las poblaciones de *A. salmiana* ssp. *crassispina*, se calculó el análisis molecular de varianza (AMOVA). Este análisis reveló que 88.73 % de la variación genética total se ubica entre individuos al interior de las poblaciones, mientras que 11.27 % se ubica entre poblaciones. El parámetro de diferenciación de poblaciones (F_{ST}) estimado de AMOVA tuvo un valor 0.11266 (Cuadro 3). Los resultados confirman que existe un bajo nivel de diferenciación genética poblacional entre las tres poblaciones de *A. salmiana* ssp. *crassispina*.

En resumen, el análisis de marcadores moleculares AFLP en tres poblaciones silvestres de *A. salmiana* ssp. *crassispina*, sugiere la existencia de un alto grado de variabilidad genética entre individuos dentro de las poblaciones, y un bajo nivel de diferenciación genética entre las tres poblaciones analizadas. Al respecto, las poblaciones Aquiles Serdán y El Cuervo mostraron niveles similares de diversidad genética (*uHe*), probablemente debido a su cercanía geográfica.

Consideraciones agroecológicas de la diversidad genética en las tres poblaciones silvestres de *A. salmiana* ssp. *crassispina*

Las tres poblaciones analizadas de *A. salmiana* ssp. *crassispina* son explotadas para la elaboración de mezcal en el Altiplano Potosino. Dicha práctica requiere la extracción de individuos en estado de propagación vegetativa (Aguirre-Rivera *et al.*, 2001; Martínez-Salvador *et al.*, 2005). La existencia de altos niveles de diversidad genética en varias especies de Agave con propagación vegetativa ha sido reportada previamente (Aguirre-Dugua y Eguiarte, 2013; Díaz-Martínez *et al.*, 2012; Eguiarte *et al.*, 2013; Infante *et al.*, 2006).

Cuadro 2. Parámetros de diversidad y diferenciación genética entre poblaciones de las poblaciones silvestres de *A. salmiana* subsp. *crassispina*.

	Tamaño	<i>Ht</i>	<i>Hs</i>	<i>Gst</i>	<i>Nm</i>
AqS+EC+Ipi	60	0.2598 ± 0.1129	0.3934 ± 0.0043	-0.5142	∞
AqS+EC	42	0.3827 ± 0.1455	0.4235 ± 0.0044	-0.1067	∞

Ht = diversidad genética total de todas las poblaciones; *Hs* = media de la diversidad genética al interior de las poblaciones; *Gst* = diferenciación genética de poblaciones, a partir de $Gst = (Ht - Hs) / Ht$; *Nm* = estimado del flujo génico, a partir de $Nm = 0.5(1 - Gst) / Gst$ (Balloux y Lugon-Moulin, 2002; McDermott y McDonald, 1993).

Cuadro 3. Análisis molecular de varianza (AMOVA) en poblaciones silvestres de *A. salmiana* subsp. *crassispina*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	2	104.26	1.75108	11.27
Dentro de poblaciones	63	868.891	13.79193	88.73
Total	65	973.152	15.54301	100
F_{ST} 0.11266				

En este contexto, se ha documentado que la propagación vegetativa en *A. tequilana* y *A. duranguensis* está asociada a variabilidad epigenética heredable, que incluye la actividad de retrotransposones pertenecientes a las familias Ty1-copia; Gypsy y CACTA, así como a diferencias en los patrones de metilación entre plantas madre y sus respectivos hijuelos (Díaz-Martínez *et al.*, 2012; Gross *et al.*, 2013; Khaliq *et al.*, 2012). Asimismo, se ha descrito la relevancia de la variabilidad epigenética en los procesos evolutivos de las especies vegetales, al presentar un comportamiento diferencial en tejidos o en presencia de estímulos abióticos y bióticos (Díaz-Martínez *et al.*, 2012; Richards, 2006; Schnable *et al.*, 2009). Por ello, la variabilidad epigenética contribuye significativamente en la generación de variabilidad natural de las especies vegetales (Fujimoto *et al.*, 2012; Khaliq *et al.*, 2012; Torres-Morán *et al.*, 2012; Zhang y Hsieh, 2013).

Este trabajo muestra que el alto grado de diversidad genética encontrada en las tres poblaciones silvestres analizadas de *A. salmiana* ssp. *crassispina*, podría ser el resultado del sinergismo entre un componente de variabilidad genética heredable (polinización cruzada) y un componente epigenético heredable, el cual incluiría la actividad de elementos genéticos transponibles y diferencias en patrones de metilación entre plantas madre y sus hijuelos.

Con base en la información de diversidad genética disponible, se han identificado especies como *A. angustifolia* y *A. victoriae-reginae* que necesitan esfuerzos prioritarios para su conservación. Estas especies poseen altos grados de diversidad genética al interior de cada especie y de diferenciación entre poblaciones, por lo cual, para salvaguardar el mayor número de alelos de cada especie se requieren altos números de individuos y poblaciones (Eguiarte *et al.*, 2013). Según los resultados de diversidad genética de las tres poblaciones analizadas en este estudio, los esfuerzos de conservación de *A. salmiana* ssp. *crassispina* deberían estar dirigidos a resguardar tantos individuos como sea posible sin considerar muchas poblaciones (Eguiarte *et al.*, 2013).

Tomando en cuenta los valores de flujo génico entre las tres poblaciones analizadas de *A. salmiana* ssp. *cras-*

sspina, los datos sugieren que las tres poblaciones se comportan como una sola población. En este escenario, los resultados de flujo génico deberían ser interpretados como evidencia de migraciones históricas entre las tres poblaciones actuales, las cuales derivarían de una sola población, que pudo haber sido fragmentada por actividades antropogénicas relativamente recientes (Habel *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Luan *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2012).

A pesar de la pérdida de hábitats y del efecto demográfico negativo como consecuencia de la extracción de individuos en propagación vegetativa (Martínez-Salvador *et al.*, 2005; 2007), el alto nivel de variabilidad genética en las tres poblaciones analizadas de *A. salmiana* ssp. *crassispina*, una especie ampliamente distribuida en el Altiplano Mexicano, asegura la compatibilidad entre la conservación de la especie y su aprovechamiento sustentable. Asimismo, el hecho resalta la necesidad de desarrollar enfoques para la protección de los recursos fitogenéticos endémicos con alto valor social y agroecológico (Eguiarte *et al.*, 2013; Martínez-Salvador *et al.*, 2007; Mora-Lopez *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES

A. salmiana ssp. *crassispina* es una especie ampliamente distribuida en el Altiplano Mexicano, que ha sufrido pérdida de hábitat y el efecto demográfico negativo como consecuencia de la extracción de individuos en propagación vegetativa. Este estudio demuestra el alto nivel de variabilidad genética en las tres poblaciones analizadas de *A. salmiana* ssp. *crassispina*. La variabilidad identificada asegura la compatibilidad entre la conservación de la especie y su aprovechamiento sustentable. Estos resultados sustentan la necesidad de desarrollar enfoques para la protección de los recursos fitogenéticos endémicos con alto valor social y agroecológico.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas perteneciente al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C. en colaboración con la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

(CONACYT apoyo No. 202399), a Verónica Zárate-Chávez y Rosalba Castillo-Collazo por su apoyo técnico y a los revisores por las valiosas críticas para la mejora de este manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-Dugua X. and L. E. Eguiarte (2013) Genetic diversity, conservation and sustainable use of wild *Agave cupreata* and *Agave potatorum* extracted for mezcal production in Mexico. *Journal of Arid Environments* 90:36-44.
- Aguirre-Rivera J. R., H. Charcas-Salazar y J. L. Flores-Flores (2001) El Maguey Mezcalero Potosino. Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí. 78 p.
- Balloux F. and N. Lugon-Moulin (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11:155-165
- Bonin A., D. Ehrich and S. Manel (2007) Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular Ecology* 16:3737-3758.
- Bourguiba H., J. M. Audergon, L. Krichen, N. Trifi-Farah, A. Mamouni, S. Traibelsi, C. D'Onofrio, B. M. Asma, S. Santoni and B. Khadari (2012) Loss of genetic diversity as a signature of apricot domestication and diffusion into the Mediterranean Basin. *BMC Plant Biology* 12:49.
- Buntjer J. B. and M. Otsen (1999) Cross Checker provides computer-assisted marker interpretation. *Journal of Agricultural Genomics* 4:1-6.
- Colunga-GarcíaMarín P., E. Estrada-Loera and F. May-Pat (1996) Patterns of morphological variation, diversity, and domestication of wild and cultivated populations of *Agave* in Yucatán México. *American Journal of Botany* 83:1069-1082.
- CONABIO, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (2006) *Mezcales y Diversidad*. 2a. ed. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. (Mapa).
- Díaz-Martínez M., A. Nava-Cedillo, J.A. Guzmán-López, R. Escobar-Guzmán and J. Simpson (2012) Polymorphism and methylation patterns in *Agave tequilana* Weber var. Azul plants propagated asexually by three different methods. *Plant Science* 185-186:321-330.
- Eguiarte L. E., E. Aguirre-Planter, X. Aguirre, R. Colín, A. González, M. Rocha, E. Scheinvar, L. Trejo and V. Souza (2013) From isozymes to genomics: population genetics and conservation of *Agave* in México. *The Botanical Review* 79:483-506.
- Esparza-Frausto G., F. J. Macías-Rodríguez, M. Martínez-Salvador, M. A. Jiménez-Guevara y S. J. Méndez-Gallegos (2008) Insectos comestibles asociados a las magueyerías en el ejido Tolosa, Pinos, Zacatecas, México. *Agrociencia* 42:243-252.
- Excoffier L. and H. E. L. Lischer (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10:564-567.
- Fujimoto R., T. Sasaki, R. Ishikawa, K. Osabe, T. Kawanabe and E. S. Dennis (2012) Molecular Mechanisms of Epigenetic Variation in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* 13:9900-9922.
- Gentry H. S. (1982) *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press, Tucson.
- Good-Avila S.V., V. Souza, B. S. Gaut and L. E. Eguiarte (2006) Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:9124-9129.
- Gross S. M., J. A. Martin, J. Simpson, M. J. Abraham-Juarez, Z. Wang and A. Visel (2013) *De novo* transcriptome assembly of drought tolerant CAM plants, *Agave deserti* and *Agave tequilana*. *BMC Genomics* 14:563
- Habel J. C., S. V. Brückmann, J. Krauss, J. Schwarzer, A. Weig, M. Husemann and I. Steffan-Dewenter (2015) Fragmentation genetics of the grassland butterfly *Polyommatus coridon*: Stable genetic diversity or extinction debt? *Conservation Genetics* 16:549-558
- Hampel V., A. Pavlíček and J. Flegr (2001) Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51:731-735.
- Huang Y., C. Q. Zhang and D. Z. Li (2009) Low genetic diversity and high genetic differentiation in the critically endangered *Omphalogramma souliei* (Primulaceae): implications for its conservation. *Journal of Systematics and Evolution* 47:103-109.
- Infante D., S. Molina, J. R. Demey and E. Gámez (2006) Asexual genetic variability in Agavaceae determined with inverse sequence-tagged repeats and amplification fragment length polymorphism analysis. *Plant Molecular Biology Reporter* 24:205-217.
- Khalilq I., M. A. Khan and S. Pearce (2012) Ty1-copia retrotransposons are heterogeneous, extremely high copy number and are major players in the genome organization and evolution of *Agave tequilana*. *Genetic Resources and Crop Evolution* 59:575-587
- Kimura M. and J. F. Crow (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49:725-738.
- Lewontin R. C. (1972) The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology* 6: 381-398.
- Li Y., M. L. Lancaster, S. J. Cooper, A. C. Taylor and S. M. Carthew (2015) Population structure and gene flow in the endangered southern brown bandicoot (*Isodon obesulus obesulus*) across a fragmented landscape. *Conservation Genetics* 16:331-345
- Luan S., T. Y. Chiang and X. Gong (2006) High genetic diversity vs. low genetic differentiation in *Nouelia insignis* (Asteraceae), a narrowly distributed and endemic species in China, revealed by ISSR fingerprinting. *Annals of Botany* 98:583-589.
- Lynch M. and B. G. Milligan (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3:91-99
- Martínez-Salvador M., H. Rubio-Arias and A. Ortega-Rubio (2005) Population structure of maguey (*Agave salmiana* ssp. *crassispina*) in southeast Zacatecas, Mexico. *Arid Land Research and Management* 19:101-109.
- Martínez-Salvador M., L. Beltrán-Morales, R. Valdéz-Cepeda, H. Arias-Rubio, E. Troyo-Diegez, B. Murillo-Amador, J. Galindo-Jiménez and A. Ortega-Rubio (2007) Assessment of sustainability performance on the utilization of *Agave salmiana* ssp. *crassispina* in Zacatecas, México. *International Journal of Sustainable Development & World Ecology* 14:362-371.
- McDermott J. M. and B. A. McDonald (1993) Gene flow in plant pathosystems. *Annual Review of Phytopathology* 31:353-373
- Mohammadi S. A. and B. M. Prassana (2003) Analysis of Genetic Diversity in Crop Plants - Salient Statistical Tools and Considerations. *Crop Science* 43:1235-1248.
- Mora-López J. L., J.A. Reyes-Agüero, J. L. Flores-Flores, C. B. Peña-Valdivia y J. R. Aguirre-Rivera (2011) Variación morfológica y humanización de la sección *Salmianae* del género *Agave*. *Agrociencia* 45:465-467.
- Nei M. (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Nei M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York. 512 p.
- Parker K. C., D. W. Trapnell, J. L. Hamrick, W. C. Hodgson and A. J. Parker (2010) Inferring ancient *Agave* cultivation practices from contemporary genetic patterns. *Molecular Ecology* 19:1622-37.
- Richards E. J. (2006) Inherited epigenetic variation - Revisiting soft inheritance. *Nature Reviews Genetics* 7:395-401.
- Sánchez-Teyer F., S. Moreno-Salazar, M. Esqueda, A. Barraza and M. L. Robert (2009) Genetic variability of wild *Agave angustifolia* populations based on AFLP: A basic study for conservation. *Journal of Arid Environments* 73:611-616.
- Schnable P. S., D. Ware, R. S. Fulton, J. C. Stein, F. Wei, S. Pasternak, C. Liang, J. Zhang, L. Fulton and T. A. Graves (2009) The b73 maize genome: Complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326: 1112-1115.
- Shakeel S.N., S. Aman, N.U. Haq, S.A. Heckathorn and D. Luthe (2013) Proteomic and transcriptomic analyses of *Agave americana* in response to heat stress. *Plant Molecular Biology Reporter* 31:840-851.
- Torres-Morán M. I., N. Almaraz-Abarca and M. Escoto-Delgadillo (2012) ISTR, a Retrotransposons-based marker to assess plant genome variability with special emphasis in the genera *Zea* and *Agave*. *American Journal of Plant Sciences* 3:1820-1826
- Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman and M. Kuiper (1995) AFLP: a new technique for

- DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23:4407-4414.
- Yeh F. C., R. C. Yang and T. Boyle (1999) POPGENE. Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis, release 1.31. University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.
- Zhang C. and T. F. Hsieh (2013) Heritable epigenetic variation and its potential applications for crop improvement. *Plant Breeding and Biotechnology* 1:307-319.
- Zhao X., Y. Ma, W. Sun, X. Wen and R. Milne (2012) High genetic diversity and low differentiation of *Michelia coriacea* (Magnoliaceae), a critically endangered endemic in Southeast Yunnan, China. *International Journal of Molecular Sciences* 13:4396-411.
- Zizumbo-Villarreal D., O. Vargas-Ponce, J. J. Rosales-Adame and P. Colunga-GarcíaMarín (2013) Sustainability of the traditional management of *Agave* genetic resources in the elaboration of mezcal and tequila spirits in western Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* 60:33-47.