

VARIABILIDAD GENÉTICA EN *Agave angustifolia* Haw. DE LA SIERRA SONORENSE, MÉXICO, DETERMINADA CON MARCADORES AFLP[†]

GENETIC VARIABILITY IN *Agave angustifolia* Haw. AT THE SONORAN SIERRA, MÉXICO, AS DETERMINED BY AFLP MARKERS

Alejandra Barraza-Morales¹, Felipe Lorenzo Sánchez-Teyer^{2*}, Manuel Robert²,
Martín Esqueda¹ y Alfonso Gardea¹

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Apdo. Postal 1735, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México. ²Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 43 # 130, Col. Chuburná de Hidalgo, C.P. 97200, Mérida, Yucatán. México. Tel: 01 (999) 981-3914. Correo electrónico: santey@cicy.mx [†]Trabajo de tesis de maestría del primer autor.

* Autor para correspondencia

RESUMEN

La variabilidad genética del maguey *Agave angustifolia* Haw. se analizó mediante polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP). Se incluyeron de 28 a 30 plantas en cada una de tres poblaciones de maguey, originarias de tres municipios de Sonora, México donde por tradición se emplea esta especie para la producción de la bebida alcohólica denominada “bacanora”. Los índices de similitud inter e intrapoblacionales oscilaron de 0.749 a 0.786 y de 0.800 a 0.827, respectivamente. La variabilidad promedio intrapoblacional fue 0.26 y la mayor distancia genética se encontró en una misma población (0.106 y 0.093). No se observó traslape interpoblacional de individuos, lo que se reflejó en el valor de estructuración de 0.165 con 65.16 % de *loci* polimórficos y heterocigosis total de 0.313 ± 0.038 . La variabilidad observada sugiere adaptación ante los factores bióticos y abióticos presentes en la Sierra Sonorense.

Palabras clave: *Agave angustifolia*, marcadores moleculares, diversidad genética, bacanora.

SUMMARY

Genetic variability of *Agave angustifolia* Haw. was analyzed by amplified fragment length polymorphism (AFLP). From 28 to 30 plants obtained from three agave populations found in three counties in Sonora, México, were included. In such region this species is traditionally used for the production of “bacanora”, an alcoholic spirit. Similarity indexes ranged from 0.749 to 0.786 among populations and from 0.800 to 0.827 within populations. Average variability within populations was 0.26, and the greatest genetic distance was found within a single population (0.106 and 0.093). No overlap between individuals of different populations was observed, since the structuring value was 0.165 with 65.16 % of polymorphic *loci* and the total heterozygosity was 0.313 ± 0.038 . The estimated variability suggests adaptation to the biotic and abiotic factors present in the Sonoran Sierra.

Index words: *Agave angustifolia*, molecular markers, genetic diversity, bacanora.

INTRODUCCIÓN

Durante siglos se ha utilizado *Agave angustifolia* Haw. en Sonora, México para la elaboración de la bebida alcohólica denominada “bacanora”. De 1915 a 1991 su producción fue clandestina, hasta la derogación de la ley seca en 1992. Su destilación y comercialización sin restricciones resultó en el sobreaprovechamiento del agave y creó diversos impactos sobre las poblaciones silvestres, problemas ecológicos y de conservación de suelos. Para los productores es cada vez más preocupante la disponibilidad de materia prima, ya que sólo existen plantaciones incipientes (Moreno, 1998; Núñez, 2001), aun cuando esta actividad es una de las más importantes, tanto económica como culturalmente, en la Sierra Sonorense (Salazar, 2001).

El conocimiento de la diversidad genética dentro y entre las poblaciones vegetales, así como del tipo de variación que conduce a la formación de nuevas especies, es parte esencial de los estudios sobre evolución (Nei y Kumar, 2000). Para determinar el polimorfismo genético y los niveles de diferenciación, los marcadores moleculares (MM) se han consolidado como una herramienta confiable porque utilizan las diferencias existentes en la secuencia del ADN para generar perfiles o huellas genéticas únicas para cada organismo (Barrett *et al.*, 1998; Aggarwal *et al.*, 1999; Arnold *et al.*, 2002). Estos marcadores tienen ventaja sobre los morfológicos, ya que no varían con el

ambiente ni dependen del estado fisiológico del individuo (Arcade *et al.*, 2000).

Se han registrado diversos métodos para la obtención de los MM, y los principales son: Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) (Botstein *et al.*, 1980), polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPDs) (Williams *et al.*, 1990), microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) (Weber y May, 1989) y los polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLPs) (Vos *et al.*, 1995). Este último se ha empleado para determinar relaciones evolutivas entre organismos (Aggarwal *et al.*, 1999), selección de individuos con fines de mejoramiento (Madigan *et al.*, 1999), identificación varietal (Barrett *et al.*, 1998), homologías de genomas entre especies cultivadas (Barrett y Kidwell, 1998; Caicedo *et al.*, 1999), análisis filogenético (Roa *et al.*, 1997), diversidad genética (Marsan *et al.*, 1998) y detección de variación somaclonal (Sánchez-Teyer *et al.*, 2003), entre otras. El conocimiento del nivel de variabilidad de las poblacio-

nes silvestres de *Agave angustifolia* es un factor determinante para la conservación y el manejo sostenible de los recursos naturales en la industria del bacanora, y coadyuva a la definición de estrategias para la selección de individuos élite en el establecimiento de plantaciones. El objetivo del presente trabajo fue determinar la diversidad genética de *A. angustifolia* en tres regiones de la Sierra Sonorense de México, mediante AFLPs.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de muestreo

En la Figura 1 se señalan las nueve áreas de muestreo de maguey. Se analizaron tres sitios por municipio, cada uno con una superficie aproximada de 2 km² y separados entre sí por una distancia mínima de 1 km. Los puntos de muestreo de cada uno de los municipios, Moctezuma, Bacadéhuachi y Nacori Chico, Sonora se consideraron como una población.

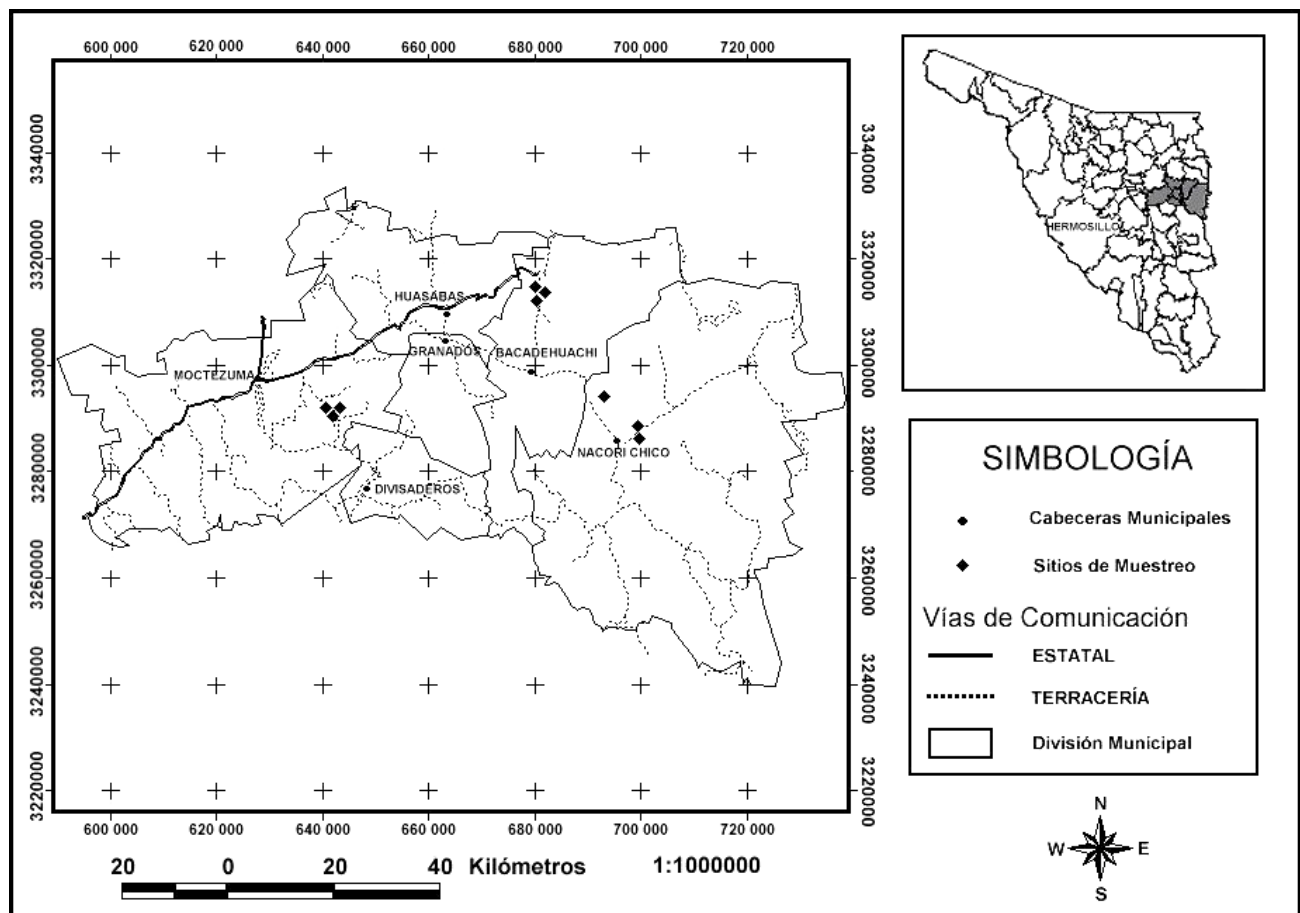


Figura 1. Sitios de muestreo de las tres poblaciones de *Agave angustifolia* estudiadas.

Material vegetal

Se colectaron 10 plantas por sitio de muestreo, como la ilustrada en la Figura 2, para un total de 90 individuos. De ese total se analizaron 87, debido a contaminación de tres especímenes. Los criterios de selección fueron que los agaves estuvieran aparentemente sanos, presentaran tallas de 20 a 50 cm, y provinieran de plantas madres diferentes.



Figura 2. Planta de *Agave angustifolia* Haw., en la Sierra Sonoronse, México.

Extracción de ADN y desarrollo de AFLPs

El ADN se extrajo con el método miniprep desarrollado por Keb-Llanes *et al.* (2002). Éste incluye la precipitación y resuspensión del ADN tres veces antes del precipitado final, así como una modificación de tres lavados con cloroformo isoamílico (24:1). El ADN genómico total se cuantificó con base en la lectura de absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro Beckman DU6.

Para la obtención de los AFLPs se empleó el protocolo de Vos *et al.* (1995) con ligeras modificaciones en los volúmenes de reacción; los fragmentos amplificados fueron separados por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida 6 %, a 1870 V, 40 mA y 70 W durante 2 h, como condiciones de corrida. Una vez transferidos a papel, los geles se secaron durante 2 h y se expusieron a una

película de rayos X (Kodak ®) durante 48 h. Luego, las películas se revelaron para visualizar las bandas.

Análisis de datos

El rango de tamaños en los fragmentos analizados fue de 100 a 400 pb, estimados con base en el marcador de 30-330 pb (Invitrogen). Para obtener el índice de similitud genética se generó una matriz binaria, en la que se asignó el valor de 1 a la presencia y 0 a la ausencia de una banda y se aplicó la fórmula de Nei y Li (1979). Para generar el dendrograma se utilizó el método de agrupación de pares no ponderados con medias aritméticas (UPGMA), con la subrutina SAHN (Sequential Agglomerative Hierarchical Nested) del programa NTSYS Versión 2.02i (Rohlf, 1993). Para obtener los índices de variación y estructuración de las poblaciones (F_{ST}) se generó otra matriz en donde a las bandas presentes y ausentes se les asignaron los valores de 1 y 2, respectivamente; estos índices se analizaron con el programa Tools for Population Genetic Analyses (Miller, 1997). Se supuso que la presencia de la banda representa al genotipo dominante, mientras que su ausencia representa al homocigoto recesivo. La variación genética se estimó mediante el cálculo de la heterocigosis esperada (H_E) en el equilibrio Hardy-Weinberg con la proporción de *loci* polimórficos (P), y se aplicó la corrección para marcadores dominantes sugerida por Lynch y Milligan (1994), así como el valor de F_{ST} para la diferenciación entre poblaciones (Op).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la amplificación selectiva con cinco combinaciones de iniciadores seleccionadas, se obtuvo un total de 393 marcadores AFLP en un rango de 100 a 400 pb, de los cuales 353 (82.8 %) fueron polimórficos, y en promedio se generaron 78.6 marcadores por combinación. El mayor polimorfismo se observó con la combinación ACG/CTT, con 78 bandas totales y 96.1 % de polimorfismo. En contraste, la combinación ACA/CAT registró 78 bandas totales y polimorfismo de 83.3 %; además se determinó un valor de reproducibilidad de 97 %. El patrón de bandas obtenido con AFLPs en agave se presenta en la Figura 3.

Índices de similitud

Los índices de similitud (IS) entre los individuos variaron de 0.747 a 0.951, en el que 80.2 % de los individuos se encontraron en un rango de 0.747 a 0.828. El dendrograma obtenido con los IS mostró agrupamientos correspondientes a cada municipio de origen y, en la mayoría de los casos, se observaron subgrupos relacionados con cada punto de muestreo, con excepción de M1-3 y M1-7 que se apartan notoriamente del grupo al que pertenecen,

Figura 3. Productos AFLP de poblaciones de *Agave angustifolia* de la Sierra de Sonora, obtenidos con la combinación ACA/CAT. Los paneles A, B y C corresponden a individuos de las poblaciones de Bacadéhuachi, Moctezuma y Nácori Chico, respectivamente. M corresponde al marcador de 30-330 pb.

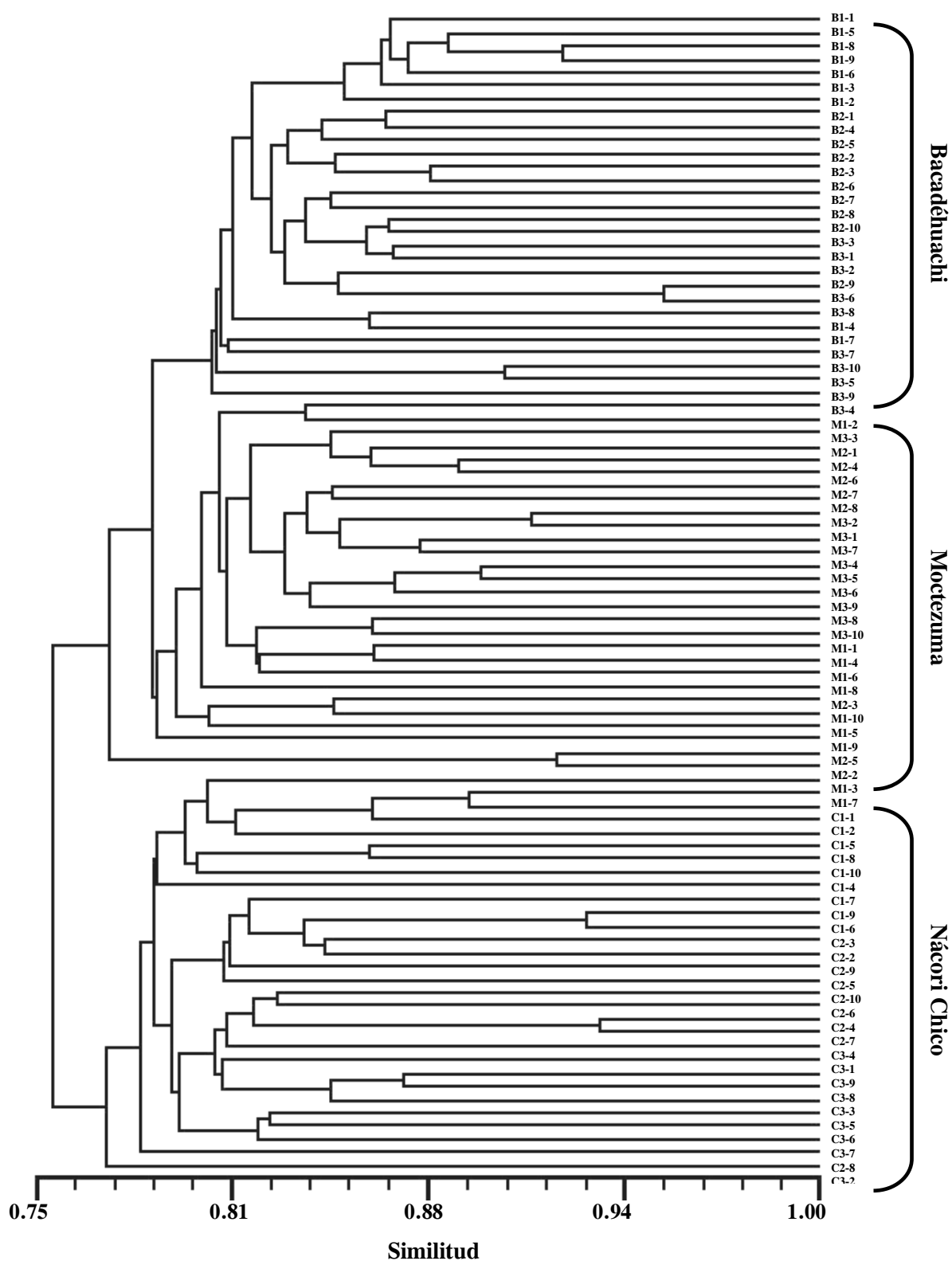


Figura 4. Dendrograma de tres poblaciones de *Agave angustifolia* basado en índices de similitud obtenidos con cinco combinaciones de iniciadores AFLP. B, M y C corresponden a los individuos de las poblaciones de Bacadéhuachi, Moctezuma y Nacori Chico, respectivamente; el número subsiguiente corresponde al punto de muestreo y el número de individuo se indica después del guión.

posiblemente debido a que son producto de la cruce con otra especie de agave que habita en la misma región. Sin embargo, no se observó variación morfológica ni traslape interpoblacional de individuos (Figura 4).

La similitud intra e interpoblacional varió de 0.800 a 0.827 y de 0.749 a 0.786, respectivamente, con promedio (ISP) de 0.81. Esta similitud fue menor a la registrada para *Agave tequilana* var. Azul donde sólo 1 de los 124 productos de RAPD (0.8 %) fue polimórfico y 39 de las 40 plantas fueron completamente isogénicas (Gil *et al.*, 2001). Esta ausencia de variabilidad se atribuyó al sistema de propagación asexual empleado en el maguey tequilero. Con este mismo método de reproducción, en *A. fourcroydes* se registró una generación de variabilidad genética entre plantas madres y rizomas (Infante *et al.*, 2003). El ISP para henequén proveniente de rizomas, bulbilos y semillas fue de 0.949, 0.915 y 0.885, respectivamente (Reyes, 2004; Com. personal)¹. Estos valores son similares a los obtenidos en el presente trabajo, lo que sugiere que el origen en algunas plantas pudo ser mediante la dispersión de semilla, con el establecimiento de la población a través de la concertación de mecanismos de reproducción sexual y asexual.

Índices de variación y estructuración genética

Para analizar los datos de variación y estructuración genética se calculó la heterocigosis esperada (H_E) y la proporción de *loci* polimórficos para cada población y la especie en conjunto. Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la heterocigocidad, la proporción de *loci* polimórficos en la población de Nácori Chico fue mayor que en Bacadéhuachi y Moctezuma (Cuadro 1). Estos resultados concuerdan con el valor de distancia genética obtenido de 0.20 para Nácori Chico, con un alto soporte de robustez (Figura 4) y sugieren que existe mayor diferencia genética en el agave de Nácori Chico.

Cuadro 1. Índices de variación genética en cada población y para la especie *Agave angustifolia*.

Población	N	H_E	P
Bacadéhuachi	29	0.249	61.57
Moctezuma	28	0.253	65.40
Nácori Chico	30	0.295	68.53
		$H_S = 0.261 (\pm 0.023)$	$P = 65.16$
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 población; H_T = Heterocigosis total.

Al comparar los valores de H_E con los registrados para otras especies de *Agave* se observó una menor variabilidad

genética que en las poblaciones de *A. lechuguilla* y *A. victoriae-reginae* (Barrett y Kidwell, 1998; Caicedo *et al.*, 1999; Martínez-Palacios *et al.*, 1999; Silva-Montellano y Eguiarte, 2003). Por el contrario, los valores citados en este trabajo fueron mayores que en *A. potatorum*, *A. cupreata*, *A. cerulata*, *A. deserti* y *A. subsimplex* (Navarro-Quezada *et al.*, 2003). La proporción de *loci* polimórficos analizados en las poblaciones de *A. angustifolia* fue inferior al de otras especies de agave previamente estudiadas (Massey y Hamrick, 1998; Martínez-Palacios *et al.* 1999; Navarro-Quezada *et al.*, 2003). Cabe mencionar que estas determinaciones se realizaron con otras técnicas, en donde el número de marcadores fue inferior al obtenido con AFLPs.

En lo que respecta a la estructuración (F_{ST}) se obtuvo un valor de 0.165 entre poblaciones, el cual indica poca diferenciación entre poblaciones y sugiere la existencia de apareamiento al azar. Los valores de F_{ST} determinados en este estudio son parecidos a los de monocotiledóneas con semillas dispersadas por gravedad (Hamrick y Golt, 1996). En otras especies de monocotiledóneas y plantas perennes se han encontrado valores de 0.38 y 0.25, respectivamente, que son superiores que la mayoría de los agaves (Martínez-Palacios *et al.*, 1999; Silva-Montellano y Eguiarte, 2003). Lo anterior sugiere la dispersión por semilla a nivel intrapoblacional más que entre poblaciones, lo que concuerda con la asincronía en la floración observada en algunos sitios al realizar los muestreos, lo que pudo ser una de las causas del mayor nivel de estructuración observado entre las poblaciones de *A. angustifolia* con respecto a otras especies de agave. Esta asincronía se ha encontrado también en algunas poblaciones de *A. potatorum* (Aguirre, 2004; Com. personal)².

Si bien las condiciones climáticas de la zona estudiada no son las más adecuadas para la germinación, las plantas de *A. angustifolia* tienden a crecer en asociación con una diversidad de árboles donde las semillas encuentran condiciones favorables para germinar. Estas asociaciones se observaron comúnmente durante la colecta de las muestras; así mismo, como *A. angustifolia* es diploide no presentaría grandes problemas para reproducirse por semilla. Las especies poliploides son las que generalmente tienden a reproducirse principalmente por propagación vegetativa (Eguiarte y Silva-Montellano, 2000).

En el caso de la reproducción por semilla, los polinizadores tienen una contribución clave en el éxito de ésta. Se ha observado que los principales polinizadores de los

¹ E. Reyes (2004) Estudio de la variabilidad genética de henequén (*Agave fourcroydes* Lem) con marcadores moleculares (AFLP) y su posible origen. Tesis Doctoral. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida.

² D Aguirre (2004) Genética de poblaciones de *Agave cupreata* y *Agave potatorum*: Aportaciones para el manejo y conservación de dos especies mezcaleras. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

agaves en México son los murciélagos, aunque en el norte del país también son importantes los esfíngidos (*Bombus pennsylvanicus*) y las abejas (*Apis mellifera*, *Lasioglossum* spp.). Sin embargo, algunas especies del subgénero *Agave* están limitadas en su fecundidad por los polinizadores (Eguiarte y Silva-Montellano, 2000).

No se encontró correlación significativa entre variabilidad genética y altitud ($r = 0.326$, $P > 0.05$). En otros estudios se ha observado que la elevación y el hábitat influyen sobre la diversidad genética, ya que afectan el crecimiento y la reproducción de las plantas, al generar ambientes propicios para favorecer la germinación y el establecimiento de genotipos (Trame *et al.*, 1995; Hernández y Bárcenas, 1996). En plantas de *A. angustifolia* localizadas en regiones cercanas a Hermosillo, Sonora, las plantas más grandes y vigorosas se encontraron en sitios con un rango de 800 a 1200 msnm (Núñez, 2001). De igual forma, Nobel (1998) y Martínez-Palacios *et al.* (1999) indicaron que en Sonora *A. deserti* presenta mejor crecimiento conforme se incrementa la altitud, debido a la mayor precipitación y temperaturas favorables para la germinación y el desarrollo de las plantas.

Según Massey y Hamrick (1998), la magnitud del flujo genético entre las especies depende de varios factores, como los hábitats que ocupan. En los sitios muestreados en Nácori Chico la vegetación es más diversa, lo cual podría

favorecer la formación de subpoblaciones parcialmente separadas una de otra y genéticamente diferenciadas, lo que contribuye al aumento de la variabilidad.

Distancia genética

Al analizar la distancia genética (DG) entre todos los puntos de muestreo que integraron cada población, se encontró en Nácori Chico los valores más alejados genéticamente con respecto a las otras dos poblaciones. En el análisis de agrupamientos se observó diferenciación entre cada población, con mayor relación de Bacadéhuachi con Moctezuma y menor con Nácori Chico (Figura 5).

CONCLUSIONES

En la región serrana de Sonora, *Agave angustifolia* mostró altos niveles de variabilidad genética dentro de sus poblaciones. Aunque presentó una baja estructuración genética, ésta resultó superior a la mayor parte de los taxones estudiados de agave. La diversidad genética observada indica que será preciso llevar a cabo estudios morfoagronómicos complementarios para identificar las plantas adecuadas para la elaboración de bacanora.

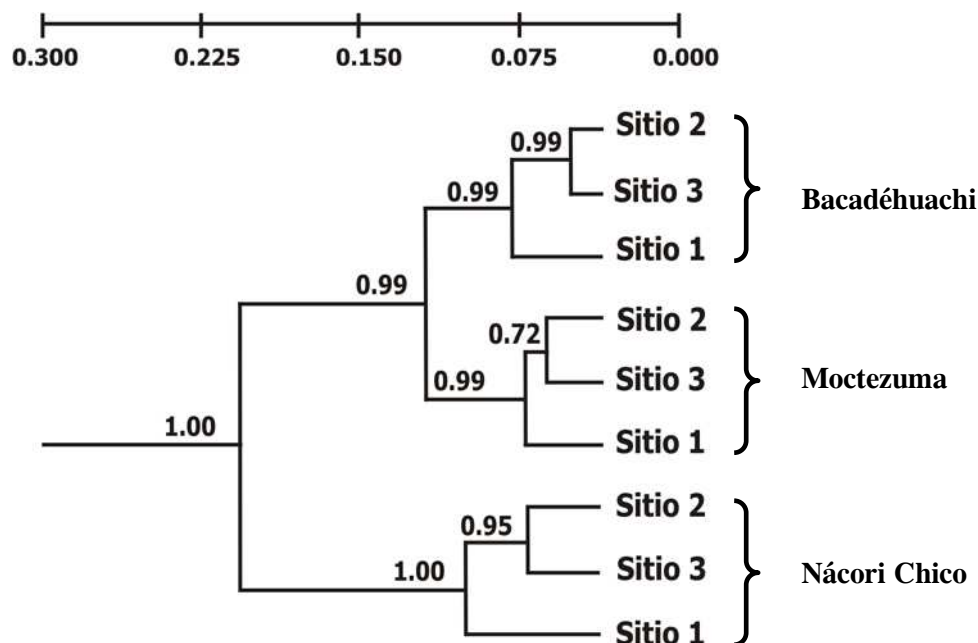


Figura 5. Dendrograma de las distancias genéticas entre poblaciones de *Agave angustifolia* mediante el uso de UPGMA. El número en los puntos de unión corresponden al valor de robustez que soporta al nodo después de 1000 réplicas.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el financiamiento parcial de este trabajo por parte del Fondo Mixto Gobierno de Sonora-CONACyT (Clave: SON-2003-C01-5); al M. en C. Alfonso Sánchez (CIAD) por su colaboración en el trabajo de campo, y al M. en C. Leopoldo Villarruel (CESUES) por la elaboración del mapa.

BIBLIOGRAFÍA

- Aggarwal, R K, D S Brar, S Nandi, N Huang, G S Khush (1999) Phylogenetic relationships among *Oryza* species revealed by AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 98:1320-1328.z
- Arcade A, F Anselin, P F Rampant, M C Lesage, L E Pâques, D Prat (2000) Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. *Theor. Appl. Genet.* 100:299-307.
- Arnold C, M Rossetto, J McNally, R J Henry (2002) The application of SSRs characterized for grape (*Vitis vinifera*) to conservation studies in Vitaceae. *Am. J. Bot.* 89:22-28.
- Barrett B A, K K Kidwell (1998) AFLP-based genetic diversity assessment among wheat cultivars from the Pacific Northwest. *Crop Sci.* 38:1261-1271.
- Barrett B A, K K Kidwell, P N Fox (1998) Comparison of AFLP and pedigree-based genetic diversity assessment methods using wheat cultivars from the Pacific Northwest. *Crop Sci.* 38:1271-1278.
- Botstein D, R L White, M Skolnick, R W Davis (1980) Construction of genetic linkage map in man using restriction length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331.
- Caicedo A L, E Gaitan, M C Duque, O T Chica, D G Debouck, J Tohme (1999) AFLP fingerprinting of *Phaseolus lunatus* L. and related wild species from South America. *Crop Sci.* 39:1497-1507.
- Eguiarte L E, A Silva-Montellano (2000) Evolución de la familia *Agavaceae*: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 66:131-150.
- Hamrick, J L, M J W Golt (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Proc. Royal Soc. London* 351:1291-1298.
- Hernández, H M, R T Bárcenas (1996) Endangered cacti in the Chihuahuan Desert: II. Biogeography and conservation. *Conserv. Biol.* 10:1200-1209.
- Gil Vega, K, M González, O Martínez de la Vega, J Simpson, G Vandemark (2001) Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. *Euphytica* 119:335-341.
- Infante D, G González, L Peraza-Echeverría, M Keb-Llanes (2003) Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes*. *Plant Sci.* 164:223-230.
- Keb-Llanes M, G Gonzalez, B Chi-Manzanero, D Infante (2002) A rapid and simple method for small-scale DNA extraction in *Agavaceae* and other tropical plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 20: 229a-229e.
- Lynch M, B G Milligan (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.* 3:91-99.
- Madigan M T, J M Martinko, J Parker (1999) *Biología de los Microorganismos*. Prentice Hall Iberia, Madrid, España. 986 p.
- Marsan P A, P Castiglioni, F Fusari, M Kuiper, M Motto (1998) Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 96:219-227.
- Martínez-Palacios A, L E Eguiarte, G R Fournier (1999) Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert. *Am. J. Bot.* 86:1093-1098.
- Massey L K, J L Hamrick (1998) Genetic diversity and population structure of *Yucca filamentosa* (Agavaceae). *Am. J. Bot.* 85:340-345.
- Miller M P (1997) Tools for population genetics (TFPGA) 1.3: A windows program for the analysis of allozymes and molecular population genetic data. Computer software distributed by the author.
- Moreno S (1998) *Agave angustifolia*, el bacanora, desde su origen hasta nuestros días. *Revista Entorno* (Instituto del Medio Ambiente y el Desarrollo Sustentable del Estado de Sonora) 2:3-5.
- Navarro-Quezada A, R González-Chauvet, F Molina-Freaner, L E Eguiarte (2003) Genetic differentiation in the *Agave deserti* (Agavaceae) complex of the Sonoran Desert. *Heredity* 90:220-227.
- Nei M, W H Li (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5269-5273.
- Nei M, A Kumar (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press Inc., New York. 333 p.
- Nobel P S (1998) *Los Incomparables Agaves y Cactus*. Ed. Trillas, México. 166 p.
- Núñez L (2001) La Producción de Mezcal Bacanora: Una Oportunidad Económica para Sonora. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora. 284 p.
- Roa A C, M M Maya, M C Duque, J Tohme, A C Allem, M W Bonierbale (1997) AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species. *Theor. Appl. Genet.* 95:741-750.
- Rohlf F J (1993) NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analyses system. Version 2.02i. Applied Biostatistics Inc., New York.
- Salazar V (2001) El comercio regional del bacanora y sus mercados potenciales. *Boletín CIAD* 10:4-5.
- Sánchez-Teyer L F, F R Quiroz-Figueroa, V M Loyola-Vargas, D Infante (2003) Culture-induced variation in plants of *Coffea arabica* cv. Caturra rojo, regenerated by direct and indirect somatic embryogenesis. *Mol. Biotechnol.* 23:107-115.
- Silva-Montellano A, L E Eguiarte (2003) Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert. II. Genetic variation, differentiation, and inbreeding estimates. *Am. J. Bot.* 90:700-706.
- Trame, A M, A J Coddington, K N Paige (1995) Field and genetic studies testing optimal outcrossing in *Agave schottii*, a long lived clonal plant. *Oecologia* 104:93-100.
- Vos P, R Hogers, M Bleeker, M Reijans, T Van de Lee, M Hornes, A Frijters, J Pot, J Peleman, M Kuiper, M. Zabeau (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23:4407-4414.
- Weber J L, P E May (1989) Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.* 44:388-396.
- Williams J G K, A R Kublik, K J Livak, J A Rafalski (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18:6531-6535.