

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA



Diversidad Genética de los Agaves Mezcaleros del Municipio de

San Felipe, Guanajuato

Por:

PAUL GARCÍA MEZA

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Saltillo, Coahuila, México

Mayo del 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA

Diversidad Genética de los Agaves Mezcaleros del Municipio de San Felipe,
Guanajuato

Por:


PAUL GARCÍA MEZA

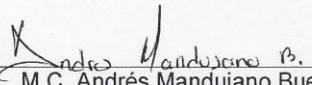
TESIS

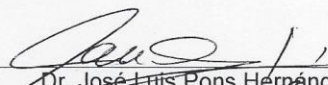
Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

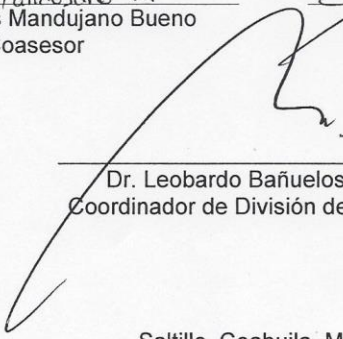
INGENIERO EN AGROBIOLOGÍA

Aprobada:


Dra. Silvia Yudith Martínez Amador
Asesor Principal


M.C. Andrés Mandujano Bueno
Coasesor


Dr. José Luis Pons Hernández
Coasesor


Dr. Leobardo Bañuelos Herrera
Coordinador de División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México
Mayo del 2014

AGRADECIMIENTOS

Se agrádesse al Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACYT- Gobierno del Estado de Guanajuato.

Este trabajo de Tesis forma parte del proyecto GTO-2011-C04-168862 Inventario, Potencial Productivo y calidad Industrial de las especies de Agave Mezcalero en Guanajuato.

Mis profundos agradecimientos a todas las personas que durante mi vida en la Narro formaron y forman parte de mi vida.

A la Comuna, el lugar idóneo para la formación Política-Científica

Al Frente Estudiantil Democrático, por acogerme como un hermano, más que un hermano, un compañero.

Abel, Arturo, Diana, Diego, Eloísa, Francisco, Javier, Jonathan, Jorge, Martha, Miguel, Rafael, Rosaura

A los No Comunos Alicia y Peña, Carlos

A Daniela por su cariño interminable

Al apoyo brindado por todas las personas del Laboratorio de Marcadores Moleculares INIFAP-CEBAJ

Adriana, Ana Paulina, Ángeles, Brenda, Janet, Miguel.

Al Departamento de Fertilidad de Suelos del INIFAP-CEBAJ

Arturo, Carolina, Fabiola, Gabriela, Francisco.

A mis asesores de UAAAN e INIFAP

Dra. Silvia Yudith Martínez Amador

Dr. Francisco Rodríguez Martínez

M.C. Andres Mandujano Bueno, Dr. José Luis Pons, M.C. Roberto Paredes
Melesio

A mis Primos Juan Luis, Marco Antonio, Moisés, Hugo, Adrián, Jesús.

A mis tíos Javier, Martin, Ema, Esperanza, Dolores y Alberto Juan, Elena

A mis amigos de la casa de Morelos: Agustín, Fabián, Adrián, Alejandro

A la Familia Chávez Rodríguez

A mi Familia Materna Lucia Peña, Ángel, Armando y María, Javier, Jaime,
Teresa

A mi gran amigo Julio Ledesma, que empujándome a cuestas, logró que no
cesáramos en el sueño que compartimos.

A Mireya

Por su increíble paciencia

DEDICATORIAS

A mi Mamá Leticia Meza y

A mis hermanos José Antonio y Gerardo

"Por su amor interminable"

A mi Papá José Antonio García

"Por haberme dicho que no podría, si me hubiera dicho que si lo lograría, jamás hubiese entrado a la Universidad"

A mi tío Armando Meza

"Por esperarme siempre para cenar"

A mis Tíos Javier y Nancy

"Por considerarme un hijo más"

A mi Primo Juan Luis y Marco

"Por considerarme un hermano más"

Al Frente Estudiantil Democrático (FED)

Al pueblo trabajador, creador de riqueza y al que se debe la existencia de Instituciones tan nobles como mi *Alma Mater*

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	I
DEDICATORIAS.....	II
ÍNDICE.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
ÍNDICE DE TABLAS.....	VIII
GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	IX
I.RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	2
III. OBJETIVO GENERAL.....	5
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
V. HIPÓTESIS.....	5
VI. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
1. AGAVACEAE.....	6
1.2. <i>Morfología de Agavácea</i>	7
2. EL GÉNERO AGAVE.....	9
2.1 <i>Morfología de Agave</i>	9
2.2 <i>Diversidad y distribución del genero Agave</i>	9
2.3 <i>Aspectos fisiológicos de Agave</i>	10
3. LOS AGAVES Y SU HUMANIZACIÓN.....	11
3.1 <i>Los agaves y las bebidas</i>	13
3.2. <i>Denominación de origen</i>	16
4. LA BIODIVERSIDAD.....	17
4.1. <i>Diversidad genética</i>	18
4.2. <i>El origen de las especies</i>	19
4.3. <i>Genética clásica</i>	20
5. GENÉTICA MOLECULAR.....	20
5.1. <i>Marcadores genéticos</i>	21
5.2. <i>Marcadores ISTR</i>	23
5.3. <i>Elementos transponibles y los marcadores ISTR</i>	23
6. DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA.....	25
6.1. <i>Marcadores moleculares</i>	26
6.2. <i>Descripción de la PCR</i>	26
6.3. <i>Descripción de la electroforesis</i>	27
7. UTILIZACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES EN LOS ESTUDIOS DE DIVERSIDAD.....	28
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
1 LOCALIZACIÓN DE LAS ZONAS CON PRESENCIA DE AGAVE MEZCALERO EN EL ÁREA DE ESTUDIO ...	29
1.1. <i>Identificación del área</i>	30
1.2 <i>Determinación de los puntos de muestreo</i>	31

1.3. <i>Identificación de las diferentes especies de Agave mezcalero en San Felipe, Gto.</i>	32
2. DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE AGAVE CON MARCADORES ISTR	32
2.1. <i>Colectas</i>	32
2.2 <i>Marcadores ISTR</i>	33
2.3 <i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	35
2.4 <i>Determinación de la diversidad genética</i>	36
VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
1 LOCALIZACIÓN DE LAS ÁREAS CON PRESENCIA DE AGAVE MEZCALERO	37
2. IDENTIFICACIÓN DE LAS DISTINTAS ESPECIES DE AGAVE MEZCALERO EN EL ÁREA DE ESTUDIO	38
3. DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LOS AGAVES MEZCALEROS	44
3.1. <i>Adecuación del protocolo de extracción de ADN</i>	44
3.2. <i>Estandarización de los marcadores ISTR</i>	45
3.3. <i>Diversidad genética</i>	46
3.4. <i>Método UPGMA</i>	48
3.5. <i>Análisis de diversidad genética</i>	55
3.6. <i>Frecuencias alélicas</i>	56
3.7. <i>Heterocigosidad</i>	56
3.8. <i>Niveles de polimorfismo por loci (%P)</i>	58
3.9. <i>AMOVA</i>	59
3.10. <i>Distancia entre grupos</i>	60
IX. CONCLUSIONES	62
X. LITERATURA CITADA	64
XI. ANEXO	69
ANEXO 1. CLASIFICACIÓN DEL GENERO AGAVE, GENTRY 1982.	69
ANEXO 2. LOCALIZACION GEOGRÁFICAS DE LOS LUGARES DONDE SE COLECTÓ EL MATERIAL VEGETAL .	70
ANEXO 3. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN	68
ANEXO 4. PREPARACIÓN DE POLIACRILAMIDA.....	69
ANEXO. 5 MATRIZ DE DISTANCIAS DE SIMILITUD GENERADA CON EL ÍNDICE DE JACCARD POR MEDIO DE	70
NTSYSpc 2.2 PARA LAS ESPECIES ENCONTRADAS EN EL MUNICIPIO DE SAN FELIPE GTO.	70
ANEXO 6. DESCRIPCIONES TAXONÓMICAS DE LAS ESPECIES ENCONTRADAS EN EL MUNICIPIO DE SAN	70
FELIPE GUANAJUATO. GENTRY 1982.....	70
ANEXO 7 FRECUENCIAS A ALELICAS DE LAS ESPECIES DE AGAVE DEL MUNICIPIO DE SAN FELIPE	79
GUANAJUATO CON 115 <i>LOCI</i> . DONDE P1 Y P2 SON FRECUENCIA OBSERVADA.	79

INDICE DE FIGURA

Figura 1. Filogenia molecular de la familia Agavaceae, el reloj molecular considera el origen de la familia hace 15 millones de años. Fuente: Eguiarte, 2000.....	7
Figura 2. Inflorescencia de Litteae, Yucaceae y Agave	8
Figura 3. Plantaciones de Agave, realizadas en su mayoría con Agave salmiana por SEMARNAT y CONAFOR del 2006 - 2008 como obras de conservación de suelo (Mandujano, 2013).	30
Figura 4. Distribución de los puntos de muestreo en el municipio de San Felipe, Guanajuato.	31
Figura 5 Condiciones de PCR que se utilizaron en la amplificación de los marcadores ISTR.....	35
Figura 6. Áreas edafoclimáticas de respuesta homogénea en el Municipio de San Felipe, Guanajuato	37
Figura 7 Especies encontradas en relación a las áreas de respuesta homogénea.....	38
Figura 8. Parcelas de <i>Agave</i> sp. Establecidas con doble propósito. La plantación A, corresponde a la plantación del ejido Cuartos de Bravo y la plantación B corresponde a la plantación del ejido de Fábrica de Melchor.	39
Figura 9.Ubicación geográfica de las distintas especies de Agave en la zona de estudio.	40
Figura 10. Especies de Agave ubicadas taxonómicamente con las claves de Gentry (1982) encontradas en San Felipe, Guanajuato.....	41
Figura 11. Presencia de <i>Scyphophorus acupunctatus</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> en parcelas de agave en San Felipe Guanajuato. En la imagen A1 y B2 se observan los daños ocasionados por el insecto. En la imagen A2 y B2 se observan los daños ocasionados por el hongo.	43
Figura 12. Gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, muestra la calidad del ADN y estandarizado a 15 µgml ⁻¹ con presencia de Background (B) o barrido.	45
Figura 13. Gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, muestra la calidad del ADN de alto peso molecular y estandarizado a 15 µgml ⁻¹ .3.2. Estandarización de los marcadores ISTR.....	45
Figura 14. Patrón de amplificación de la combinación F5/B62 para las especies 1 (<i>Agave salmiana</i>), 2 (<i>Agave salmiana</i> subsp. <i>crassispina</i>), 3 (<i>Agave salmiana</i> subsp. <i>ferox</i>), 4(<i>Agave mapisaga</i>), 5 (<i>Agave atrovirens</i> subsp. <i>mirabilis</i>) ,6 (<i>Agave americana</i>), 7 (<i>Agave amer americana</i> var. <i>marginata</i>), 8 (<i>Agave lechuguilla</i>), 9 (<i>Agave aplanata</i>), 10 (<i>Agave inaequidens</i>), 11 (<i>Agave weberi</i>). M indica el marcador Low Weight de 25 pb. S. A significa carril sin ADN.....	47
Figura 15. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de Jaccard utilizando el método de UPGMA con el programa NTSYSpc 2.2 para	

11 especies de Agave con 6 combinaciones de ISTR (F9/B6, F10/B8, F5/B3, F6/B3, F6/B62, F5/B62).	49
Figura 16. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de Jaccard utilizando el método de UPGMA con el programa NTSYSpc 2.2 para especies agrupadas de Agave taxonómicamente con 6 combinaciones de ISTR (F9/B6, F10/B8, F5/B3, F6/B3, F6/B62, F5/B62).	51
Figura 17. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de Jaccard utilizando el método de UPGMA con el programa NTSYSpc 2.2 para la población total de especies de Agave taxonómicamente con 6 combinaciones de ISTR (F9/B6, F10/B8, F5/B3, F6/B3, F6/B62, F5/B6)	53
Figura 18. Dendrograma basado en el coeficiente de Nei (1972) con el programa TFPGA 1000 permutaciones de bootstrap. Los números significan el orden del grupo: 1=SCA, 2=CB, 3=EL molino, 4=FZJ, 5=SJA, 6=CH, 7=Salmiana, 8=Crassispina, 9=Jaral de Berrios. A, B, C y D agrupaciones generadas.	60

INDEÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies con reporte de uso para mezcal en México (Schneivar, 2008)	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 2. Secuencias de los iniciadores ISTR utilizados por Torres (2010). Forward (F) y Reverse (R).....	34
Tabla 3. Secuencias de los iniciadores ISTR utilizados por (Montalvo <i>et al</i> , 2010). Forward (F), Reverse (R).....	34
Tabla 4. Especies de Agave y su reporte de uso en el Municipio de San Felipe, Guanajuato.	42
Tabla 5. Lectura mediante espectrofotómetro que indica mala calidad de ADN44	
Tabla 6. Combinaciones de oligonucleótidos con la TM elegida.....	46
Tabla 7. Presencia y grado de polimorfismo en las combinaciones de oligonucleótidos de ISTR en <i>Agave</i>	48
Tabla 8. Variabilidad genética obtenida para cada una y el total de las poblaciones, a partir de la heterocigosis esperada (H_e), heterocigosis observada (H_o) y porcentaje de loci polimórficos (% P), con el criterio del 95% de confianza, así como el número de individuos que se utilizaron en cada población (N).....	57
Tabla 9. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de los grupos de Agave identificados mediante los marcadores moleculares ISTR. Realizado con GenAlEx 6.501.....	59

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
ADN	Ácido desoxirribonucléico
AFLP	Del ingles Amplified fragment length polymorphism
AMOVA	Del ingles Analysis of molecular Variance
ARN	Ácido ribonucleico
CAM	Crassulacean Acid Metabolism
CTAB	Del ingles Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
DNTP	Del ingles Deoxynucleotides Triphosphates
DO	Denominación de origen
DOM	Denominación de Origen del Mezcal
ET	Elementos Transponibles
F	Forward
H	Heterocigocidad
He	Heterocigosis esperada
ISTR	Inverse Sequence tagged repeat (Repeticiones invertidas de secuencias etiquetadas)
LINES	Long Terminal Sequences (Secuencias terminales largas)
NTSYS	Software estadístico y análisis de datos
<i>P</i>	<i>Loci</i> polimorfo
PCR	Del Inglés Polimerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
R	Reverse
RAPD	Random Amplification of Polymorphic
TFPGA	Del ingles Tools for Population Genetics Analysis
TM	Del ingles Temperature Melting
UPGMA	Ungweighted Paired Group Method Using Arithmetic Average

I.RESUMEN

México es considerado un país "megadiverso". En su territorio se encuentra entre un 12 y 15 % de las especies vegetales conocidas por la ciencia, además de ser centro de origen de un gran número de ellas. La familia *Agavaceae* es endémica de América pero su mayor centro de riqueza y diversidad se encuentra en México. El uso y aprovechamiento que los antiguos pobladores y hasta la fecha, ha hecho del aprovechamiento de las especies de la familia *Agavaceae* una cultura. El estado de Guanajuato tiene gran presencia de especies del género *Agave*. Uno de los principales usos es la producción de bebidas destiladas, mezcal y tequila. Pero la estandarización de las técnicas de producción así como la reducción legal de las especies que como materia prima se usa para la elaboración de los mezcales, han traído como desventajas la reducción de la diversidad genética. La diversidad genética o variabilidad genética es la razón principal para que un determinado taxón tenga la oportunidad de evolucionar a condiciones cambiantes del ambiente. Los marcadores moleculares son una gran herramienta para el conocimiento de la diversidad genética. Los marcadores Inverse Sequence Tagged Repeat (ISTR) basados en secuencias de retrotransposones, han sido utilizados en la medición de diversidad genética. En este estudio se determinó la diversidad genética de los agaves mezcaleros de San Felipe Guanajuato, se utilizaron marcadores moleculares ISTR, obtenidos por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se realizó la experimentación con un total de 86 individuos pertenecientes al género *Agave* obtenidos mediante muestreos dirigidos en el municipio de San Felipe. Mediante el método UPGMA, distancia entre grupos y AMOVA, se determinó la diversidad genética de los agaves mezcaleros del municipio de San Felipe, Guanajuato. Los resultados permiten confirmar la reproductibilidad de los marcadores ISTR en el género *Agave*.

Palabras clave: *Agave*, San Felipe, Diversidad genética, marcadores moleculares, Inverse Sequence Tagged Repeat, Reacción en Cadena de la Polimerasa.

II. INTRODUCCIÓN

México está considerado como un país “mega diverso” no solo por poseer un alto número de especies de plantas y animales, sino también por su diversidad genética y de ecosistemas. Ocupa el quinto sitio en cuanto a especies vegetales y es centro de origen de un gran número de ellas. Se estima que en el país se encuentra entre 10 y 12% de las especies vegetales conocidas por la ciencia. Prácticamente los principales tipos de vegetación del mundo se encuentran representados en el país. Esta diversidad en organismos y comunidades se debe a distintos factores que han interactuado, entre ellos podemos mencionar los aislamientos, hibridaciones, hibridación introgresiva, poliploidía, selección natural, migraciones, interacciones con los demás organismos incluyendo al hombre, o bien, factores físicos como el sustrato geológico, la topografía, el suelo, el clima, etc. La familia Agavaceae, es endémica de América (Arizaga y Ezcurra, 1995). En México se encuentra el mayor centro de riqueza y diversidad de esta familia, donde se distribuyen 261 especies (75 % del total) con 171 endémicas (70%) (Eguiarte, 2000). El género más grande y diverso es *Agave* con 159 especies, 119 endémicas de México, cifra que representa el 74% (García-Mendoza, 2011). En México los agaves han tenido y tienen una gran importancia económica y cultural para numerosos pueblos indígenas y mestizos, que los han aprovechado durante siglos como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, cobijo, ornato, fibras duras extraídas de las hojas (ixtle), abono, construcción de viviendas y elaboración de implementos agrícolas, entre otros usos (García, 2007).

En el Estado de Guanajuato la presencia de especies del género *Agave* es muy extensa, debido principalmente a las condiciones climatológicas y tipos de suelo, condiciones que comparte con los estados vecinos de San Luis Potosí y Jalisco, también productores de mezcal y tequila respectivamente. Al noreste del estado se encuentra el municipio de San Felipe, ahí existen áreas de distribución natural así como plantaciones de agave realizadas con un doble propósito; la reforestación y la producción de mezcal, la mayoría de éstas fueron llevadas a cabo por la Secretaria de Agricultura Ganadería Desarrollo

Rural Pesca y Alimentación (SAGARPA). En ellas es posible encontrar a especies del complejo *Salminae*, uno de los más importantes en la historia cultural de Mesoamérica debido a su alto grado de humanización (domesticación) además de ser el más joven del género *agave*. Actualmente la industria productora de tequila y mezcal está teniendo gran importancia, pero la uniformización de la técnica para la producción de estas bebidas, ha llevado al establecimiento de pocas especies como materia prima y la utilización de un material genético único que trae como resultado algunos inconvenientes, uno de los más importantes es el nulo intercambio genético.

La diversidad genética dentro de las especies, es la razón principal para que un determinado taxón tenga la oportunidad de evolucionar bajo condiciones cambiantes del ambiente a presiones de selección (Eguiarte *et al*, 1999). La utilización de los marcadores moleculares, tiene una amplia historia de aplicación para el conocimiento de la diversidad biológica y la mejora genética (Espinel y Aragonés, 1997). Los marcadores moleculares han sido muy usados en los vegetales para la determinación de las relaciones filogenéticas intra e interespecíficas en las especies, historia evolutiva y los patrones de desarrollo (Aguirre, 2001). Los ISTR son marcadores basados en secuencias de retrotransposones y estos son elementos genéticos que se mueven dentro del genoma de un organismo vía ARN, existen en la mayoría de las plantas y son secuencias que se auto-repican y reinsertan en diferentes partes del genoma (Torres *et al*, 2006). Montalvo *et al* (2010) usaron marcadores moleculares ISTR (Inverse Sequence-Tagged Repeat) para la identificación de la variabilidad genética de la especie de cactus en peligro de extinción: *Pilosocereus sp.* Esta experimentación mostró resultados positivos. Torres (2009) utilizó marcadores ISTR para la determinación de la variabilidad genética *Agave duranguensis*, utilizado para la fabricación de mezcal al sur de Durango. Los ISTR mostraron alta sensibilidad para mostrar la variabilidad genética del *Agave duranguensis*. Torres *et al* (2006) encontraron que los marcadores moleculares ISTR son efectivos para discriminar las muestras de ADN de *Agave tequilana* y de *Agave cocui* y así como la efectividad mostrada para la detección de polimorfismo

entre las muestras de agave utilizadas. Los marcadores moleculares ISTR produjeron más marcadores polimórficos que los marcadores AFLP, mostrando con ello mayor capacidad discriminadora (Demey *et al*, 2004).

En el género *Agave* aún queda mucho campo para la caracterización y conocimiento de la diversidad genética (Barraza *et al.*, 2006; Torres, 2009). La pérdida de la biodiversidad se ve afectada por su desconocimiento, así como por la pérdida de tradiciones y culturas que han coevolucionado entre el humano y los seres vivos. El Municipio de San Felipe Guanajuato presenta las condiciones para el aprovechamiento de los recursos naturales como lo es el Agave, pero un uso irracional traería como consecuencia un efecto negativo sobre la diversidad natural y cultural de la región.

Este trabajo de investigación tuvo como propósitos la determinación de la diversidad genética del género *Agave* como una herramienta útil para el conocimiento de esta planta que posibilitará hacer un uso racional y sustentable de este recurso (Torres, 2009). El trabajo fue centrado en el uso de marcadores moleculares para conocer la variabilidad genética de las especies como parte de las nuevas tendencias mundiales de conservación y uso sustentable de los recursos y, aunque las especies no se encuentren en peligro de extinción, el conocimiento oportuno de su diversidad genética, dispersión e historia evolutiva, otorgará mayor facilidad para la toma correcta de decisiones encaminadas al uso sustentable de los recursos.

III. OBJETIVO GENERAL

Determinar la variabilidad genética de los agaves mezcaleros en el municipio de San Felipe, Guanajuato.

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Localizar las áreas con presencia de agave mezcalero en San Felipe, Guanajuato.

Identificar y caracterizar taxonómicamente las diferentes especies de agave en San Felipe, Guanajuato.

Determinar la diversidad genética de los agaves mezcaleros con marcadores moleculares ISTR.

V. HIPÓTESIS

Existe diversidad genética entre las especies de agave mezcalero presentes en el municipio de San Felipe Guanajuato.

VI. REVISIÓN DE LITERATURA

1. Agavaceae

El Maguey (*Agave* spp.) es una planta perteneciente a la familia *Agavaceae*, la cual es de gran importancia social, económica y ecológica en México debido a que numerosos pueblos indígenas y mestizos la han aprovechado durante siglos como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible y cobijo, entre otros (Gentry, 1982; Eguiarte *et al.*, 2000). Además, su comportamiento biológico es extraordinario debido a su capacidad para hacer un uso más eficiente de la escasa precipitación y de la fertilidad limitada del suelo especialmente en regiones de clima semiárido, donde las perspectivas productivas con cultivos tradicionales son limitadas.

La familia *Agavaceae*, es endémica de América (Arizaga y Ezcurra, 1995; Rzedowski y Rzedowski, 2001), se originó hace aproximadamente 15 millones de años (Figura 1) está conformada por ocho géneros (*Agave*, *Beschorneria*, *Furcraea*, *Hesperaloe*, *Menfreda*, *Polianthes*, *Prochnyanthes* y *Yucca*) y alrededor de 300 especies (Rzedowski y Rzedowski, 2001). En México se encuentra el mayor centro de riqueza y diversidad de esta familia, donde se distribuye 75 % de estas plantas (261 especies) de las cuales 70% son endémicas (171 especies) (Eguiarte, 2000).

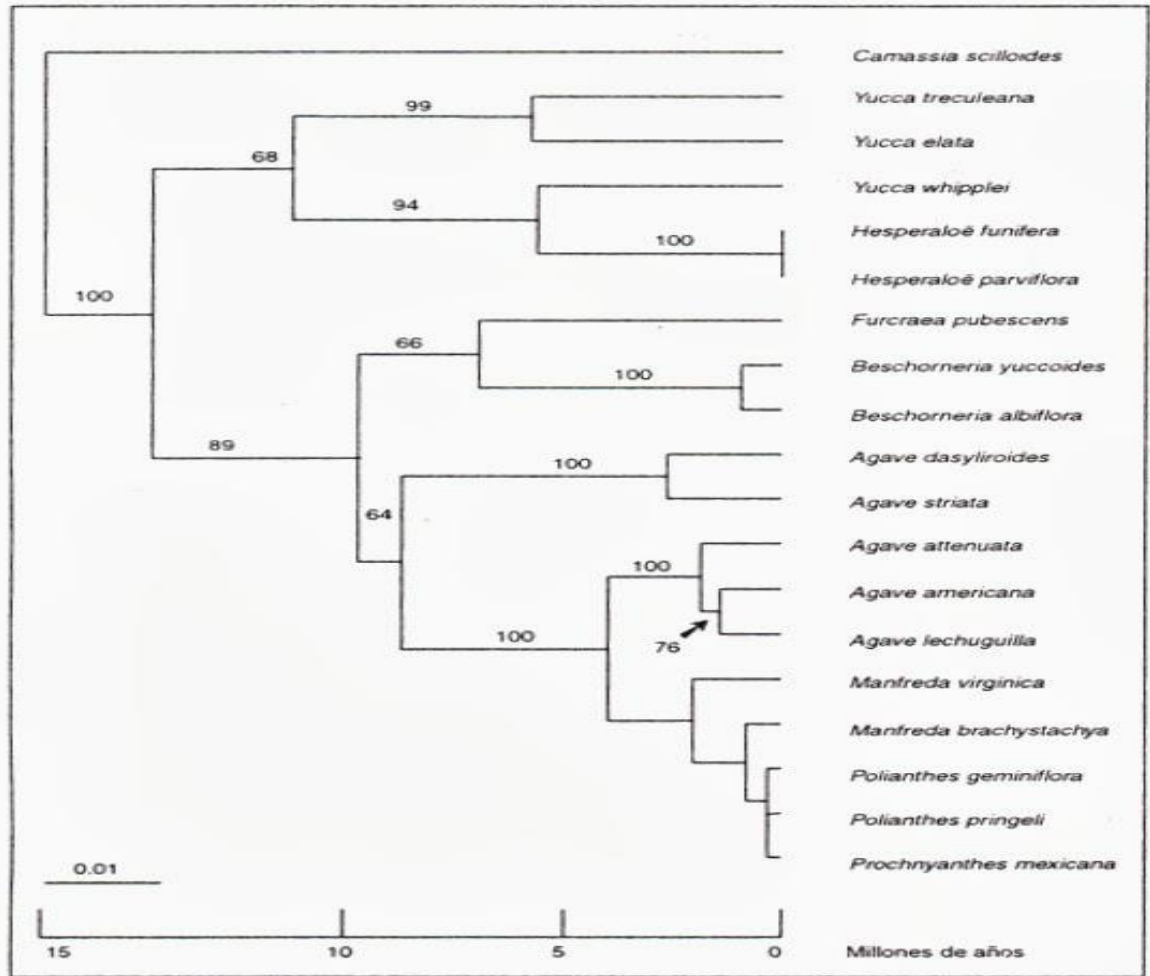


Figura 1. Filogenia molecular de la familia Agavaceae, el reloj molecular considera el origen de la familia hace 15 millones de años. Fuente: Eguiarte, 2000.

1.2. Morfología de Agavácea

Las plantas pertenecientes a esta familia son herbáceas, arbustivas o arborescentes, a menudo cuentan con rizomas fibrosos, cilíndricos o globosos bien desarrollados; sus hojas están dispuestas en rosetas basales o terminales con formas que van desde lineares, linear-lanceolada, ampliamente lanceoladas hasta ovadas u oblanceoladas, de textura membranosa, subcoriácea y coriácea a carnosa. Los márgenes de las hojas son enteros serrulados o con dientes aculeiformes, rara vez filíferos, su zona apical puede o no estar provista de una espina terminal pungente. Tienen inflorescencias terminales, en forma de racimo, espiga o panícula simple o compuesta, laxa o densa, la forma de las flores puede ser actinomorfas o zigomorfas de reproducción hermafrodita.

Los segmentos del perianto están dispuestos en dos series de tres elementos formando un tubo de longitud variable, en cuya base están insertos seis estambres de filamentos filiformes o engrosados y anteras peltadas con dehiscencia longitudinal. El ovario es trilobular y puede estar súpero o ínfero con numerosos óvulos anátropos de forma filiforme o columnar. Los estigmas pueden ser capitados o trilobados. Los frutos tienen forma de cápsula loculicida o a veces carnosa e indehisciente y semillas delgadas, aplanadas que varían de la forma deltoidea a la semicircular, de color negro provisto por el fitomelano (Figura 2).

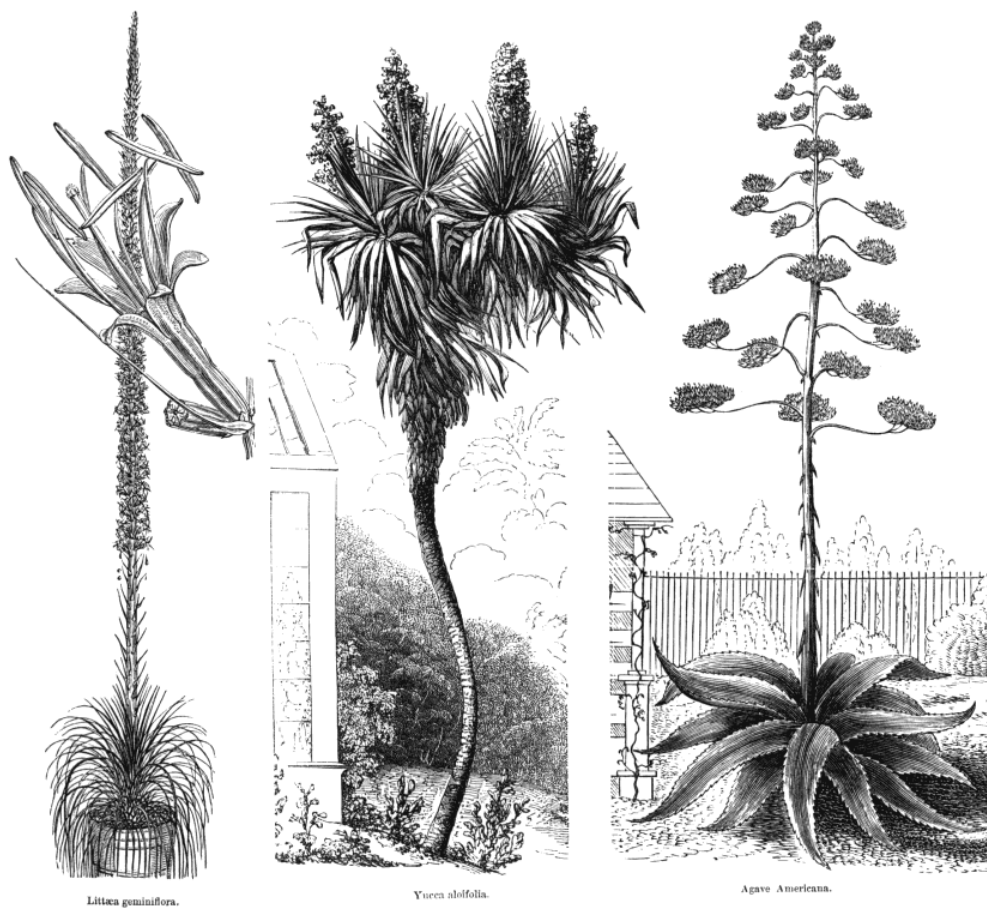


Figura 2. Inflorescencia de Litteae, Yucaceae y Agave

2. El género *Agave*

El género agave se ubica como un grupo parafilético (Figura 1) es decir que aunque el grupo comparta un antepasado común no todos los descendientes pertenecen a él. El género es endémico de América, surgió hace aproximadamente 8 millones de años y fue descrito por primera vez en 1753 por Linneo en su libro *Species Plantarum*, proviene del vocablo griego *Agavos* que significa "noble o admirable" (Eguiarte y González, 2007).

2.1 Morfología de *Agave*

Las especies de este género son plantas perennes, generalmente con vástagos presentes, en ocasiones bulbíferas a nivel de la inflorescencia, raíces fibrosas con desarrollo radial poco profundo, acaules o con tallos cortos y gruesos, simples o ramificados; hojas grandes, dispuestas en roseta, con frecuencia suculentas, ápice con espina terminal. Márgenes de las hojas enteros, provistos de dientes aculeiformes, o bien, filíferos; la inflorescencia espigada, racimosa o paniculada, flores son protándricas, segmentos del perianto unidos en un tubo de longitud variable, iguales o dimórficos, erectos o curvados, imbricados; los estambres exsertos, filamentos con inserción en el tubo o en la base de los segmentos, anteras versátiles; el ovario suculento, de paredes gruesas, óvulos dispuestos en dos series por lóculo, estilo alargado, filiforme, tubular, estigma trilobado, papiloso-glandular; capsula globosa, oblonga a suboblonga, loculicidad, semillas planas negras (Rzedowski y Rzedowski, 2001).

2.2 Diversidad y distribución del género *Agave*

Agave sensu lato cuenta con alrededor de 200 especies que es posible encontrar al sur de los Estados Unidos (con dos especies disyuntas en Florida) hasta Colombia y Venezuela, incluidas todas las islas del Caribe (García, 2007). México es considerado el centro de origen y diversidad del género *Agave* (Colunga *et al*, 2007; Eguiarte *et al*, 2000), debido a que en su territorio se distribuye la mayor parte de las especies (75%) pertenecientes al género *Agave*, divididas en dos subgéneros: 1) *Littaea* con 47 especies en ocho diferentes grupos, 2) *Agave* con 103 especies clasificadas dentro de 12 grupos

(García, 2007). El aspecto morfológico utilizado para dividir estos dos subgéneros es el tipo de inflorescencia, mientras que para *Litsea* es de apariencia espigada, para *Agave* las inflorescencias son paniculadas y las flores se encuentran en grandes agregados umbelados sobre pedúnculos laterales (Gentry, 1982).

El género agave en México se encuentra distribuido en más del 75% del territorio, sin embargo, ésta distribución no es uniforme ya que existen regiones con mayor presencia de especies que otras. El gran endemismo y diversidad existente en México es debido a la heterogeneidad del territorio y a las propiedades intrínsecas de cada taxón, tales como su plasticidad genética, tolerancia ecológica, capacidad de dispersión, germinación de sus semillas, así como de las interacciones bióticas con otros organismos como polinizadores, y a factores que influenciaron en Norteamérica la distribución actual, uno de ellos es el contacto con el humano hace aproximadamente 10 mil de años, lo cual aumentó explosivamente su diversificación (García, 2007; Gentry, 1982). La mayor diversidad de especies se encuentra en las provincias áridas y semiáridas del centro y norte del país, que van desde las zonas áridas y semiáridas de la península de Baja California, Sonora, el Altiplano Mexicano (de Chihuahua y Coahuila a Guanajuato y Querétaro), la planicie Tamaulipeca, el Valle de Tehuacán-Cuicatlán y la Cuenca del río Balsa. Se les puede encontrar como dominante o codominante los diferentes tipos de matorral xerófilo así como también es posible encontrarlo en bosque tropical caducifolio, bosque espinoso y pastizal.

2.3 Aspectos fisiológicos de Agave

Los agaves son plantas xerofitas perenes, adaptadas a vivir en condiciones climáticas desfavorables con largos periodos de sequía y altas temperaturas. Una de las adaptaciones más sobresalientes para su supervivencia en las zonas áridas es el Metabolismo Acido de las Crasuláceas (CAM, por sus siglas en inglés Crassulacean Acid Metabolism) (García, 2007). De las 1500 plantas CAM desérticas suculentas, 1200 pertenecen a la familia Cactaceae y 300 a la

Agavaceae (Luttge, 2004). No todas las especies del género *Agave* son CAM, algunas son facultativas, como en el caso de *Agave deserti* o *Agave mapisaga*, que por la mañana o por la tarde pueden abrir sus estomas para capturar carbón como las C3. El sistema de reproducción es de tipo semelparo o monocárpico, es decir, las plantas mueren después de reproducirse, algunas especies son iteroparas o policárpicas es decir, pueden tener más de una floración en su vida. La polinización es realizada por murciélagos, aves e insectos y se propone que para *Agave Sensu stricto*, la polinización es a través de murciélagos, mientras que para los del género *Littaea* es a través de insectos (Rocha, 2006). En la etapa reproductiva del agave, interviene la inulina. La inulina es el carbohidrato de reserva en las plantas del género *Agave*, es un polisacárido formado por 35 unidades de fructosa y dos de glucosa. Durante la etapa vegetativa de la planta, la inulina se concentra en el tallo y esta es utilizada hasta la etapa de reproducción cuando las demandas energéticas son mayores, en ese momento la inulina se hidroliza mediante la exoinulinasa, de ahí proviene la glucosa y la fructosa las cuales abastecerán los requerimientos energéticos. El tallo o quiotillo son los mayores reservorios de fructosa (Michel, 2007). La mayoría de los agaves se reproducen de manera asexual, produciendo clones en diferentes partes de la roseta o la inflorescencia -los estolones- o por rizomas. Un ejemplo de la utilización de esta cualidad por el hombre son los extensos plantíos de *Agave tequilana* weber var., azul en Jalisco.

3. Los agaves y su humanización

Rzedowski (1999) concluye que en México las condiciones que permiten la gran diversificación de la flora, quedaron establecidas desde el Terciario moderno. La gran diversidad que existe de agaves en México, además de las condiciones geográficas y climáticas que permitieron que existiera tal diversidad, se debe también a que éstas plantas fueron manejadas por un grupo de humanos que aumento explosivamente su variación (Gentry, 1982 y Eguiarte, 2007). Es por eso que en México este grupo de plantas ha tenido y tiene una gran importancia económica y cultural para numerosos pueblos indígenas y mestizos. Durante

siglos el agave se ha aprovechado como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, cobijo, ornato, fibras duras extraídas de las hojas (ixtle), abono, construcción de viviendas y elaboración de implementos agrícolas, entre otros usos (García, 2007).

El uso de las bondades del agave estaba tan dentro de la cultura que, por ejemplo, entre los aztecas, el pulque (la bebida resultante de la fermentación de la savia de agave) se usaba en festividades religiosas y su preparación era precedida de ceremonias y sacrificios. En el pueblo, el uso de estas bebidas se limitaba a personas enfermas, mayores de 50 años o en trabajos pesados, y siempre en cantidades moderadas. Las borracheras eran severamente castigadas; se le cortaba el pelo a los borrachos y se les destruían sus casas (Bukasov, 1963).

Al proceso en el que las plantas se modifican a través del tiempo junto al uso que el humano les da, se conoce como "humanización". La humanización de la biota se puede ubicar en tres fases, de las cuales la domesticación es la última. La primera fase es la recolección de especies que son útiles y que reaccionen en forma positiva a la humanización, la segunda es el cultivo incipiente de los individuos que muestren la mejor respuesta y la diferenciación genética en la que las especies más exitosas se diferencian de manera morfológica y fisiológica. No todas las especies u organismos sometidos al proceso de humanización llegan hasta la tercera fase, esto es que, existen muchas especies en las que puede obtenerse algún uso sin necesidad de eliminar o atenuar sus características silvestres delimitando con ello su etapa de domesticación. La sección Salminae del genero *Agave* tiene las tres fases de humanización representadas en especies dentro de grupo, estas son *Agave macroculmis* como especie silvestre, *Agave salmiana* y sus variantes (Subespecies y variedades) como intermedias y por último *Agave mapisaga* como especie domesticada (Mora *et al.*, 2011). En el análisis de 13 características morfológicas Mora *et al* (2011), ubicaron a las hojas y los

dientes, como adecuadas y suficientes para identificar y reconocer un gradiente de humanización en la sección Salminae.

3.1 Los agaves y las bebidas

En la alimentación precolombina existían dos grupos de agaves domesticados; los "magueyes" aguamieleros-pulqueros cultivados en las zonas templadas y altas como el altiplano central, y los agaves mezcaleros (mezcales) (Valenzuela, 2007). La domesticación de los agaves mezcaleros es evidente por ser plantas con tallos cortos, bases o vainas de las hojas gruesas y su palatabilidad agradable después de la cocción, las especies de agave con reporte de utilización para producción de mezcal se presentan en la Tabla 1. En los agaves aguamieleros la humanización se hace evidente debido a que son agaves de grandes dimensiones y gran succulencia como: *Agave salmiana*, *Agave mapisaga*, *Agave macroculmis*, *Agave hookeri*.

Tabla 11. Especies con reporte de uso para mezcal en México (Schneivar, 2008)

Especie	Nombre común	Distribución
<i>A. angustifolia</i>	chelem (Maya), doba-yej (Zapoteco), hamoc (Seri), juya cuu (Mayo), y avi incoy o (Mixteco),	Neovolcánico, Sierra Madre del Sur, Península de Yucatán.
<i>A. salmiana</i>	Mbänuada (Otomí), bronco, cimarrón, manso, verde.	Altiplano Zacatecano-Potosino, Sierra madre
<i>ssp. crassispina</i>	Mbänuada (Otomí), bronco, cimarrón, manso, verde.	Occidental, Eje Neovolcánico y Depresión del Balsas y Sierra Madre del Sur.
<i>A. maximiliana</i>	Lechuguilla, manso tecolote	Sierra madre occidental y oriental.
<i>A. duranguensis</i>	Cenizo	Sur de la sierra madre occidental y oeste de Eje Neovolcánico
<i>A. inaequidens</i>	ocumel (náhuatl), lechuguilla.	Sur de la sierra madre occidental y oeste de Eje Neovolcánico
<i>A. cupreata</i>	papalometl (náhuatl), y alabeándose (mixteco), ancho, cimarrón, maguey de mezcal, papalote, tuchi.	Depresión del Balsas.
<i>A. potatorum</i>	biliá, dob-bé, bob-lá (zapoteco), papalometl (náhuatl), y auiticushi (mixteco), maguey de monte.	Depresión del Balsas y Noreste de Sierra
<i>A. americana</i>	t' ax' uada (otomí), teometl (náhuatl), americano mezcal, serrano.	Norte de Sierra madre Oriental, sur del altiplano Zacatecano-Potosino y Sierra madre del sur oaxaqueña
<i>A. karwinskii</i>	al-mal-bi-cuish (chontal), bicuixe, dob-cirial, madre cuixe, tobasiche (zapoteco), cachutum (popoloca), barril, cirial	Zona central de la Sierra madre del sur en Oaxaca.
<i>A. rhodacantha</i>	quixe, mexicano, mezcal, maguey de monte	Desierto sonorense, costa del pacífico
<i>A. lophanta</i>	estoquillo, lechuguilla, mezortillo	Vertiente al Golfo de la Sierra Madre Oriental.
<i>A. tequilana.</i>	tequila (nada más).	Cultivada.
<i>A. marmorata</i>	du-cual (zapoteco), pitzometl (náhuatl), maguey de caallo, curandero, tepezate	Sierra Madre del Sur
<i>A. americana</i>	dua-bzog (zapoteco), y avi cuan (mixteco), arroqueño, blanco, castilla cenizo	Valle de Tehuacán y extremo oriental de la Cuenca del Balsas.
<i>A. funkiana</i>	Henequén, Ixtle de Jaumavé, Lechuguilla,	Sierra Madre Oriental.
<i>A. hookeri</i>	Ixquitécatl (náhuatl), mezcal Bravo	Depresión del Balsas.
<i>A. kerchovei</i>	Cacalla, tunecho de cacaya, Cachrojá (popolca), Duba-gu (zapoteco), Ixtle amarillo, lechuguilla dura.	Sierra madre del sur, porción oriental del eje Neovolcánico y sur de Sierra Madre Oriental.
<i>A. palmeri</i>	Agave de palmeri, chino bermejo, lechuguilla, mano larga	Desierto sonorense
<i>A. scabra</i>	Lechuguilla, Maguey bruto, Maguey cenizo. Maguey de cerro, Maguey mezcal, Maguey serrano,	Desierto Chihuahuense.
<i>A. seemanniana</i>	Maguey chato	Chiapas a Nicaragua
<i>A. shrevei</i>	Mahí tofosa, Totosá, Tosali u O'tosák, Mé (Raramuri), Bacanora, Ceniza, Lechugilla	Sonora y Chihuahua-Sonora

Con la llegada de los españoles a América, los agaves también formaron parte de los tesoros que encontraron. Con la introducción de nuevas tecnologías como la destilación (técnica de origen asiático introducida a las Américas por los europeos) se generaron nuevas bebidas en América, dando origen a las bebidas destiladas.

La palabra mezcal proviene del Náhuatl *mexcalli*, que significa maguey cocido (Carrillo, 2007). Toda bebida destilada de alguna planta del género *Agave* es considerada tradicional y técnicamente como un mezcal (antiguamente llamado "Vino mezcal"), así, el tequila y el Bacanora, son un mezcal. Esto no podría aplicarse para Xotol, pues esta bebida, aunque es un destilado también, es proveniente de plantas del género *Dasyliirion*, pertenecientes a otra familia de las *Monocotiledoneae*; *Nolinaceae* o *Convalariaceae* respectivamente, que se encuentran filogenéticamente separadas unos 50 millones de años de la familia *Agavaceae* (Eguiarte y González, 2007; Valenzuela, 2007).

La introducción de este proceso innovador para la producción de una nueva bebida, trajo consigo efectos sobre la producción de aguamiel. Es por esto que los factores que minaron el consumo de las bebidas de agave, fueron limitantes antropogénicas y en menor medida técnicas (Zapata, 2007). Una vez que se logró mediante un proceso de destilación obtener el "Vino mezcal" del fermento de los jugos de agave, éste comenzó a tener fuerte competencia con los licores de uva del viejo continente, provocando que se prohibiera la producción del destilado durante un siglo (Aguirre y González, 2007). Así también para las bebidas fermentadas como el pulque, el mayor enemigo fue el creciente consumo de cerveza en México, aunado a esto, la dificultad existente para envasar estas bebidas (Zapata, 2007). Los estados de Hidalgo, Tlaxcala y Estado de México, fueron los productores de pulque más importantes de todo México. En segundo lugar se encuentran los estados de Guanajuato, Querétaro, Puebla, Veracruz, Michoacán, San Luis Potosí, Distrito Federal, Oaxaca y Tamaulipas (Bukasov, 1963). Mientras que los mayores productores

de mezcal en el país son: Guerrero, Oaxaca, Durango, San Luis Potosí y Zacatecas (Carrillo, 2007).

3.2. Denominación de origen

La designación de los productos agroalimentarios con el nombre de su lugar de producción y venta es una práctica antigua que les confiere un valor especial o merito particular al ser reconocida la fuerte unión entre el entorno natural, el hombre y sus especificidades históricas y culturales que en conjunto configuran las características propias y la calidad de los productos (Carrillo, 2007; Valenzuela, 2007).

En México hay catorce productos con Denominación de Origen dentro de los que se encuentran cinco bebidas destiladas: mezcal, tequila, bacanora, sotol y charanda. El mezcal mantiene el nombre genérico a diferencia del tequila y Bacanora, este nombre se debe a la llamada región del mezcal en Oaxaca. La Denominación de Origen del Mezcal (DOM) se encuentra regulada por la Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994. Esta norma permite la utilización de diferentes agaves en la producción de mezcal: *Agave angustifolia* Haw, *Agave esperima* Jacobi, *Agave weberi* Cela; *Agave potatorum* Zucc y *Agave salmiana* Otto ex Salm. *Agave salmiana* ssp *crassispina*, *Agave salmiana* ssp *salmiana*, *Agave cupreata*. Así como cualquier otra especie de agave, siempre y cuando no sea utilizada como materia prima, para la elaboración de otras bebidas con Denominación de Origen en el mismo estado, y que sean cultivadas en las entidades federativas, municipios y regiones que señala la Declaración General de Protección a la denominación de origen en vigor. La DOM se otorgó por primera vez en 1994 para los estados de Guerrero, Oaxaca, Durango, San Luis Potosí y Zacatecas. Para el año 2003 sufre la primera modificación en la que se incluyen algunos municipio del estado de Tamaulipas, y para el año 2004 se incluye al municipio de San Felipe como único poseedor de esta protección en el estado de Guanajuato, entre otras cosas, por compartir las mismas condiciones climatológicas que sus estados vecinos pertenecientes también al Altiplano Potosino y a su amplia historia mezcalera que data desde el siglo XVII (Aguirre, 2008).

San Felipe es el municipio con mayor superficie en el estado, actualmente la producción de mezcal se mantiene de forma artesanal y semi-industrial (Mandujano, 2013). Sin embargo la Denominación de Origen del Mezcal está siguiendo el mismo patrón que la del tequila, la estandarización de los procesos, reduciendo con ello la diversidad de la producción y hasta de las especies con que se elaboran (Valenzuela, 2007). Con estas prácticas se elimina toda diversidad de especies, el paisaje y se alteran los procesos naturales, además de que se pierde no solo las otras especies de las que se puede producir mezcal, sino también los recursos genéticos (Eguiarte y González, 2007).

Según la CONABIO (2000), en México se produce mezcal de alrededor de 26 especies (Tabla 1). Pero la estandarización de producción, en la que el máximo beneficio paga cualquier costo y que busca los mayores rendimientos, lleva a la búsqueda de las mejores especies para la mayor producción de los destilados, esto, lleva implícita una visión minimista de un aspecto importante dentro de la evolución, la diversidad genética.

4. La Biodiversidad

La diversidad biológica o biodiversidad tiene su origen en la formación de especies nuevas y extinción de otras que podrían no adaptarse a las condiciones ambientales cambiantes a través de miles de millones de años. Este concepto está formado por la diversidad genética, diversidad de especie y diversidad ecológica. La diversidad genética se refiere a la variabilidad de la información genética entre individuos de una misma especie; la diversidad de especie a la variedad de las especies existentes en diversas partes del planeta bosques, praderas, desiertos lagos y océanos; y la diversidad ecológica comprende la variedad de bosques desiertos y praderas, ríos lagos y otras comunidades biológicas que interactúan entre sí y con sus ambientes no vivos (Tyler, 1994).

4.1. Diversidad genética

La variabilidad genética o diversidad genética en sentido amplio es el componente más básico de la biodiversidad, se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones de una especie (Ericcson, 2000). Ante la importancia de la variación genética, los estudios de la genética de población se han incrementado con el objetivo de entender y disminuir problemas como la pérdida de la variación genética y depresión endogámica (Rocha, 2006), enfrentados generalmente por poblaciones pequeñas (Eguiarte *et al*, 2007).

La diversidad genética, se debe a las variaciones en la secuencia del genoma, por esto, en un sentido amplio se puede decir que diversidad es sinónimo de polimorfismo. Actualmente se debe entender por polimorfismo a la existencia simultánea en una población de genomas con distintos alelos para un *locus* determinado (Eguiarte *et al*, 2007). El grado de polimorfismo de una población es tanto mayor cuantos más individuos contenga, viene determinado por el número de alelos distintos existentes para un *locus* concreto y se refleja en el grado de heterocigosis (Lewin, 2008). Entre los vegetales, el polimorfismo por cromosomas supernumerarios alcanza mayor importancia que entre los animales, en general las formas poliploides se muestran mejor adaptadas a condiciones extremas o son más eurioicas, esto se atribuye a tener un sistema súper genético más estable y más rico en genes (que a su vez puede diversificarse). Pero todo sistema poligénico dificulta la separación y aislamiento de mutantes y, por tanto, retarda la evolución, y tiende a estabilizar la estirpe (Margalef, 1980). Las variaciones en: secuencias, número de nucleótidos de ADN, número y estructura de cromosomas, son utilizadas para medir la diversidad genética. La variación en el tamaño del genoma tiene significado adaptativo e influye sobre el fenotipo de dos formas, en la expresión de su contenido génico y en los efectos físicos de su masa y volumen. El cariotipo del Agave es un cariotipo bimodal (5 + 25) es decir, tiene 5 cromosomas grandes y 25 del mismo tamaño, significando esto que el agave tiene un numero cromosómico base $X= 30$ según Moreno *et al* (2007), existe en

el agave una relación entre el peso del ADN y la ploidía, aunque esta relación no siempre se mantiene. Es por eso que no en todos los agaves, aunque sean de la misma especie pero provenientes de distintos lugares, se debe asumir que la ploidía se mantiene (Moreno, 2007).

4.2. El origen de las especies

Charles Darwin fue uno de los primeros científicos que planteó las causas de la diversidad de especies, en su libro "El origen de las especies", da énfasis claro a las condiciones físicas que permiten esa diversidad y era algo que en esa época no necesitaba discusión, pero sabía que algo faltaba, como se puede apreciar en el siguiente fragmento "*Los naturalistas continuamente aluden a condiciones externas, tales como clima, alimento etc., como la sola causa posible de la variación. En un sentido limitado, puede ser esto verdad, pero es absurdo atribuir a causas puramente externas la estructura, es igualmente absurdo explicar esas estructuras y sus relaciones con varios seres orgánicos distintos, por efecto de las condiciones externas, de la costumbre o de la voluntad del individuo mismo*" (Darwin, 1885). Darwin, al igual que Mendel utilizó la caracterización fenotípica meticulosa (marcadores morfológicos) de los individuos para inferir de manera inductiva sus leyes (genética clásica). Mediante esta práctica Darwin, entre otras cosas dejó claro que las especies no tienen conciencia sobre sus mutaciones y en cambio, propone la capacidad acumulativa de la selección natural. En este sentido una de las adaptaciones más sorprendentes causadas por la selección natural en los agaves es la forma de polinización, ya que en el caso del *Agave salmiana* ésta depende de algunos insectos y murciélagos del orden *Leptonycteris* y *Choeronycteris* (Gentry, 1982), y en los que su ciclo de vida está acorde al periodo de floración del agave, mientras que las especies de agaves del grupo *Littea* como el *Agave lechuguilla*, su polinización depende de insectos nectaríferos. Esta diferencia, además de ser utilizada como una característica para la diferenciación de los grupos, también tiene implícita el nivel de variación puesto que las especies polinizadas predominantemente por murciélagos presentan una diferenciación génica menor y un flujo génico mayor (Rocha, 2006). Para 1883, Darwin ya

había establecido cuales eran las fuerzas evolutivas como; la selección natural, deriva génica, la endogamia, flujo génico y mutación. Y aunque no propone una explicación de cómo sucede la mutación, si atribuye a los órganos sexuales la capacidad generadora de esta. Dentro de las fuerzas evolutivas, la mutación es la causante de aumentar los niveles de variación, la deriva génica y la endogamia la disminuyen, pero el flujo génico y la selección, son capaz de aumentar o disminuir la variación según sea el caso específico de cada uno (Rocha, 2006). Así pues se puede decir que la evolución es un juego del que no se conserva más registro que la acumulación de los aciertos precedentes.

4.3. Genética clásica

Con la entrada del siglo XX se produce una explosión de nuevos descubrimientos en Genética: se redescubren las leyes mendelianas, se integran los estudios genéticos y citológicos, se revalora la conducta cromosómica en la meiosis, se acuñan los términos gen y genética para describir los factores unitarios y la ciencia dedicada al estudio de los fenómenos de la herencia y de la variación respectivamente, se descubre la herencia ligada al X y la base cromosómica del ligamento, se construye el primer mapa genético, se demuestra definitivamente la teoría cromosómica de la herencia mediante la no disyunción del cromosoma X. Todos estos descubrimientos condujeron a la fundación conceptual de la Genética clásica que conjuntamente con la teoría de la genética de poblaciones integrada a otros programas de investigación evolutiva (biología de poblaciones experimental, la sistemática, la paleontología, la zoología y la botánica) dieron luz, durante el periodo de 1937-1950, a la teoría sintética o neo darwinista de la evolución. En esta nueva teoría se produce la mayor integración de disciplinas, nunca antes alcanzada, de una teoría evolutiva.

5. Genética molecular

Tras la segunda guerra mundial se produce el verdadero asalto a la naturaleza física del material hereditario. La genética de procariotas inicia los nuevos horizontes de indagación. Se establece finalmente el ADN como la substancia

genética. A ello le sigue el descubrimiento del dogma del flujo de la información genética: ADN -> ARN -> proteínas. También se producen grandes avances en el conocimiento de la estructura y función de los cromosomas. Por último, en los setenta surgen los marcadores moleculares que son técnicas de manipulación de ADN, mejor conocidas como técnicas de biología molecular (amplificación; separación y detección de secuencias) que afectarán revolucionariamente a todas las disciplinas de la Genética.

5.1. Marcadores genéticos

Un marcador genético es una característica (producto de la expresión de un gen) de fácil identificación y cuantificación en un individuo que ayuda a su reconocimiento. La importancia de los marcadores radica en que ofrecen la posibilidad de estudiar poblaciones de organismos y seleccionar aquellos que presentan rasgos de interés para el hombre. Existen dos tipos de marcadores: morfológicos y moleculares (Solís y Andrade, 2005).

Los marcadores morfológicos aprovechan las características de forma, color, tamaño, altura, etc., para predecir la respuesta genética a seleccionar. Este tipo de marcadores contribuyó significativamente al desarrollo teórico del ligamiento genético y a la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos (Vázquez *et al.*, 2000).

Los marcadores moleculares como su nombre lo indica buscan diferencias o similitudes en biomoléculas para predecir la respuesta genética de un individuo. Las biomoléculas que pueden ser empleadas como marcadores moleculares son las proteínas (antígenos e isoenzimas) y el ADN (genes conocidos o fragmentos de secuencia y función desconocida) (Simpson, 1997).

A la primera generación de marcadores moleculares se le conoce como marcadores bioquímicos los cuales utilizan como marcador a las proteínas que son el producto primario de los genes. Las proteínas se forman mediante procesos de transcripción y traducción, por lo que se ven menos influidos por el

ambiente a diferencia de los marcadores morfológicos. Las proteínas se identifican mediante el proceso denominado electroforesis que es una técnica que separa las moléculas por su movilidad diferencial a través de un solvente en un campo eléctrico (Becerra, Paredes; 1999). Las diferencias en la movilidad diferencial de las moléculas son el resultado de las diferencias en las secuencias del ADN que codifican tales proteínas.

Los marcadores moleculares tienen la ventaja de que la técnica es relativamente barata, accesible y no destructiva debido a que utiliza pequeñas cantidades de material, sin embargo, su utilización ha sido muy limitada debido a que no permiten cubrir todo el genoma, ya que sólo representan una estrecha fracción del contenido genético por lo que únicamente detectan la variación de los genes que codifican para la expresión de una característica del individuo. Además de que se dificulta la precisión de los datos obtenidos debido al polimorfismo en el tejido de las isoenzimas (por ejemplo, el polimorfismo detectado en una hoja no es el mismo que el que se obtiene usando la semilla del mismo individuo). También tienen polimorfismo ontogenético, lo cual implica que los resultados obtenidos serán muy diferentes al trabajar con material vegetal proveniente de un árbol joven y de otro adulto; además, las isoenzimas son específicas para determinados sustratos (Solís y Andrade 2000).

La nueva generación de marcadores moleculares está constituida por los marcadores de ADN que son capaces de generar una cantidad virtualmente infinita de marcadores a diferencia de los marcadores basados en proteínas. Para la identificación de marcadores de ADN existen diferentes técnicas agrupadas en tres categorías: de hibridación (Southern), de amplificación, y de secuenciación (Arif *et al.*, 2010).

Los marcadores de amplificación están basados en la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) para detección de polimorfismo genético. El polimorfismo se observa debido a que la variación en la secuencia del genoma altera los sitios de reconocimiento del “primer”. Permite la

generación de grandes números de marcadores, su utilización no es técnicamente difícil y solo utiliza mínimas cantidades de material genético. Las técnicas basadas en la PCR difieren entre sí en la longitud y secuencia de los primers empleados, condiciones de la PCR y en el método de separación y detección de los fragmentos. Los marcadores de PCR emplean primers de secuencia arbitraria, semiarbitraria o específica.

5.2. Marcadores ISTR

Los marcadores ISTR (Repetición Marcada de Secuencias Inversas del inglés Inverse Sequence Tagget Repeat), son marcadores moleculares que se detectan por PCR, la ventaja que presentan respecto a otros marcadores y además los hace adecuados para los estudios de diversidad genética son: utilizan iniciadores universales, no es necesaria la radioactividad para su visualización, amplifican un gran número de *loci* (5-100) detectan un polimorfismo considerable, son altamente reproducibles, no requieren gran cantidad ni gran calidad de ADN y se aplican a un amplio espectro de organismos. Cuando se utilizan marcadores dominantes se asume que la presencia/ausencia de bandas corresponde al fenotipo de un *locus* con dos alelos, en el que la presencia de la banda indica un genotipo homocigoto dominante o heterocigoto, mientras que la ausencia indica un genotipo homocigoto recesivo.

5.3. Elementos transponibles y los marcadores ISTR

Debido a que los marcadores ISTR presentan diferentes grados de heterogeneidad en sus secuencias y de polimorfismo, poseen una gran capacidad de detección de variabilidad tanto inter como infra específica y por lo tanto pueden detectar diferencias entre individuos como entre poblaciones, esto se debe a que utilizan las secuencias de los Elementos Transponibles (ET) para su identificación (Lewin, 2008). Los Elementos Transponibles son secuencias de ADN con capacidad de moverse de una región a otra dentro del genoma, forman parte de los genomas de todos los seres vivos y constituyen en algunos casos como en los mamíferos y las plantas, una fracción

cuantitativamente muy importante de su información genética. La estructura base de un ET, es la de una secuencia corta de ADN flanqueada por dos repeticiones terminales y conteniendo en su módulo central uno o más genes cuyos productos son necesarios para su propia transposición, pero sobre esta estructura pueden existir distintas modificaciones (Lewin, 2008). La mayoría de los transposones en los eucariotas pertenecen a la clase I: retrotransposones, la transposición en esta clase, comprende un intermediario obligatorio de RNA, esto es una propiedad exclusiva de los organismos eucariotas y es semejante a la capacidad de los retrovirus de insertar ADN (pro virus) de un genoma vírico RNA en los cromosomas de una célula hospedadora. Dentro de esta clase de transposones se pueden ubicar dos grandes grupos de elementos; en el primer grupo se encuentran los retrotransposones con dos repeticiones terminales largas (LTR, por sus siglas en Ingles Long Terminal Repeat) y aunque ésta es una estructura semejante a la de los retrovirus, se diferencia de ellos al no tener la capacidad infectiva. El segundo grupo de los retrotransposones corresponde a los que no tienen LTRs y se presentan normalmente el extremo 5", están terminados por una cola A en su extremo 3" (Eguiarte, 2007).

La segunda clase de elementos transponibles corresponde a los que no necesitan de RNA para su transcripción, en éste, el transposon se escinde del ADN donador para insertarse en el ADN diana, de modo que la molécula queda interrumpida cortada y el transposon cambia de molécula, este mecanismo también se presenta en procariontes (Lewin, 2008). Las secuencias de los retrotransposones son una herramienta muy apropiada para el estudio de la biodiversidad genética, la evolución genética, la evolución del genoma, mutación de los genes y su expresión.

6. Determinación de la diversidad genética

La diversidad genética es necesaria para la adaptación de las especies en ambientes nuevos e importantes para la supervivencia en algunas circunstancias (Hsiung, 1997). Existen varias formas de conocer la variación o diversidad genética de una población. La heterocigosidad, el número o proporción de *loci* polimórfico y el número promedio de alelos por *locus* son las medidas más comunes de diversidad.

La heterocigosidad o la heterocigosis esperada (H_E) para un “locus” cualquiera con n alelos cuando una población está en equilibrio Hardy-Weinberg es la probabilidad de que al sacar dos alelos al azar de una población, éstos sean iguales:

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^n P^2_i$$

Esta medida también conocida como diversidad genética Nei (1978), es útil para organismos con ploidias diferentes y son sistemas reproductivos diferentes (Hedrick, 2000).

El polimorfismo genético es una de las formas para conocer la diversidad genética, esto se refiere a las formas alternativas que un alelo puede ser encontrado en un *locus* y en una población, la proporción en la que se encuentra ese alelo es llamada frecuencia alélica o frecuencia genética. La proporción de un *loci* polimórfico (P), definiendo como *loci* polimórfico a aquellos *loci* cuya frecuencia del alelo más común es menor a 0.95 o 0.99.

$$P = \frac{x}{m}$$

Donde X es el número de *loci* polimórficos en una muestra de m . Otra medida para conocer la diversidad genética es el número de alelos, n , es decir este es un conteo de los alelos observados en un *locus* en una población. Sin embargo debido a que esta medida se ve fuertemente influenciada por el tamaño de la población, la comparación entre poblaciones debe ser hecha con cautela (González, 2007).

En los marcadores dominantes como los son los ISTR, la diversidad ocurre en forma de variantes de la posición relativa de los retrotransposones del genoma. Y debido a que son marcadores dominantes, la homología de las bandas es incierta. Por lo tanto, no permiten el cálculo de ciertos parámetros que exigen distinguir a los heterocigóticos de los homocigóticos dominantes (como FIS y FIT; Wright, 1965). Asimismo, para estimar la heterocigosis poblacional es necesario asumir *a priori* que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, por lo que las estimaciones de heterocigosis y estructuración genética pueden sesgarse un poco, aunque existen correcciones estadísticas (Lynch y Milligan, 1994). Por otro lado, los genetistas de poblaciones han elaborado modelos en donde los estudios evolutivos se enfocan a un *locus* con dos alelos, es así como nace la Ley del Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), la cual no es más que un modelo que describe la relación que hay entre las frecuencias alélicas y genotípicas en un estado de equilibrio de un sólo *locus*, en una población diploide que se entrecruza aleatoriamente (Gillespie, 1998).

6.1. Marcadores moleculares

Los pasos básicos para trabajar con marcadores ISTR son: extracción del ADN, realización de PCR y electroforesis. La extracción del ADN consiste a grandes rasgos en la ruptura de la pared celular y la membrana del núcleo mediante detergentes para lograr la extracción del ADN nuclear.

6.2. Descripción de la PCR

En 1984, Kari Mullis describe un método para amplificar secuencias específicas de ADN. La PCR se lleva a cabo añadiendo a la reacción los siguientes componentes: un par de cebadores que hibridan con la secuencia que hibridan a la secuencia diana, los cuatro desoxirribonucleosidos trifosfato (dNTPs) y una ADN polimerasa termoestable. La información que la PCR amplifica proviene del código genético. El código genético es la relación entre la secuencia de bases en el ADN (o de su RNA transcrito) y la secuencia de los aminoácido en las proteínas.

Un ciclo de PCR consta de 3 etapas: primera etapa: separación de las hebras; en esta etapa se calienta la disolución a 95°C durante 15 segundos y se separan las hebras del ADN parental. La segunda etapa es la hibridación de los cebadores: aquí es enfriada bruscamente la disolución a 54 °C de forma que cada cebador pueda hibridar con cada una de las hebras de ADN. Un cebador hibrida en el extremo 3' de la secuencia diana localizada en una de las hebras y el otro cebador hibrida en el extremo 3' de la hebra complementaria a la secuencia diana, como los cebadores se encuentran en forma abundante no se forman dúplex entre las hebras del ADN parental, normalmente los cebadores tienen una longitud de 20 a 30 nucleótidos. La tercera etapa corresponde a la síntesis del ADN; aquí posteriormente se calienta la disolución a 72 °C, esta es la temperatura óptima para la Taq polimerasa. La polimerasa elonga ambos cebadores en dirección a la secuencia diana por que la síntesis de ADN se realiza en sentido 5' 3'. La síntesis de ADN tiene lugar sobre las 2 hebras y se extiende más allá de la secuencia diana. Estas tres etapas constituyen las etapas de amplificación por PCR y este se puede realizar en forma repetitiva.

En condiciones ideales después del tercer ciclo aparecen 2 hebras cortas que están formadas únicamente por la secuencia diana (que incluye tanto a la secuencia que está delimitada por los cebadores como a los propios cebadores. Los ciclos subsecuentes amplificaran la secuencia diana en forma exponencial. El número de hebras más grandes aumenta en forma aritmética y estas serán fuente para la síntesis de más hebras cortas. Así tras 20 ciclos, la amplificación es de un millón de veces y a los 30 ciclos podría ser en menos de una hora de mil millones de veces (Berg *et al*, 2007).

6.3. Descripción de la electroforesis

Básicamente la electroforesis es una técnica que separa las moléculas por su movilidad diferencial a través de un solvente en un campo eléctrico. (Becerra, Paredes; 1999). En muchos tipos de gel, la movilidad electroforética de un fragmento de ADN es inversamente proporcional al logaritmo del número de pares de bases, hasta cierto límite. Para separar fragmentos que contienen hasta mil pares (Kb) de bases se utilizan geles de poliacrilamida mientras que

para separar mezclas de fragmentos mayores (hasta 20 Kb) se utilizan geles de agarosa más porosos (Berg *et al*, 2007; Schochetman *et al*, 1988).

7. Utilización de marcadores moleculares en los estudios de diversidad

La utilización de los marcadores moleculares, tienen una amplia historia de aplicación para el conocimiento de la diversidad biológica y la mejora genética (Espinel y Aragonés, 1997). En la investigación de Cuevas y Flores (2006) se utilizó la técnica de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) en varias especies del genero *Agave* sp. La cual demuestra la confiabilidad para ser utilizada como método de caracterización genético del género *Agave*. Barraza *et al* (2006), analizaron la variabilidad genética de *Agave angustifolia* Haw, con marcadores moleculares AFLPs encontrando altos niveles de variabilidad genética entre sus poblaciones. Simpson (2006) encontró que los marcadores AFLP son de gran utilidad para la discriminación molecular entre 9 variedades de *Agave tequilana*. Espinel y Aragonés, (1997) demuestran la eficiencia de utilizar los marcadores moleculares PCR (Polimerase Chain Reaction), RAPD (Random Amplification of Polymorphic ADN) e ISTR, para conocer la diversidad genética de *Pinus radiata* colectada en diferentes localidades en País Vasco. Montalvo *et al* (2010), utilizaron marcadores moleculares ISTR (para la identificación de la variabilidad genética de la especie de cactus en peligro de extinción: *Pilosocereus* sp. Esta experimentación mostró resultados positivos Torres (2009) utilizó marcadores ISTR para la determinación de la variabilidad genética *Agave duranguensis*, utilizado para la fabricación de mezcal al sur de Durango. Los ISTR mostraron alta sensibilidad para mostrar la variabilidad genética del *Agave duranguensis*. Torres *et al*, (2006), encontraron que los marcadores moleculares ISTR son efectivo para discriminar las muestras de ADN de *Agave tequilana* y de *Agave cocui* y así como la efectividad mostrada para la detección de polimorfismo entre las muestras de agave utilizadas. Los marcadores moleculares ISTR produjeron más marcadores polimórficos que los marcadores AFLP, mostrando con ello mayor capacidad discriminatoria (Demey *etal*,2004).

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1 Localización de las zonas con presencia de agave mezcalero en el área de estudio

Esta investigación se realizó en el municipio de San Felipe que se localiza en la región norte del estado de Guanajuato dentro de la franja del semiárida mexicana, con características de clima extremo y suelos con bajo contenido de materia orgánica y nutrientes, sus coordenadas extremas son: 21° 50' 21.0 N, 21° 08' 16.50 S, 101° 40' 44.8 E, y 100° 50' 02.2 O, cuenta con una elevación promedio de 2 080 msnm, siendo el punto más elevado la Sierra del Cubo con una Altitud de 2 880 msnm. Sus colindancias son: al norte con el estado de San Luis Potosí, al sur con los municipios de León y Guanajuato, al este con los municipios de Dolores Hidalgo y San Diego de la Unión y al oeste con el municipio de Ocampo y una porción con el estado de Jalisco.

La vegetación en el municipio de San Felipe se constituye por 14.5% de bosque de encino, 10.7% por bosque de pino, 1.5% por chaparral, 26.5% se destina a actividades agrícolas, 9.6% a actividades pecuarias y 37.5% por matorral xerófilo característico de zonas áridas y semiáridas del país, este estrato de vegetación comprende a su vez al matorral crasicaule (85.5%), matorral sarcocrasicaule (11.5%), mezquital-huizachal (2.8%) y vegetación halófila y gípsofila (0.2%) (Rzedowski, 2006). Las especies dominantes de este tipo de vegetación en el municipio son: nopal cardón (*Opuntia streptacantha*), nopal hartón (*Opuntia hyptiacantha*), nopal tapón (*Opuntia robusta*), nopal cuijo (*Opuntia engelmanni*), maguey pulquero (*Agave salmiana*), y otras variedades de maguey (*Agave spp*), en otras zonas se encuentran dominadas por el huizache (*Acacia sp*), sangre de drago (*Jatropha dioica*), así también se encuentran especies en menor abundancia como el Coyonoxtle (*Opuntia imbricata*), garabatlillo (*Mimosa biuncifera*), tatalencho (*Gymnosperma glutinosum*), entre otros.

Metodológicamente el estudio se dividió en tres fases: a) trabajo en campo para localizar, identificar taxonómicamente las especies de maguey presentes en el

municipio, b) trabajo de laboratorio para determinar la variabilidad genética de los Agaves mezcaleros del municipio empleando marcadores moleculares de amplificación basados en PCR, c) trabajo en escritorio para analizar los polimorfismos del agave en el municipio y generar una base de datos de diversidad genética.

1.1. Identificación del área

Mediante la utilización de los sistemas de información geográfica se ubicaron las plantaciones realizadas por SEMARNAT y CONAFOR en el periodo de 2006-2008 como plantaciones de doble propósito; la reforestación y el aprovechamiento regional (alimento humano, animal, construcción, y más). La geoposición de las parcelas (Figura 3), permitió un trazo adecuado de las rutas para el muestreo y la colecta del material vegetal.

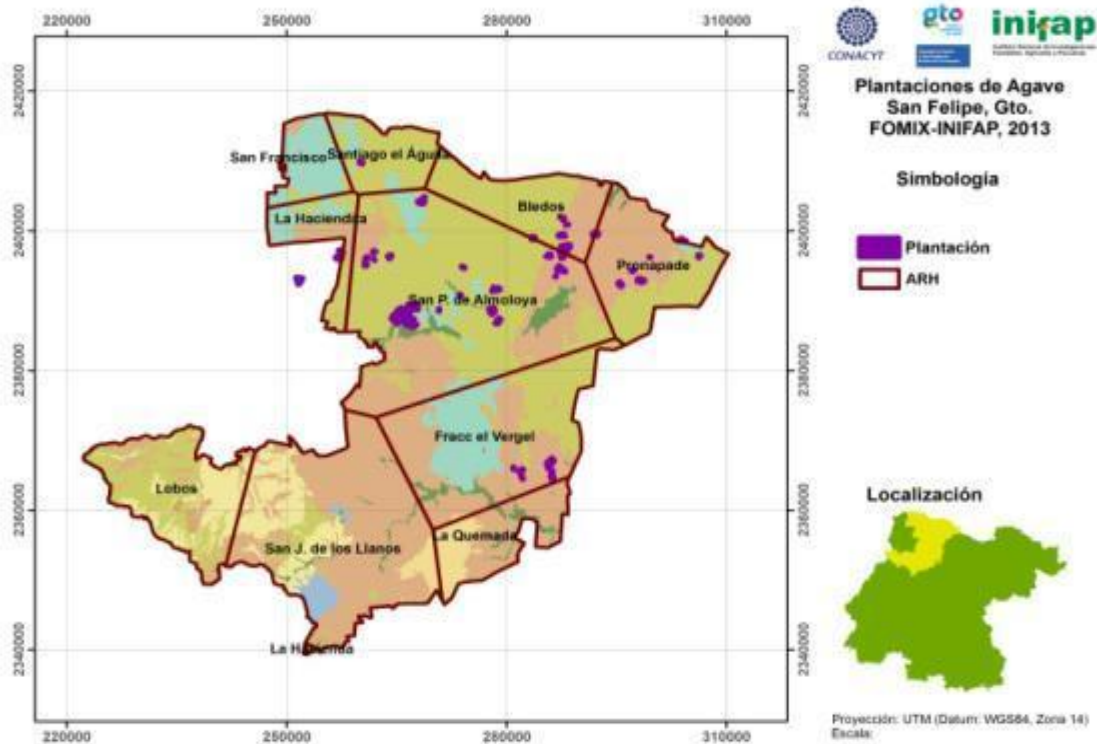


Figura 3. Plantaciones de Agave, realizadas en su mayoría con Agave salmiana por SEMARNAT y CONAFOR del 2006 - 2008 como obras de conservación de suelo (Mandujano, 2013).

1.2 Determinación de los puntos de muestreo

Una vez ubicadas las parcelas además de la información arrojada por los sistemas de información geográfica permitió la identificación de las zonas con potencial para el crecimiento en las cuales sería posible encontrar zonas de distribución natural del agave. Con esta información fue posible plantear los puntos de muestreo dirigidos (Figura 4) como se muestran en el mapa.

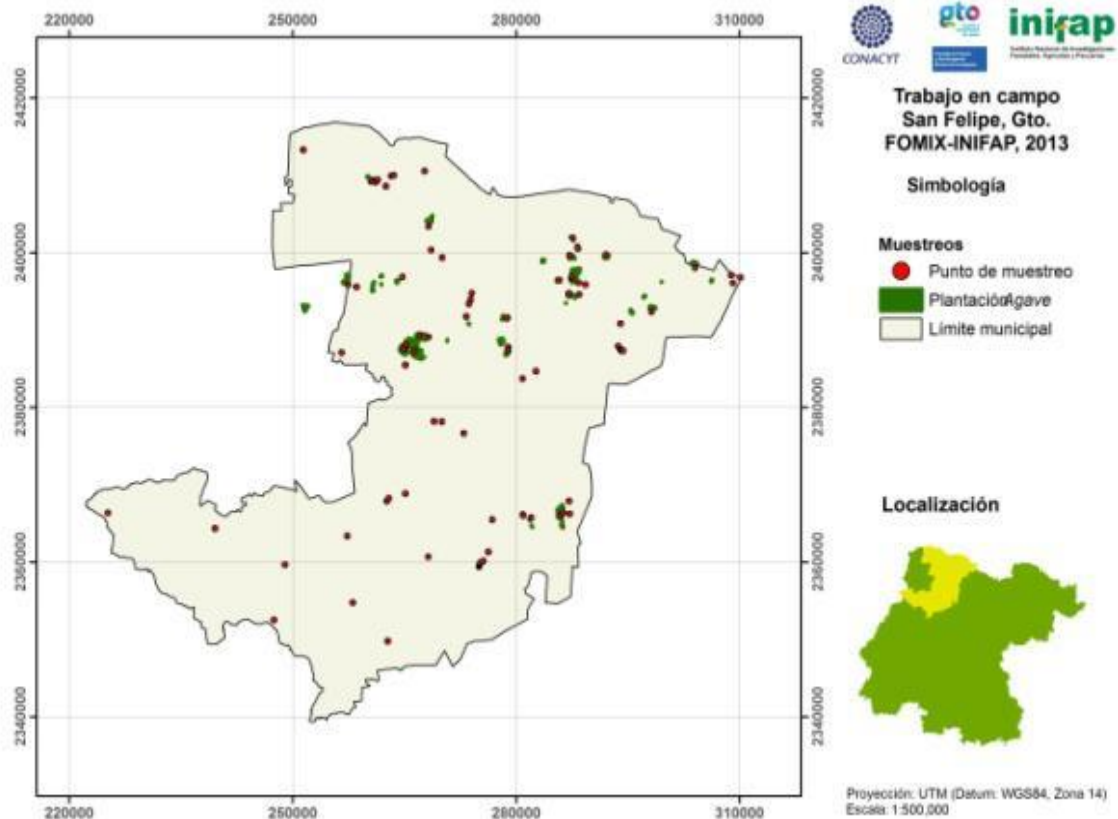


Figura 4. Distribución de los puntos de muestreo en el municipio de San Felipe, Guanajuato.

Las áreas de respuesta homogénea también se incluyeron dentro de la determinación de los puntos de muestreo. En base a el área de influencia de las estaciones climáticas y a la calidad de sus datos que consistió en la antigüedad (por lo menos 10 años de información) y continuidad de los registros (90% de los datos) se generaron áreas de influencia para cada una de las estaciones

empleadas en el presente trabajo, una vez generadas estas áreas fueron sobrepuestas a la cobertura cartográfica de suelos para generar áreas con características similares tanto de clima como de suelo que permitieran la planeación y distribución de recorridos en campo y el análisis de información

1.3. Identificación de las diferentes especies de Agave mezcalero en San Felipe, Gto.

La identificación de las especies del género Agave en el área de estudio se realizó mediante las claves descritas por Gentry (1982), (Anexo 9), así como apoyo visual de las colecciones de agave disponibles en los herbarios digitales de la UNAM.

2. Determinación de la diversidad genética de Agave con marcadores ISTR

2.1. Colectas

De cada punto de muestreo se obtuvieron 3 muestras de material vegetal o más en caso de existir en el lugar más de una especie de agave. Cada muestra de material vegetal consistió en un trozo de aproximadamente 100 gramos. El material vegetal fue etiquetado y georreferenciado con un geoposicionador (Garmin-20®). El material se mantuvo en hielo hasta su congelación a -80°C en un ultra-congelador (REVCO®) en el laboratorio de Marcadores Moleculares.

El trabajo de laboratorio para la obtención de diversidad genética por medio de los marcadores ISTR basados en la PCR se puede resumir en pasos; la extracción de ADN genómico puro y buena calidad, realización de la PCR con los marcadores moleculares ISTR y por último la lectura de geles de los diferentes patrones de bandeo generados por la PCR.

3.3.2 Extracción y purificación del ADN

El proceso de la extracción se realizó por medio del protocolo de extracción de ADN CTAB (Doyle y Doyle) modificado con STE haciendo algunas adecuaciones anexo 4.

Una vez lograda la extracción del ADN, se procedió con la cuantificación de la concentración de ADN y la comprobación de la calidad de las diluciones. La cuantificación se realizó con el espectrofotómetro (Nano Drop 8000®), las

unidades de cuantificación son ($\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$). Los rangos que se establecen en la literatura para aceptar los ADN de buena calidad según la lectura del espectrofotómetro tienen un grado de pureza de 1.8 a 2.1 a 260/280 de longitud de onda y una concentración mayor a $50 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$. Mediante la cuantificación de los ADN se realizaron los cálculos para uniformizar las diluciones con la concentración de $15 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ con la fórmula:

$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$, donde;

C_1 = Concentración del ADN genómico

V_1 = Es la cantidad de ADN genómico para llevar la dilución a una concentración de $15 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$.

C_2 = Es la concentración esperada ($15 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$).

V_2 = Es el volumen esperado, $100 \mu\text{l}$.

El valor obtenido por V_1 es restado a 100 y se obtiene el volumen de agua a utilizar en la dilución.

La lectura de la calidad de las diluciones a $15 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$ se realizó por medio de la electroforesis en geles de Agarosa al 1.5% + TBE 1X figura 5. El proceso electroforético se realizó con $4 \mu\text{l}$ de ADN genómico en combinación con $3 \mu\text{l}$ de Biotina® como buffer de carga y marcador Lambda λ a una concentración de ($25 \mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$). Las condiciones de la electroforesis fueron de 130V por 35 min con el equipo (Power Pac 3000®) y el buffer de corrida fue TBE 1X. Se tomó la fotografía con rayos UV con el transiluminador (Bio Rad®). Las diluciones bien realizadas deben mantener uniformidad de intensidad y espesor.

2.2 Marcadores ISTR

Los marcadores aplicados fueron los utilizados por Torres (2009), en el complejo *Agave duranguensis* y los utilizados por Fernández *et al*, (2010) en plántulas de *Pilosocereus sp*. Los oligonucleótidos utilizados para la determinación de la variabilidad genética, fueron los que se muestran en la Tabla 2 y 3 de Torres (2009) y Montalvo (2010) respectivamente. Para la

realización de las Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó una prueba de gradientes para encontrar las temperaturas óptimas para la alineación (TM por sus siglas en inglés Temperature melting). Esta prueba se realizó con el ADN correspondientes a dos especies distintas (*Agave salmiana* y *Agave americana*) con las 10 combinaciones de iniciadores, las temperaturas de alineación probadas fueron 40, 45, 50, 55, 60 y 65 °C, en 40 ciclos.

Tabla 2. Secuencias de los iniciadores ISTR utilizados por Torres (2010). Forward (F) y Reverse (R).

INICIADOR	TIPO	NOMBRE
d5´ (TTACCTCCTCCA TCT CGT AG)3´	ISTR	F9
d5´(TAA GCA AGC ATC TCG GAG) 3´	ISTR	F10
d5´(ATC AGC AAG GTC TGT AAA GC) 3´	ISTR	B1
d5´(GGT TCC ACT TGG TCC TTA G) 3´	ISTR	B6 I
d5´(ATA CCT TTC AGG GGG ATG) 3´	ISTR	B8
d5´(GCA CTC CAC CAA GAA TAC C) 3´	ISTR	F1

Las combinaciones de estos oligonucleótidos fueron las siguientes; F9/B6, F10/B1, F1/B6, F10/ B6, F10/B8.

Tabla 3. Secuencias de los iniciadores ISTR utilizados por (Montalvo *et al*, 2010). Forward (F), Reverse (R).

INICIADOR	TIPO	NOMBRE
d5´(GTC GAC ATG CCA TCT TTC) 3´	ISTR	F3
d5´(TAT AGT ACC TAT TGG GTG) 3´	ISTR	F4
d5´(ATA TAT GGA CTT AAG CAA GC) 3´	ISTR	F5
d5´(GTA TTG TAC GTG GAT GAC ATC) 3´	ISTR	F6
d5´(ATT CCC ATC TGC ACC ATT) 3´	ISTR	B3
d5´(ATA TAT GGA CTT AAG CAA GAC) 3´	ISTR	B6 II

Las combinaciones de estos oligonucleótidos fueron las siguientes; F3/ B3, F4/B3, F5/B3, F6/B3, F6/B6_{II}. Así, también se realizaron combinaciones entre las secuencias de los oligonucleótidos de ambos autores que fueron las siguientes F6/B8, F6/B6_{II}, F57/B8, F5/B6_{II}.

Mediante los gradientes se logró determinar las temperaturas de alineación para cada una de las combinaciones.

2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la amplificación de los ISTR a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa se utilizó un volumen final de mezcla de reacción de 25 μ l con los siguientes componentes; 10.8 μ l agua destilada estéril, 2.5 μ l de buffer 10X, 2 μ l de DNTP'S A 2.5 μ M, 1.5 μ l de MgCl₂, 5 μ l de la combinación de oligonucleótidos a 5 μ M, 0.2 μ l de ADN Taq Polimerasa y 3.0 μ l de ADN genómico a 15 ng μ l⁻¹.

Los PCR se llevaron a cabo en el Termociclador (Applied biosystems®) bajo las siguientes condiciones que se indican en la Figura 7.

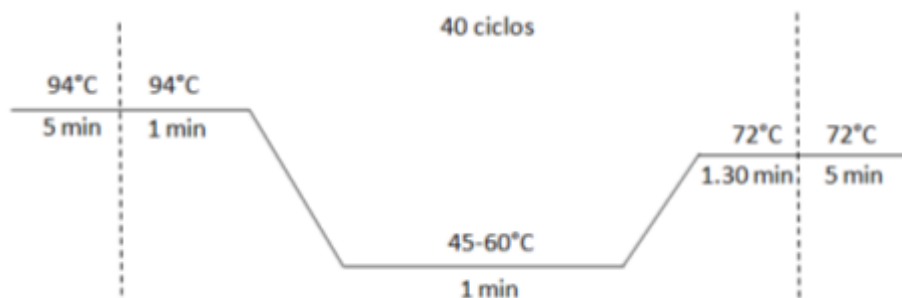


Figura 5 Condiciones de PCR que se utilizaron en la amplificación de los marcadores ISTR.

Una vez terminado la PCR, a cada reacción se le agregaron 8 μ l de buffer desnaturizante. La separación de los fragmentos amplificados en los gradientes se realizó en geles de agarosa y después en geles de poliacrilamida al 6%. El proceso de preparación de la acrilamida se detalla en el anexo 5.

Para la lectura de los geles de agarosa se utilizaron 12 μ l del producto resultado del PCR + buffer de carga, y se utilizaron 4 μ l de marcador de peso molecular de 100 pb (1 kb plus), y se corrió a 135 V durante 35 min en cámara electroforética horizontal. En los geles de poliacrilamida se depositaron con 12 μ l de reacción de PCR de cada muestra y 8 μ l del marcador de peso molecular de 25 pb (Low weight), la electroforesis se realizó en la cámara electroforética vertical UBIBA-K0322SEV a 250 V durante 1 hora y 25 min.

Una vez establecidas las T_m , se procedió a realizar las amplificaciones mediante PCR con la población, estas sumaron en total 96 muestras, en las cuales se incluyó un ADN de la especie *Agave americana* var. *marginata* como testigo de amplificación.

2.4 Determinación de la diversidad genética.

El proceso de análisis de las pruebas electroforéticas de los PCR se realizó con el programa Cross Checker para Windows XP. Este programa es de libre acceso y está diseñado para el funcionamiento en equipo de 32 Bits, el programa se utilizó para generar una matriz binaria de 0 y 1 en los cuales 1 significa presencia de la banda y 0 ausencia de ella, así como para calcular los pares de bases de las bandas amplificadas de acuerdo al marcador de peso molecular. Los resultados binarios arrojados por el Cross Checker se utilizaron para construir el dendrograma mediante el índice de similitud con el índice de Jaccard y el UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) con el software NTSYSpc 2.2j. Se realizaron las pruebas para determinaciones de los índices como: heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e), el polimorfismo por locus ($P\%$) y las frecuencias alélicas (p) y (q), de los grupos y el total de los individuos analizados con los programas GenAlex 6.501 y Tools for Population Genetics Analysis (TFPGA) además de que se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) con el programa GenAlex 6.501.

VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Localización de las áreas con presencia de agave mezcalero

Las áreas con respuesta homogénea para el crecimiento de *Agave* se pueden observar en la Figura 6.

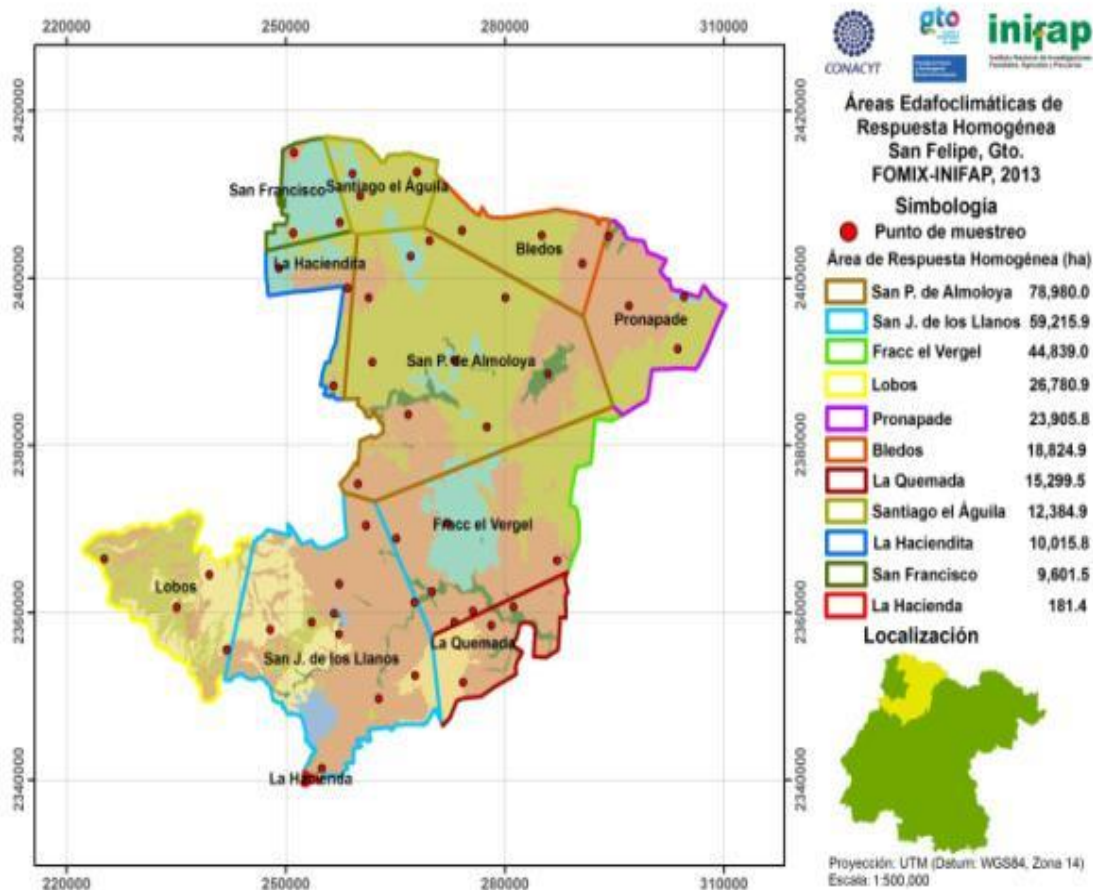


Figura 6. Áreas edafoclimáticas de respuesta homogénea en el Municipio de San Felipe, Guanajuato

En la figura 6 se presenta la distribución de las ARH (Áreas de Respuesta Homogénea) y los puntos definidos en escritorio para toma de muestras en campo. Los puntos de muestreo fueron establecidos en áreas susceptibles a contar con presencia de alguna especie de *Agave*. En total dentro del área de estudio se definieron 42 ARH por clima y suelo y se localizaron 50 posibles

puntos de muestreo. Los puntos de muestreo fueron georreferenciados y se pueden observar en el Anexo 2.

Los puntos de muestreo se pueden observar en la figura 7 en la que se muestran las especies encontradas en relación a las Áreas de Respuesta Homogénea.

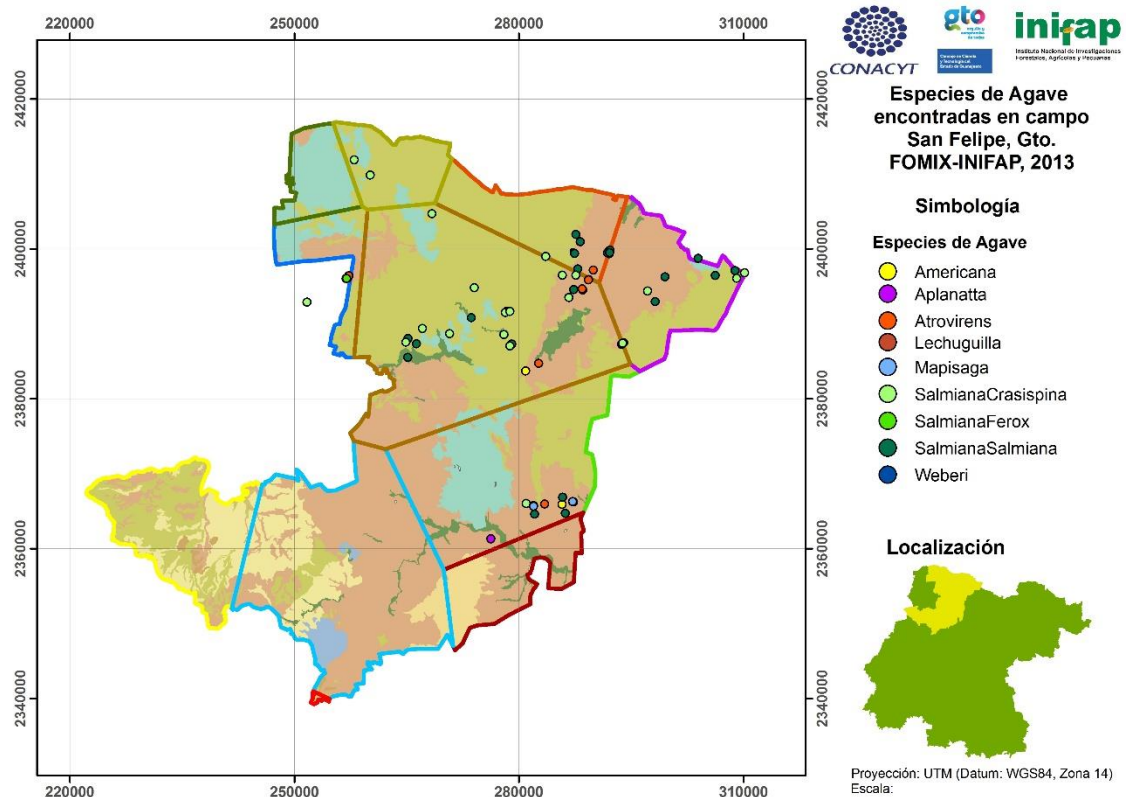


Figura 7 Especies encontradas en relación a las áreas de respuesta homogénea

La identificación de las parcelas (Figura 8) fue de gran ayuda para la determinación de los puntos de muestreo. Algunas de las plantaciones se encontraron en estado saludable y otras con presencia de plagas o enfermedades

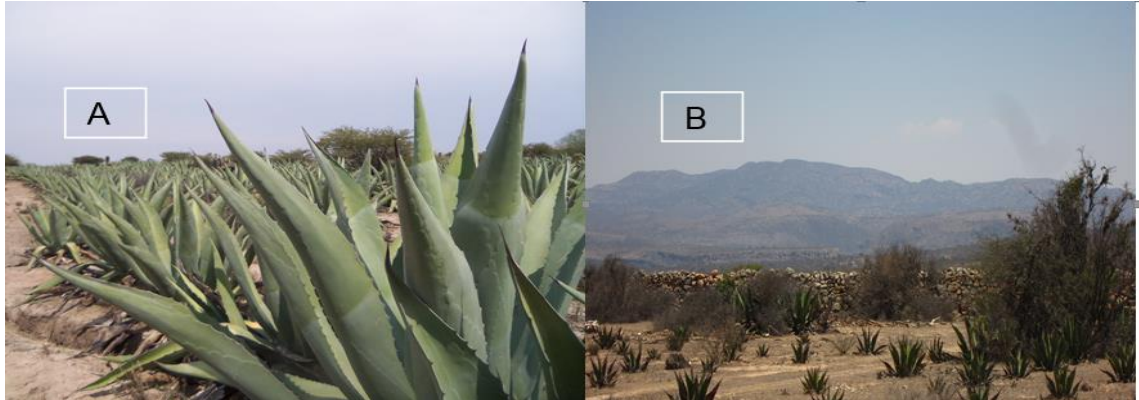


Figura 8. Parcelas de *Agave* sp. Establecidas con doble propósito. La plantación A, corresponde a la plantación del ejido Cuartos de Bravo y la plantación B corresponde a la plantación del ejido de Fábrica de Melchor.

2. Identificación de las distintas especies de agave mezcalero en el área de estudio

Mediante las claves descritas por Gentry (1982) anexo 7. Se identificaron las siguientes especies *Agave salmiana* (Maguey pulquero chino), *Agave salmiana* subsp. *crassispina* (Maguey cimarrón), *Agave salmiana* subsp. *ferox* (Maguey manso), *Agave aplanata* (Maguey mesote), *Agave americana* (Maguey pita), *Agave mapisaga* (Maguey manso), *Agave atrovirens* subsp. *mirabilis*, *Agave weberi*, *Agave lechuguilla*. De manera representativa se ubican geográficamente las distintas especies en los lugares en los que fueron encontrados Figura 9.

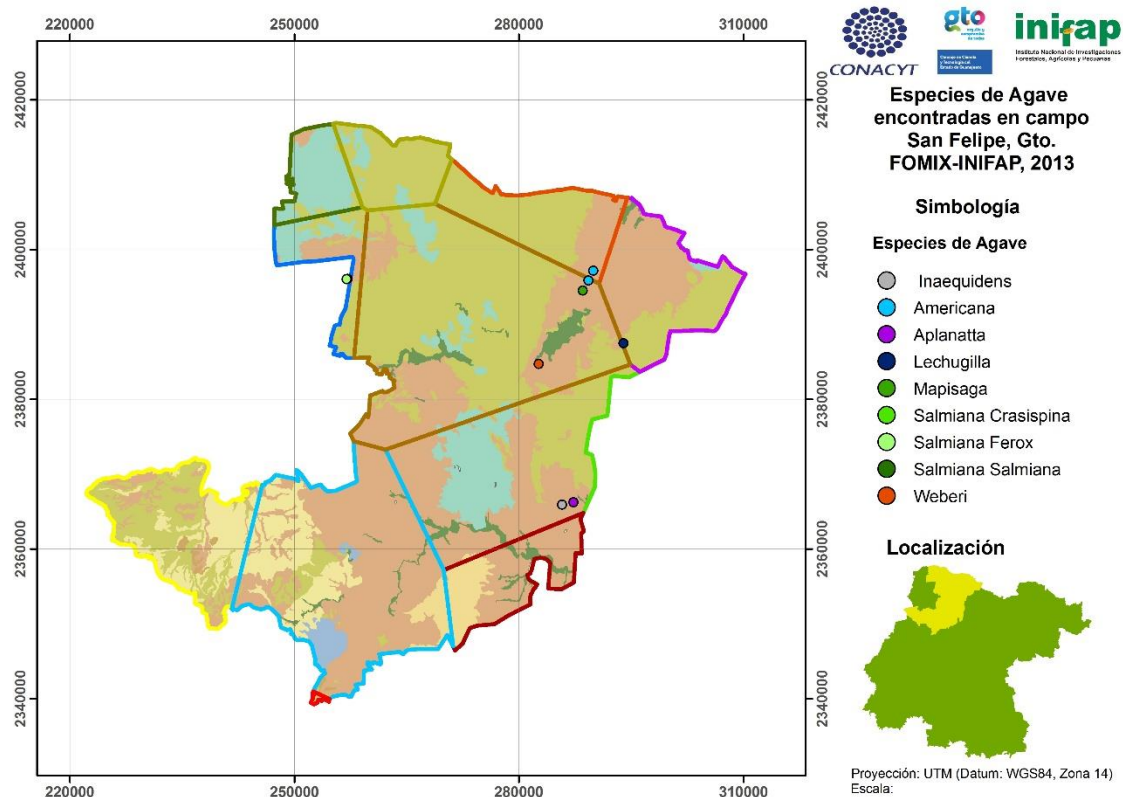


Figura 9. Ubicación geográfica de las distintas especies de Agave en la zona de estudio.

En la figura 10 se pueden observar las especies de *Agave* en San Felipe, clasificadas taxonómicamente.



Figura 10. Especies de *Agave* ubicadas taxonómicamente con las claves de Gentry (1982) encontradas en San Felipe, Guanajuato.

Las especies de distribución natural son: *Agave salmiana*, *Agave salmiana* subsp. *crassispina*, *Agave salmiana* subsp. *ferox*, *Agave aplannata*, *Agave lechuguilla*, mientras que las especies introducidas son las especies *Agave mapisaga* y *Agave weberi*.

Esto contrasta con lo encontrado por Aguirre (2003), en el reporte para la aceptación de San Felipe dentro de la zona de protección por la Denominación de Origen, en la que reporta además de las mencionadas a ; *Agave aspérrima*, *Agave espadín* y *Agave tequilana var. Weber azul*.

La utilización de las especies de *Agave* sp. encontradas en el municipio de San Felipe Guanajuato, según los pobladores, se puede observar en la Tabla 5. En las especies *Agave americana* subsp. *americana*, *Agave inaequidens*, *Agave salmiana* subsp. *crassispina* y *Agave salmiana* subsp. *salmiana* se concuerda con Shneibar (2008), quien reporta con uso para producción de mezcal a las especies mencionadas.

Tabla 4. Especies de *Agave* y su reporte de uso en el Municipio de San Felipe, Guanajuato.

Especie	Uso Aguamiel o pulque	Uso mezcal
<i>Agave americana</i>	si	Si
<i>Agave aplanata</i>	no	No
<i>Agave atrovirens</i>	si	No
<i>Agave guttata</i>	no	No
<i>Agave inaequidens</i>	no	Si
<i>Agave lechuguilla</i>	no	No
<i>Agave mapisaga</i>	si	No
<i>Agave salmiana</i> subsp. <i>crassispina</i>	si	Si
<i>Agave salmiana</i> subsp. <i>ferox</i>	si	Si
<i>Agave salmiana</i>	si	Si
<i>Agave weberi</i>	no	No

Durante los recorridos realizados en el municipio para la colecta de material vegetal, se encontraron plantaciones de *Agave* con presencia de plagas y enfermedades, como lo es la *Scyphophorus acupunctatus* y *Fusarium oxisporum*. Respectivamente, lo cual se muestra en la figura 11.

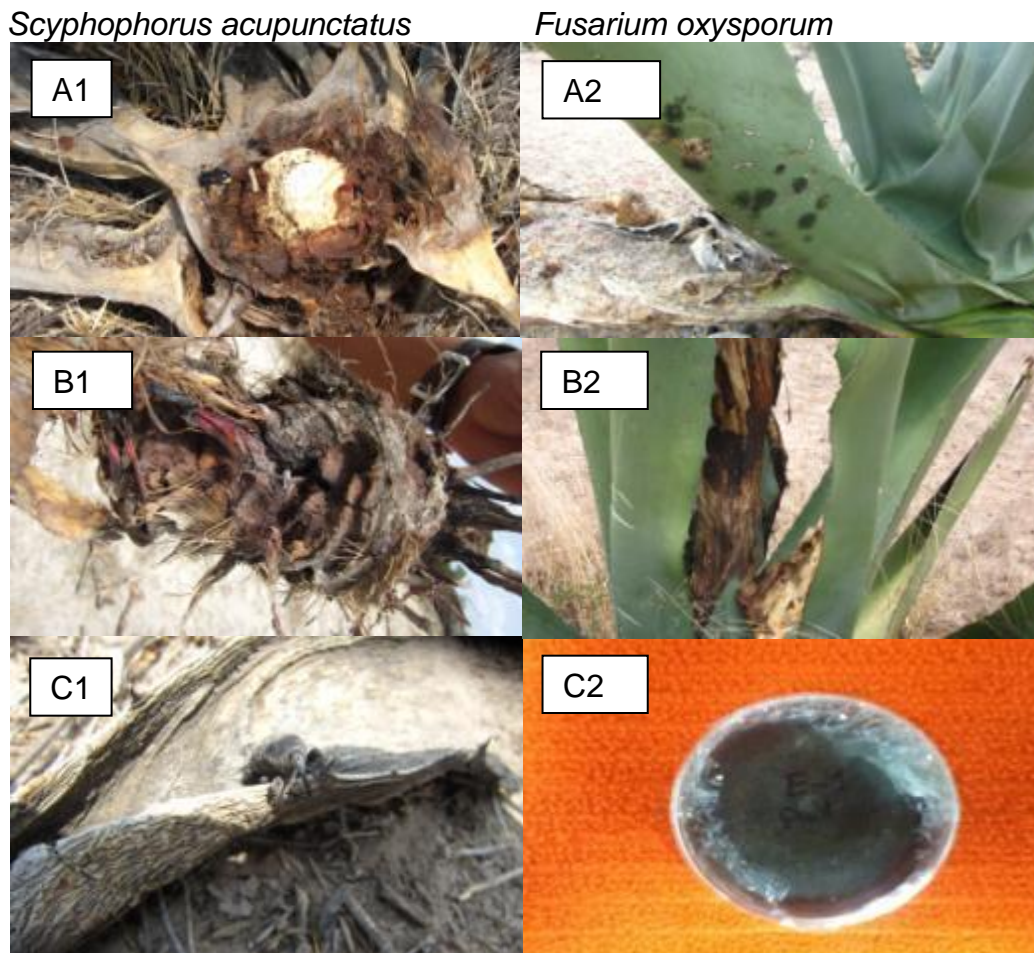


Figura 11. Presencia de *Scyphophorus acupunctatus* y *Fusarium oxysporum* en parcelas de agave en San Felipe Guanajuato. En la imagen A1 y B2 se observan los daños ocasionados por el insecto. En la imagen A2 y B2 se observan los daños ocasionados por el hongo.

El picudo del agave (nombre común del *Scyphophorus acupunctatus*) es una de las plagas más importantes en los agaves, las larvas de este insecto barrenan el tallo y penca del agave provocando la pudrición y marchitez de las plantas, en la etapa adulta el insecto hace perforaciones sobre la penca para alimentarse y ovipositar, esto hace que en cualquiera del estado metamórfico que se encuentre el insecto, además de ser peligroso por el daño mecánico que genera sobre la planta, también esté asociado con microorganismos fitopatógenos. Los daños ocasionados por el hongo *Fusarium* en el agave son enormes y provoca la enfermedad de la mancha negra. Las parcelas en las que

se encontró una mayor incidencia de *Scyphophorus acupunctatus* corresponde a parcelas con poco o nulo manejo, en las que los desechos de las plantas enfermas no se eliminan, o plantas que presentan un mal estado de salud, en las zonas en las que la precipitación está muy por debajo de los requerimientos, es decir, los desequilibrios generan una mayor probabilidad de incidencia de plagas y enfermedades (Chaboussou, 1987). La presencia de la mancha negra está relacionada a zonas en las que la configuración montañosa permite una humedad relativa que propicia la propagación del hongo, por lo tanto se puede presentar en zonas con clima templado (Barrera y Sánchez, 2003).

3. Determinación de la diversidad genética de los agaves mezcaleros

3.1. Adecuación del protocolo de extracción de ADN

La utilización del protocolo de extracción de ADN CTAB (Doyle y Doyle 1987) modificado, necesitó de algunas adecuaciones para que la pureza, así como la concentración del ADN fuera de mejor calidad, esto se debió a que los ADN se presentaba en bajas concentraciones y baja calidad en su pureza (Tabla 6).

Tabla 5. Lectura mediante espectrofotómetro que indica mala calidad de ADN

Sample ID	Conc.	Units	260/280
1	18.53	ng/ul	2.49
2	18.01	ng/ul	2.53
3	20.01	ng/ul	1.82
4	11.07	ng/ul	2.17
5	37.56	ng/ul	2.4
6	13.49	ng/ul	2.3
7	14.11	ng/ul	2.29
8	15.71	ng/ul	2.74
9	22.89	ng/ul	2.3
10	23.38	ng/ul	2.08
11	23.79	ng/ul	1.97
12	18.53	ng/ul	2.57
13	21.72	ng/ul	1.96
14	19.33	ng/ul	2.19
15	15.2	ng/ul	2.58
16	11.29	ng/ul	3.57
17	18.8	ng/ul	2.45
18	20.59	ng/ul	2.11

Las lecturas de las concentraciones de mala calidad se comprobaron por medio de la electroforesis (Figura 12), la cual muestra la presencia de "barridos" o "Background" esto indica la presencia de una mala calidad en ADN o posiblemente la presencia de algunos contaminantes.

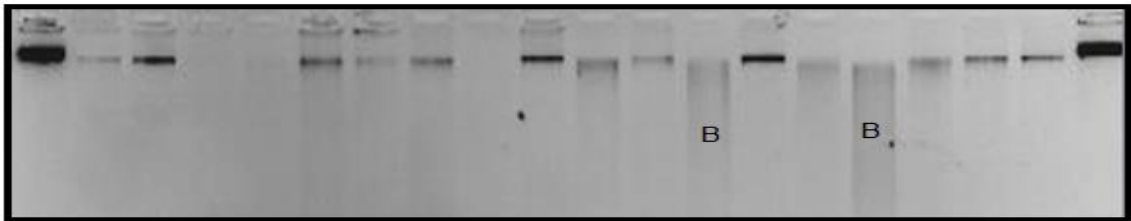


Figura 12. Gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, muestra la calidad del ADN y estandarizado a $15 \mu\text{gml}^{-1}$ con presencia de Background (B) o barrido.

Después de la estandarización del protocolo de extracción se obtuvieron concentraciones de 100 a $1000 \mu\text{g/ml}$. La pureza se determinó primeramente con el grado de absorbancia de luz entre la relación a una longitud de onda de A_{260}/A_{280} . Estos grados de pureza oscilaban entre 1.8 y 2.09 una vez analizado lo grados de pureza se corroboró mediante electroforesis. Se determinó que para mantener los ADN en buenas condiciones de debe diluir en TE 1X ésta, en una solución de sales a baja molaridad. Esta solución resulto tener un buen grado de conservación de la calidad del ADN sin intervenir en los PCR.

Luego de las adecuaciones al protocolo de extracción se logró obtener ADN de buena calidad y concentración esto se puede observar en la Figura 13.



Figura 13. Gel de agarosa al 1.5% en TBE 1X, muestra la calidad del ADN de alto peso molecular y estandarizado a $15 \mu\text{gml}^{-1}$.3.2. Estandarización de los marcadores ISTR

Mediante los gradientes realizados con las combinaciones de los oligonucleótidos se logró establecer la temperatura de alineamiento (TM, por sus siglas en Ingles Temperatura Melting). Las temperaturas utilizadas en los gradientes fueron 40, 45, 50, 55, 60 y 65 °C, en 40 ciclos. Las temperaturas de alineación elegidas por su mejor reproductibilidad así como su mejor visualización son las que se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Combinaciones de oligonucleótidos con la TM elegida.

Combinación	Temperatura de alineación C°	Numero de combinación
F9/B6	45	1
F10/B1	50	2
F1/B6	45	3
F10/ B6	50	4
F10/B8	50	5
F3/ B3	45	6
F4/B3	50	7
F5/B3	50	8
F6/B3	50	9
F6/B6	50	10
F6/B8	45	11
F6/B6 ₂	45	12
F5/B8	55	13
F5/B6 ₂	60	14

3.3. Diversidad genética

Se comprobó la reproductibilidad de los marcadores ISTR en el género agave, esto concuerda con lo encontrado por (Eguiarte *et al*, 1999; Scheinbar 2008; Torres *et al* 2006; Torres *et al*, 2008; Torres, 2009) así como la reproductibilidad en el género *Agave* de las secuencias ISTR utilizadas en *Pilosocereus sp* por Fernández *et al*, (2010).

Las combinaciones mostraron patrones de amplificación para las especies de *Agave* encontradas en San Felipe, así como para la especie *Agave americana* var *marginata* usada como ADN control. Las especies *Agave salmiana*, *Agave salmiana* subsp. *crassispina*, *Agave salmiana* subsp. *ferox*, *Agave mapisaga*, *Agave atrovirens* subsp. *mirabilis* *Agave americana*, *Agave americana* var. *marginata*, *Agave lechuguilla*, *Agave aplanata*, *Agave inaequidens*, *Agave weberi*. Como se puede ver en la figura 14.

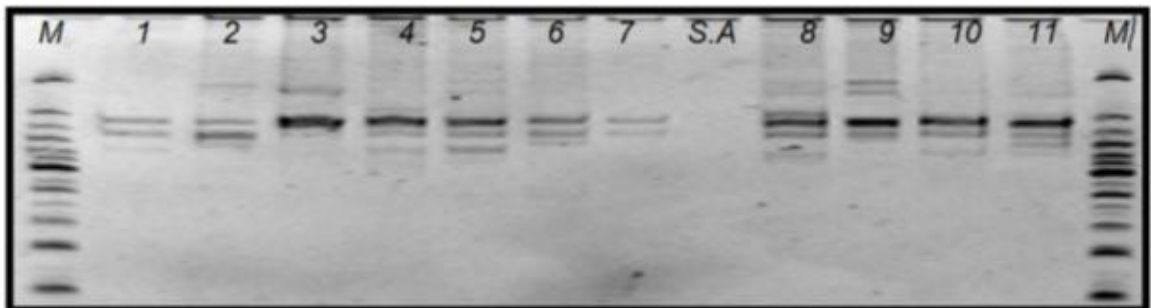


Figura 14. Patrón de amplificación de la combinación F5/B62 para las especies 1 (*Agave salmiana*), 2 (*Agave salmiana* subsp. *crassispina*), 3 (*Agave salmiana* subsp. *ferox*), 4 (*Agave mapisaga*), 5 (*Agave atrovirens* subsp. *mirabilis*), 6 (*Agave americana*), 7 (*Agave americana* var. *marginata*), 8 (*Agave lechuguilla*), 9 (*Agave aplanata*), 10 (*Agave inaequidens*), 11 (*Agave weberi*). M indica el marcador Low Weight de 25 pb. S. A significa carril sin ADN.

La comparación de los patrones de amplificación de las distintas especies de del género *Agave* muestra que son especie-específicos, esto se puede interpretar como la utilidad de los marcadores ISTR como herramienta molecular para la identificación de especies dentro del género *Agave*. Esto concuerda con lo encontrado por Scheinbar (2008); Torres *et al*, (2006); Torres *et al*, (2008); Torres (2009), quienes afirman la utilidad de marcadores ISTR para la identificación de las especies del género *Agave*.

El análisis de los datos generados al observar los patrones de amplificación de las combinaciones de ISTR utilizadas en *Agave*, permitió discriminar algunas y determinar que 6 de ellas resultaron polimórficas así también, se logró definir el grado de polimorfismo como se muestra en la Tabla 8. Del total de los 115 fragmentos amplificados con las combinaciones de marcadores ISTR, 101 fueron polimórficos, este valor indica la presencia de un polimorfismo del 87%.

lo cual contrasta con lo encontrado por Torres (2006), quien reporta un polimorfismo del 88% en *Agave Duranguensis*, utilizando secuencias de ISTR. Las combinaciones utilizadas por Montalvo *et al*, (2010), presentaron un polimorfismo del 62.8% en el género *Pilosocereus* de *Cactaceae*.

Tabla 7. Presencia y grado de polimorfismo en las combinaciones de oligonucleótidos de ISTR en *Agave*.

Combinación	Total de bandas	Bandas polimórficas	Polimorfismo %
F9/B6	15	13	86
F10/B1	–	–	–
F1/B6	–	–	–
F10/ B6	–	–	–
F10/B8	18	16	88
F3/ B3	–	–	–
F4/B3	–	–	–
F5/B3	18	16	88
F6/B3	20	17	85
F6/B6	–	–	–
F6/B8	–	–	–
F6/B6 ₂	21	19	90
F5/B8	–	–	–
F5/B6 ₂	23	20	86
Total	115	101	87

Esto puede deberse a la diferencia de presencia de los elementos transponibles con esos oligonucleótidos de la familia *Agavaceae* y la *Cactaceae*. Montalvo *et al*, (2006) encontraron que los marcadores ISTR son eficientes para demostrar la variabilidad genética de *Pilosocereus sp*. Davila *et al* (2007) detectaron un polimorfismo del 96% en *Agave angustifolia*, *Agave cocui* y *Agave tequilana*, el estudio fue realizado con micro satélites ISSR para inferir la variabilidad genética de estas especies.

3.4. Método UPGMA

Mediante el método de UPGMA utilizando el coeficiente de Jaccard (cabe señalar que este coeficiente mide la proporción de bandas entre dos unidades

taxonómicas, excluyendo aquellas ausentes en ambas unidades) para estimar la similitud entre las especies de *Agave* encontradas en San Felipe Guanajuato.

En la Figura 15 se muestra un dendrograma generado por medio de NTSYSpc 2.2 que denota las diferencias generadas por los marcadores ISTR en las 10 especies encontradas en el municipio de San Felipe Guanajuato, y una especie testigo que fue *Agave americana* var. *marginata* colectada en Celaya Guanajuato.

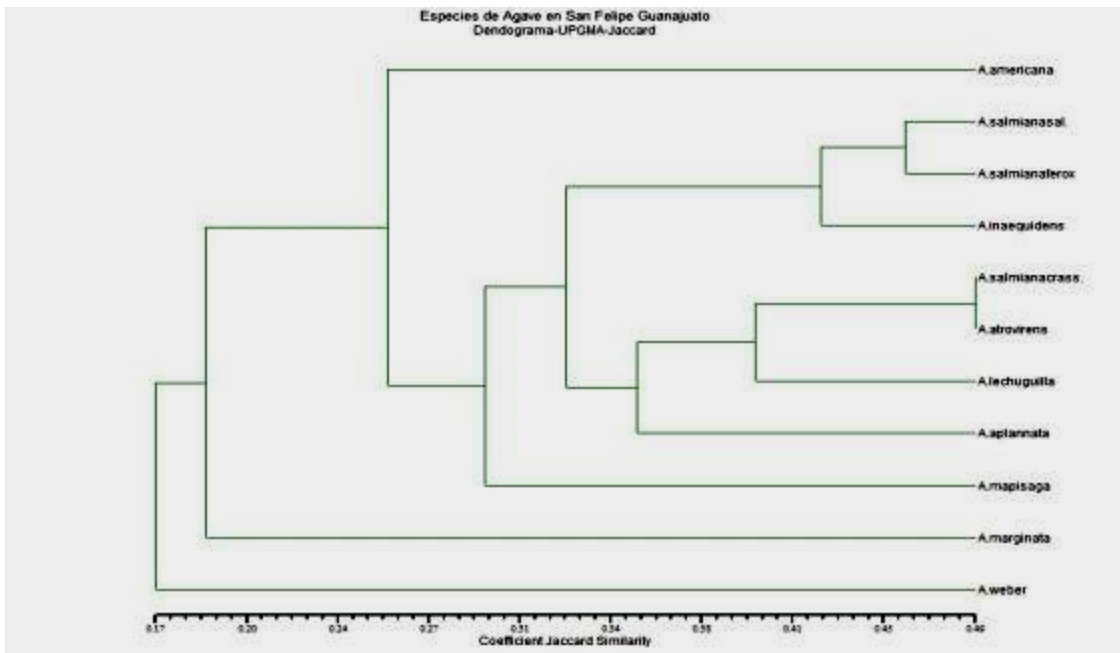


Figura 15. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de Jaccard utilizando el método de UPGMA con el programa NTSYSpc 2.2 para 11 especies de *Agave* con 6 combinaciones de ISTR (F9/B6, F10/B8, F5/B3, F6/B3, F6/B62, F5/B62).

La información generada por los *loci* de las seis combinaciones de ISTR que resultaron reproductibles y polimórficos fue utilizada para la realización del dendrograma de la figura 16. Los individuos que se compararon, fueron especies identificadas previamente con las claves taxonómicas. La correlación cofenética entre las distintas especies encontradas en San Felipe Guanajuato fue de 0.49. En el dendrograma se pueden ubicar seis grupos a un coeficiente de 0.32 mediante el índice de Jaccard. Como primer grupo se puede ubicar al *Agave weberi* el cual presenta un grado de similitud del 0.16, el siguiente grupo

se encuentra ocupado por *Agave marginata* con un grado de similitud del 0.18, el tercer grupo está ocupado por *Agave mapisaga* con un coeficiente de similaridad de 0.29, el cuarto grupo comprende a las especies *Agave aplannata*, *Agave lechuguilla*, *Agave atrovirens*, *Agave salmiana subesp. crassispina*; el quinto grupo, con un índice de similaridad de 0.42 comprende a las especies: *Agave inaequidens*, *Agave salmiana var. ferox*, *Agave salmiana*. El sexto grupo se encuentra ocupado por la especie *Agave americana*, con un índice de similaridad de 0.24. Resulta importante analizar el cuarto grupo, en el cual se agrupan especies tanto de *Littaea* y *Agave sensu stricto*, por ejemplo, el agrupamiento de la especie *Agave lechuguilla* con *Agave aplannata*, *Agave salmiana subesp. crassispina* y *Agave atrovirens*. Resultados semejantes fueron encontrados por Torres *et al* (2008), en cuya investigación y mediante la utilización de marcadores ISTR en siete distintas especies de la familia *Agavaceae*, el agrupamiento generado mediante el método UPGMA utilizando el coeficiente de Jaccard, encontró que las especies *Agave tequilana* y *A. angustifolia*, se encontraban genéticamente más distantes entre sí, que *A. tequilana* con *A. salmiana* y *A. duranguensis*, contrastando con las clasificaciones taxonómicas en las cuales se ubica a la especie *Agave angustifolia* como ancestro inmediato de la especie *Agave tequilana*. La ubicación de la especie *Agave lechuguilla* perteneciente al subgénero *Littaea* dentro del cuarto grupo, que también abarca a las especies de *Agave salmiana*, puede deberse a que dentro de la familia *Agavaceae* el género *Agave* *sensu lato*, se ubica como un género parafilético, así lo demostró Eguiarte *et al* (2000), que mediante un análisis filogenético y estableciendo un reloj molecular, ubica a *Agave americana* y *Agave lechuguilla* con un origen de aproximadamente 2 millones de años y que mantiene una mayor afinidad de las especies del grupo *Marginatae* con *Americanae*, que con *Striatae* y *Amolae*. Así también, la relación de similitud que mantienen las especies *Agave salmiana subesp. crassispina* y *Agave atrovirens* cuyo grado es de 0.51 de similitud, no podría significar que estas especies son semejantes genéticamente, puesto que aún resta 0.49 de posible divergencia. La matriz de

similitud mediante el índice de Jaccard para las especies encontradas en el municipio de San Felipe Gto. Se puede observar en el anexo 6.

Mediante la identificación taxonómica realizada de las especies encontradas en la zona de estudio, se logró agrupar por especies y así, realizar un dendrograma (Figura 16) basado en el coeficiente de similitud de Jaccard y utilizando el método de UPGMA.

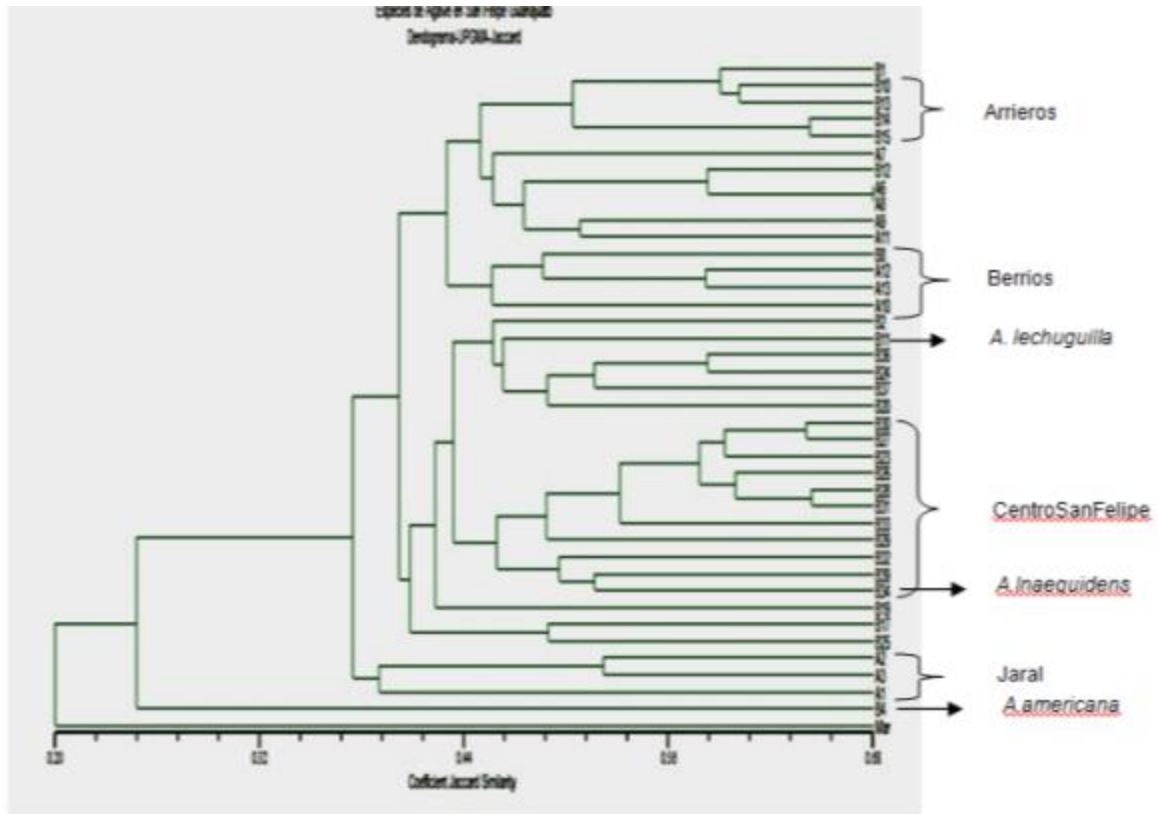


Figura 16. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de Jaccard utilizando el método de UPGMA con el programa NTSYSpc 2.2 para especies agrupadas de Agave taxonómicamente con 6 combinaciones de ISTR (F9/B6, F10/B8, F5/B3, F6/B3, F6/B62, F5/B62).

En el dendrograma de comparación de grupos por especies previamente clasificadas taxonómicamente de la Figura 15, con un coeficiente de similaridad de 0.20 a 0.68 indica un alto nivel de diversidad. En el dendrograma, a un coeficiente de similaridad del 0.35, es posible diferenciar a cinco grandes grupos. El primer grupo se encuentra ocupado por *Agave marginata* con un coeficiente de similaridad del 0.20, el segundo grupo se encuentra ocupado por

B4, taxonómicamente descrita como *Agave americana* a un coeficiente de 0.25. Estas dos especies son abiertamente más distintas del resto. El tercer grupo (Jaral) se encuentra ocupado por las identidades A1, A3, y A2, a un coeficiente de 0.36, el cuarto grupo se encuentra a un coeficiente de 0.37, a su vez se encuentra subdividido en 5 ramificaciones más que incluyen un total de 20 individuos. El quinto grupo se encuentra a un coeficiente de 0.42 y se divide en dos subgrupos más con distintas ramificaciones incluyendo un total de 15 individuos. El dendrograma de la figura 15 muestra un patrón de agrupamiento de acuerdo a la zona de colecta del material vegetal. Por lo tanto se observan los siguientes agrupamientos: "Jaral", "Centro San Felipe", "Berrios" y "Arrieros" identificados geográficamente en la Figura 16. Las especies ubicadas dentro de la agrupación "Jaral", son especies clasificadas taxonómicamente como *Agave atrovirens*, y su ubicación geográfica corresponde a los alrededores de la Hacienda de Jaral de Berrios. La notable separación de estos individuos del resto, indica un alto grado de diferencia, esto puede deberse a que la zona de la Hacienda de Jaral de Berrios tiene registro dentro de las aéreas de reforestación con *Agave* del Programa Nacional de Reforestación a cargo de CONAFOR en 2002 el cual reporta reforestación con *Agave atrovirens*, por lo tanto, esto sugiere que la notable diferencia se deba a genotipos introducidos a la zona. El siguiente agrupamiento que se observa obedece a la zona centro del municipio en la cual fue posible identificar especies como *Agave inequidens*, así como *Agave salmiana subesp. crassispina*, *Agave atrovirens* y *Agave aplannata*. La agrupación correspondiente a "Berrios" es un área al noroeste de la Hacienda de Jaral de Berrios, en esta agrupación es posible identificar *Agave salmiana subesp. crassispina* y *Agave atrovirens*. En esta área también se establecieron plantaciones según los pobladores de la región. Pero la separación genética mostrada mediante los marcadores ISTR, indica que genéticamente son más parecidas a las especies de la agrupación "Arrieros", las cuales corresponden a especies encontradas en distribución natural. Esto puede indicar que las reforestaciones o plantaciones establecidas de *Agave* se realizaron con material vegetal de la región, lo cual es una buena técnica que

promueve la conservación de material genético que se encuentra apto para esas condiciones y asegura el éxito de la plantación. La agrupación de "Arrieros" comprende especies colectadas hacia el este de la hacienda de Jaral de Berrios en colindancia con San Diego de la Unión, la mayoría de estos individuos son *Agave salmiana* subesp. *crassispina* de distribución natural.

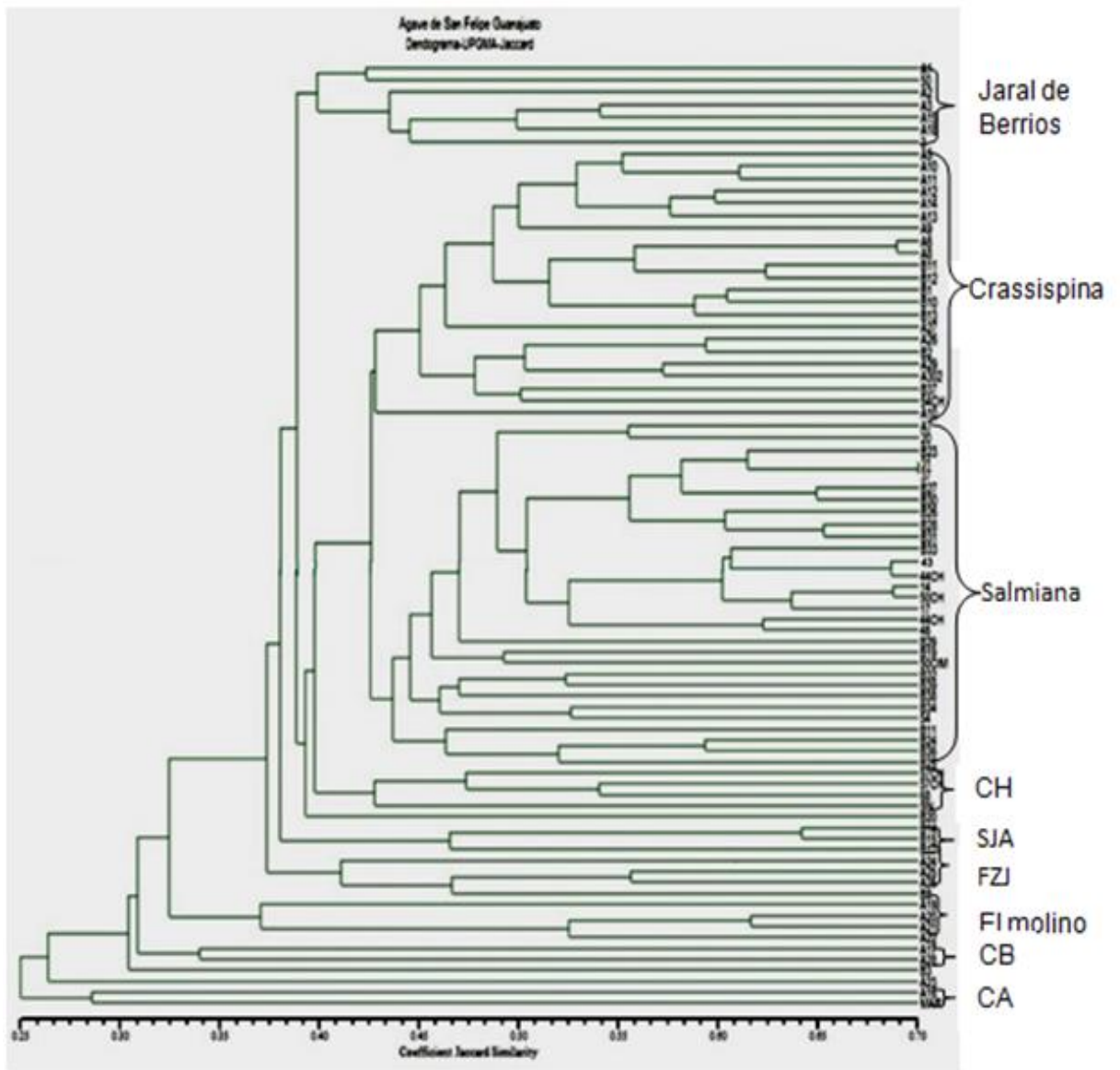


Figura 17. Dendrograma basado en el coeficiente de similitud de Jaccard utilizando el método de UPGMA con el programa NTSYSpc 2.2 para la población total de especies de *Agave* taxonómicamente con 6 combinaciones de ISTR (F9/B6, F10/B8, F5/B3, F6/B3, F6/B62, F5/B6)

En el dendrograma de la Figura 15 presenta un coeficiente de similaridad de 0.20 a 0.70 indicando un alto nivel de diversidad. A un coeficiente de diversidad del 0.42 es posible observar 14 grupos. El primer grupo (CA), así como en el dendrograma de la Figura 14, se observa a la especie *Agave americana* var *marginata* con un coeficiente de similitud del 0.25. Esto indica la poca similitud de esta especie colectada en un lugar distinto al área de estudio. El segundo grupo se encuentra a un coeficiente de similitud del 0.28 con un solo individuo identificado como A16. El tercer grupo se encuentra ocupado por un individuo identificado como A 23 a un coeficiente de 0.26. El cuarto grupo a un coeficiente de similaridad del 0.30 ocupado con el individuo clasificado como B3. El quinto grupo a un coeficiente del 0.31 ocupado por un el individuo clasificado como A28. El sexto grupo a un coeficiente del 0.34 ocupado por el individuo identificado como A17. El séptimo grupo a su vez subdividido ocupando un total de 4 individuos, se encuentra a un coeficiente del 0.37 estos individuos corresponden al ejido El Molino, el estado en que se encontraron estos agaves, sugieren que pertenecen a una plantación antigua. El octavo grupo a un coeficiente del 0.41 comprende a 4 individuos ellos fueron tomados en tres distintos puntos: Fabrica del Melchor, El Zacatón y Jaral de Berrios (FZJ). Los distintos puntos comparten la característica de ser parcelas antiguas de agave correspondientes a reforestaciones (Valentín, 2013) por lo tanto mantienen una similaridad genética, la especie identificada es *Agave salmiana subesp. crassispina*. El noveno grupo formado a un coeficiente de 0.46 agrupa a tres individuos que corresponden al ejido San José de los Arrieros (SJA), en este lugar las muestras vegetales fueron tomadas a 2193 m.s.n.m, sobre una cordillera montañosa que atraviesa ese ejido. La especie identificada en ese punto de muestreo corresponde a *Agave salmiana subesp. crassispina*. El decimo grupo con un coeficiente de 0.39 se encuentra ocupado únicamente por un individuo (B20), este fue localizado en el ejido La Chirimoya. El onceavo grupo (CH) se encuentra con un coeficiente de similitud del 0.42, este grupo a su vez se subdivide en tres grupos más, con un total de 4 individuos. El doceavo grupo, con un coeficiente de similitud del 0.44 se encuentra

subdividido en 7 subgrupos más, con un total de 31 individuos. Este grupo no mantiene una relación geográfica específica pero en su mayoría, agrupa especies de *Agave salmiana*, así como un subgrupo que contiene a la subespecie *ferox* (B24 y B25), en este grupo también se puede encontrar al *Agave lechuguilla* y *Agave mapisaga*. Esta agrupación con una enorme divergencia quizá se deba a las características que comparten los individuos que se agrupan dentro de *Salminae*, mientras que la aparición de *Agave lechuguilla* dentro del mismo, es el posible resultado del origen parafilético del género *Agave* según reporto Eguiarte (2007). El treceavo grupo (Crassispina) a un coeficiente del 0.43, se encuentra subdividido a su vez en 9 subgrupos a un coeficiente de 0.52, este gran grupo incluye especies de distintas regiones del municipio de San Felipe pero contiene a la especie *Agave salmiana subesp. crassispina*. Es importante ver que el rango de similitud entre el grupo va del 0.43 al 0.70 es decir, dentro del grupo existe una gran divergencia aunque se catalogue dentro de la misma especie. El catorceavo grupo (Jaral de Berrios), a un coeficiente de 0.35 con un total de 7 individuos, se encuentra a su vez subdividido en dos subgrupos más, en esta agrupación al igual que en otras anteriores, es posible observar un patrón de agrupamiento debido a la zona donde fueron colectadas, el lugar de colecta fue en Jaral de Berrios. La separación de los grupos Crassispina y Salmiana indica una fuerte diferenciación, esto puede obedecer al origen de las plantaciones que se realizaron en la zona (CONAFOR, 2002).

3.5. Análisis de diversidad genética

De acuerdo a la clasificación generada por el programa NTSYS versión 2.2 observados en el dendrograma de la Figura 15. Se dividieron los grupos y se tomaron todos aquellos que incluyeran a más de un individuo, así, se seleccionaron 9 grupos. Según los grupos formados se realizaron pruebas de estadísticas para determinar la diversidad genética. Esta fue determinada mediante los parámetros aplicables a los marcadores dominantes como lo son, frecuencia alélica (p y q), heterocigosidad observada y esperada (H_o y H_e) y

porcentaje de *loci* polimórficos (%*P*) así como un análisis molecular de varianza (AMOVA).

3.6. Frecuencias alélicas

Debido a que los ISTR son marcadores dominantes, los heterocigóticos no pueden ser distinguidos, por lo que, para calcular las frecuencias *alélicas* se estimó la frecuencia de los alelos recesivos (*q*) a partir de los individuos sin banda, como la raíz cuadrada de la frecuencia de las ausencias, esto es, $x = q^2$, siendo $q = x^{1/2}$. Por otro lado, la frecuencia de los alelos dominantes (*p*) es igual a $1 - q$. las frecuencias alélicas pueden ser observadas en el anexo 8.

3.7. Heterocigosidad

Puesto que son marcadores dominantes, la homología de las bandas es incierta, por lo tanto, no permiten el cálculo de ciertos parámetros que exigen distinguir a los heterocigóticos de los homocigóticos dominantes (como FIS y FIT; Wright, 1965). Asimismo, para estimar la heterocigosis poblacional es necesario asumir *a priori* que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, por lo que las estimaciones de heterocigosis y estructuración genética pueden sesgarse un poco, aunque existen correcciones estadísticas (Lynch y Milligan, 1994). El cálculo de la heterocigosis (*Ho* y *He*) y el porcentaje de *loci* polimórficos (Tabla 8), se realizó mediante los programas GenAlEx 6.501 y Tools for Population Genetics Analysis (TFPGA) versión 1.3 (Miller, 1997). Él cual asume que las poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

Tabla 8. Variabilidad genética obtenida para cada una y el total de las poblaciones, a partir de la heterocigosis esperada (H_e), heterocigosis observada (H_o) y porcentaje de loci polimórficos (% P), con el criterio del 95% de confianza, así como el número de individuos que se utilizaron en cada población (N).

Población	N	H_o	H_e	%P
CA	2	0.0999	0.1332	26.9565
CB	2	0.1128	0.1504	30.4348
El molino	4	0.1503	0.1718	39.1304
FZJ	4	0.1574	0.1799	40.8696
SJA	3	0.1067	0.1281	27.8261
CH	4	0.2018	0.2307	51.3043
Salmiana	30	0.333	0.3386	84.3478
Crassispina	23	0.3259	0.3332	80
Jaral de Berrio	7	0.3186	0.3431	79.1304
Total		0.2007111	0.2232	51.1111

Los altos grados de heterocigosidad y porcentaje de *loci* polimórficos por grupo de los Agave mezcaleros del municipio de San Felipe Guanajuato, generadas a través de los 6 marcadores ISTR (Tabla 8), indican un grado de diversidad genética grande, siendo los grupos: CH, Salmiana, Crassispina, Jaral de Berrio con 0.2307, 0.3386, 0.3332 y 0.3431 respectivamente, los grupos con mayor grado de diversidad genética. Considerando la heterosigocidad total promedio de 0.2232, según Torres (2009) que establece un rango de heterosigocidad total, asumiendo que los valores fluctúan entre 0 y 1, siendo 0= a no diversidad y 1 la fijación de alelos alternativos en diferentes poblaciones o subpoblaciones, esto es en valores de 0 a 0.05 la diferenciación genética es pequeña; entre 0.05 a 0.15 la diferenciación es moderada; entre 0.15 y 0.25 es grande y >0.25 la diferenciaciones es muy grande.

Los niveles de heterocigosidad encontrados en los agaves mezcaleros del municipio de San Felipe Guanajuato, concuerdan con Alfaro (2007), quien analizó a través de marcadores RAPD, poblaciones de *Agave salmiana* var.

salmiana, *Agave salmiana* y *Agave mapisaga*; encontrado un índice de diversidad promedio de 0.28. Navarro-Quesada *et al.* (2003) encontró en otras especies de *Agave*, mediante marcadores RAPD en *Agave cerulata*, *Agave subsimplex* y *Agave deserti* heterocigosidad esperada (He) de 0.237, 0.144 y 0.186 respectivamente. Los índices mencionados anteriormente se ubican cercanas a la media de heterocigosidad de especies del genero *Agave* en distribución silvestre establecido por Piñero *et al* (2007). Mientras que con marcadores ISSR fue reportada por González-González (2004) una heterocigosidad del 0.24 para *Agave garciae-mendozae* y Rocha (2006) encuentra para diversas especies de *Agave* una heterocigosidad del 0.236. Los altos grados de diversidad pueden compararse con lo encontrado por Gil-Vega *et al.* (2001) encontraron por medio de marcadores RAPD, una heterocigosidad de 0.0004 para *Agave tequilana* especie genéticamente homogenizada a través del tiempo por el uso extensivo para su explotación. Torres (2009) también encontró por medio de marcadores ISTR en poblaciones de *Agave duranguensis* bajos niveles de heterocigosidad con un promedio poblacional de 0.076.

3.8. Niveles de polimorfismo por *loci* (%P)

El análisis estadístico de los grupos de *Agave*, presentaron diversos niveles de polimorfismo por *loci* (Tabla 8), los valores más altos los pertenecientes a los grupos FZJ, CH, Salmiana, Crassispina y Jaral de Berrio; con 40.86, 51.30, 84.34, 80 y 79.13 respectivamente. Mientras que polimorfismo por *loci* total promedio fue de 51.11. Los bajos niveles de polimorfismo por *loci* presentado por los demás grupos, se debe al bajo tamaño de individuos dentro del grupo, mientras que los grupos que presentaron altos niveles de polimorfismo por *loci* contrasta con lo encontrado por Torres (2009) quien determino mediante el uso de ISTR en *Agave durangunesis* polimorfismo del 88%. Mientras que con marcadores ISSR se ha determinado polimorfismos por *loci* promedio para individuos del genero *Agave* de 78 % y con marcadores RAPD de 81.2 % para el mismo género (Piñero *et al*, 2007).

3.9. AMOVA

Para conocer la variación entre y dentro de los grupos de *Agave* se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) con el programa GenAlex 6.501. El AMOVA calcula la distancia entre los diferentes haplotipos (en el caso de los ISTR un haplotipo consiste en el patrón de 1 y 0 que representa las bandas observadas (1) y las ausencias de banda (0) para cada individuo) y produce estimados de los componentes de la varianza que son similares a los estadísticos (Rocha, 2006). El AMOVA presenta la diversidad inter-poblaciones e intra-poblacional (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de los grupos de *Agave* identificados mediante los marcadores moleculares ISTR. Realizado con GenAIEx 6.501.

Fuente de variación	g.l.	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	% de la variación
Entre poblaciones	8	351.342	3.509	16%
Dentro poblaciones	70	1248.404	17.834	84%
Total	78	1599.747	21.343	100%

Los datos mostrados en la Tabla 9, muestran un porcentaje de variación altamente significativo dentro de las poblaciones con un 84%, mientras que presenta un 16 % entre las poblaciones. Esto concuerda con lo encontrado por Rocha (2009) quien utilizó marcadores ISSR en 5 especies del subgénero *Littaea* y encontró que entre las poblaciones se encuentran los valores más bajos de diversidad en la cuenca de Mestitlan, mientras que dentro de las poblaciones se encuentra el mayor nivel de diversidad, Rocha atribuye esto a los cambios de polinizadores, pues en su investigación logra registrar polinización por murciélagos algo que en el subgénero *Littaea* no se contemplaba. La existencia de una diversidad alta dentro de los grupos y menos entre los grupos puede indicar la alta tasa de flujo génico, esto es debido a que los principales polinizadores de las especies de *Agave* analizadas en el presente trabajo, son murciélagos, esto influye directamente, explicando así el

hecho de que la mayor parte de la variación genética se encuentre dentro de las poblaciones. En *Agave* se han encontrado niveles contrastantes de diferenciación genética que probablemente se deba al origen reciente de la mayor parte de las poblaciones Piñero *et al*, (2009).

3.10. Distancia entre grupos

Con el programa de análisis moleculares de TFPGA se obtuvo un dendrograma basado en las distancias genéticas de Nei (1972) con un Bootstrap de 1000 réplicas (Figura 17). Este nuevo dendrograma renombra a los grupos asignándoles un número.

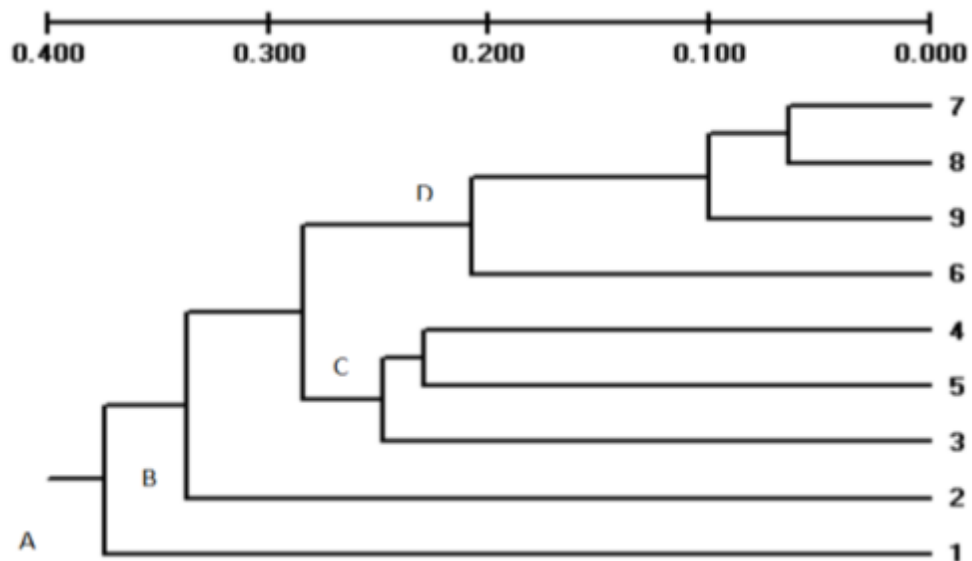


Figura 18. Dendrograma basado en el coeficiente de Nei (1972) con el programa TFPGA 1000 permutaciones de bootstrap. Los números significan el orden del grupo: 1=SCA, 2=CB, 3=EL molino, 4=FZJ, 5=SJA, 6=CH, 7=Salmiana, 8=Crassispina, 9=Jaral de Berrios. A, B, C y D agrupaciones generadas.

El dendrograma de la figura 16, genera 4 grupos (A, B, C y D), el grupo A y B están conformados por el número de grupo 1 y 2 respectivamente, el grupo C, a una distancia de 0.28 agrupa a su vez a los grupos 4, 5 y 3. El grupo D a una distancia de 0.21 contiene a su vez a los grupos 7, 8 y 9. Esta agrupación que los grupos A y B se encuentran más alejados genéticamente de C y D. C y D son diferentes genéticamente uno del otro. El que cada uno de los grupos C y D

contengan a su vez a otros grupos dentro de ellos significa que los grupos que contienen son más parecidos genéticamente. Se puede afirmar que en los Agaves mezcaleros del municipio de San Felipe Guanajuato, se encuentran 4 distintos grupos genéticos de *Agave*.

IX. CONCLUSIONES

La aptitud potencial del municipio de San Felipe Guanajuato, generada por medio de las áreas de respuesta homogénea es una gran herramienta para la determinación de los muestreos dirigidos. La localización de las plantaciones de *Agave* a través de los Sistemas de Información Geográfica, permitió, además de la exacta ubicación, el análisis de las condiciones fisiológicas de las plantas respecto a al área de respuesta homogénea en que se encontró. Así también, se puede asumir que prácticamente todo el municipio es apto para el crecimiento y desarrollo de especies del género *Agave*.

Mediante la caracterización taxonómica de las especies de *Agave* en el Municipio de San Felipe, Guanajuato, se logró determinar la existencia de 7 especies distintas pertenecientes al género *Agave sensu stricto* así como una subespecie y una variedad. También se logró identificar a las especies introducidas a las de distribución natural.

Los marcadores ISTR son útiles para la determinación de la diversidad genética en el género *Agave*. Los análisis de diversidad genética permitieron determinar un alto grado de diversidad entre los grupos de *Agave* identificados. Así también permitió establecer que en los agaves del Municipio, existe un grupo genético predominante, en el que se encuentra la especie *Agave Salmiana* y la subespecie *Crassispina*, esto comprueba la relación genética existente entre esta especie y la taxonómicamente clasificada como variedad. Además se logró establecer que las especies *Agave americana* así como el *Agave marginata* mantienen una distancia genética mayor a los grupos predominantes, que *Agave mapisaga* respecto a los mismos grupos y que explica el estatus de especies introducidas. Se puede establecer que los altos grados de diversidad genética existente dentro y entre los agaves mezcaleros del Municipio, se debe a que es un género que aún se encuentra en diversificación.

La existencia de los altos valores de diversificación en el pool genético de *Agave* encontrados en el municipio de San Felipe, comprueba la injerencia de la mano del hombre en la vida evolutiva de la familia *Agavaceae*. Así como la importancia de los polinizadores que para *Agave sensu stricto* se han identificado.

X. LITERATURA CITADA

- Aguirre R. J.R., H.S. Charcas, J.L. Flores. 2001. El maguey mezcalero potosino. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, México. 87p.
- Álvarez NN y Egon Köhler (1987) Morfología Del Polen De Las Agavaceae Y Algunos Géneros Afines, Grana. 26 (1): 25-46,
- Barraza M. A., F.L. Sánchez T., M. Robert., M. Esqueda, A. Gardea.2006. Variabilidad genética en *Agave angustifolia* Haw. De la Sierra Sonorense, México, determinada con marcadores AFLP. Revista Fitotecnia Mexicana. Chapingo, México. 29:1-8.
- Bellon, M.R., *et al* 2009. Diversidad y conservación de recursos genéticos en plantas cultivadas, en Capital natural de México, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. CONABIO, México, pp. 355-382.
- Berg J. M., L. Stryer, J. L. Tymoczko. 2007. Bioquímica. Sexta edición. Ed. Reverte. 1152 pp.
- Bukasov S. M.1963. Las plantas cultivadas de México, Guatemala y Colombia. Instituto Interamericano de las Ciencias Agrícolas de la OEA. Lima, Perú.
- CarrilloT.L.A. 2007. Los destilados de agave en México y sus denominaciones.Ciencias. 87 (3): 40-49.
- Cuevas F. X. M. y E. P. Flores B. 2006. Distancias genéticas entre *Agave tequilana* Weber Var. Azul y especies y variedades afines. Scientia. 8(2): 231-249.

- Dávila, M., M. A. Castillo., H. Laurentin. 2007. Uso de marcadores moleculares ISSR para inferir las relaciones genéticas y la variabilidad interespecifico en el Agave. *Agronomía, Maracay*. 33(2): 93-111.
- Demey J. R., E. Gámez, S. Molina, D. Infante. Comparative study of the discriminating capacity of AFLP and ISTR markers for genetic analysis of *Agave fourcroydes*. *Plant Molecular Biology Reporter*. 22: 29-35.
- Eguiarte L., J. Larson G., J. Núñez F., A. Martínez P., K. Santos P., H. Arita.1999. Diversidad genética y conservación: ejemplos a diferentes escalas y una propuesta a nivel poblacional para *Agave victoriae-reginae* en el desierto de Chihuahua México. *Revista Chilena de Historia Natural*.72: 475-492.
- Eguiarte L.E. y A. González .2007. De genes y magueyes estudio y conservación de los recursos genéticos del tequila y mezcal.*Ciencias*.87 (3): 28-35.
- Espinel S., y A. Aragonés.1997.Mejora genética de *Pinus radiata* D. Don. En el País Vasco. Situación actual. Cuadernos de la Sección Forestal .Madrid, España. 5:109-110pp.
- Gentry, H. S. A.1982. Agaves of Continental North America. The University of Arizona Press. Tucson. 670pp.
- González Q., L. 1978. Origen de la domesticación de los vegetales en México. *In*: Lorenzo L., J. (coord). Historia de México. Tomo 1. Medio Ambiente y Primeras Etapas. Salvat. México, D.F.77-92 pp

- Ibrahim A.A., B. Mohammad A., K. Haseeb A., A. Ahmad H., A. Ali A., B. Ali H., A. Mohammad, S. Mohammad. 2010. A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. *International journal of Molecular sciences*. (11): 2079-2096.
- Lewin B. 2008. *Genes IX*. Jones y Bartlett publishers. 891 pp.
- Mandujano B. A. 2013. Viabilidad del Agave como alternativa para controlar la desertificación de la microcuenca Laguna de Guadalupe, Gto. Tesis de Maestría de la Universidad Autónoma de Querétaro. Santiago de Querétaro, México. 121p.
- Margalef, R. 1980. *Ecología*. Ed. Ediciones Omega. 3ra reimp. España. 951pp.
- Montalvo F. G., M. Ortiz G., E. Quiala M., M. Keb LL., L.M. Rojas., M. Bautista A., M. Alonso E., A. Quiroz M., R. Wolfgang, L. F. Sánchez T. 2010. Primer reporte del empleo de marcadores ISTR en *Cactaceae Pilosocereus sp.* Universidad Nacional de Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*. Bogotá, Colombia. VII (2): 223-229.
- Mora, J. I., J. A. Reyes., J.L. Flores., C. B. Peña., J.R. Aguirre. (2011). Variación morfológica y humanización de la sección salmiana del género *Agave*. *Agrociencia*. 45 (4): 465-477.
- Nobel, P. S., and E. S. Meyer. 1985. Field productivity of CAM plant, *Agave salmiana* estimated using daily acidity changes under various environmental conditions. *Physiologia Plantarum*. 65: 397-404.
- Perales, H., y J. R. Aguirre R., 2008. Biodiversidad humanizada. *In*: Sarukhán, J. (coord), Dirzo, R., R. González y I. March. (eds). *Capital Natural de México*. Tomo 1. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. pp: 565-603.

- Piñero, D., *et al.* (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas, en *Capital natural de México*, vol. I: *Conocimiento actual de la biodiversidad*. Conabio, México, pp. 437-494.
- Ruvalcaba, M. J. 1983. El Maguey Manso: Historia y Presente en Epazoyucan, Hidalgo. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 85 p.
- Rzedowski, G C de, Rzedowski y colaboradores. 2001. Flora fanerogámica del valle de México, 2ª, ed., Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad, Patzcuaro, Michoacán. 1406 pp.
- Scheinvar G. E. 2008. Genética de poblaciones silvestres y cultivadas de dos especies mezcaleras: *Agave cupreata* y *Agave potatorum*. Tesis de Maestría de la Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 191 pp.
- Schochetman G., C. Yih, W.K. Jones.1988. Polymerase chain reaction. *The Journal of Infectious Diseases*. 158 (6): 1154-1157 pp.
- Silvertown J., D. Charlesworth. 2007. *Introduction to Plant Population Biology*. 4ta Edi.Blackwell publishing. Australia. 351p.
- Simpson J., K. Gil V., C. Diaz., A. Nava C. 2006. AFLP Analysis of *Agave tequilana* varieties. *Plant Science*. 170: 904-909.
- Simpson, J. 1997. Molecular markers. *Boletín de la sociedad botánica de México*. 60: 73-76
- Solís, R. L. Y. y Andrade T. A. Que son los marcadores moleculares. *La ciencia y el hombre*, Universidad Veracruzana. Xalapa, Ver.

- Torres M. M. 2009. Caracterización molecular del complejo *Agave duranguensis* por marcadores ISTR. Tesis de Doctorado del Instituto Politécnico Nacional. México. 50p.
- Torres M. M., M. Morales R., L. Cruz L. A. Villalobos A. 2006. Identificación de polimorfismo entre hijuelos y plantas micropropagadas de *Agave tequilana* y *Agave cocui* usando ISTR. Scientia Centro Universitario de Ciencias Biológicas Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. México. 8(2): 203-206.
- Tyler M.G. 1994 Ecología y medio ambiente. Wadsworth publishing company. United States of America. pp12.
- Valenzuela Z. A. G.2007. Las denominaciones de Tequila y mezcal y la biodiversidad del genero *Agave* sp. Centro Universitario de Ciencias Biológica y Agropecuarias.
- Vázquez., J. F., Sánchez, Y. M.D. y Carrillo, J.M. 2000. Marcadores morfológicos y bioquímicos. En: Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Nuez., F. y Carrillo J. M. (Edi). Universidad Politécnica de Valencia. Valencia España. pp.: 50-93

XI. ANEXO

Anexo 1. Clasificación del Genero Agave, Gentry 1982.

subgénero *Littaea*

Sección	Especie	Subespecie	Variedades	Forma	Total
Amolae	8		1		9
Choritepaleae	3				3
Filiferae	8				8
Marginatae	21			7	28
Parviflorae	4	2	1		7
Polycephalae	5		2		7
Striatae	3	1			4
Urceolatae	2	1	2		5
Subtotal	54	4	6	7	71

subgénero *Agave*

Americanae	6	5	8		19
Campaniflorae	3				3
Deserticolae	10	11			21
Crenatae	6	1	1		8
Ditepalae	10	2			12
Hiemiflorae	12				
Marmoratae	4				
Parryanae	6		4		10
Rigidae	12		7		19
Salminae	5	1	3		9
Siasalanae					6
Umbelliflorae	2	1			3
Subtotal	82	21	23		126
Total	136	25	29	7	197

Anexo 2. Localización geográficas de los lugares donde se colectó el material vegetal.

No.	Latitud N	Longitud W
1	21.6870556	-101.009722
2	21.6883889	-101.009611
3	21.7071111	-101.053222
4	21.7075278	-101.053278
5	21.6875278	-101.056944
6	21.6875833	-101.059611
7	21.6873889	-101.056444
8	21.68725	-101.056694
9	21.6873889	-101.05675
10	21.6667222	-100.846222
11	21.6667222	-100.846222
12	21.6581111	-101.07175
13	21.6619722	-101.053889
14	21.6430833	-101.05775
15	21.688832	-101.010155
16	21.58962	-101.238397
17	21.695859	-101.046578
18	21.707873	-101.053295
19	21.579539	-101.268291
20	21.57516	-101.270725
21	21.58962	-101.238397
22	21.556836	-101.268058
23	21.687516	-101.056947
24	21.674979	-100.893857
25	21.664155	-100.834945
26	21.687675	-101.010061
27	21.687675	-101.010061
28	21.573437	-101.256861
29	21.657792	-100.844793
30	21.592124	-101.249786
31	21.592124	-101.249786
32	21.666688	-100.847195
33	21.6654444	-101.030111
34	21.6537222	-101.036111
35	21.6536111	-101.03625
36	21.6413889	-101.043583
37	21.6415	-101.043444
38	21.6423889	-101.044056
39	21.6403889	-101.042861
40	21.6403889	-101.042861
41	21.5819722	-100.992444
42	21.5781667	-100.989861
43	21.5781667	-100.989861
44	21.5774722	-100.98825
45	21.5775278	-100.988778
46	21.5775	-100.988611
47	21.5771667	-100.985944
48	21.5519444	-101.098944
49	21.5519444	-101.098944
50	21.5519444	-101.098944
51	21.5428056	-101.11575
52	21.5428056	-101.11575

53	21.5428056	-101.11575
54	21.6513611	-101.346861
55	21.6513611	-101.346861
56	21.6509444	-101.348333
57	21.6509444	-101.348333
58	21.7304444	-101.239306
59	21.7244722	-101.245556
60	21.7244722	-101.245556
61	21.3804722	-101.103139
62	21.3798611	-101.103306
63	21.3800278	-101.103083
64	21.3828333	-101.066778
65	21.3828333	-101.066778
66	21.3826389	-101.066361
67	21.3856667	-101.051972
68	21.3861111	-101.052778
69	21.3859167	-101.052472
70	21.3398056	-101.157361
71	21.4066111	-101.265806
72	21.4066944	-101.265861
73	21.4066944	-101.265861
74	21.3975556	-101.289889
75	21.3971944	-101.289639
76	21.4015	-101.285694
77	21 48 38.66	-101.360611
78	21 49 10.20	-101.329472
79	21 47 06.90	-101.342444
80	22 47 07.88	-102.346278
81	21 47 00.70	-101.348028
82	21 46 13.47	-101.316139
83	21 47 14.50	-101.335667
84	21 47 08.90	-101.339583
85	21 47 08.90	-101.339583
86	21 47 11.60	-101.332
87	21 46 52.00	-101.34375
88	21 46 52.00	-101.34375
89	21 46 52.00	-101.34375
90	21 46 45.77	-101.342139
91	21 46 45.77	-101.342139
92	21 46 21.40	-101.308528
93	21 46 21.40	-101.308528
94	21 46 58.52	-101.336694

Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN

Las soluciones para llevar a cabo el proceso de extracción son las siguientes:

CTAB-2X (100ml): Tris-HCl 100 mM pH8 (10ml)+EDTA 20 mM pH8(4ml)+NaCl 1.4M (28ml)+ 2% CTAB+0.3%β-Mercaptoetanol, aforado con agua destilada.

CTAB (100ml): Tris-HCl mM pH8 (10ml)+EDTA 20 mM pH8(4ml)+NaCl 1.4mM (30ml)+ 2% CTAB+ PVP 40 4%+ Ácido ascórbico 0.1% + 0.3%β-Mercaptoetanol, aforado con agua destilada.

STE (100ml): Tris-HCl 100 mM pH8 (10ml)+EDTA 20 mM pH8(10ml)+NaCl 1.4M (2ml) + 0.3%β-Mercaptoetanol, aforado con agua destilada.

TE-1X (100ml): Tris-HCl 100 mM pH8 (1ml) + EDTA 20 mM pH8(0.8ml) y se afora a 100 ml.

Es importante aclarar que a las soluciones no se debe agregar el β-mercaptoetanol y el ácido acético sino hasta el momento de la extracción.

Proceso de extracción de ADN de Doyle y Doyle modificado con algunas adecuaciones.

Se comenzó con la molienda de aproximadamente 5 gr del tejido con Nitrógeno líquido (N₂) tratando de obtener mediante un bisturí, únicamente la capa más superficial de la hoja de agave,

A continuación se recuperó el material en un tubo eppendorf de 1.5 ml, a este se le agregó 250 y 750 µl de buffer CTAB y STE respectivamente, se homogenizó en el vortex (Vortex-2 ®) y se centrifugo a 10000 rpm durante 8 min en la centrifugadora (Centrifuger Termo Co. ®).

Una vez centrifugado se retiró el sobrenadante y se re suspendió con buffer 400 µl CTAB-2X con β-mercaptoetanol y 600 µl de STE, se homogenizó y nuevamente se centrifuga a 10000 rpm por 8 min.

A continuación, después de eliminar el sobrenadante se agregó 600 µl de CTAB 2x con β-mercaptoetanol y 20 µl de RNasa A (5 µg/ml), se homogenizó nuevamente y se incubó en un incubadora (Termomixer ®) durante 20 min a 37° C. después de la incubación se mantuvo en hielo por 15 min.

Una vez terminada la incubación se agregaron 20 µl de proteinasa K (20 mg/ml), se homogenizó y se incubo a 65°C por 20 min. Después de la incubación se mantuvo en hielo por 15 min.

Se procedió a agregar 600µl de cloroformo-octanol 21:1, se agito para homogenizar y se centrifugo a 9000 rpm por 14 min.

A continuación se trasladó el sobrenadante con una pipeta de 200µl a un nuevo tubo eppendorf cuidando de no llevarse residuos de la extracción y se agregó 600 µl de isopropanol a -20°C, esto se dejó precipitando en un Súper congelador (REVCO ®) a -80°C durante una hora.

Después de la hora, se centrifugó a 9000 rpm durante 5 min, se retiró el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 70% a -20 °C y nuevamente se centrifugó a 7000 rpm durante 5 min.

Se retiró el sobrenadante y se dejó secando toda una noche hasta que al pellet (ADN genómico) se le evaporó el etanol para resuspenderse en 100 µl la solución TE- 1X para mantener el ADN de buena calidad.

Anexo 4. Preparación de poliacrilamida

Poliacrilamida (1000ml): Urea 480.4g+TBE 10X 100ml+ Stock acrilamida 40% 5ml. La elaboración del Stock de acrilamida comprende los siguientes componentes: Acrilamida 380g+Bisacrilamida 20g+ Persulfato de amonio 1.25/5ml

Anexo. 5 Matriz de distancias de similitud generada con el índice de Jaccard por medio de NTSYSpc 2.2 para las especies encontradas en el municipio de San Felipe Gto.

A.americana	1.00E+00																			
A.salmianasal	3.70E-01	1.00E+00																		
A.salmianacre	5.90E-01	4.40E-01	1.00E+00																	
A.atrovians	1.80E-01	2.70E-01	2.10E-01	1.00E+00																
A.lechugilla	3.80E-01	4.00E-01	4.20E-01	2.30E-01	1.00E+00															
A.salmianafe	3.90E-01	4.60E-01	4.30E-01	2.30E-01	3.80E-01	1.00E+00														
A.mapisaga	4.10E-01	4.80E-01	5.20E-01	2.30E-01	3.80E-01	4.80E-01	1.00E+00													
A.aplanata	3.80E-01	5.20E-01	4.40E-01	2.70E-01	4.30E-01	4.60E-01	5.50E-01	1.00E+00												
A.weber	2.20E-01	2.50E-01	2.70E-01	1.90E-01	2.60E-01	2.00E-01	1.80E-01	2.40E-01	1.00E+00											
A.marginata	1.50E-01	2.10E-01	1.40E-01	9.60E-02	1.40E-01	2.00E-01	3.20E-01	2.00E-01	7.90E-02	1.00E+00										
A.inaequidens	4.00E-01	4.20E-01	4.60E-01	2.30E-01	4.20E-01	4.30E-01	5.00E-01	5.00E-01	2.60E-01	2.70E-01	1.00E+00									

Anexo 6. Descripciones taxonómicas de las especies encontradas en el municipio de San Felipe Guanajuato. Gentry 1982

Agave mapisaga

Las plantas grandes con tallos cortos masivas, suculenta, 2-2,4 m de altura, casi el doble de ancho, formando rosetas abiertamente de propagación; hojas lineales, 185-250 x 19-25 cm, extendiéndose a ascendente, a veces flexionadas o inflexionadas, verde o amarillo pálido glauco, en la base muy gruesa carnosa, plano anterior, convexa por debajo de la hoja hacia arriba, largo acuminado, margen recto de con pequeños dientes marrones, las cúspides de 2-5 mm de largo de bases bajas, en su mayoría 4-6 cm de distancia , espina apical 3-5 cm de largo. Inflorescencia masiva, 7-8 m de altura o más, pedúnculo muy ajustado con grandes brácteas carnosas; panícula amplia difusión con 20-25 umbelas, flores grandes, suculentas, 80-100 mm de largo, tépalos frecuencia rojizo en la yema, la apertura amarillo sobre ovarios verdes; ovario 40-52 mm de largo, grueso, rotundamente 3-6 en ángulo recto, con cuello corto, tubo de 14-21 mm de profundidad, carnal de paredes gruesas, acanalado, tépalos desiguales, linear, erecta a curvadas hacia adentro, los exteriores 22-27 mm de largo, 7-8 mm de ancho, estrechándose hasta 5 mm, el interior de 2-3 mm más corto, con gruesa quilla carnosa, involuta y 2-coestado dentro de filamentos; 55-70 mm de largo, insertados en 2 niveles 11 a 15 mm por encima de la base del tubo, grueso pero aplanadas; anteras amarillas, 30-35 mm de largo, excéntricos; pistilo eventualmente estambres más alcance, robustos, cápsulas 6-6,5 x 2 cm , oblongo, estípite, de pico corto, de color marrón, de paredes gruesas, semillas de 7-8 x 5-6 mm.

Agave salmiana Otto ex Salm, var. *salmiana* (1859)

Sinónimos

Agave salmiana Bonplandia, (1859)
Agave coarctata Jacobi (1868)
Agave cochlearis Jacobi (1870)
Agave lehmannii Jacobi (1868)
Agave mitriformis Jacobi (1868)
Agave tehuacanensis Karw. ex Salm (1859)
Agave jacobiana Salm (1859)
Agave atrovirens var. *sigmatophylla* Berger (1915)
Agave quiotifera Trel. ex Ochoterena (1913)
Agave compluviata Trel. Baleiy Satand (1914)
Agave salmiana var. *angustifolia* Berger (1915)
Agave whitackeri Hort. ex Jacobensen (1933)
Nombre común: "Magüey verde", "Magüey pulquero".

Planta de tamaño mediano a grande, con vástagos cortos, con renuevos marcadamente surculosos, formando rosetas de 1.5 a 2.0 m de alto. Hojas de 100-200 cm de largo y 20-35 cm de ancho, lineares lanceoladas, acuminadas, grueso-carnosa; color verde a glauco grisáceo, profundamente convexo hacia la base, cóncava o hasta acanalada hacia la punta, el ápice curveado sigmoide, margen sinuado, a veces mamilado; dientes más grandes a lo largo de la parte media de la hoja, en su mayoría de 5 a 10 mm de largo, con una separación de 3 a 5 cm, de color castaño a castaño grisáceo, las cúspides derechas recurvadas desde la parte amplia de la base, espinas largas, gruesas, subuladas, de 5-10 cm de largo, café oscuro acanaladas por arriba de la mitad de su longitud, largo decurrentes, a veces a la mitad de la hoja con un fuerte margen córneo; Inflorescencia fuerte (figura 2), pedúnculo de 7-8 m de altura; cerradamente imbricado con brácteas carnosas y grandes; panícula amplia, con 15-20 grandes umbelas desarregladas a partir de la mitad superior del eje; flores de 80-110 mm de largo, gruesas y carnosas, amarillas sobre el ovario verde; ovario de 50-60 mm de largo, grueso, cilíndrico con constricciones en el cuello; tubo largo infundibuliforme, 21-24 mm de profundidad, 20 mm de ancho, grueso entre los surcos de la espina; tépalos desiguales, lanceolados, rizados entre los exteriores 21-25 mm de largo y 6 mm de ancho y pandeándose en la base, angosta arriba, con margen delgado e involuto, el interior corto, con amplia quilla filamentos 55-70 mm de largo insertos desigualmente apenas por encima de la parte media del tubo, los de los tépalos más externos, 1-3 mm más arriba que los otros; anteras de 30-35 mm de largo, amarillas, excéntricas; pistilos alargados en la post-floración; fruto una cápsula de 5.5-7 cm de largo y 2-2.2 cm de ancho, estipitada puntiaguda leñosa, color café; semillas de 8-9 mm de largo y 6-7 mm de ancho, negras, lacrimiformes, ovoides, hilo poco profundo, apical

Agave salmiana Otto ex Salm. ssp. *crassispina* (Trel.) Gentry.

Nombre común: Maguey verde

Sinónimo

Agave crassispina Trel. (1914)

Plantas con pocas hojas, más pequeñas que las presentes en la variedad *salmiana*, rosetas de 80-120 cm de alto, compactas a extensas; Hojas de 60-90 cm de largo y 16-25 cm de ancho, rara vez largas, lanceoladas, gruesas y rígidas, angostas hacia la base convexa, delgadas y cóncavas a través de la parte media, acuminada, de color verde a grisáceo, los márgenes undulados a crenados con dientes basales firmes, la mayoría de 7-12mm de largo, café oscuro o grisáceo con la edad, con una separación de 1-3 cm; espina terminal fuertemente subulada, de 5-9 cm de largo, acanalado por encima de los $\frac{3}{4}$ de su longitud, decurrentes, de color café oscuro. inflorescencia grande cuando carnosas, brácteas cerradas ajustadas;

flores de 7-9 cm de longitud, suculentas, por lo regular de color amarillo; ovario 3.8-5 cm de largo, cilíndrico, cuello no constricto; tubo de 1.1-1.4 cm de largo y 1.7-2 cm de ancho con paredes gruesas y finamente acanaladas; tépalos desiguales de 2.1-3.0 cm de largo; filamentos de 5.2-7.0 cm de largo, insertados sobre el nivel ligeramente encima de la parte media del tubo; anteras de 3.0-3.5 cm de largo, de color amarillo.

Agave salmiana ssp. *Crassispina*

Plantas con relativamente pocas de hojas, más pequeño que variedad Salmiana silvestre, las rosetas de 80-120 cm de altura, compactos, hojas ampliamente lanceoladas, de 60-90 x 16-25 cm, rara vez más grandes, gruesas, rígidas estrechadas hacia la base debajo convexa gruesa, delgada y cóncava a través de la mediados de la hoja, acuminado, verde grisáceo, los dientes de amplia base, sobre todo 7-12 mm de largo, de color marrón oscuro entrecano edad, de 1-3 cm de distancia; espina apical 5-9 cm de largo de color marrón oscuro; inflorescencia como en la especie, flores generalmente de color amarillo por encima de ovario verde, 70-90 mm de largo, densamente suculentas; ovario 38-50 mm de largo, cilíndrico, cuello no constreñida; tubos 11-14 mm de largo, 17-20 mm de ancho, con paredes gruesas, más finamente estriados; tépalos desiguales, 21-30 mm de largo; filamentos de 52-70 mm de largo, en posición casi en un nivel ligeramente superior a medio metro; anteras 30-35 mm de largo, de color amarillo.

Agave salmiana otto ex salm dick

Las plantas de tamaño medio a grande, con tallos cortos y gruesos, muy suculenta, formando rosetas grandes 1,5-2 m de altura y el doble de ancho; hojas de 100-200 x 20-35 cm, lanceoladas ampliamente lineal, acuminadas, gruesas, carnosas verde glauco a grisáceo, muy abajo en la base convexa, el vértice curva, los dientes más grande de la mitad de la hoja, la mayoría de 5-10 mm de largo, 5.3 cm de separación, de color marrón a marrón grisáceo, las cúspides directamente a flexionadas o curvados, la espina apical larga y gruesa de 5-10 cm de largo, de color marrón oscuro. inflorescencia, el pedúnculo estrechamente imbricados con grandes brácteas carnosas, de 7-8 m de altura; panícula amplia, con 15 a 20 grandes umbelas, flores de 80 a 110 mm de largo, gruesas carnosas, de color amarillo por encima de ovario verde; ovario 50-60 mm de largo, grueso, cilíndrico, con el cuello; tépalos desiguales, lanceoladas, curvando hacia dentro con la floración, el exterior 21 - 25 x 6 mm y abultamiento en la base, se estrecharon más arriba, con estrecho margen involuta, sin rodeos galeate, el interior de 2-3 mm más corto, con una amplia quilla; filamentos de 55-70 mm de largo, insertado justo encima de la mitad del

tubo, las del exterior tépalos frecuencia 1-3 mm más altos que los demás, anteras 30-35 mm de largo, de color amarillo, excéntrico; pistilo estambres largo alcance en post-antesis; cápsula (Gentry 22416) 5.5-7 x 2-2.2 cm, las semillas picudas, arbolado , de color marrón de 8-9 x 6-7 mm.

Agave salmiana ssp. Ferox

Grandes rosetas, bastante compacta, 1 a 1,5 m de altura, las hojas de 70-90 x 23-30 cm, ampliamente lanceoladas a corto acuminado, verde claro brillante, densamente succulento, el margen festoneado, fuertemente armados con dientes de 10-14 mm prominentes; espina terminal estrecha de 6-7 cm de largo; inflorescencia como para las especies, con umbelas densos pesados, pero las flores más delgado, 70-85 mm de largo, tubo de 15 amplias mm; cápsulas (Berger) 58-60-70 mm de largo, obovoide, estípite, de pico largo, marrón grisáceo a marrón oscuro, las semillas 7x5 mm, negro brillante, con un margen de alas estrechas.

Agave Americana

Es una planta Perenne, Acaule, resistente a terrenos áridos. Las hojas de entre 15 y 30 cm. de ancho y más de un metro de largo, crecen desde el suelo, grandes, lanceoladas y carnosas de color blanco-azulado o blanco-grisáceo (según autores), saliendo todas desde el centro donde permanecen enrolladas a un tallo central donde se van formando hasta su separación, con espinas en su borde de casi 3 cm muy duras, rígidas y finas.

Todas las hojas terminan en el Ápice en una aguja fina de unos 5 cm de longitud y de hasta 1 cm de ancho en su parte menos extrema

Florece una sola vez en su vida (muere tras esta floración (Monocárpico), aunque no sin haber dejado una copiosa descendencia en Hijuelos o retoños de raíz) en un tallo de unos ocho o diez metros y una anchura superior a los 10 cm de diámetro (fotografía en el margen derecho) de él y desde más de la mitad de su longitud van saliendo pequeñas ramas en forma de pirámide terminando cada una en un grupo de flores de color amarillo-verdoso, cada flor tiene un tamaño de unos 5 a 10 cm. El fruto es una cápsula trígona y alargada

Agave americana L. ssp. protoamericana

Rosetas: acaulecentes o con tallos cortos, generalmente surculosos, frecuentemente reproducción por semillas; Hojas: anchas lanceoladas, 80-135 x 17-22 cm, algo rígidas poco angostas por encima de la base carnosa, convexas en su parte inferior, llegando a ser planas a acanaladas en la superior, color

glauco gris a verde pálido, en ocasiones marcadas con bandas; el margen crenado a sinuado; los dientes: por lo general regulares de tamaño y con espacios entre sí de 5-10 mm de largo con escasas cúspides planas, de bases anchas, rectas a curvadas, café oscuro a gris; espinas de 3-6 cm de largo, anchas en la base, subuladas, café oscuro a café grisáceo, cortamente decurrente, acanaladas y abiertas hacia la punta; Inflorescencia: panículas de 6-8 m de altura con pequeñas brácteas laterales, de 15-20 ramificaciones amplias, casi rectas hacia $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{3}$ del eje; flores de 75-90 mm de largo, sobre delgados pedicelos bibracteolados; ovario de 38-45 mm de largo, cilíndrico o fusiforme, tubo profundamente infundibuliforme, 15-20 mm de largo, carnoso, acanalado profundamente, tépalos desiguales, estrechándose durante la floración, los exteriores de 20-30 mm de largo, lineares a lanceolados, el ápice levemente en forma de capucha, rugoso papilado, oscuro a veces coloreado; filamentos de 60-70 mm de largo, insertos en medio del tubo; anteras 25-35 mm de largo, excéntricas; Fruto, cápsulas pequeñas 3.5-4 x 1.6-2 cm. oblongas, pared delgada, café claro, estipitada, cortas- puntiagudo; semillas de 7-7.5 x 5-6 mm lacrimiformes, negras, hilo no subapical, margen alado y uniforme

Agave americana L., var. *americana* Sp. Pl. 1753.

Nombre común: "maguey cenizo"

Sinónimos:

Agave complicata Trel. ex Ochoterana (1915)

Agave graccilispina Engelm. ex Trel. (1914)

Agave melliflua Trel.

Agave zonata Trel.

Agave felina Trel. (1920)

Agave rasconensis Trel.

Agave subzonata Trel.

Plantas medianas a grandes, por lo regular con vástagos y algunas veces con reproducción por semilla, corto-pedunculado, las rosetas de 1-2 m de alto, 2-3 m de ancho; Hojas en su mayoría de 10-20 x 1.5-2.5 dm, lanceoladas, angostas y anchas hacia la base, planas o acanaladas, o reflexas, por lo regular acuminada, de color gris-glauco claro a verde claro, algunas veces jaspeada; cutícula lisa a ligeramente áspera; margen ondulado a crenado; dientes variables, el más grande de 5-10 mm de largo, cúspides delgadas rectas a flexuosas o curvadas, amplias hacia la base, 2-6 cm de separado, color café a grisáceo pruinoso, Espinas en su mayoría de 3-5 cm de largo, cónicas a subuladas, en ocasiones acanaladas por arriba de la parte media, café brillante a gris pruinoso; Inflorescencia de 5-9 m de altura, eje delgadamente recto, escarioso, brácteas triangulares muy pequeñas, las panículas en forma general largas, ovales, algo abiertas, con 15-35 ramas diseminadas integradas por

umbelas desarregladas que se separan de un $\frac{1}{2}$ - $\frac{1}{3}$ del eje; Flores 70-100 mm de longitud, con largos, pedicelos, ovario verdoso, delgado, abierto, de 30-45 mm con el cuello acanalado, afilado y base más estrecha; tubo de 8-20 mm de profundidad, de 30-45 mm de ancho, infunbuliforme, pared gruesa, profundamente acanalada. Tépalos desiguales, los más externos de 25-35 mm de largo, grueso, linear-lanceolado, cuculado del ápice, rugoso, algunas veces rojo-dentado, conduplicadamente estrecho en la floración, los de la segunda y tercera hileras internas más cortos, conduplicados, con la quilla estrecha y grande, apostillada en su interior, filamentos por lo común muy largos, de 60-90 mm de largo, algo aplanados, adelgazados hacia el ápice, insertos en la parte media del tubo de 5-10 mm por encima de la base; anteras 30-36 mm de largo, amarillas, céntricas a excéntricas excertas en la post-floración; pistilo sólido, con estigma trilobado; Fruto cápsulas oblongas 4-5 cm de largo, corto-estipitadas y puntiagudas; semillas lunadas a lacrimiformes, 7-8 x 5-6 mm, color negro brillante

Agave weberi

Plantas medianas a grandes, abundantes retoños, verde grisáceo, formando rosetas abiertas 1.2 a 1.4 m de altura, de 2-3 m de ancho, hojas 110-160 x 12-18 cm, más anchos en la mitad de la hoja, estrechados a continuación, lanceoladas, más carnosas suaves, flexibles, cóncavas, el margen superior por lo general sin dientes a lo largo de $\frac{1}{3}$ a $\frac{1}{2}$, denticulado a continuación, los dientes de 1-2 mm de largo, 1 cm o menos distancia, raramente sin dientes en todo momento como en brácteas; columna 3-4.5 cm de largo, pardo a grisáceo, abiertamente superficialmente acanalados arriba en la mitad inferior, decurrente por varios cm; inflorescencia panícula 7-8 m de altura, a veces bulbíferos, flores de color amarillo brillante por encima de los ovarios de color verde pálido, 70-80 mm de largo; ovario 33-40 mm de largo, cilíndricos, con cuello corto. tubo 18-20 mm de profundidad, 16 mm de ancho, profundamente acanalada; tépalos igual 20-24 mm de largo, erguido, involuta, obtuso, el interior más estrecho. Filamentos de 55-60 mm de largo, largos afilados, insertados en medio tubo; anteras 30-31 mm de largo, de color amarillo, céntrica o excéntrica, cápsulas de 55 x 30 mm, apenas picuda.

Agave lechuguilla

Pequeñas plantas, con muchos retoños, más abiertos, pocas rosetas de hojas, en su mayoría 30-50 x 40-60 cm, con flores de color amarillo o rojizo, las hojas generalmente 25-50 x 2,5-4 cm, lanceoladas lineal, verde claro a amarillo verde, mayormente ascendente para erigir, cóncava hacia arriba, muy convexa por debajo, a veces, gruesa, dura, el margen recta continua, de color marrón claro a

gris, fácilmente separable de la hoja seca, dientes normalmente desviado, normal 2 -5 mm de largo, de color marrón o en su mayoría de color gris claro y débil, en su mayoría 1.5-3 cm de separación, de 8 a 20 por lado, espina apical de 1.5-4 cm de largo, color gris, escapo pico 2.5 hasta 3.5 m de altura, el eje general glauca, las flores pediceladas corto de dos en dos o de a tres, (2-15 cm) paniculadas laterales ascendentes varias-muchas flores, flores de 30-45 mm de largo , teñida de amarillo o frecuencia con rojo o morado; ovario 15-22 mm de largo, fusiforme, rotundamente en ángulo, constreñido en el cuello, tubo de 2,5 a 4 mm de largo, poco profunda, abierta; tépalos, linear, 13-20 mm de largo, envuelta con filamentos, lo externo muchos filamentos de 25-40 mm de largo, extensión, anteras 15-20 mm de largo, cápsulas oblongas a piriforme, 18-25 x 11-18 mm, bruscamente muy corta pediceladas o sésiles, redondeado y de pico corto en el ápice, glauco, semillas 4.5-6 x 3.5 a 4.5 mm.

Agave aplanata

Rosetas medianas a grandes, en su mayoría glauco gris, muchas hojas, fuertemente armados con espinas, radial en las formas silvestres 5-10 dm de altura, 10-20 dm amplio, en los cultivares de 12 a 20 dm de altura, 25 a 30 dm de ancho; hojas de plantas maduras mucho más tiempo que las primeras etapas, 40-60 x 7-10 cm (silvestres) o 100 a 140 cm de largo (cultivadas), lanceoladas lineal, por lo general más amplias en o cerca de la base, muy rígidos, abundante fibra, espinas laterales muy fuertes de 8-15 mm de largo, medio erguida, o con frecuencia flexionada hacia abajo, en su mayoría 4-6 cm de distancia son de color marrón, la espina apical es de 3-7 cm de largo, 0,8 a 1,4 cm de ancho en la base, escapo de 4-8 m de alto, estrecho y profundo con numerosos ramales; brácteas pedunculares, flores de color amarillo verdoso con ovario, 55-80 mm de largo; ovario 35-38 mm de largo, cilíndrico angular, se estrecha hacia la base; tubo cilíndrico, de 15-22 mm de profundidad, con paredes gruesas, profundamente surcada, tépalos desiguales, grueso, linear-lanceoladas, de color marrón con punta; filamentos de 45-55 mm de largo, anteras 23-30 mm de largo, céntrica o excéntrica.

Agave inaequidens

Plantas medianas a grandes, individual, de tallo corto, visiblemente abiertas; hojas variables, en su mayoría 75-150 x 11-21 cm, amplia o estrechamente lanceoladas a oblanceoladas, ascendiendo al curvo divergente, cóncava hacia arriba, grueso carnosos, especialmente hacia la base redondeada , de color verde claro a amarillo-verde, rara vez ligeramente glauco, el margen ondulan a curvado y dentado; dientes di mórficos, la más grande en grandes prominencias, comúnmente de 8-10 mm de altura, las bases aplanadas largo

que la altura de los dientes, 2.5-4 cm de distancia , recta o curva diversamente, castaño a marrón oscuro, pocos dientes más pequeños intersticiales ; espinal apical, 2.5 a 5.5 cm de largo, amplia, profunda canalizado anteriormente, de color marrón oscuro, liso, que sobresale en la carne de la hoja de abajo, fuertemente decurrente a los dientes superiores; panículas de 5-8 m de altura, en una profunda contorno estrecho, con 30-50 umbelas compactos en la mitad superior del árbol, brotes y tépalos de color rojizo púrpura, flores de 60-90 mm de largo, la apertura de amarillo; ovario 30-40 mm de largo, cilíndrico, con cuello corto fruncido, tubo de 5-12 (-15) mm de profundidad, profundamente acanalado, abultamiento con inserciones de filamentos, de paredes gruesas, tépalos desiguales, 25-30 (-34) mm de largo, estrecho, linear, erecta, involucionan, sujetado fuertemente y dentro ápice; filamentos de 50-60 mm de largo, cerveza negra, oval en sección transversal, se inserta encima de la mitad de tubo; anteras grandes, 26-34 mm de largo, centrada a excéntrico; cápsulas 4-4,5 x 2 cm, oblongas , estípites, redondeado a apiculados en el ápice, pico menor, marrón, la bien cercada; muesca semillas 6-7,5 x 4.5 a 5.5 mm, hemisférica, de color negro brillante, finamente punteada , el ala marginal curvada o erecto, hilar amplio .

Agave atrovirens var. mirabilis

Grande, gigantescas rosetas individuales con muchas hojas, suave suculento, ascendente, en sentido amplio lanceoladas hojas de hasta 2 m de largo. Difiere de la especie única en tener las hojas constantemente gris claro glauco.

Anexo 7 Frecuencias a alelicas de las especies de Agave del municipio de San Felipe Guanajuato con 115 loci. Donde p1 y p2 son frecuencia observada.

Locus	Frecuencia génica observada		Frecuencia génica esperada	
	p ₁	p ₂	q=p ₂ ^{1/2}	p=1-q
1	0.1250	0.8750	0.9354	0.0646
2	0.0938	0.9063	0.9520	0.0480
3	0.1354	0.8646	0.9298	0.0702
4	0.5104	0.4896	0.6997	0.3003
5	0.7083	0.2917	0.5401	0.4599
6	0.5313	0.4688	0.6847	0.3153
7	0.3021	0.6979	0.8354	0.1646
8	0.1354	0.8646	0.9298	0.0702
9	0.3958	0.6042	0.7773	0.2227
10	0.4896	0.5104	0.7144	0.2856
11	0.3958	0.6042	0.7773	0.2227
12	0.1771	0.8229	0.9071	0.0929
13	0.4583	0.5417	0.7360	0.2640
14	0.1979	0.8021	0.8956	0.1044
15	0.4479	0.5521	0.7430	0.2570
16	0.6667	0.3333	0.5774	0.4226
17	0.5625	0.4375	0.6614	0.3386
18	0.4479	0.5521	0.7430	0.2570
19	0.1771	0.8229	0.9071	0.0929
20	0.2500	0.7500	0.8660	0.1340
21	0.6458	0.3542	0.5951	0.4049
22	0.7083	0.2917	0.5401	0.4599
23	0.3333	0.6667	0.8165	0.1835
24	0.5000	0.5000	0.7071	0.2929
25	0.1458	0.8542	0.9242	0.0758
26	0.0521	0.9479	0.9736	0.0264
27	0.1354	0.8646	0.9298	0.0702
28	0.3542	0.6458	0.8036	0.1964
29	0.5833	0.4167	0.6455	0.3545
30	0.3646	0.6354	0.7971	0.2029
31	0.4688	0.5313	0.7289	0.2711
32	0.0000	1.0000	1.0000	0.0000
33	0.0000	1.0000	1.0000	0.0000
34	0.0000	1.0000	1.0000	0.0000
35	0.0000	1.0000	1.0000	0.0000
36	0.0000	1.0000	1.0000	0.0000

37	0.8750	0.1250	0.3536	0.6464
38	0.3021	0.6979	0.8354	0.1646
39	0.0833	0.9167	0.9574	0.0426
40	0.1667	0.8333	0.9129	0.0871
41	0.5625	0.4375	0.6614	0.3386
42	0.5521	0.4479	0.6693	0.3307
43	0.3542	0.6458	0.8036	0.1964
44	0.5000	0.5000	0.7071	0.2929
45	0.7396	0.2604	0.5103	0.4897
46	0.6667	0.3333	0.5774	0.4226
47	0.4271	0.5729	0.7569	0.2431
48	0.3229	0.6771	0.8229	0.1771
49	0.2917	0.7083	0.8416	0.1584
50	0.1667	0.8333	0.9129	0.0871
51	0.1875	0.8125	0.9014	0.0986
52	0.2500	0.7500	0.8660	0.1340
53	0.2083	0.7917	0.8898	0.1102
54	0.2188	0.7813	0.8839	0.1161
55	0.7813	0.2188	0.4677	0.5323
56	0.0833	0.9167	0.9574	0.0426
57	0.6771	0.3229	0.5683	0.4317
58	0.7813	0.2188	0.4677	0.5323
59	0.8646	0.1354	0.3680	0.6320
60	0.8125	0.1875	0.4330	0.5670
61	0.8021	0.1979	0.4449	0.5551
62	0.4479	0.5521	0.7430	0.2570
63	0.4792	0.5208	0.7217	0.2783
64	0.8438	0.1563	0.3953	0.6047
65	0.8333	0.1667	0.4082	0.5918
66	0.9167	0.0833	0.2887	0.7113
67	0.9792	0.0208	0.1443	0.8557
68	0.7708	0.2292	0.4787	0.5213
69	0.2604	0.7396	0.8600	0.1400
70	0.1250	0.8750	0.9354	0.0646
71	0.0938	0.9063	0.9520	0.0480
72	0.0729	0.9271	0.9629	0.0371
73	0.0625	0.9375	0.9682	0.0318
74	0.3333	0.6667	0.8165	0.1835
75	0.2292	0.7708	0.8780	0.1220
76	0.3438	0.6563	0.8101	0.1899
77	0.3229	0.6771	0.8229	0.1771
78	0.4688	0.5313	0.7289	0.2711
79	0.4167	0.5833	0.7638	0.2362
80	0.7292	0.2708	0.5204	0.4796
81	0.6458	0.3542	0.5951	0.4049

82	0.5938	0.4063	0.6374	0.3626
83	0.6146	0.3854	0.6208	0.3792
84	0.5000	0.5000	0.7071	0.2929
85	0.2292	0.7708	0.8780	0.1220
86	0.2188	0.7813	0.8839	0.1161
87	0.2083	0.7917	0.8898	0.1102
88	0.2083	0.7917	0.8898	0.1102
89	0.2292	0.7708	0.8780	0.1220
90	0.2396	0.7604	0.8720	0.1280
91	0.2083	0.7917	0.8898	0.1102
92	0.2604	0.7396	0.8600	0.1400
93	0.0938	0.9063	0.9520	0.0480
94	0.3125	0.6875	0.8292	0.1708
95	0.2708	0.7292	0.8539	0.1461
96	0.1875	0.8125	0.9014	0.0986
97	0.2188	0.7813	0.8839	0.1161
98	0.2604	0.7396	0.8600	0.1400
99	0.6250	0.3750	0.6124	0.3876
100	0.4896	0.5104	0.7144	0.2856
101	0.7188	0.2813	0.5303	0.4697
102	0.4688	0.5313	0.7289	0.2711
103	0.4896	0.5104	0.7144	0.2856
104	0.6458	0.3542	0.5951	0.4049
105	0.7500	0.2500	0.5000	0.5000
106	0.6563	0.3438	0.5863	0.4137
107	0.5521	0.4479	0.6693	0.3307
108	0.5000	0.5000	0.7071	0.2929
109	0.4479	0.5521	0.7430	0.2570
110	0.3750	0.6250	0.7906	0.2094
111	0.1979	0.8021	0.8956	0.1044
112	0.1563	0.8438	0.9186	0.0814
113	0.1354	0.8646	0.9298	0.0702
114	0.1771	0.8229	0.9071	0.0929
115	0.1979	0.8021	0.8956	0.1044
