



Universidad Autónoma Chapingo

ENSEÑAR LA EXPLOTACION DE LA TIERRA, NO LA DEL HOMBRE

Departamento de Fitotecnia
Postgrado en Biotecnología Agrícola

**DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES DE
AGAVES PULQUEROS DEL NORORIENTE DEL
ESTADO DE MÉXICO**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA**

PRESENTA:

ING. GUILLERMO ALFARO ROJAS



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES DE AGAVES PULQUEROS DEL NORORIENTE DEL ESTADO DE MÉXICO

Tesis realizada por Guillermo Alfaro Rojas bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECTOR:



Dr. Juan Porfirio Legaria Solano

ASESOR:



Dr. José Luis Rodríguez de la O

ASESOR:



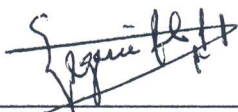
Dra. Margarita Gisela Peña Ortega.

DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES DE AGAVES PULQUEROS DEL NORORIENTE DEL ESTADO DE MÉXICO

Tesis realizada por Guillermo Alfaro Rojas bajo la dirección del Comité
Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial
para obtener el grado de:

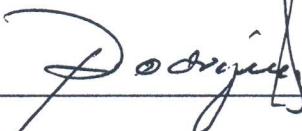
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECTOR:



Dr. Juan Porfirio Legaria Solano

ASESOR:



Dr. José Luis Rodríguez de la O

ASESOR:



Dra. Margarita Gisela Peña Ortega.

DEDICATORIA

A Dios por darme salud, vida, familia, un poco de inteligencia y también por ser una guía en la que siempre he confiado.

Dedico de manera particular esta tesis a dos personas que con su trabajo inquebrantable me han enseñado que lo que se puede soñar se puede hacer y que sólo se puede aprender haciendo las cosas, de tal manera que a lo largo de estos años juntos hemos logrado iniciar proyectos como éste, que seguramente se traducirán en buenos resultados; con cariño a ellos:

Guillermo Alfaro Espinosa

Maria Esther Rojas Espinosa

Con gratitud a mis hermanos y hermanas por formar un gran equipo

José de Jesús

Servando

Telesforo

Maria Guadalupe

Adriana

Guillermo

Netzahualcoyotl

Maria Esther

AGRADECIMIENTOS

A La Universidad Autónoma Chapingo, institución que me ha permitido tener una formación profesional de excelencia.

Al Departamento de Fitotecnia, ya que tuvo la visión de implementar un postgrado en Biotecnología Agrícola.

Al Dr. Juan Porfirio Legaria Solano, que a mi juicio es el mejor Biólogo Molecular en esta Universidad y que sin su apoyo logístico, económico y académico no sería posible presentar estos resultados.

Al Dr. José Luis Rodríguez de la O y Dra. Gisela Peña Ortega por la revisión realizada al presente documento.

A los viejos y nuevos amigos Carlomagno, Tepale, Jorge, Jacob, Marciano, Jáuregui, Maurino que de alguna manera han contribuido con su buen juicio y apoyo económico en la realización de este trabajo: Sr. Esteban Coello Macias y familia, Sra. Micaela González Aguilar y familia.

DATOS BIOGRÁFICOS

El Ingeniero Agrónomo Guillermo Alfaro Rojas es originario de Santa Bárbara, Otumba, Estado de México; ingresó a la Universidad Autónoma Chapingo en el año de 1997 donde realizó estudios en la Preparatoria Agrícola y Departamento de Fitotecnia, concluyendo la carrera de Ingeniero Agrónomo especialista en Fitotecnia en el año 2001. A partir del año 2001 inició su ejercicio profesional en la empresa DIAAPROY S.A. de C.V. donde desempeñó el cargo de gerente de proyectos en diversas licitaciones públicas nacionales e internacionales; de manera paralela realizó asesoramiento a microempresas dedicadas a la producción hidropónica de pepino y tomate rojo. Actualmente se dedica a la producción de tomate rojo, nopal verdulero y maguey pulquero. En el año 2004 ingresó a la Maestría en Biotecnología Agrícola del Departamento de Fitotecnia en la Universidad Autónoma Chapingo, donde concluyó en junio del 2006 con la realización de su trabajo de tesis en aspectos de diversidad morfológica y molecular mediante el uso de marcadores moleculares en maguey pulquero.

RESUMEN

DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES DE AGAVES PULQUEROS DEL NORORIENTE DEL ESTADO DE MÉXICO.

Guillermo Alfaro Rojas. Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo.

(Bajo la Dirección del Dr. Juan Porfirio Legaria Solano).

Esta investigación se realizó en parcelas de maguey, del Nororiente del Estado de México y el Laboratorio de Biotecnología Agrícola, ubicado en el Campo Experimental del Valle de México. Se muestrearon y analizaron seis poblaciones de magueyes pulqueros (Manso, Ayoteco, Verde, Carrizo, Negro y Xilometl), para estimar la diversidad genética entre y dentro de las mismas, obtener las huellas genéticas correspondientes, así como realizar comparaciones para diferenciar las variantes de maguey pulquero. Se utilizaron marcadores tipo RAPD (Polimorfismos en el ADN Amplificados al Azar) y algunas variables morfológicas. En el estudio se evaluaron 20 iniciadores de los que 13 rindieron productos de amplificación: OPA01, OPA02, OPA03, OPA04, OPA05, OPA07, OPA09, OPA10, OPA13, OPA14, OPA15, OPA19 y OPA20, de Operon Technologies®. Los productos amplificados mediante PCR se separaron en geles de agarosa al 1.2 %, se tiñeron con bromuro de etidio, se fotografiaron y finalmente se documentaron. Se encontró una correlación positiva entre el número de hojas y la altura de planta, altura de planta y largo de hojas, altura de planta y el número de espinas laterales, así como entre el número de hojas y largo de hojas. El análisis de varianza, mostró diferencias significativas ($\alpha \leq 0.01$) entre poblaciones para las variables: altura de planta, número de hojas, largo de hojas, ancho de hojas, número de espinas laterales y longitud de espina principal. Los discriminantes morfológicos que permitieron separar a las poblaciones en cuatro grupos fueron la longitud de espina principal y el número de espinas laterales, las cuales en conjunto explicaron el 94 % de la variación. El porcentaje de *loci* polimórficos entre las poblaciones fue de 73.17 %; mientras que dentro de las poblaciones para maguey Manso se detectó un polimorfismo de 32.52 %; para Ayoteco, 32.52 %; Verde Temazcalapa, 12.20 %; Xilometl 22.78 %; Negro, 24.39 % y para Carrizo, 26.02 %; indicando reducida variabilidad genética dentro de las poblaciones, lo que podría colocarlas en un futuro en serio peligro de extinción. El coeficiente de diversidad de Nei (H) para todos los *loci* estudiados en las seis poblaciones de magueyes fue de 0.2757 ± 0.1971 , mientras que para maguey Manso fue de 0.1211 ± 0.1918 , Ayoteco 0.1191 ± 0.1878 , Verde Temazcalapa 0.0384 ± 0.1126 , Negro 0.0855 ± 0.1682 , Xilometl 0.0820 ± 0.1695 y Carrizo 0.0860 ± 0.1656 , confirmándose la reducida diversidad entre las poblaciones. El grado de flujo genético ($Nm = 0.2394$) fue bajo, y las cruces entre las poblaciones son raras, indicando que existe menos de un migrante entre las seis poblaciones por generación. El número de alelos por locus (A) y el número efectivo de alelos (Ae) fue semejante para las seis poblaciones. Con base en la distancia genética de Nei, los marcadores RAPD permitieron separar a las poblaciones de maguey en dos grandes grupos, cada uno de los cuales incluyó tres variantes relacionadas. Las poblaciones que se asociaron de manera más estrecha en un grupo fueron la especie *Agave mapisaga* Trel (maguey Carrizo) y la variante Verde Temazcalapa con un valor de identidad de 0.9098, mismos que se relacionaron con maguey Xilometl con una similitud de 0.8224; por el otro lado, en un segundo grupo hubo una asociación muy cercana entre maguey Manso (*Agave salmiana* var. *Salmiana*) y maguey Negro (0.8927), seguida de maguey Manso con maguey Ayoteco con un valor de identidad de 0.8333. Los marcadores RAPD fueron altamente eficientes para diferenciar y agrupar a cada variante de manera inequívoca.

SUMMARY

GENETIC DIVERSITY IN POPULATIONS OF AGAVES PULQUEROS (*AGAVE SPP.*) FROM THE NORTHEAST OF MEXICO STATE

Guillermo Alfaro Rojas. Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola. Departamento de Fitotecnia.
Universidad Autónoma Chapingo.

(Under the direction of Dr. Juan Porfirio Legaria Solano).

In the present research six populations of maguey pulquero Manso (*Agave salmiana* var. *Salmiana*), Ayoteco, Verde, Carrizo (*Agave mapisaga* Trel), Negro y Xilometl of fields located in the Northeast of Mexico State were analyzed to determine the genetic diversity among and within of them, to obtain the corresponding genetics fingerprints, and also to carry out comparisons in order to differentiate and distinguish between the different variants of maguey pulquero. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers and some morphological variables were analyzed. Analysis of variance showed significant differences ($\alpha \leq 0.01$) between populations in the traits: length of plant, number of leaves, length of leaves, width of leaves, number of lateral thorns and length of principal thorn. The morphological traits that permitted the separation of the populations into four groups were the length of principal thorn and the number of lateral thorns and explained 94 % of the total variation. The percentage total of polymorphic *loci* was 73.17 %. In maguey Verde Temazcalapa a polymorphism of 12.20 % was detected and in Manso and Ayoteco, 32.52 %; indicating low genetic variability within the populations. Nei's coefficient of diversity (H) of all *loci* studied in the six populations of maguey was 0.2757 ± 0.1971 , confirming the low diversity within the populations. The level of genetic flow ($Nm = 0.2394$) was low, this indicates that exists less than one migrant per generation between the six populations. Based on Nei's genetic identity, the RAPD markers permitted the separation of the populations of maguey in two large groups; each of them included three related variants. The populations that were associated with group one were *Agave mapisaga* Trel (maguey Carrizo) and the variant Verde Temazcalapa with a value of identity of 0.9098, and there were related to maguey Xilometl with a similarity coefficient of 0.8224. On the other hand, in a second group a very close association between maguey Manso and maguey Negro (0.8927) was determined, followed by maguey Manso with maguey Ayoteco, with 0.8333 of identity.

INDICE

CONTENIDO	Pág.
RESUMEN.....	xii
SUMMARY.....	xiii
LISTA DE CUADROS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
ANEXOS.....	xv
ABREVIATURAS Y SIMBOLOS.....	xx
I. INTRODUCCION.....	1
1.1. Objetivos.....	3
II. REVISION DE LITERATURA.....	5
2.1. Diversidad Genética.....	5
2.2. Origen de los Agaves.....	8
2.3. Características Botánicas de los Agaves.....	8
2.4. Uso de los Agaves.....	9
2.5. Importancia Ecológica de los Agaves.....	11
2.6. Producción de Bebidas a partir de Agaves en México.....	11
2.7. Importancia de los Magueyes Pulqueros.....	13
2.8. Descripción de Especies de Agaves Pulqueros.....	14
2.8.1. Maguey Carrizo (<i>Agave mapisaga</i> Trel)	14
2.8.2. Maguey Manso (<i>Agave salmiana</i>).....	15
2.9. Marcadores Genéticos.....	16
2.9.1. Marcadores Morfológicos.....	16

2.9.2. Marcadores Moleculares de ADN.....	18
2.9.3. Bases Moleculares de Marcadores de ADN.....	19
2.9.4. RAPD.....	21
2.10. Trabajos Realizados con RAPD; en Agaves y en otras Especies... ..	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
3.1. Descripción del Área de Estudio.....	25
3.1.1. Localización Geográfica.....	25
3.1.2. Clima.....	25
3.1.3. Suelo.....	25
3.1.4. Geología.....	26
3.2. Material Vegetal.	26
3.2.1. Colecta de Material Vegetal.....	30
3.3. Fase de Campo.....	31
3.4. Muestreo.....	31
3.5. Caracteres Evaluados.	31
3.5.1. Fase de Campo.....	31
3.5.2. Fase de Laboratorio.....	33
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
4.1. Análisis de Datos Morfológicos.....	38
4.1.1. Correlaciones y Análisis de Varianza de Caracteres Morfológicos..	38
4.1.2. Comparación de Medias.....	41
4.1.3. Análisis Discriminante.....	43
4.2. Análisis de Datos Moleculares.....	48
4.2.1. Análisis Discriminante Canónico.....	48
4.2.2. Análisis por Individuos en Poblaciones de Maguey Pulquero.....	49

4.2.3. Análisis de Poblaciones en Especies y Variantes de Maguey Pulquero.....	58
4.2.4. Contraste entre Caracteres Morfológicos vs Marcadores Moleculares (RAPD).....	64
V. CONCLUSIONES.....	68
VI. PERSPECTIVAS.....	70
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	71
VIII. ANEXOS.....	77

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Principales entidades federativas de la República Mexicana que explotan el maguey pulquero.....	13
Cuadro 2. Secuencia de los iniciadores utilizados en el análisis RAPD	35
Cuadro 3. Concentración de reactivos y volúmen empleado en la mezcla de reacción de PCR.	35
Cuadro 4. Programa del termociclador Techne TC-412 utilizado para la reacción de PCR de ADN de <i>Agave spp.</i> (maguey pulquero).....	36
Cuadro 5. Correlación lineal entre variables morfológicas de las seis variantes de Maguey pulquero (<i>Agave spp</i>)	38
Cuadro 6. Análisis de varianza de caracteres evaluados en seis variantes de magueyes pulqueros.....	41
Cuadro 7. Comparación de medias en seis variantes de magueyes para los caracteres evaluados.....	41
Cuadro 8. Número de observaciones y porcentaje de clasificación por variables evaluadas en campo.....	43
Cuadro 9. Número y porcentaje de <i>loci</i> polimórficos detectados en las poblaciones analizadas.....	50
Cuadro 10. Lista de iniciadores y sus secuencias, número de productos amplificados, polimorfismo detectado por especie y polimorfismo total.....	52
Cuadro 11. Diversidad genética entre y dentro de las variantes de maguey pulquero Manso, Ayoteco, Verde, Xilometl, Negro y Carrizo.....	59
Cuadro 12. Matriz de distancias (diagonal inferior) e identidad genéticas según Nei's (1978) (diagonal superior) entre las poblaciones de Magueyes pulqueros (<i>Agave spp.</i>) obtenidas de los datos moleculares con 13 iniciador.	61

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Diagrama ombrotérmico del área de estudio.....	26
Figura 2. Maguey Manso (<i>Agave salmiana</i> variedad Salmiana).....	27
Figura 3. Maguey Ayoteco (<i>Agave salmiana</i> variedad Ayoteco).....	28
Figura 4. Maguey Verde (selección de maguey pulquero Temazcalapa)	28
Figura 5. Maguey Xilometl (selección de maguey pulquero Santa Bárbara).....	29
Figura 6. Maguey Negro (selección de maguey pulquero Santa Bárbara).....	29
Figura 7. Maguey Carrizo (<i>Agave mapisaga</i> Trel).....	30
Figura 8. Patrón de agrupamiento generado por el discriminante 1 y 2. Grupo 1, Carrizo; Grupo 2, Negro; Grupo 3, Xilometl; Grupo 4, Ayoteco, Manso y Verde Temazcalapa. El discriminante 1 (número de espinas laterales) explica el 63.0 % de la varianza, mientras que el discriminante 2 (longitud de espina principal) aporta el 31.06 %.....	45
Figura 9. Dendrograma de relaciones fenotípicas entre las especies y variantes de magueyes pulqueros obtenido mediante el método de agrupamiento Ward Estándar y la distancia R^2 semiparcial. Grupo 1 (Maguey Xilometl); Grupo 2 (Maguey Carrizo); Grupo 3 (Maguey Manso, Verde Temazcalapa y Negro); Grupo 4 (Maguey Ayoteco).....	47
Figura 10. Representación grafica de variables discriminantes de seis grupos de agaves pulqueros.	48
Figura 11. A y B. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA07. A. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38. B. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 39-54, Maguey Carrizo 55-66, Maguey Verde Temazcalapa 66-76...	53

Figura 12 A y B. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA20. A. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38. B. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 40-54, Maguey Carrizo 55-66, Maguey Verde Temazcalapa 66-76. Verde Temazcalapa, 66-76.....	54
Figura 13. Dendrograma de relaciones entre individuos de variantes de maguey pulquero, generado mediante 1000 remuestreos y utilizando el coeficiente de Jaccard y 76 individuos con claves: Maguey Ayoteco (AYO); Maguey Manso (MA); Maguey Negro (NE); Maguey Xilometl (XI); Maguey Carrizo (CA); y Maguey Verde Temazcalapa (VT). La línea superior indica 0.02 de disimilitud. Los números romanos indican grupos.....	56
Figura 14. Dendrograma de relaciones genéticas entre poblaciones de magueyes pulqueros.....	64
Figura 15. Dendrograma de relaciones fenotípicas entre las especies y variantes de magueyes pulqueros obtenido mediante el método de agrupamiento Ward Estándar, con base en distancias euclidianas al cuadrado.....	65
Figura 16. Dendrograma de relaciones genéticas entre las especies y variantes de magueyes pulqueros obtenido mediante el método de agrupamiento Ward Estándar, el cual utiliza las varianzas mínimas para obtener el mejor patrón de agrupamiento. Grupo A, (Maguey Ayoteco); Grupo M, (Maguey Manso); Grupo N, (Maguey Negro); Grupo X, (Maguey Xilometl); Grupo C, (Maguey Carrizo); Grupo V, (Maguey Verde Temazcalapa).....	66

VIII. ANEXOS

CONTENIDO	Pág.
1A. Protocolo Utilizado para la Extracción de ADN en Magueyes Pulqueros.....	77
2A. Reactivos Utilizados en el Proceso de Extracción de ADN.....	78
3A. Procedimiento para Lavar Muestras con Residuos Vegetales.....	79
4A. Cálculos para Determinar la Concentración de ADN.....	80
5A. Protocolo para Fenolizar las Muestras de Agave.....	81
FIGURAS	
Figura 1A. Determinación de la calidad del ADN; M = marcador de peso molecular 1kb. (1-20): Muestras aleatorias de ADN proveniente de las 6 poblaciones de magueyes pulqueros.....	82
Figura 2A. Prueba de primer grupo de 40 iniciadores de la serie A de Operon (Operon Technologies® Inc, Alameda, EE.UU) en muestras aleatorias de maguey pulquero. OPA 01 (1); OPA02 (2); OPA05 (3); OPA06 (4); OPA08 (5); OPA13 (6); OPA14 (7); OPA17 (8); OPA18 (9) y OPA19 (10). M = marcador de peso molecular 1kb.....	82
Figura 3A. Prueba de iniciadores de la serie A de Operon (Operon Technologies® Inc, Alameda, EE.UU) en muestras aleatorias de maguey pulquero. OPA03 (1); OPA04 (2); OPA07 (3); OPA09 (4); OPA10 (5); OPA11 (6); OPA12 (7); OPA15 (8); OPA16 (9) y OPA20 (10). M = marcador de peso molecular 1kb.....	83

Figura 4A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA01. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.....	84
Figura 5A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA01. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 39-54, Maguey Carrizo 55-66, Maguey Verde Temazcalapa 66-76.....	84
Figura 6A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA02. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.....	85
Figura 7A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA02. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 39-54, Maguey Carrizo 55-66, Maguey Verde Temazcalapa 66-76.....	85
Figura 8A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA03. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.....	86
Figura 9A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA03. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 39-54, Maguey Carrizo 55-66, Maguey Verde Temazcalapa 66-76.....	86
Figura 10A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA04. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.....	87

Figura 11A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA04. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 39-54, Maguey Carrizo 55-66, Maguey Verde Temazcalapa 66-76.....	88
Figura 12A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA05. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.....	88
Figura 13A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA05. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 39-54, Maguey Carrizo 55-66, Maguey Verde Temazcalapa 66-76.....	89
Figura 14A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA07. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.....	89
Figura 15A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA07. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 39-54, Maguey Carrizo 55-66, Maguey Verde Temazcalapa 66-76.....	90
Figura 16A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA09. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.....	90
Figura 17A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA09. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 39-54, Maguey Carrizo 55-66, Maguey Verde Temazcalapa 66-76.....	91

Figura 18A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA10. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.....	91
Figura 19A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA10. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 39-54, Maguey Carrizo 55-66, Maguey Verde Temazcalapa 66-76.....	91
Figura 20A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA13. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.....	92
Figura 21A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA13. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 39-54, Maguey Carrizo 55-66, Maguey Verde Temazcalapa 66-76.....	92
Figura 22A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA14. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.....	93
Figura 23A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA14. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 39-54, Maguey Carrizo 55-66, Maguey Verde Temazcalapa 66-76.....	93
Figura 24A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA15. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.....	94

Figura 25A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA15. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 39-54, Maguey Carrizo 55-66, Maguey Verde Temazcalapa 66-76.....	94
Figura 26A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA19. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.....	95
Figura 27A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA19. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 39-54, Maguey Carrizo 55-66, Maguey Verde Temazcalapa 66-76.....	95
Figura 28A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA20. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.....	96
Figura 29A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA20. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 39-54, Maguey Carrizo 55-66, Maguey Verde Temazcalapa 66-76.....	96

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
ARNasa	Ribonucleasa
ddH ₂ O	Agua bidestilada
dNTP's	Desoxirribonucleótidos
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
µg	Microgramo
µL	Microlitro
M	Molar
mM	Milimolar
µM	Micromolar
ng	Nanogramo
PCR	Reacción en cadena de la ADN polimerasa
RAPD	Polimorfismos de ADN amplificados al Azar
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TE	Amortiguador Tris-EDTA
UV	Ultravioleta

I. INTRODUCCIÓN

Los recursos biológicos de nuestro planeta son vitales para el desarrollo económico y social de la humanidad. Por ello, hay un reconocimiento creciente de que la diversidad biológica es un activo global de enorme valor para las generaciones presentes y futuras.

En México los recursos genéticos vegetales han estado ligados a su historia, economía y cultura; han sido parte de la evolución de la sociedad mexicana al permitir, mediante su aprovechamiento, la supervivencia, crecimiento, desarrollo y florecimiento de sus diferentes culturas; y actualmente constituyen la base de un gran número de sistemas de producción, tradicionales y modernos, que se practican en la superficie agrícola del país.

La situación actual de los recursos genéticos vegetales de México se caracteriza por dos aspectos contrastantes. Por un lado estos recursos son importantes para la producción de alimentos y otros productos agrícolas y, por otro, no existe interés en su protección y adecuado aprovechamiento; esto último como un mecanismo para impulsar el desarrollo de la agricultura mexicana. Además, a pesar de que México es uno de los centros principales de la diversidad biológica vegetal a nivel mundial y centro de origen de la agricultura mesoamericana, carece de una política de acciones coordinadas para su conservación y aprovechamiento.

Por otro lado, México es considerado centro de origen del género *Agave*, del que según Granados (1993) existen 272 especies. Las diferentes especies de agave se han utilizado para satisfacer y complementar una serie de necesidades básicas:

alimento, fibras, forraje, medicamento, construcción y elaboración de bebidas como tequila, pulque, bacanora, mezcal y sotol (Ramírez *et al.*, 2000).

El típico maguey pulquero fue descrito por Karw, pero existe una gran diversidad de agaves que producen aguamiel con características que le confieren al pulque una determinada calidad. El maguey Manso, cuyo nombre científico es *Agave atrovirens* Karw es el típico maguey del pulque. Sin embargo, son de 6 a 8 las especies de maguey que se cultivan para la obtención de aguamiel y la elaboración de pulque (Loyola, 1956).

No obstante que estos magueyes originalmente fueron seleccionados para la obtención de aguamiel y posterior producción de pulque, en la actualidad si bien el pulque sigue siendo un producto importante, las pencas, mixiotes, gusanos blancos y rojos, así como usos para la reforestación han cobrado particular importancia, por lo que la caracterización molecular y morfológica aunado a la asociación con los usos actuales es impostergable para así poder proteger las selecciones generadas por los productores.

Los marcadores genéticos son importantes en muchas áreas de la investigación biológica; particularmente aquéllos que son clave en estudios genéticos de muchos organismos. Éstos han podido ser usados en agricultura y ciencias ambientales, diagnósticos médicos, jurisprudencia, procesos de inmigración y otras áreas diferentes (Islam, 2004).

Debido a que el conocimiento de los recursos vegetales es estratégico para el desarrollo de un país y que México es centro de origen de los agaves, este estudio pretendió conocer más a fondo la diversidad actual que presentan los magueyes pulqueros, mediante el uso de marcadores genético-moleculares RAPD (Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar) y caracteres morfológicos, obteniendo las huellas genéticas de las variantes y especies que se siguen conservando en las parcelas de los productores.

1.1. Objetivos

1. Caracterizar la diversidad de las especies y las variantes de seis agaves pulqueros en la región Nororiente del Estado de México, mediante el uso de caracteres morfológicos y marcadores moleculares tipo RAPD (Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar).
2. Identificar las especies y las variantes mediante sus patrones RAPD y características morfológicas y asociarlos con los usos que les dan los productores.

Con base en los presentes objetivos, se plantean las siguientes hipótesis:

En las plantaciones comerciales de magueyes pulqueros existen variantes de especies que han sido seleccionadas por sus características agronómicas, agroindustriales y usos particulares.

La diversidad de magueyes pulqueros no ha sido suficientemente estudiada y se desconocen en gran medida las selecciones particulares de magueyes que los productores han obtenido a lo largo de la historia de este cultivo.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. Diversidad Genética

El término diversidad genética se utiliza para expresar la variabilidad de poblaciones existentes dentro de una especie, género, familia de plantas, animales, insectos, hongos, bacterias, virus u otros organismos. La diversidad génica o índice de heterogeneidad es una medida estimada de la variación génica en una población que es igual a la probabilidad de que genes escogidos al azar en dos o más individuos no sean idénticos (Nei y Roychoudhuri, 1974).

Los análisis sobre variabilidad de las poblaciones a partir de caracteres morfológicos se realizan tratando de involucrar a todos los genes posibles en un organismo, lo que es prácticamente imposible, ya que es necesario contar con poblaciones adecuadas para la estimación de las frecuencias génicas, tipo de acción génica, *interloci* o *intra locus*, lo cual consume mucho tiempo. Adicionalmente, el manejo de caracteres poligénicos o cuantitativos requiere de un mayor esfuerzo.

La genética de un carácter métrico gira alrededor del estudio de su variación, ya que es en términos de ésta, que son formuladas las preguntas genéticas primarias. La idea básica del estudio de la variación es la partición en componentes atribuibles a diferentes causas. La magnitud relativa de estos componentes determina las propiedades genéticas de una población, en particular el grado de parecido entre parientes (Falconer, 1972).

Hay dos formas de medir esta diversidad genética, la identidad y la distancia genética; la primera estima la proporción de genes que tienen la misma estructura en dos poblaciones y la segunda el número de sustituciones alélicas por *locus* que han ocurrido en la evolución independiente de las poblaciones. Hay una sustitución alélica cuando un alelo es reemplazado por un alelo diferente, o cuando un conjunto de alelos es reemplazado por un conjunto diferente (Ayala y Kiger, 1984).

Para los caracteres cuantitativos, los estudios de variabilidad o diversidad genética son difíciles, debido a que el efecto de cada gen es pequeño con relación al efecto del genotipo total; existiendo expresiones idénticas que pueden ser producidas por un número muy grande de genotipos diferentes; las poblaciones, en su mayoría, portan una gran variabilidad genética y las distintas expresiones pueden deberse a causas ambientales o a la interacción genotipo ambiente (Sahagún, 2002).

Ante esta situación y el avance sobresaliente en el estudio del genoma basado en técnicas de isoenzimas y marcadores genético-moleculares, la estadística responde como una herramienta fundamental en el estudio de la diversidad genética.

Sin embargo no se debe menospreciar el estudio de los caracteres morfológicos, puesto que ofrecen caracterizaciones acordes a la realidad, principalmente en las relaciones filogenéticas; de tal forma que el uso de estas herramientas en forma integral pueden aportar resultados mucho más confiables, ya que no necesariamente un carácter está gobernado por un solo gen (Ayala y Kiger, 1984).

Los recursos genéticos vegetales constituyen la base biológica de la seguridad alimentaria del mundo y de México; y la supervivencia de la raza humana está asociada directa e indirectamente con ella. En México, los recursos genéticos vegetales han estado ligados a su historia, economía y cultura; han sido parte de la evolución de la sociedad mexicana al permitir, mediante su aprovechamiento, la supervivencia, crecimiento, desarrollo y florecimiento de sus diferentes culturas; y actualmente constituyen la base de un gran número de sistemas de producción, tradicionales y modernos, que se practican en la superficie agrícola del país (Ramírez *et al.*, 2000).

La situación actual de los recursos genéticos de México se caracteriza por dos aspectos contrastantes. Por un lado estos recursos son importantes para la producción de alimentos y otros productos agrícolas y, por otro, no existe interés en su protección y adecuado aprovechamiento, esto último como un mecanismo para impulsar el desarrollo de la agricultura mexicana; además, a pesar de que México es un megacentro de diversidad biológica vegetal y centro de origen de la agricultura mesoamericana, carece de una política de acciones coordinadas para su conservación y aprovechamiento (Ramírez *et al.*, 2000).

El intenso deterioro actual de la biodiversidad, la erosión genética de las especies utilizadas en la agricultura, la estrecha base genética de la mayoría de los cultivos explotados en los países desarrollados, la amenaza de plagas, enfermedades y los efectos de factores climáticos adversos sobre la agricultura, se encuentran entre las causas de gran interés sobre la biodiversidad en general y en particular en las

especies útiles para la alimentación y la agricultura; es decir, en los recursos genéticos (Ramírez *et al.*, 2000).

2.2. Origen de los Agaves

México es considerado centro de origen del género *Agave*, del que según varios autores se han identificado entre 150 y 272 especies distintas (Granados, 1993; Salas, 2001; Nobel, 1998; Rzedowski y Calderón, 1990). Las diferentes especies de agave se han utilizado para satisfacer y complementar una serie de necesidades básicas: alimento, fibras, forraje, medicamento, construcción y elaboración de bebidas embriagantes (Ramírez *et al.*, 2000).

2.3. Características Botánicas de los Agaves

Planta: Los agaves son plantas perennes, generalmente con vástagos presentes, en ocasiones bulbíferas a nivel de la inflorescencia, raíces fibrosas con desarrollo radial somero, acaules o con los tallos cortos y gruesos, simples o ramificados; hojas grandes, dispuestas en roseta, con frecuencia suculentas, ápice con espina terminal, márgenes enteros, provistos de dientes o bien filíferos; inflorescencia espigada, racimosa o paniculada, flores protándricas, segmentos del perianto unidos en un tubo de longitud variable, iguales o dimórficos, erectos o curvados, imbricados; estambres exsertos, filamentos con inserción en el tubo o la base de los segmentos, anteras versátiles, ovario suculento de paredes gruesas, óvulos dispuestos en dos series por lóculo, estilo alargado, filiforme, tubular; semillas planas y negras (Rzedowski y Calderón, 1990).

Hojas: Los agaves tienen hojas gruesas y puntiagudas que se despliegan del cogollo, el cual tiene las hojas adheridas. Las hojas de los agaves por lo general tienen grandes cantidades de parénquima con capacidad para almacenar agua, por lo que ayuda a la planta a soportar largos períodos de sequía. En la medida en que crecen las plántulas de agave sus hojas engruesan (Nobel, 1998).

Tallos: Todos los agaves tienen hojas prominentes y tallos verticales simples que, por lo general están ocultos entre las hojas (Nobel, 1998).

Raíz: Las raíces han recibido mucho menos atención que los tallos, debido a que la observación directa de la raíz por lo general no es posible. Las raíces de los agaves son necesarias para la toma de agua y nutrimentos y son relativamente superficiales. Las raíces principales de los agaves tienden a ser delgadas y a originarse en la base del tallo; no se ramifican como ocurre en la mayoría de las monocotiledóneas; las finas raíces laterales se originan en las raíces principales y por lo general se desprenden durante la sequía (Nobel, 1998).

Propagación: La mayoría de las especies de agaves agronómicamente importantes no se propagan por semilla. La mayoría de los agaves adultos pueden producir tallos subterráneos, denominados rizomas, que surgen de la base de sus tallos, a partir del cual emerge una nueva planta o hijuelo (Nobel, 1998).

2.4. Uso de los Agaves

Su uso se remonta a la época precolombina, cuando los pueblos indígenas encontraron en esta maravillosa planta una fuente abastecedora de materia prima

para elaborar cientos de productos. De las pencas obtenían hilos para tejer costales, tapetes, morrales, ceñidores, redes de pesca y cordeles; las pencas enteras se usaban para techar las casas a modo de tejado, los “quiotes” secos (escapo floral que alcanza más de tres metros) servían como vigas y como cercas para delimitar terrenos; las púas o espinas se utilizaban como clavos y como agujas; de las raíces se elaboraban cepillos, escobas y canastas; del jugo del maguey además de la miel, se obtenía la bebida ritual por excelencia: el pulque. Sin embargo, de esta multiplicidad de usos, sólo unos cuantos han prevalecido y se han transformado a lo largo de la historia (Ramírez, 2001).

Los agaves son usados como alimento, bebidas, licores, azúcares, dulces, fibras, celulosa, papel, “mixiotes”, alimento para ganado, combustible, en la industria farmacéutica, extracción de saponinas y otros productos (Ammirato *et al.*, 1984).

La explotación del maguey como alimento, bebida, vestido, protección, cosmético y medicamento llevó a los conquistadores españoles a darle el nombre de árbol de las maravillas (Salas, 2001).

Mas allá de poder describir los usos que en otro tiempo tuvieron diversas partes del maguey, ya sea en la época precolombina, la colonia, o el México revolucionario; en este momento es importante describir de manera concreta aquellos usos que por su impacto económico o ecológico tienen estas plantas; y entre los cuales se destacan en orden de importancia los siguientes: obtención de aguamiel, procesamiento de pulque, penca para barbacoa, mixiotes, gusano rojo y blanco, troncos para macetas, forraje, leña, y protección ecológica.

2.5. Importancia Ecológica de los Agaves

El maguey permite conservar el suelo, mediante su plantación en áreas con pendientes mayores al 5 %, al lado de los caminos, orillas de ríos o cárcavas. El agave garantiza la protección del suelo ya que la generación de abundante raíz retiene el suelo, evitando que la corriente del agua lo arrastre y permite además, disminuir la tasa de movimiento del agua, haciendo que esta se infiltre en el suelo (Rivera, 1990).

2.6. Producción de Bebidas a partir de Agaves en México

Varias especies de magueyes se han usado de manera tradicional, para la obtención de numerosos productos como el aguamiel, pulque y mezcal (Rzedowski y Calderón, 1990). En la actualidad las especies de maguey más conocidas son las que se emplean para obtener pulque, mezcal y tequila (Salas, 2001). Para la producción de mezcal el agave preferido es el *Agave angustifolia*. Sin embargo, también se aprovechan otras 10 especies consideradas como silvestres para la elaboración de mezcal, en especial el *Agave salmiana* (Nobel, 1998). Las especies de las cuales se obtiene el pulque son *A. salmiana* y *A. mapisaga*, que se distribuyen principalmente en el Valle de México, en los estados de México, Tlaxcala, Hidalgo y Puebla (Ramírez, 2001).

A. salmiana es la especie de maguey que provee probablemente cerca del 75 % de la bebida fermentada conocida como pulque, producida y consumida en las regiones del altiplano central de México. Existen otras especies del género *Agave*, de las cuales se extrae también el aguamiel y posteriormente se elabora pulque como *A. americana* y *A. mapisaga* (INEGI, 1998).

Agave salmiana, también llamado “maguey Manso”, se caracteriza por ser de los agaves más robustos; sus hojas (pencas) miden unos 2.5 metros y son de color verde a glaucas grisáceas. Antes de que se desarrolle el escapo floral se elimina éste y se hace en su sitio una concavidad donde se almacena la savia o “aguamiel” (INEGI, 1998).

En menor proporción se usan otros ocho taxas que incluyen especies silvestres y al *A. americana* (Nobel, 1998).

Al igual que el maguey mezcalero y el tequilero, el maguey pulquero requiere aproximadamente diez años para alcanzar su madurez y poder ser aprovechado. La etapa productiva de un maguey pulquero comienza cuando éste es "capado"; es decir, cuando se le corta el conjunto de pencas más tiernas del centro de la planta, para que al cabo de cuatro meses, comience a producir los primeros litros de aguamiel. Este periodo de producción dura generalmente de tres a cuatro meses, y rinde en promedio 300 litros. De la fermentación del aguamiel, que tarda menos de 24 horas, se obtiene la bebida que conocemos como pulque (Ramírez, 2001).

Por los estudios químicos que se han realizado se sabe que el aguamiel y el pulque son bebidas ricas tanto en proteínas, como en vitaminas y calcio. Sin embargo, su consumo está prácticamente rezagado (Ramírez, 2001).

2.7. Importancia de los Magueyes Pulqueros

Cuadro 1. Principales entidades federativas de la República Mexicana que explotan el maguey pulquero.

Maguey pulquero	Unidades de producción	Superficie		
		Total (ha)	En desarrollo (ha)	En producción (ha)
Rep. Mexicana	120,534	120,534	59,565.38	32,989.68
Aguascalientes	488	488	522.47	199.38
Baja California	142	142	52.93	28.24
Coahuila	1,445	1,445	671.10	381.76
Colima	24	24	134.76	98.75
Chiapas	297	297	211.74	160.96
Distrito Federal	880	880	116.15	87.36
Durango	1,201	1,201	346.72	246.79
Guanajuato	4,525	4,525	270.44	1,305.02
Guerrero	276	276	3,166.19	2,531.68
Hidalgo	27,948	27,948	12,084.21	52.66
Jalisco	508	508	322.43	133.42
México	29,403	29,403	5,852.61	3,142.06
Michoacán	4,529	1,247.91	578.77	609.13
Nuevo León	1,367	7,642.01	322.75	73,196.26
Oaxaca	8,119	3,537.02	1,955.42	1,581.6
Puebla	10,313	4,589.93	2,135.51	2,454.4
Querétaro	9,383	4,730.32	3,440.25	1,290.06
San Luis Potosi	10,399	5,872.38	2,195.94	3,676.44
Tlaxcala	2,084	2,830.02	2,012.77	817.24
Veracruz	2,955	708.98	421.8	287.10

Fuente: INEGI (1998).

La superficie nacional plantada con maguey pulquero en el año agrícola 1990-91 en las 32 entidades de la República Mexicana fue de 59,565 ha, la cual se distribuye de la siguiente forma: Hidalgo con 12,084 ha; Nuevo León con 7,642 ha; San Luis Potosí con 5,872 ha y Estado de México con 5,852 ha (Cuadro 1) (INEGI, 1998).

Las superficies anteriores representan el 53 % de la superficie total plantada con este cultivo en el país. Las 28 entidades restantes aportaron una superficie de 28,114 ha plantadas con esta agavacea. El porcentaje de la superficie nacional plantada con maguey pulquero, con respecto a la superficie nacional plantada con cultivos perennes fue del 0.6 % (Cuadro 1) (INEGI, 1998).

En el Estado de México existen 29,403 unidades de producción que equivalen a 5,852 ha, de las cuales 2,710.5 ha están en pleno desarrollo y 3,142 se encuentran en producción (Cuadro 1) (INEGI, 1998).

2.8. Descripción de Especies de Agaves Pulqueros

2.8.1. Maguey Carrizo (*Agave mapisaga* Trel)

El *A. mapisaga* es una planta amplia con tallo pequeño, de 2 a 2.5 m de altura, hojas lineales formando rosetas desplegadas, 185-250 cm de largo por 19-25 cm de ancho, extendidas o ascendentes; la base maciza carnosa extendida arriba y convexa abajo; la hoja ascendente, margen recto en pequeños dientes pardos; la cúspide de 2-5 mm de longitud; espinas de 3-5 cm de longitud, cónicas; inflorescencia maciza de 7 a 8 metros o más de alto; pedúnculo cerrado colocado a lo largo de las brácteas succulentas, panoja ancha extendida, con 20 a 25 kg de peso, flores largas y densas,

suculentas, 80-100 mm de longitud; pétalos frecuentemente rojizos en la yema y abiertos amarillos, sobre los ovarios verdes; ovarios de 40 a 52 mm de longitud, gruesos y redondos; tubo profundo; el ápice en el interior de 2-3 mm, filamentos 55-70 mm de longitud insertados en dos hojas de 11 a 15 mm sobre la base del tubo, anteras amarillas de 30 a 35 mm de longitud, excéntricas; pistilo distribuido sobre el estambre corpulento, cápsulas de 6-6.5 por 2 cm; semillas de 7-8 cm por 5-6 mm, negras. *A. mapisaga* está emparentado con *A. salmiana*, pero se distingue fácilmente de éste por presentar sus hojas largas lineales (Granados, 1993).

2.8.2. Maguey Manso (*Agave salmiana*)

A. salmiana es una monocotiledónea de raíz fibrosa, carnosa y maciza, de color verde a grisáceas, profundamente convexas, cóncavas hacia arriba. Son plantas de medianas a grandes, con un tallo pequeño y grueso, forma rosetas macizas de 1.5 a 2 metros de alto y con el doble de ancho, revestida de escamas morenas e imbricadas de hojas en roseta, apretadas más o menos carnosas y por lo regular de textura firme, con espina terminal punzante y con abundantes espinas marginales; las hojas son largas, acanaladas, simples, enteras, más o menos lanceoladas con ápice agudo, de color verde oscuro y desde el glauco hasta el color verde casi gris; la longitud de las hojas es según las variedades; hojas de 100-200 cm de largo por 20-35 cm de ancho, la prefloración es central. La inflorescencia es densamente subespigada o dispuesta en canícula o panoja tirsoide. El borde floral es alto y se halla provisto de numerosas brácteas prefoliadas. Las flores son monoperiantadas de ovario ínfero, hermafroditas y provistas de pedúnculos cortos y encorvados; perianto de seis piezas, tubulosa e influndiliforme; androceo de 6 estambres, largamente

excertos. El fruto es una cápsula oblonga. Las semillas son negras deprimidas, triangulares con el embrión recto y el endospermo carnososo (Granados, 1993).

2.9. Marcadores Genéticos

Hasta mediados de la década de los 60 los marcadores genéticos utilizados en mejora de plantas eran caracteres morfológicos, en general, fenotipos de fácil identificación visual controlados por pocos genes. Los marcadores morfológicos contribuyeron al desarrollo técnico del análisis del ligamiento genético y por tanto en la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos. Ocasionalmente, se identificaron algunos marcadores morfológicos ligados a genes de importancia económica. La disponibilidad de marcadores morfológicos estaba restringida esencialmente a unas pocas especies de plantas, utilizadas como sistemas modelo o para estudios de genética. La mayoría de las especies vegetales, carecía y carece, de información a este nivel (García-Mas *et al.*, 2000).

2.9.1. Marcadores Morfológicos

La utilización de las diferencias fenotípicas como marcadores en el análisis genético aplicado a la mejora vegetal se remonta a las primeras décadas de la Genética como ciencia. Los marcadores morfológicos controlados por un solo locus pueden ser usados como marcadores genéticos si su expresión es temprana, reproducible en cualquier ambiente y están estrechamente ligados a un carácter de interés económico (García-Mas *et al.*, 2000).

El gran salto de los marcadores genéticos se inició con el desarrollo de los marcadores isoenzimáticos y de otros tipos de proteínas (marcadores bioquímicos).

Se amplió considerablemente el número de marcadores genéticos disponibles, y todas las especies de plantas podían potencialmente ser analizadas. Con la aparición de las técnicas modernas de la Biología Molecular surgieron diferentes métodos de detección del polimorfismo genético a nivel del ADN (García-Mas, 2000).

El alto número de plantas mejoradas cercanamente relacionadas, liberadas en la actualidad, hace difícil lograr una identificación única y válida. Este problema se acentúa en cultivos con niveles limitados de diversidad genética, en materiales élite o cuando se practica la selección de materiales muy similares. Lo mismo puede suceder en poblaciones de plantas con amplia diversidad genética.

La morfología refleja no sólo la constitución genética del cultivar, sino también la interacción genotipo-ambiente. Los descriptores basados en datos morfológicos no son tan efectivos para proporcionar información necesaria para el cálculo de distancias genéticas, debido a su interacción con el ambiente sobre todo en materiales colectados en diferentes años y/o localidades. Existen otras consideraciones respecto al uso de datos morfológicos como el hecho de que para muchos cultivos un número considerable de variaciones morfológicas se han eliminado con la consecuencia que las variedades disponibles son aparentemente muy similares. Para un gran número de características morfológicas se desconoce su control genético; se sabe también que genotipos diferentes pueden dar fenotipos aparentemente similares (Smith y Smith, 1992; Lee, 1995).

2.9.2. Marcadores Moleculares de ADN

Un marcador genético molecular es cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente y utilizada en el análisis genético, por tanto, es un locus marcador que tiene que ser polimórfico. Como marcador puede utilizarse con una doble finalidad, para marcar o señalar el locus que controla la diferencia fenotípica y/o para marcar otro locus próximo que controle algún carácter de interés (García-Mas *et al.*, 2000).

Un buen marcador molecular debe presentar las siguientes características:

- Polimórfico
- Codominante
- No epistático: se puede leer el genotipo a partir del fenotipo, independientemente del genotipo de otro *loci*.
- Neutro: las sustituciones alélicas no tienen otros efectos fenotípicos.

Insensible al medio: el fenotipo se infiere a partir del genotipo, independientemente del medio (García-Mas *et al.*, 2000).

Los avances de la biología molecular durante los años 80, han aportado una clase nueva de marcadores genéticos que permiten visualizar diferencias entre las secuencias homólogas de ADN de los organismos. Esas diferencias resultan de cambios o arreglos entre los pares de bases que conforman este tipo de molécula, tales como: translocaciones, inversiones, inserciones, o deleciones en regiones homólogas (Valadez y Kahl, 2000).

Los marcadores genético-moleculares pueden ser utilizados para analizar grupos de individuos o poblaciones y estimar diferentes medidas de diversidad y distancias genéticas, haciendo inferencia sobre las poblaciones y permitiendo elaborar patrones de agrupamiento, realizar pruebas de equilibrio Hardy Weinberg y equilibrio multi/*loci*, así como pruebas de *loci* polimórficos para encontrar evidencias de neutralidad selectiva. Éstos marcadores pueden ser usados en mejoramiento genético vegetal y manejo de germoplasma (Labate, 2000).

Los marcadores genético moleculares son una de las herramientas más exactas dentro de la caracterización vegetal y la filogenia; por medio de secuenciación de proteínas, aminoácidos y de ADN, se pueden obtener las relaciones filogenéticas entre individuos, obteniendo similitudes, substituciones o disimilitudes en bases nitrogenadas, aminoácidos o proteínas (Valadez y Kahl, 2000).

Una de sus mayores ventajas es que teóricamente no interaccionan con el ambiente, puesto que estas técnicas manipulan directamente el ADN (Grandillo y Fulton, 2002). Los marcadores moleculares son importantes en muchas áreas de investigación biológica; particularmente aquéllos que son clave en estudios genéticos de muchos organismos. Estos han podido ser usados en la agricultura y ciencias ambientales, diagnósticos médicos, jurisprudencia, procesos de inmigración y otras áreas diferentes (Islam, 2004).

2.9.3. Bases Moleculares de los Marcadores de ADN

Los marcadores de ADN se basan en variaciones naturales ocurridas en la secuencia de ADN que dan como resultado mutaciones, deleciones aleatorias,

inserciones o la presencia de un número variable de copias repetidas en un fragmento de ADN (Islam, 2004).

Las variaciones en el ADN son numerosas, cuando se considera el genoma completo de un individuo. Estas pueden diferir mucho entre individuos de una especie particular y por tanto pueden ser detectados como polimorfismos. Un locus polimórfico es aquel en el que dos o más secuencias variantes se encuentran en el mismo cromosoma. Estos polimorfismos o marcadores tienen un rango muy amplio de aplicaciones potenciales. Estas comprenden, entre otras, estudios de transmisión génica, mapeos de alta densidad de ligamiento, análisis genético de poblaciones, estudios de migración, estudios filogenéticos, estudios de especímenes o poblaciones silvestres, interacciones genotipo-ambiente, programas de mejoramiento, identificación de variedades, análisis parental, control de calidad y salvaguarda de la propiedad intelectual (Islam, 2004). Valadez y Kahl (2000) citan diferentes metodologías que pueden utilizarse para obtener estos marcadores genético-moleculares, mismas que pueden dividirse en tres categorías:

1. **Hibridación tipo “Southern”**. Esta técnica explora las variaciones en la longitud de los fragmentos del ADN, ocasionadas por la digestión del genoma con una endonucleasa particular, las cuales originalmente fueron aisladas a partir de bacterias. Esta técnica incluye a los RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, por sus siglas en inglés) y los VNTR (Variable Number of Tandem Repeats).

2. **Reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR).** Esta técnica utiliza secuencias de oligonucleótidos que inician la síntesis *in vitro* de fragmentos de ADN de longitudes variables, no mayores a 6 kb. Estas secuencias iniciadoras pueden ser aleatorias, semialeatorias o específicas, con las cuales ha sido posible caracterizar genomas de diferentes organismos, detectar, aislar genes y diferenciar organismos relacionados genéticamente. Dentro de éstas se encuentran los RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA); AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR); DAF (DNA Amplification Fingerprinting) y AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), entre otros.
3. **Combinación de PCR e hibridación tipo “Southern”.** Estas técnicas requieren primero de la síntesis previa de ADN con cualquiera de las metodologías PCR y la posterior hibridación con alguna sonda que detecte cualquier serie de secuencias cortas repetidas (2 a 10 pares de bases), o medianamente repetidas, arregladas en serie (microsatélite), esto permite optimizar los resultados, obteniendo datos más precisos, debido a que al utilizarse las dos metodologías anteriores (PCR e hibridación tipo Southern), se obtiene un doble diagnóstico. La técnica más utilizada es el RAHM (Random Amplified Hibridation Microsatellites) o también llamada RAMPO (Random Amplified Microsatellites Polymorphisms).

2.9.4. RAPD

Los RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) se obtienen mediante amplificación de PCR del ADN genómico usando un único iniciador, normalmente de 10 nucleótidos de longitud. Esta técnica permite amplificar de manera aleatoria el genoma de un individuo en aquellas zonas en las que los iniciadores hibridan con el

ADN molde en ambas cadenas y en direcciones opuestas. La amplificación se producirá si los iniciadores están situados entre sí a una distancia corta, entre 200 y 2000 pb, dentro del rango de tamaño amplificable por la Taq ADN polimerasa (García-Mas *et al.*, 2000).

Puesto que el iniciador utilizado en la PCR es muy corto y la temperatura de hibridación empleada en la reacción es muy baja, es probable que se encuentren varios lugares de amplificación en el genoma. El número de fragmentos amplificados con cada iniciador depende de su secuencia y será mayor cuanto mayor sea el tamaño del genoma de la especie estudiada (García-Mas *et al.*, 2000).

Cuando comparamos los patrones de fragmentos amplificados del ADN de varios individuos podemos ver diferencias. Cuando se considera un fragmento determinado y está presente en un individuo pero no en otro se considera un polimorfismo de ADN ó un RAPD y puede usarse como un marcador genético (García-Mas *et al.*, 2000).

Los RAPD son un método basado en PCR, son más rápidos de obtener que los RFLP, requieren pequeñas cantidades de ADN, y se cuenta con iniciadores complementarios conocidos. Los oligonucleotidos de 10-12 bases generados al azar son usados como punto de partida por la enzima Taq ADN polimerasa, la cual es termoestable. Ésta produce de 1 a 10 fragmentos únicos en la primera reacción de PCR, los cuales son altamente polimórficos y pueden ser detectados mediante tinción con bromuro de etidio en un gel de agarosa (García-Mas *et al.*, 2000).

El proceso de amplificación al azar presenta algunas dificultades en la reproducción de los patrones RAPD obtenidos en diferentes laboratorios y con distintos

termocicladores las cuales pueden deberse a impurezas en el ADN, por lo cual pueden ser resueltas (García-Mas., 2000).

Los RAPD se comportan de manera mendeliana ya que la técnica produce marcadores dominantes. Los individuos que tienen dos copias iguales (homocigotos) no se pueden diferenciar de aquellos que solo tiene una copia (heterocigotos). Ocasionalmente se detecta algún RAPD codominante, lo que puede ocurrir cuando ha habido alguna inserción o delección dentro del fragmento ha amplificar la cual no ha alterado el lugar de hibridación del iniciador (García-Mas *et al.*, 2000).

2.10. Trabajos Realizados con RAPD en Agaves y en otras Especies

Legaria (2005) en trabajos realizados con frijol determinó que los marcadores RAPD detectaron polimorfismo entre variedades de *P. vulgaris* y entre individuos de *P. coccineus*. En otros trabajos Chan y Sun (1997) examinaron la diversidad y relaciones genéticas de 23 especies cultivadas y silvestres de amaranto con marcadores RAPD e isoenzimas. El grado más alto de diversidad genética se encontró dentro de especies. De los 600 fragmentos RAPD generados por 27 iniciadores, 39.9 % fueron polimórficos entre las poblaciones dentro de cada especie cultivada.

Las relaciones filogenéticas entre taxa de la familia Agavaceae han sido previamente examinadas usando diferentes técnicas moleculares. Estas incluyen RFLP (del inglés Restriction Fragment Length Polymorphisms) en cloroplastos (Bolger y Simpson, 1995) variación de secuencias de espacios transcritos internos

(ITS), regiones de genes nucleares codificados para ADN ribosomal (Bolger y Simpson, 1996) y el análisis de isoenzimas (Massey y Hamrick, 1998).

En *Agave tequilana* var. Azul donde se estimó la cantidad de variación genética presente dentro y entre campos con marcadores AFLP y RAPD se encontró que la mayoría de las plantas que se cultivan en México prácticamente son clones, lo cual es un resultado lógico por la forma en que se propagan pues sus valores de similitud fueron menores a 0.01. Las huellas genómicas obtenidas por RAPD y AFLP presentaron un promedio de 9.8 y 87.25 fragmentos por reacción, respectivamente; donde sólo se encontraron dos y cuatro fragmentos polimórficos (1.7 % y 1.6 %) entre los 40 individuos analizados. Entre ambos marcadores los RAPD presentan la ventaja de ser una tecnología sencilla y accesible, que ha tenido una gran utilidad en muchas áreas y en una amplia gama de organismos. Estos resultados reflejan la carencia de variación genética en *A. tequilana* var. Azul cultivado (Gil-Vega *et al.*, 2001).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Descripción del Área de Estudio

3.1.1. Localización Geográfica

La colecta de los materiales evaluados se realizó en plantaciones de maguey pulquero pertenecientes a pequeñas propiedades de la comunidad de Santa Bárbara, Otumba y la comunidad de Teacalco, municipio de Temazcalapa, Estado de México. Santa Bárbara se localiza al este de la cabecera municipal de Otumba, entre las coordenadas 19° 41' 59" de latitud norte y 98° 45' 33" de longitud oeste y a una altura promedio de 2,700 m (Dirección General de Geografía, 1982). En tanto Teacalco se encuentra al norte de la cabecera municipal de Temazcalapa.

3.1.2. Clima

En el área de estudio se presenta un clima BS1 k' w (w) (i')g; el cual es un clima semiárido, con temperatura media anual de 13.58 °C y menos de 18 °C para todos los meses del año, 673.3 mm de precipitación media anual concentrada en los meses de mayo a octubre, poca oscilación térmica (4.7 °C), el mes más caluroso es mayo y presenta una etapa denominada canícula, con una marcha anual de temperatura tipo Ganges (Figura 1)(García, 1981).

3.1.3. Suelo

En las comunidades se presenta una gran diversidad de suelos destacando por la ubicación de las parcelas aquéllos con coloración café claro denominados feozem háplico con textura media (Dirección General de Geografía, 1982).

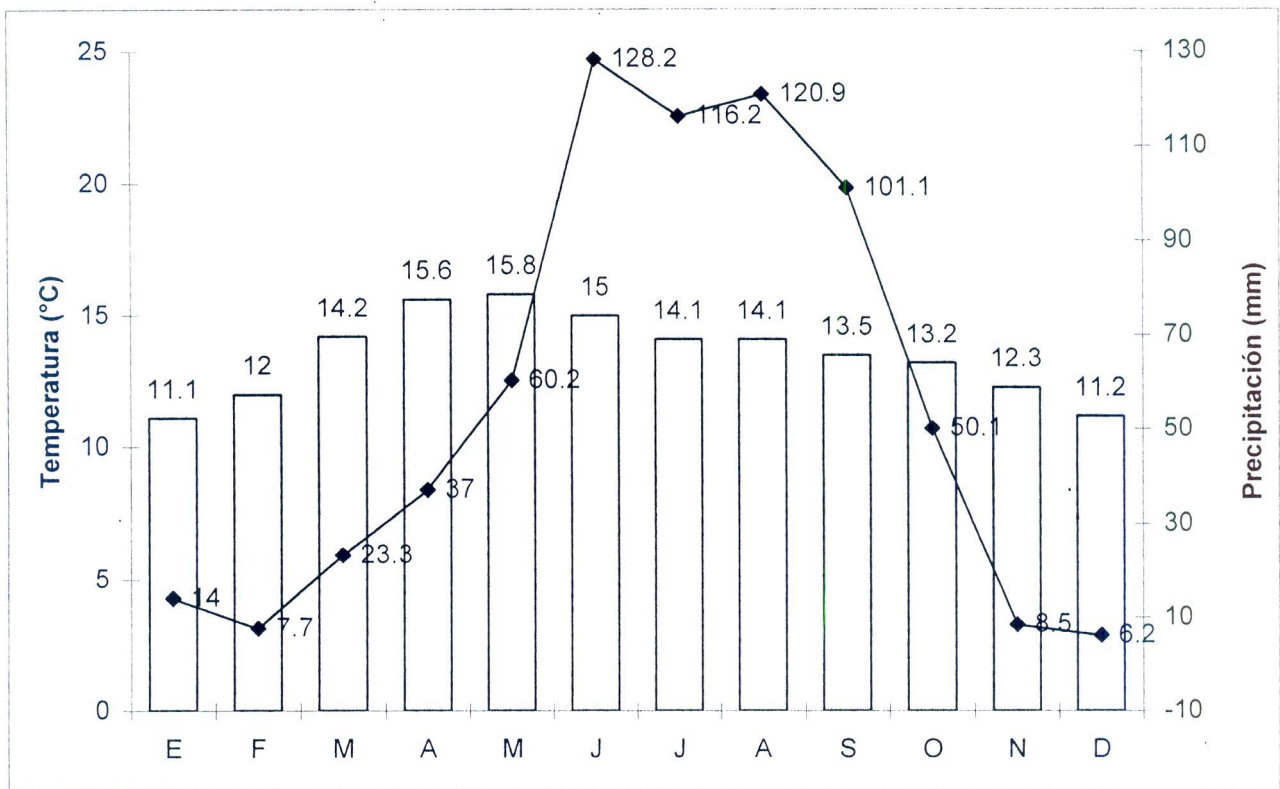


Figura 1. Diagrama ombrotérmico del área de estudio.

3.1.4. Geología

La comunidad de Santa Bárbara se encuentra localizada en el eje neovolcánico, por lo que las rocas que más abundan en prácticamente todo el territorio son las ígneas extrusivas, basaltos y tezontle. Por otro lado la comunidad de Teacalco, se encuentra en las faldas del cerro Gordo, donde predominan las rocas denominadas basaltos. (Dirección General de Geografía, 1982).

3.2. Material Vegetal

Se evaluaron seis poblaciones correspondientes a explotaciones comerciales, con aproximadamente 10 años de edad.

Las especies de magueyes analizadas fueron:

1. Maguey Manso (*Agave salmiana* variedad Salmiana) (Figura 2).
2. Maguey Ayoteco (*Agave salmiana* variedad Ayoteco) (Figura 3).
3. Maguey Verde (selección de maguey pulquero Temazcalapa) (Figura 4).
4. Maguey Xilométl (selección de maguey pulquero Santa Bárbara) (Figura 5).
5. Maguey Negro (selección de maguey pulquero Santa Bárbara) (Figura 6).
6. Maguey Carrizo (*Agave mapisaga* Trel) (Figura 7).



Figura 2. Maguey Manso (*Agave salmiana* variedad Salmiana).



Figura 3. Maguey Ayoteco (*Agave salmiana* variedad Ayoteco).

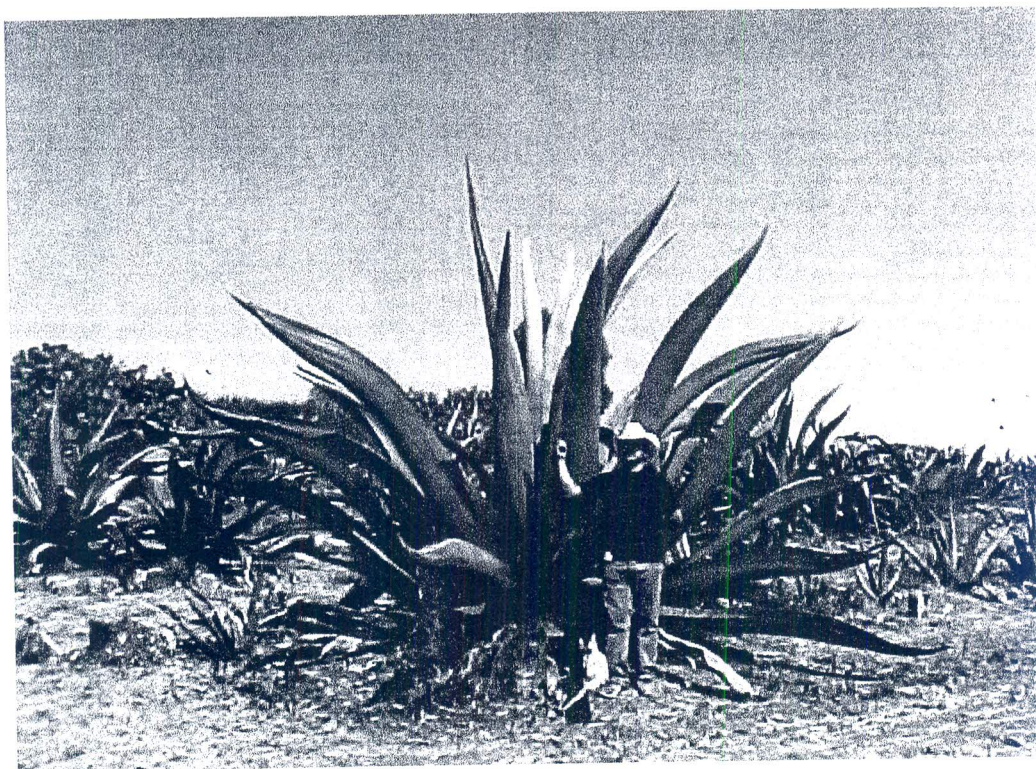


Figura 4. Maguey Verde (selección de maguey pulquero Temazcalapa).

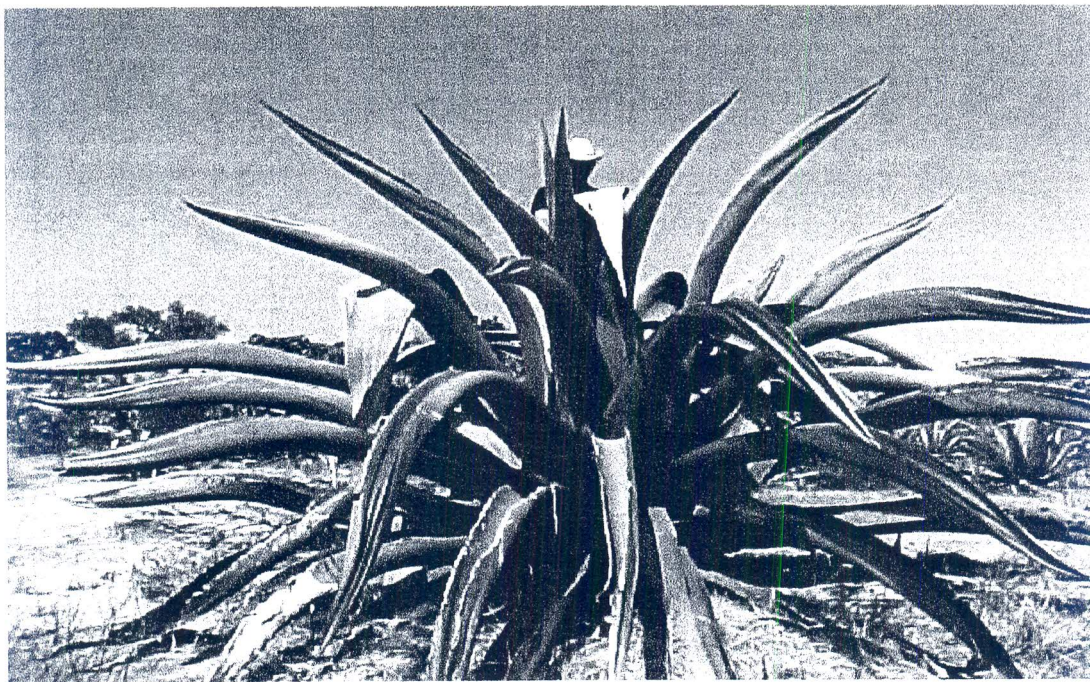


Figura 5. Maguey Xilometl (selección de maguey pulquero Santa Bárbara).

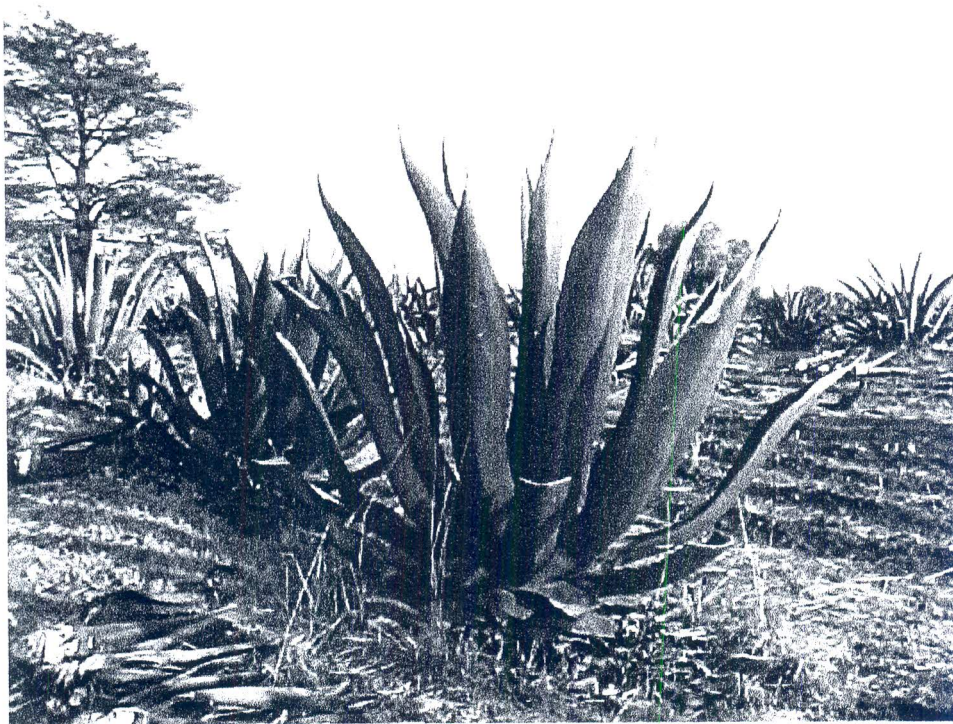


Figura 6. Maguey Negro (selección de maguey pulquero Santa Bárbara).

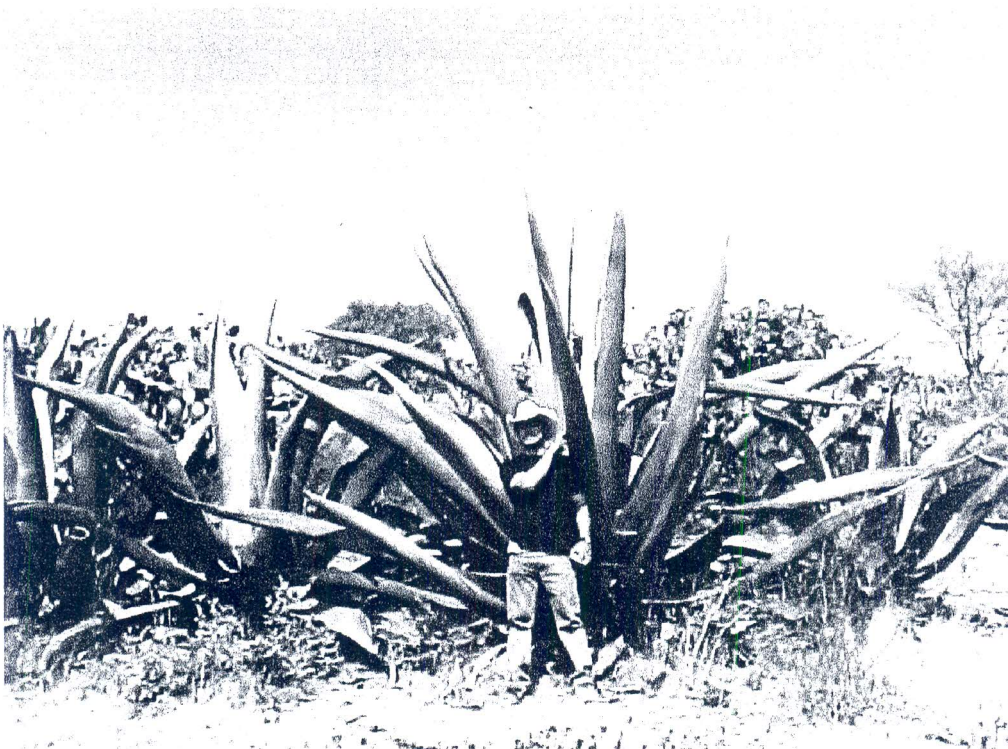


Figura 7. Maguey Carrizo (*Agave mapisaga* Trel).

3.2.1. Colecta de Material Vegetal

La colecta de las muestras para la extracción de ADN en el laboratorio se realizó en los meses de enero-abril del 2005, tomando muestras de 25 gramos de 10 agaves adultos representativos de cada población, mismas que se guardaron en bolsas de plástico previamente identificadas por número de planta, parcela, nombre del productor, nombre regional y nombre científico en los casos que fue posible determinarse en campo. Para poder transportarlas a laboratorio, las muestras se colocaron en un recipiente de plástico conteniendo hielo a fin de evitar la oxidación.

3.3. Fase de Campo

Las variables morfológicas evaluadas se tomaron, cuidando que las especies y variantes de magueyes fueran previamente localizadas y reconocidas por los productores por edad, nombre regional, usos a los que es sometida cada una de las variantes, cuidados agronómicos, plagas y enfermedades por las que son atacadas, calidad del aguamiel para pulque, rendimiento, periodos de explotación y tiempo de explotación para el caso de extracción de penca y aguamiel.

3.4. Muestreo

El muestreo aleatorio se realizó en parcelas representativas de cada población, con el objetivo de minimizar el efecto del suelo, posición de la planta, labores agronómicas o cualquier otro factor que pudiera contribuir a sesgar los datos. En el caso de las variables morfológicas se utilizaron 25 repeticiones por población, donde la unidad experimental fue una o varias parcelas cuyo cultivo fuese la población deseada.

3.5. Caracteres Evaluados

3.5.1. Fase de Campo

Altura de planta (cm)

Este carácter se determinó con la ayuda de una cinta métrica, a partir de la base de la planta hasta la punta de la roseta.

Número de hojas (vivas)

Se contaron todas aquellas hojas o pencas que estuvieran vivas y enteras, plantas que no manifestaran indicios de cosecha de hojas.

Longitud de hojas (cm)

Esta variable se midió con una cinta métrica tomándose desde la base de la hoja o penca hasta la punta de la púa o espina.

Ancho de hojas (cm)

Esta determinación se hizo midiendo dos partes de la hoja y sacando un promedio.

Numero de espinas laterales

Se contó número de espinas laterales de las pencas que estuvieran bien formadas.

Longitud de la espina principal (cm)

Para evaluar este parámetro se consideraron pencas adultas y se midió la espina principal de la base a la punta.

Análisis de las Variables Morfológicas

Se seleccionaron las variables morfológicas a partir de una matriz de correlación de los datos. Con las variables seleccionadas y estandarizadas se realizó un análisis de agrupamiento mediante el uso de distancias euclidianas cuadradas y la varianza mínima de Ward para la construcción de los dendrogramas usando PROC CLUSTER y PROC TREE de SAS. Tomando en cuenta los grupos formados en el punto anterior como clases categóricas, se aplicó un análisis discriminante canónico mediante PROC DISCRIM de SAS con el propósito de corroborar dichos agrupamientos y detectar las variables con mayor importancia que diferenciaron los grupos generados (Bowley, 1999). Se aplicó esta misma metodología a los datos moleculares para obtener el dendrograma respectivo y poder compararlo contra el generado a partir de las variables morfológicas. Los datos se analizaron bajo un diseño experimental

completamente al azar y se realizó un análisis de medias Tukey usando el paquete estadístico SAS Versión 8.0 (1999).

3.5.2. Fase de Laboratorio

La fase de laboratorio de la presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola perteneciente al Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, ubicado en instalaciones del Campo Experimental del Valle de México (CEVAMEX). Una vez que las muestras de las diferentes variantes de magueyes pulqueros se encontraron en el laboratorio se realizó un lavado de las mismas con agua destilada y alcohol al 70 % para eliminar posibles patógenos, tierra y materiales extraños que pudieran contaminar y se retiró la cutícula de la hoja (mixiote) ya que ésta presenta una cera que puede interferir con la extracción. Con la ayuda de una navaja se extrajo una muestra de 0.3 gramos sin parénquima ya que éste, al ser un tejido con células muy grandes y constituidas principalmente por agua puede disminuir la cantidad de ADN. Los 0.3 g de tejido fresco (hoja) se maceraron en nitrógeno líquido y el tejido pulverizado se transfirió a un microtubo de 1.5 mL, conteniendo 600 µL de amortiguador de extracción (ver Anexo 2A) y se mezcló muy bien; se incubó a 65 °C por 10 minutos con inversión ocasional de los tubos, adicionando 200 µL de acetato de potasio 5 M, agitando por inversión y dejando 30 minutos en hielo. Luego se centrifugó a 15 000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente y se transfirió el sobrenadante a otro microtubo conteniendo 700 µL de isopropanol frío. Se mezcló por inversión y dejó a -20 °C durante 20 minutos, luego se centrifugó por 10 minutos a 13 000 xg a temperatura ambiente, eliminando el sobrenadante y disolviendo el precipitado en 200 µL de

solución para diluir. Posteriormente se añadieron 2 μL de ARNasa A a una concentración de 10 mg/mL y los tubos se incubaron a 37 °C por una hora, se adicionaron 20 μL de acetato de sodio 3M y 200 μL de isopropanol frío, mezclando por inversión y dejando precipitar a -20 °C por 2 horas. Las muestras luego se centrifugaron durante 10 minutos a 13 000 xg a temperatura ambiente y finalmente se eliminó el sobrenadante, lavando el precipitado con 200 μL de etanol al 70 % (v/v) y dejando secar la pastilla para luego disolverla en 100 μL de TE. Finalmente, las muestras de ADN puro se almacenaron a una temperatura de 4 °C.

La concentración de ADN se cuantificó en un espectrofotómetro marca Jenway 6305 UV/vis a una longitud de onda de 260 nm y la integridad y calidad del ADN se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % (p/v) y mediante tinción de los geles en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 0.5 mg mL^{-1} (ver Figura 1A del Anexo). Una vez evaluada la calidad del ADN, las muestras se diluyeron a una concentración de 10 ng/ μL (ver Anexo 4A) a fin de obtener patrones tipo RAPD mediante reacciones en cadena de la Taq ADN polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Para la obtención de los patrones RAPD se probaron 20 iniciadores de la serie A (Operon Technologies Inc, Alameda, EE.UU.)(Cuadro 2); de los que se seleccionaron los 13 que generaron los mejores patrones de amplificación.

Cuadro 2. Secuencia de los iniciadores utilizados en el análisis RAPD.

OLIGONUCLEOTIDO	SECUENCIA
OPA01	5'-CAGGCCCTTC-3'
OPA02	5'-TGCCGAGCTG-3'
OPA03	5'-AGTCAGCCAC-3'
OPA04	5'-AATCGGGCTG-3'
OPA05	5'-AGGGGTCTTG-3'
OPA06	5'-GGTCCCTGAC-3'
OPA07	5'-GAAACGGGTG-3'
OPA08	5'-GTGACGTAGG-3'
OPA09	5'-GGGTAACGCC-3'
OPA10	5'-GTGATCGCAG-3'
OPA11	5'-CAATCGCCGT-3'
OPA12	5'-TCGGCGATAG-3'
OPA13	5'-CAGCACCCAC-3'
OPA14	5'-TCTGTGCTGG-3'
OPA15	5'-TTCCGAACCC-3'
OPA16	5'-AGCCAGCGAA-3'
OPA17	5'-GACCGCTTGT-3'
OPA18	5'-AGGTGACCGT-3'
OPA19	5'-CAAACGTCGG-3'
OPA20	5'-GTTGCGATCC-3'

La mezcla de reacción se realizó en un volumen total de 25 μL con los reactivos que se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Concentración de reactivos y volumen empleado en la mezcla de reacción de PCR.

REACTIVO	VOLUMEN (μL)
ddH ₂ O (agua bidestilada estéril)	4.0
dNTP's (500 μM)	10.0
Amortiguador 10 X	2.5
MgCl ₂ (50 μM)	1.0
Iniciadores (10 picomoles μL^{-1})	2.0
Taq ADN polimerasa (5U μL^{-1})	0.5
ADN (10 ng μL^{-1})	5.0
Volumen final	25.0

Las condiciones de reacción fueron: un ciclo a 94 °C, 9 minutos; 35 ciclos a 94 °C durante 60 segundos, 37 °C por 60 segundos, 72 °C por 60 segundos; y finalmente un ciclo a 72 °C por 7 minutos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Programa del termociclador Techne TC-412 utilizado para la reacción de PCR de ADN de *Agave* (maguey pulquero)

CICLOS	TIEMPO
1 ciclo a 94 °C	9 minutos
35 ciclos a 94 °C	1 minuto (desnaturalización)
37 °C	1 minuto (alineamiento)
72 °C	1 minuto (polimerización)
1 ciclo a 72 °C	7 minutos

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador marca Techne TC-412.

Los productos se separaron en geles de agarosa al 1.2 % (p/v) con amortiguador TAE (40 mM Tris-Base, 5 mM Acetato de Sodio y 0.77 mM EDTA) durante 3 h a 85 V. Finalmente, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 mg mL⁻¹) y se fotografiaron bajo luz UV utilizando un documentador Kodak EDAS 290. El análisis de los patrones de bandeo se llevó a cabo mediante la construcción de una Matriz Básica de Datos (MBD) asignando un valor de 1 a la presencia de la banda y cero a la ausencia de la misma. Empleando la MBD (matriz básica de datos) se calculó una matriz de similitud usando el coeficiente de Jaccard elaborado mediante el paquete Free Tree y Tree View entre las variantes de magueyes. Con los datos resultantes se hizo un análisis de agrupamiento mediante el método de medias aritméticas (UPGMA, Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average; Sneath y Sokal, 1973),

que se representaron en un dendrograma de relaciones genéticas entre los materiales. Las seis variantes de agave (Ayoteco, Manso, Negro, Xilometl, Verde Temazcalapa y Carrizo) fueron consideradas como poblaciones y con el auxilio del programa Popgene 32 (Yeh *et al.*, 1999) se estimaron los parámetros siguientes: porcentaje de *loci* polimórficos, número de alelos por locus, número efectivo de alelos por locus, índice de Shannon, índice de diversidad genética de Nei, coeficiente de diferenciación genética entre las poblaciones y número de individuos migrantes.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis de Datos Morfológicos

4.1.1. Correlaciones y Análisis de Varianza de los Caracteres Morfológicos

En el Cuadro 5 se presentan las correlaciones determinadas entre los caracteres morfológicos evaluados.

Cuadro 5. Correlación lineal entre variables morfológicas de las seis variantes de Maguey pulquero (*Agave spp*).

VARIABLES	NH	LH	AH	NEL	LEP
ALTURA DE PLANTA	0.30*	0.91**	0.16*	0.68**	-0.41**
NÚMERO DE HOJAS		0.37*	0.13	0.005*	0.005*
LARGO DE HOJAS			0.16*	0.68**	-0.42*
ANCHO DE HOJAS				0.92**	0.42*
NUMERO DE ESPINAS LATERALES					-0.75**

** Altamente significativo $\alpha \leq 0.01$, * Significativo $\alpha \leq 0.05$. NH (Número de hojas); LH (Longitud de hojas); AH (Ancho de hojas); NEL (Número de espinas laterales); LEP (Longitud de espina principal)

Hubo una asociación positiva y significativa entre el número de hojas y la altura de planta lo que es observable en las plantaciones comerciales, ya que aquellas plantas que presentan mayor altura también son las que muestran un mayor número de hojas.

De acuerdo a los resultados, sería importante conservar estas selecciones de magueyes para poder así presentar una opción a los productores que deseen obtener planta con el propósito de explotarla para penca y pulque, ya que al ser

plantas altas el grado de mutilación que sufren al cortar las pencas es menor en comparación con plantas chaparras, permitiendo así que gran parte de la hoja permanezca en la planta para almacenar el agua y puedan seguir fotosintetizando para que la planta sobreviva hasta la explotación final que sería la obtención de aguamiel, materia prima del pulque.

Hubo una asociación baja entre la altura de planta con el ancho de las hojas (Cuadro 5), esta baja asociación se observa mas marcada en el maguey Carrizo (*Agave mapisaga*), el cual aunque presenta plantas altas tiene hojas angostas (Cuadros 5, 6 y 7).

Estas características morfológicas observadas en el maguey Carrizo (*Agave mapisaga* Trel) hacen que este maguey sea una opción viable para aquellas regiones donde el robo del mixiote y la penca no permiten incentivar el establecimiento de nuevas plantaciones; puesto que esta especie no se puede desmíxiotar y su penca no sirve para la barbacoa debido a que las hojas son poco anchas, la convierte en una especie prometedora para la recuperación de suelos en lomeríos ya que al igual que para los otros agaves su sistema radical es superficial, permitiendo la retención del suelo fácilmente; además, los porcentajes de sobrevivencia son muy altos en comparación con cualquier otra especie forestal.

Por otro lado, esta especie es una de las que mas fácilmente son atacadas por larvas en la hoja tanto de gusano blanco como rojo, lo cual puede representar una opción de ingresos extra para los productores ya que estos gusanos se venden a muy altos

precios en el mercado nacional. Adicionalmente, esta especie es una de las mejores en cuanto a la calidad del aguamiel para la producción de pulque.

Se detectó una asociación alta y positiva entre la altura de planta y el número de espinas laterales (Cuadro 5), esto debido a que a mayor altura de planta las hojas tienden a ser más grandes y por tanto el número de espinas laterales se incrementa. Existe asociación negativa y muy significativa entre la altura de la planta y la longitud de la espina principal, ya que no importa que tan grande sea la planta, la longitud de la espina no incrementa. Hubo una asociación positiva entre número y largo de hojas, esto se explica ya que entre más sean las hojas existirá mayor superficie para la captación de luz solar lo que permitirá a la planta fotosintetizar más y por consecuencia se incrementará la longitud final de las hojas.

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza mostraron diferencias significativas ($\alpha \leq 0.01$) entre variantes para todas las variables morfológicas, evaluadas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Análisis de varianza de caracteres evaluados en seis variantes de magueyes pulqueros.

F.V.	G.L.	AP	NH	LH	AH	NEL	LEP
Variantes	5	26.43**	486.39**	5.25**	764.54**	11316.90**	31.51**
Error	144	0.05	40.65	0.05	170.69	87.81	0.23
Total	149						
C.V		8.01	15.80	10.81	37.31	13.03	8.96
Media		2.89	40.34	1.99	35.01	71.92	5.39

**Altamente significativo $\alpha \leq 0.01$, F.V. =Fuente de variación, G.L. Grados de libertad, C.V. = Coeficiente de variación, NH (Número de hojas); LH (Longitud de hojas); AH (Ancho de hojas); NEL (Número de espinas laterales); LEP (Longitud de espina principal)

4.1.2. Comparación de Medias.

En el Cuadro 7 se presenta la comparación mediante el método de medias Tukey.

Cuadro 7. Comparación de medias* en seis variantes de magueyes para los caracteres evaluados.

VARIANTE	AP	NH	LH	AH	NEL	LEP
Xilometl	4.96 a	45.64 a	2.88 a	39.41 ab	104.68 a	4.29 c
Ayoteco	2.67 b	44.04 a	2.04 b	39.59 a	62.78 c	5.11 b
Manso	2.58 bc	42.00 ab	1.78 c	37.56 abc	60.89 c	6.29 a
Verde	2.57 bc	38.44 bc	1.78 c	37.52 abc	60.98 c	6.29 a
Carrizo	2.40 c	33.64 c	1.82 c	27.22 c	91.86 b	3.88 d
Negro	2.17 d	38.28 bc	1.64 c	28.76 bc	50.31 d	6.45 a
DMSH	0.19	5.20	0.18	10.67	7.65	0.39

*Valores con la misma letra dentro de columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $\alpha = 0.05$). NH (Número de hojas); LH (Longitud de hojas); AH (Ancho de hojas); NEL (Número de espinas laterales); LEP (Longitud de espina principal)

Las plantas más altas de magueyes pulqueros fueron también las que presentaron mayor número de hojas, así como mayor longitud de hojas y mayor número de espinas laterales, como fue el caso del maguey Xilométl (Cuadro 7), sin embargo presentó la espina principal más pequeña. Una gran altura de planta podría considerarse no muy recomendable, ya que en el caso de maguey Xilométl las plantas tienden a inclinarse al igual que sus hojas, lo cual les resta valor durante la venta. Se observó que no hubo diferencias estadísticas en el ancho de las pencas para 4 de las variantes estudiadas (Cuadro 7), por lo que estas 4 poblaciones son igualmente útiles para extraer penca y usarlas en la industria de la barbacoa. De acuerdo a la experiencia de los productores la mejor penca es la del maguey Ayoteco, ya que presenta mayor cantidad de fibras, mismas que protegen a la penca de temperaturas demasiado altas; sin embargo en la industria de la barbacoa se usan todas las pencas sin control de calidad.

Se observó que el maguey más pequeño fue el Negro, sin embargo no difiere estadísticamente en cuanto a número, largo y ancho de hojas con magueyes como el Verde Temazcalapa, Carrizo y Manso (Cuadro 7); agronómicamente ésto coloca al maguey negro en ventaja con respecto a los demás magueyes, ya que con estas características de planta se podrían incrementar las densidades de población por hectárea, logrando obtener mayor cantidad de penca, o aguamiel para la industria pulquera e inclusive penca para forraje, ya que presenta buena calidad para este fin.

4.1.3. Análisis Discriminante

En el Cuadro 8 se presentan el número de plantas muestreadas en el campo para cada variante así como el porcentaje de plantas que fueron adecuadamente agrupadas por el análisis discriminante dentro del grupo correspondiente.

Cuadro 8. Número de observaciones y porcentaje de clasificación por variables evaluadas en campo.

VARIANTE	Ayoteco	Carrizo	Manso	Negro	Verde	Xilometl	Total
Ayoteco	21	0	1	0	3	0	25
%	84	0	4	0	12	0	100
Carrizo	0	24	0	1	0	0	25
%	0	96	0	4	0	0	100
Manso	1	0	18	0	6	0	25
%	4	0	72	0	24	0	100
Negro	0	0	0	25	0	0	25
%	0	0	0	100	0	0	100
Verde	1	0	7	0	17	0	25
%	4	0	28	0	68	0	100
Xilometl	0	0	0	0	0	25	25
%	0	0	0	0	0	100	100
Total	23	24	26	26	26	25	150
%	15.333	16	17.333	17.333	17.333	16.67	100

Las caracteres morfológicos permitieron clasificar a las poblaciones de agaves en cuatro grupos bien definidos de acuerdo a la Figura 8, esto debido a que desde el punto de vista morfológico algunas poblaciones fueron muy parecidas, ello es explicable, debido a la influencia que pudieran ejercer las condiciones edáficas, topográficas o nutricionales en las que se encontraron los magueyes, de tal manera que algunos magueyes Mansos se clasificaron dentro de los magueyes Verde Temazcalapa y Ayotecos (Cuadro 8). Lo mismo ocurrió para maguey Ayoteco donde un individuo se clasificó dentro de Manso y 3 dentro de Verde Temazcalapa (Cuadro 8). Igual se observó para el maguey Verde Temazcalapa, donde 7 de sus

especímenes se clasificaron dentro de los magueyes Mansos (Cuadro 8); sin embargo variantes como Xilometl, Negro y Carrizo presentaron una clasificación muy uniforme incluyendo al 100 % de sus individuos, debido a que son magueyes morfológicamente muy diferenciados permitiendo que los grupos se separaran por el análisis estadístico (Cuadro 8).

El discriminante 1 (Número de espinas laterales) explicó el 63 % de la variabilidad y al sumar el discriminante 2 (Longitud de espina principal) se obtuvo un patrón de agrupamiento estadísticamente fiable que acumuló el 94 % de la variabilidad (Figura 8), logrando determinar que éstos son los caracteres que permiten separar mejor las especies y variantes agronómicas de magueyes pulqueros. Lo anterior es trascendente, ya que en estudios posteriores el investigador interesado podrá obviar tomar medidas como la altura de planta, largo, ancho y número de hojas dado que estos caracteres no permitieron agrupar de manera confiable a las especies y variantes de magueyes pulqueros estudiados.

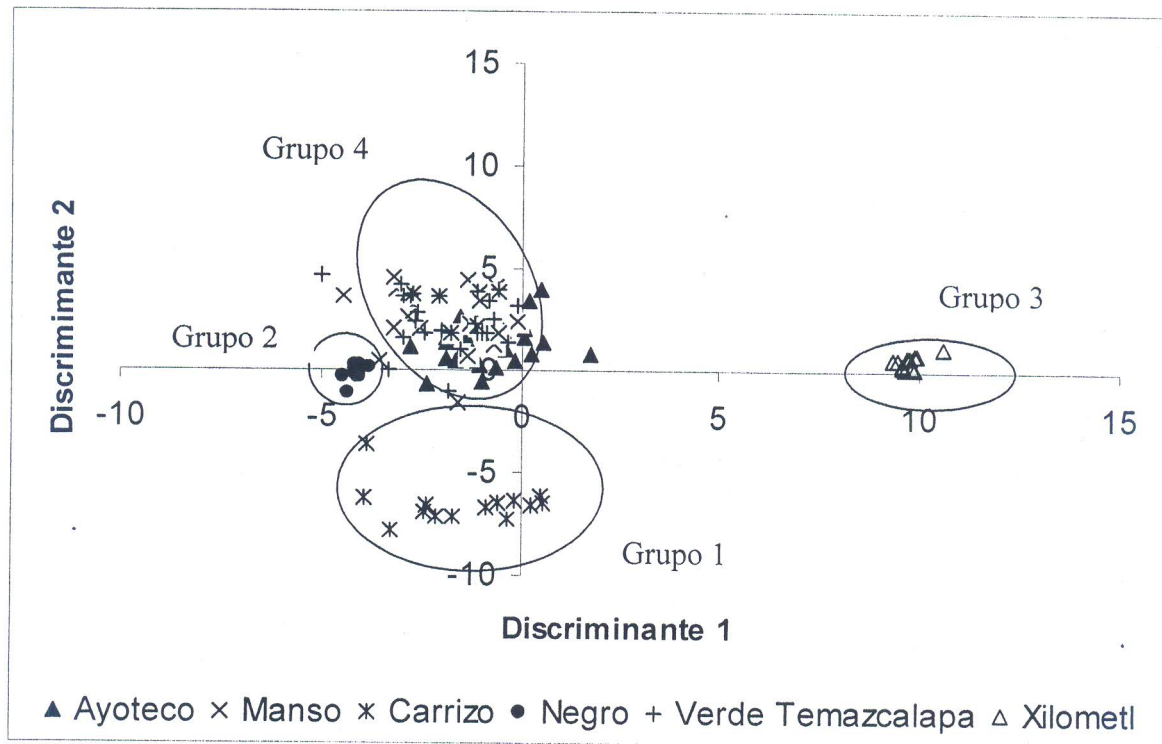


Figura 8. Patrón de agrupamiento generado por el discriminante 1 y 2. Grupo 1, Carrizo; Grupo 2, Negro; Grupo 3, Xilometl; Grupo 4, Ayoteco, Manso y Verde Temazcalapa. El discriminante 1 (número de espinas laterales) explica el 63.0 % de la varianza, mientras que el discriminante 2 (longitud de espina principal) aporta el 31.06 %.

Al analizar la interacción de los dos discriminantes (Figura 8) se observó la formación de cuatro grupos bien definidos destacando por su grado de diferenciación el grupo 1 al que pertenece el maguey Carrizo; el grupo 2 que agrupó al maguey Negro y el grupo 3 que incluyó a los magueyes Xilometl; sin embargo el grupo 4 agrupó a los magueyes Manso, Ayoteco y Verde Temazcalapa (Figura 8). Estos resultados establecen una estrecha relación entre los maguey Ayoteco y Manso, mismos que concuerdan con lo reportado por Rzedowski *et al.* (1990) ya que los dos pertenecen a la especie *Agave salmiana*; sin embargo aunque Verde Temazcalapa se confunde

morfológicamente con estos dos magueyes, genéticamente es diferente, esto de acuerdo a los resultados obtenidos a partir de los análisis con marcadores moleculares tipo RAPD realizados en ésta investigación y que se presentan posteriormente.

Tomando como punto de referencia el agrupamiento generado usando el coeficiente de Jaccard y el método Ward, el cual toma en cuenta las varianzas mínimas para poder realizar el mejor agrupamiento de individuos, con relación a características fenotípicas particulares, es posible afirmar con base en la Figura 9, que los cuatro grupos formados permiten distinguir; primero, a los magueyes Xilometl, los cuales se separan principalmente por tamaño de planta; el segundo grupo esta formado por el maguey Carrizo (*Agave mapisaga* Trel) que es una especie clasificada de agave y no presenta dudas taxonómicas. El grupo tres, que incluye a maguey Manso (*Agave salmiana* var. *Salmiana*), a la selección Verde Temazcalapa y a la selección Negro Santa Bárbara, permite observar que de acuerdo a las características fenotípicas dichos magueyes son muy semejantes, por lo que el algoritmo utilizado no permitió separar a la especie de las variantes, sí es que tuvieran algún grado de relación. Este agrupamiento generado mediante el uso de caracteres morfológicos indica que no es posible la separación de *A. salmiana* var. *Salmiana* en variantes dado que todos los individuos evaluados fueron fenotípicamente muy similares por lo que no fue posible distinguir entre las selecciones generadas por los productores. Sin embargo, los análisis realizados posteriormente con marcadores genético-moleculares arrojan resultados que sí permiten separar a las selecciones de manera clara ya que el genoma es un factor propio de cada especie o selección y no varía

por influencia del ambiente, ni es producto de la interacción genotipo-ambiente, particularidad que permite una clasificación más precisa. Finalmente, el grupo cuatro integró a maguey Ayoteco (*Agave salmiana* var. Ayoteco); éste maguey es una variedad botánica con características fenotípicas muy particulares y aunque está muy emparentado con maguey Manso no se mezcló en el mismo grupo.

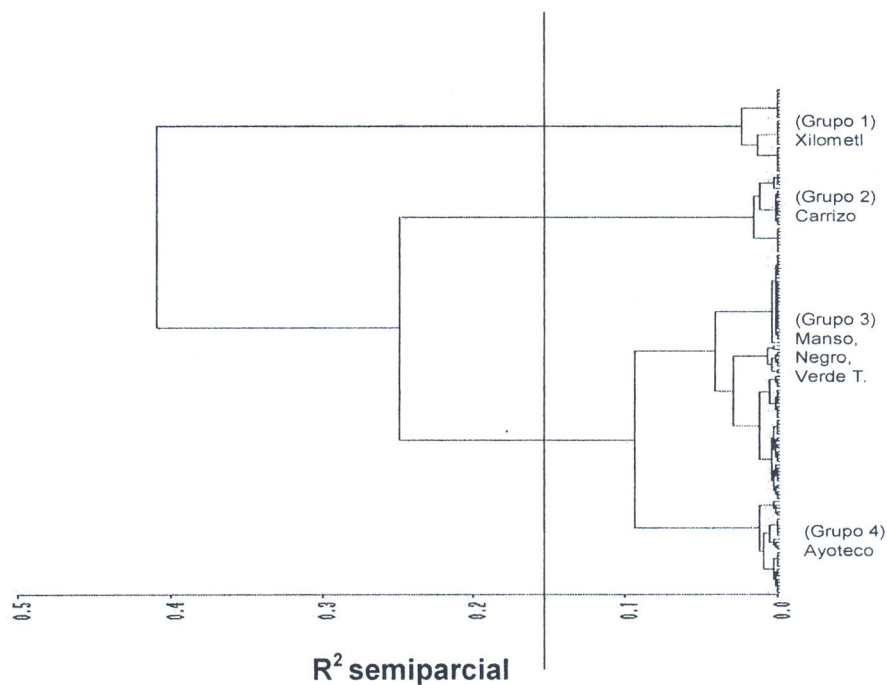


Figura 9. Dendrograma de relaciones fenotípicas entre las especies y variantes de magueyes pulqueros obtenido mediante el método de agrupamiento Ward Estándar y la distancia R^2 semiparcial. Grupo 1 (Maguey Xilometl); Grupo 2 (Maguey Carrizo); Grupo 3 (Maguey Manso, Verde Temazcalapa y Negro); Grupo 4 (Maguey Ayoteco).

4.2. Análisis de Datos Moleculares

4.2.1. Análisis Discriminante Canónico

El buscar un método con rigurosidad estadística, que nos permita agrupar de manera lógica a los diferentes materiales analizados es particularmente importante, ya que permite explicar y lograr desarrollar los objetivos, por lo que en este trabajo el análisis discriminante canónico de datos moleculares permitió separar adecuadamente a las especies y variantes de maguey pulquero.

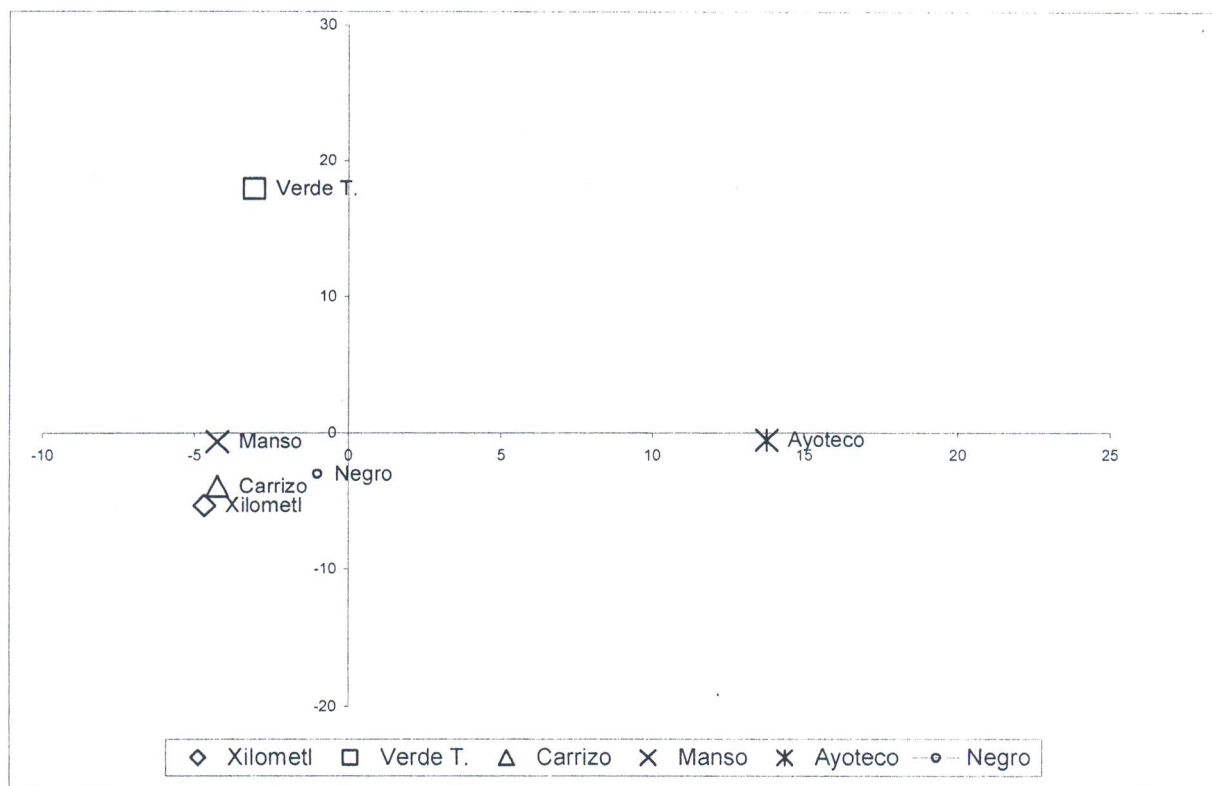


Figura 10. Representación grafica de variables discriminantes de seis grupos de agaves pulqueros.

En contraste con el patrón de agrupamiento obtenido a partir de los caracteres morfológicos, en esta figura se pueden distinguir claramente 6 grupos generados por

el análisis discriminante a los cuales pertenecen Xilometl, Verde Temazcalapa, Carrizo, Manso, Ayoteco y Negro, por lo que la información obtenida a partir de la matriz de presencia-ausencia de bandas fue mas precisa. Se analizaron 123 bandas generadas por los 13 diferentes iniciadores, encontrándose diferencias marcadas entre los distintos materiales analizados, lo que permitió realizar un agrupamiento preciso. La clara diferenciación entre poblaciones sugiere que los 6 materiales analizados son especies y selecciones bien definidas para la producción de aguamiel, penca, mixiote u otros usos alternativos específicos de cada variante, según los productores.

La distinción precisa de las poblaciones a partir de sus patrones RAPD; generados por la participación única del genoma, sugiere que aunque los materiales comparten grandes porciones de su genoma, las variaciones naturales ocurridas en la secuencia de ADN que dan como resultado mutaciones, delecciones aleatorias, inserciones o la presencia de un número variable de copias repetidas en un fragmento de ADN (Islam, 2004), han permitido la generación de suficiente variabilidad genética en las poblaciones evaluadas. Dichos eventos más la selección ejercida por los productores han permitido la generación de especies y variantes de especies que no pudieron ser diferenciadas de manera clara mediante la caracterización morfológica pero sí cuando se hizo uso de los marcadores moleculares tipo RAPD, es decir, a nivel de análisis del genoma.

4.2.2. Análisis por Individuos en Poblaciones de Maguey Pulquero.

El conjunto de iniciadores evaluados generó 123 bandas. En el cuadro 9 se presentan el número de *loci* polimórficos así como el porcentaje que éstos

representaron del total de 123 bandas generadas por los iniciadores evaluados para cada una de las poblaciones de magueyes analizadas.

Cuadro 9. Número y porcentaje de *loci* polimórficos detectados en las poblaciones analizadas.

Variante	Número de <i>loci</i> polimórficos	% de <i>loci</i> polimórficos
Maguey Manso	40	32.52
Maguey Ayoteco	40	32.52
Maguey Negro	30	24.39
Maguey Carrizo	32	26.20
Maguey Xilometl	28	22.76
Maguey Verde	15	12.20

Los resultados obtenidos indican que tanto el número, como el porcentaje de *loci* polimórficos dentro de cada una de las especies y variantes fueron muy bajos; observándose que los valores más altos los presentaron los magueyes Manso y Ayoteco con valores de 32.52 % de *loci* polimórficos, mientras que la selección Verde Temazcalapa mostró solo un 12.20 %. Estos resultados establecen que las poblaciones presentan reducida variabilidad genética. Lo anterior se debe posiblemente a la forma de propagación de los magueyes, vía reproducción vegetativa por hijuelos, lo que ocasiona que las selecciones locales tiendan a mostrar un polimorfismo genético mucho más bajo que aquellas variedades como Manso y Ayoteco, que son las más cultivadas en el país para la obtención de aguamiel y penca para barbacoa.

El número y el porcentaje de *loci* polimórficos fueron también muy bajos para maguey Carrizo (32 y 26.2 %, respectivamente), Xilométl (28 y 22.76 %) y Negro (30

y 24.39 %); y esta baja diversidad genética de las poblaciones es explicable dado que éstos magueyes están restringidos a pequeñas áreas de cultivo.

En el Cuadro 10 se muestra un listado de todos los iniciadores probados y sus secuencias, el número de productos amplificados, el polimorfismo detectado por cada iniciador por especie y el polimorfismo total por género. De 20 iniciadores de la serie A de Operon probados, sólo 13 rindieron productos de amplificación y 10 mostraron polimorfismo. Los iniciadores OPA02 y OPA20 detectaron un 100 % de polimorfismo a nivel de género, mientras que el OPA15 un 50 % .

Las Figuras 11A y 11B, así como las Figuras 12A y 12B muestran los patrones RAPD obtenidos mediante el empleo de los iniciadores OPA07 y OPA20, en ellas se observa la existencia de variabilidad genética entre los individuos evaluados, tanto dentro del género como entre las especies o poblaciones.

La Figura 13 muestra un dendrograma de relaciones entre individuos pertenecientes a diferentes variantes de maguey pulquero, obtenido mediante el análisis de 123 bandas tipo RAPD. En la misma se observa la formación de dos grandes grupos que incluyen cada uno a tres subgrupos bien definidos y que permiten distinguir a las seis variantes de maguey evaluadas: 1) Maguey Ayoteco (*Agave salmiana* variedad Ayoteco), 2) maguey Manso (*Agave salmiana* variedad Salmiana), 3) maguey Negro (selección Santa Bárbara), 4) maguey Xilométl (selección Santa Bárbara), 5) maguey Carrizo (*Agave mapisaga* Trel), y 6) Maguey Verde Temazcalapa. Cabe destacar que el uso de marcadores genético-moleculares tipo RAPD fue muy eficiente para discriminar individuos de cada variante e incluirlos en grupos bien definidos.

Cuadro 10. Lista de iniciadores y sus secuencias, número de productos amplificados, polimorfismo detectado por especie y polimorfismo total.

Oligonucleótido	Secuencia	Productos amplificados	Polimorfismo por variante (%)						Polimorfismo total
			Manso	Ayoteco	Verde	Xilometl	Negro	Carrizo	
OPA01	5'-CAGGCCCTTC-3'	12	50.0	50.0	16.7	25.0	41.7	16.7	66.7
OPA02	5'-TGCCGAGCTG-3'	11	0.0	9.1	9.1	18.2	0.0	27.3	100.0
OPA03	5'-AGTCAGCCAC-3'	10	40.0	80.0	30.0	70.0	80.0	60.0	90.0
OPA04	5'-AATCGGGCTG-3'	9	33.3	33.3	11.1	0.0	33.3	22.2	77.8
OPA05	5'-AGGGGTCTTG-3'	4	25.0	50.0	50.0	50.0	0.0	0.0	75.0
OPA06	5'-GGTCCCTGAC-3'	NA [†]	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OPA07	5'-GAAACGGGTG-3'	17	35.3	17.7	5.9	11.8	5.9	17.6	64.7
OPA08	5'-GTGACGTAGG-3'	NA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OPA09	5'-GGGTAACGCC-3'	7	0.0	0.0	0.0	14.3	0.0	14.3	71.4
OPA10	5'-GTGATCGCAG-3'	8	25.0	37.5	0.0	12.5	25.0	12.5	62.5
OPA11	5'-CAATCGCCGT-3'	NA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OPA12	5'-TCGGCGATAG-3'	NA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OPA13	5'-CAGCACCCAC-3'	5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OPA14	5'-TCTGTGCTGG-3'	8	25.0	37.5	0.0	12.5	25.0	0.0	62.5
OPA15	5'-TTCCGAACCC-3'	8	37.5	12.5	0.0	12.5	37.5	25.0	50.0
OPA16	5'-AGCCAGCGAA-3'	NA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OPA17	5'-GACCGCTTGT-3'	NA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OPA18	5'-AGGTGACCGT-3'	NA	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
OPA19	5'-CAAACGTCGG-3'	15	46.7	26.7	33.3	33.3	6.7	60.0	86.7
OPA20	5'-GTTGCGATCC-3'	9	66.7	66.7	0.0	33.3	55.6	33.3	100.0
Promedio		9.5							

NA = No amplificó

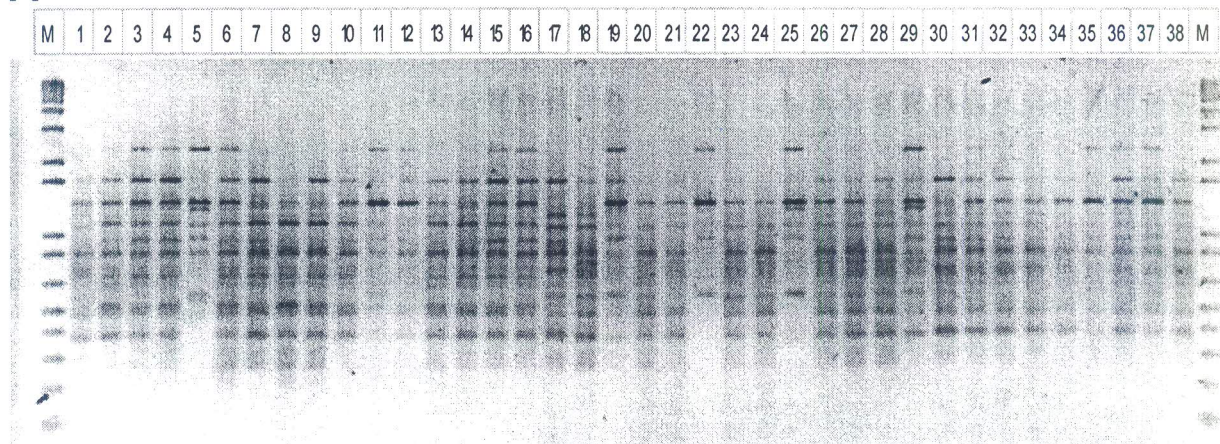
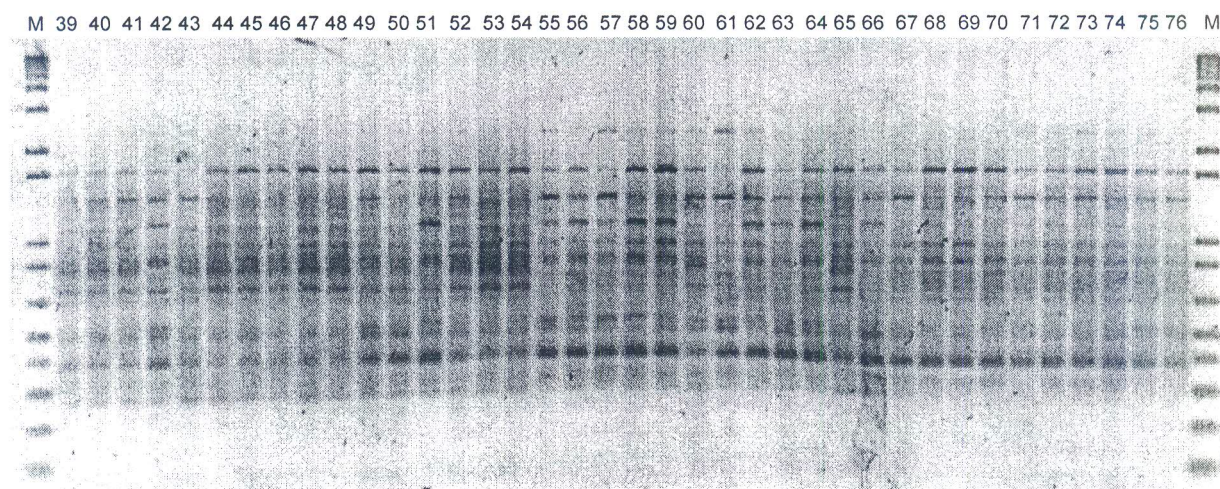
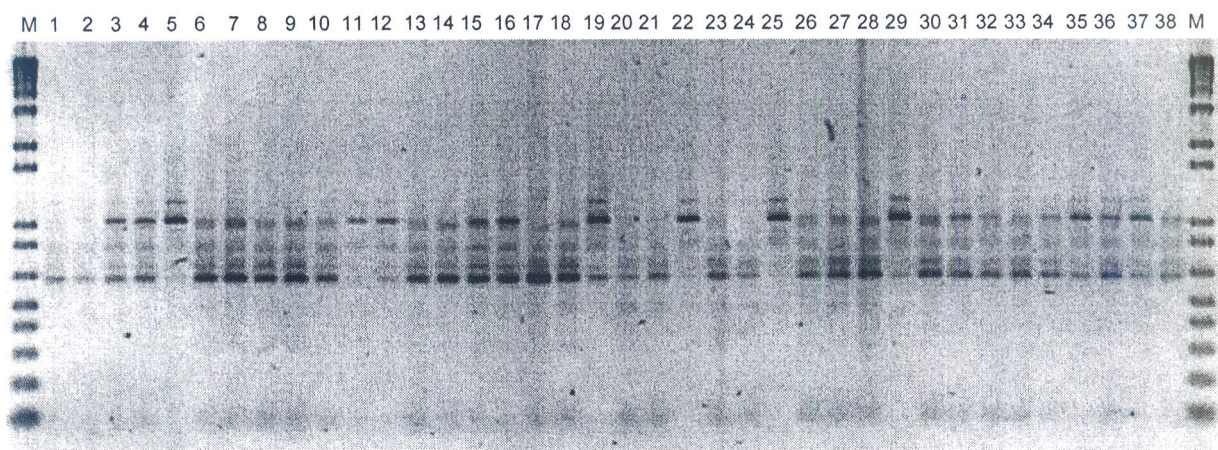
A**B**

Figura 11. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA07. **A.** M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38. **B.** M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 39-54, Maguey Carrizo 55-66, Maguey Verde Temazcalapa 66-76.

A



B

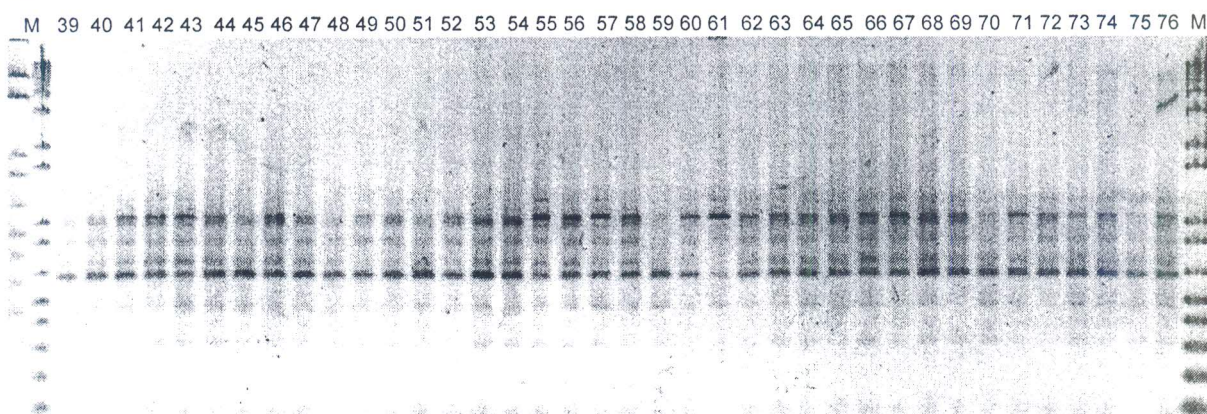


Figura 12. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA20. **A.** M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38. **B.** M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 39-54, Maguey Carrizo 55-66, Maguey Verde Temazcalapa 66-76.

La clasificación de las variantes realizada por los productores en campo coincide con la clasificación genético-molecular obtenida mediante el análisis de los patrones RAPD.

Este agrupamiento indica que las variantes de maguey pulquero analizadas son selecciones muy específicas, donde los productores han sido muy cuidadosos logrando con ello obtener materiales genéticamente bien definidos y diferenciados, además de relacionados con características de calidad del aguamiel, como es el caso de los magueyes Negro, Manso, Verde Temazcalapa y Carrizo; o por la mayor producción de aguamiel como en los magueyes Ayoteco y Xilométl.

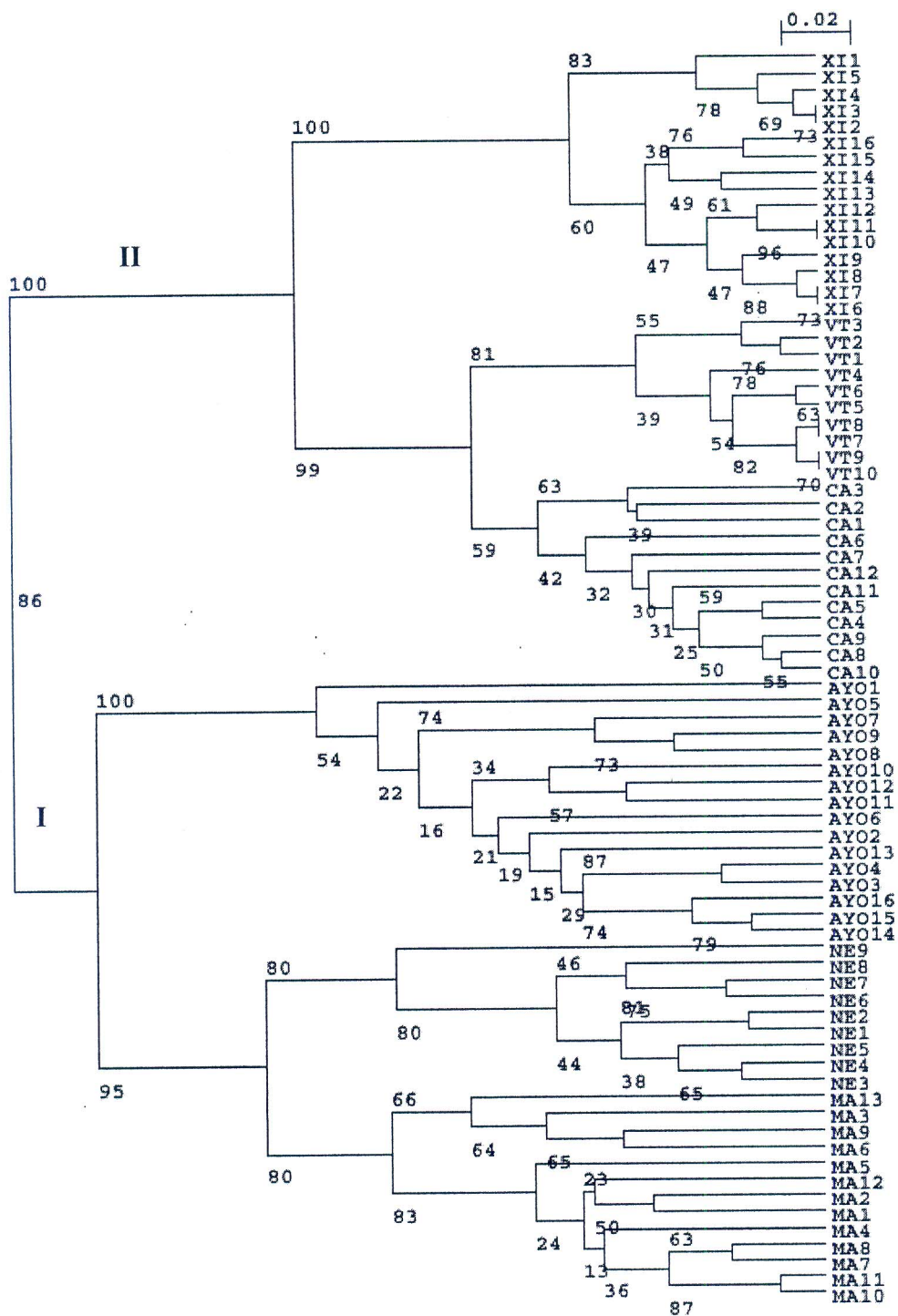


Figura 13. Dendrograma de relaciones entre individuos de variantes de maguey pulquero, generado mediante 1000 remuestreos y utilizando el coeficiente de Jaccard y 76 individuos con claves: Maguey Ayoteco (AYO); Maguey Manso (MA); Maguey Negro (NE); Maguey Xilometl (XI); Maguey Carrizo (CA); y Maguey Verde Temazcalapa (VT). La línea superior indica 0.02 de disimilitud. Los números romanos indican grupos.

En campo se observó que las selecciones utilizadas en este estudio son las que predominan ya que por un lado, el maguey Carrizo se adapta a una diversidad amplia de suelos; además, ésta especie es quizás la única que no es objeto de extracción de mixiote, lo que la hace excelente candidata para ser transplantada en lugares donde la vigilancia de los productores no es tan eficiente. Por el contrario, los magueyes Manso, Xilométl, Verde Temazcalapa, Negro y Ayoteco son variantes que han sido objeto constante de rapiña para la obtención ilegal de mixiotes. Debido a que son las que proporcionan mejor calidad de penca, esto las ha ayudado a que sobrevivan en pequeños ranchos y propiedades privadas, donde el productor las vigila constantemente y aprovecha de manera integral.

Se determina a través del dendrograma (Figura 13) que las variantes relacionadas según el agrupamiento I son Maguey Ayoteco, Manso y Negro, siendo éstas dos últimas las más relacionadas genéticamente. Lo anterior coincide con los estudios taxonómicos realizados por Rzedowski y Calderón (1990) que clasifican a los magueyes Manso y Ayoteco como *Agave salmiana* variedad Salmiana y variedad Ayoteco, respectivamente. La selección Negro Santa Bárbara hasta el momento no ha sido clasificada taxonómicamente y los resultados del presente trabajo sugieren que genéticamente puede estar muy relacionada con los magueyes Manso, por lo que pudiera ser una selección de *Agave salmiana*.

El grupo II incluyó a los magueyes Xilometl, Carrizo y Verde Temazcalapa. De los tres, Carrizo y Verde fueron los más emparentados. Los taxónomos clasifican al maguey Carrizo como *Agave mapisaga* Trel, y dado que el maguey Verde esta genéticamente muy relacionado con esta variante, es posible que sea una selección

de la misma. Aunque desde el punto de vista morfológico los tres magueyes son muy diferentes, genéticamente parecen ser muy semejantes, cuestión particularmente interesante, ya que quizá se trata de selecciones de mutantes para ciertas características morfológicas o bien son híbridos producto de cruas espontáneas las cuales fueron seleccionadas por los productores.

4.2.3. Análisis de Poblaciones en Especies y Variantes de Maguey Pulquero

El análisis de poblaciones realizado utilizando el paquete Popgene versión 32 refleja que el porcentaje de *loci* polimórficos (P) entre las poblaciones o variantes fue de 73.17 % (Cuadro 11). Dentro de cada población de maguey, los individuos mostraron un polimorfismo de 32.52 % en Manso, 32.52 % en Ayoteco, 12.20 % en maguey Verde Temazcalapa, 22.78 % en maguey Xilometl, 24.39 % en maguey Negro y 26.02 % en maguey Carrizo. Los valores bajos de polimorfismo entre los individuos dentro de las poblaciones sugieren que éstas presentan reducida variabilidad genética. Lo anterior se explica por varias causas entre las que destacan el tipo de propagación (por hijuelos) lo que limita el cruzamiento entre los individuos, la drástica disminución del cultivo del maguey pulquero en todo el país, la ausencia de programas de mejoramiento genético, el nulo conocimiento de las selecciones de los productores y la actual sobreexplotación de las mismas. El maguey Manso, que es el más cultivado, presenta el mayor porcentaje de *loci* polimórficos (32.52), mientras que las selecciones particulares como el maguey Verde Temazcalapa (12.20), Xilométl (22.78) y Negro (24.39) presentan porcentaje de *loci* polimórficos muy bajos (Cuadro 11), esto debido a que son selecciones muy específicas que además de propagarse vía hijuelos, presentan un número actual de individuos muy

limitado lo que aumenta el riesgo de extinción y con ello la pérdida de la diversidad en agaves con importancia socioeconómica.

Cuadro 11. Diversidad genética dentro y entre las especies y variantes de maguey pulquero Manso, Ayoteco, Verde, Xilométl, Negro y Carrizo.

Variante	P (%)	A	Ae	S	H	G _{ST}	Nm	N.I.
Manso	32.52	1.3252 (0.4704)	1.2142 (0.3560)	0.1781 (0.2748)	0.1211 (0.1918)			13
Ayoteco	32.52	1.3252 (0.4704)	1.2074 (0.3442)	0.1763 (0.2705)	0.1191 (0.1878)			16
Verde	12.20	1.1220 (0.3286)	1.0626 (0.1973)	0.0591 (0.1677)	0.0384 (0.1126)			10
Xilometl	22.78	1.2276 (0.4210)	1.1473 (0.3183)	0.1206 (0.2418)	0.0820 (0.1695)			16
Negro	24.39	1.2439 (0.4312)	1.1446 (0.3101)	0.1271 (0.2419)	0.0855 (0.1682)			9
Carrizo	26.02	1.2602 (0.4405)	1.1482 (0.3035)	0.1293 (0.2393)	0.0860 (0.1656)			12
Entre poblaciones	73.17	1.7317 (0.4449)	1.4822 (0.3829)	0.4066 (0.2765)	0.2757 (0.1971)	0.6762	0.2394	

P = Porcentaje de *loci* polimórficos; A = número de alelos por locus; Ae = número efectivo de alelos por locus; S = coeficiente de diversidad de Shannon; H = coeficiente de diversidad de Nei (1973); G_{ST} = coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones; Nm = grado de flujo genético; N.I.= número de individuos analizados. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar.

El coeficiente de diversidad de Nei (H) (1973) para todos los *loci* estudiados en las seis poblaciones de magueyes pulqueros fue de 0.2757 ± 0.1971 (Cuadro 11); mientras que para maguey Manso fue de 0.1211 ± 0.1918 , maguey Ayoteco 0.1191 ± 0.1878 , maguey Verde Temazcalapa 0.0384 ± 0.1126 , maguey Negro 0.0855 ± 0.1682 , maguey Xilometl 0.0820 ± 0.1695 y maguey Carrizo 0.0860 ± 0.1656 , por lo que se confirma la poca diversidad genética existente entre las poblaciones. El maguey Manso presentó la mayor diversidad, mientras que las selecciones fueron las menos diversas.

En el mismo Cuadro 11 se observa que el coeficiente de diferenciación genética entre las poblaciones fue relativamente alto ($G_{ST}= 0.6762$), lo que confirma que las poblaciones están altamente diferenciadas, producto de la selección dirigida de los productores, que en su momento la realizaron con fines de mejorar la calidad del pulque, penca, forraje o la adaptabilidad de las plantas a ciertas condiciones agroecológicas.

El grado de flujo genético ($Nm= 0.2394$) es muy bajo e indica que existe menos de un individuo migrante por generación entre las seis poblaciones lo que explica el grado de diferenciación entre los distintos magueyes pulqueros analizados.

Estos resultados son alarmantes en las poblaciones de magueyes pulqueros ya que las variantes o especies pueden estar en riesgo de desaparecer, ya sea por el tipo de propagación practicado o por el nulo interés por parte de las instituciones gubernamentales para realizar programas de mejoramiento genético. El número de alelos por locus (A) y el número efectivo de alelos (A_e) fueron semejantes para las seis poblaciones.

La reducida variabilidad genética detectada para las especies y selecciones analizadas las pone en riesgo ya que en caso de ser atacadas por plagas o enfermedades o ser expuestas a factores abióticos adversos (bajas temperaturas, sequía, baja fertilidad del suelo), las poblaciones no contarían con la variabilidad genética necesaria para adaptarse a estos cambios, lo que podría traer como consecuencia la virtual desaparición de éste cultivo.

En el Cuadro 12 se observa que las poblaciones de maguey Manso y Negro relacionaron con un valor de identidad igual a 0.8927. Este resultado sugiere que el maguey Negro podría clasificarse como una variedad botánica de *Agave salmiana*. Este resultado se confirma también mediante el análisis genético de poblaciones realizado con 13 iniciadores (Cuadro 11), del cual se llevaron a cabo 1000 remuestreos (Figura 13), que permitió clasificar a todos los individuos analizados de maguey Negro dentro de un solo grupo.

Cuadro 12. Matriz de distancias (diagonal inferior) e identidad genética (diagonal superior) según Nei's (1978) entre poblaciones de Magueyes pulqueros (*Agave spp.*) obtenidas de los datos moleculares con 13 iniciadores.

Población	Ayoteco	Manso	Negro	Xilometl	Carrizo	Verde T.
Ayoteco	0.0	0.8333	0.8144	0.7114	0.7388	0.7188
Manso	0.1824	0.0	0.8927	0.7078	0.6553	0.6366
Negro	0.2053	0.1136	0.0	0.7418	0.6985	0.6987
Xilometl	0.3406	0.3455	0.2986	0.0	0.8224	0.8097
Carrizo	0.3027	0.4227	0.3588	0.1934	0.0	0.9098
Verde T.	0.3303	0.4516	0.3585	0.2111	0.0946	0.0

En el Cuadro 12 se observa que las poblaciones más distantes fueron maguey Verde y Maguey Manso con un valor de identidad de 0.6366. Los taxónomos clasifican al maguey Carrizo como *Agave mapisaga* Trel, y dado que el maguey Verde está muy relacionado genéticamente con esta variante (0.9098 de identidad genética) es posible que sea una selección de la misma. El maguey Manso y el maguey Verde pueden ser especies distintas, siendo *Agave salmiana* variedad Salmiana el primero; y Verde que está muy relacionado con Carrizo podría clasificarse como una variante de *Agave mapisaga* Trel. Los marcadores moleculares resultan muy útiles en el análisis de poblaciones, ya que en el caso de los magueyes

pulqueros permitieron la diferenciación entre las especies de manera bastante clara, así como distinguir las variantes presentes dentro de las especies.

Es importante resaltar el hecho que aunque de acuerdo con los resultados obtenidos mediante marcadores moleculares los magueyes Verde Temazcalapa y Carrizo están muy emparentados genéticamente (90 % de identidad), no obstante el análisis de los caracteres morfológicos concluye que están poco relacionados.

De la matriz de identidad genética estimada con base en la distancia genética de Nei (1978) (Cuadro 12) se derivó el dendrograma mostrado en la Figura 14, donde se agrupan o separan las poblaciones correspondientes a especies y variantes de maguey pulquero. Es posible observar que se forman dos grandes grupos que incluyen cada uno a tres subgrupos bien definidos. Maguey Manso (*Agave salmiana* var. *salmiana*), Maguey Negro y Maguey Ayoteco (*Agave salmiana* var. *Ayoteco*) en el primer grupo; Maguey Xilometl, Maguey Verde Temazcalapa, y Maguey Carrizo (*Agave mapisaga* Trel) en el segundo.

Las poblaciones que asociaron de manera más estrecha fueron la especie *Agave mapisaga* Trel (maguey Carrizo) y la variante Verde Temazcalapa con un valor de identidad de 0.9098 el cual a su vez se relacionó con maguey Xilometl con una identidad de 0.8224. Por otro lado, hubo una asociación muy cercana entre maguey Manso y maguey Negro (0.8927), seguida de la asociación entre maguey Manso con maguey Ayoteco, con un coeficiente de identidad de 0.8333.

El dendrograma de la Figura 14 muestra muy claramente las relaciones genéticas existentes entre las poblaciones estudiadas. Las poblaciones pertenecientes a las

dos especies conocidas de maguey pulquero, Manso (*Agave salmiana*) y Carrizo (*Agave mapisaga* Trel) formaron dos grupos claramente diferenciados a una distancia genética de 0.4227. *Agave salmiana* (maguey Manso) agrupó y estuvo muy relacionado genéticamente con las variantes Ayoteco y Negro; mientras que *Agave mapisaga* Trel (maguey Carrizo) agrupó con las variantes Xilométl y Verde Temazcalapa.

Las relaciones establecidas sugieren que los magueyes pulqueros pudieron haberse originado a partir de un ancestro común y que en algún momento de la evolución se separaron y dieron origen a las especies que actualmente conocemos. Cabe destacar que aunque la relación genética existente entre maguey Carrizo, Xilométl y Verde Temazcalapa fue muy estrecha, los caracteres morfológicos evaluados no permitieron establecer esta relación ya que en campo estos magueyes son muy diferentes entre sí, lo que nos permite afirmar que la caracterización molecular fue más efectiva para clasificar variantes agronómicas.

Con base en los resultados obtenidos se concluye que los patrones RAPD obtenidos en este estudio fueron efectivos para estudiar la diversidad de los magueyes pulqueros, puesto que permitieron agrupar de manera clara las distintas especies y variantes.

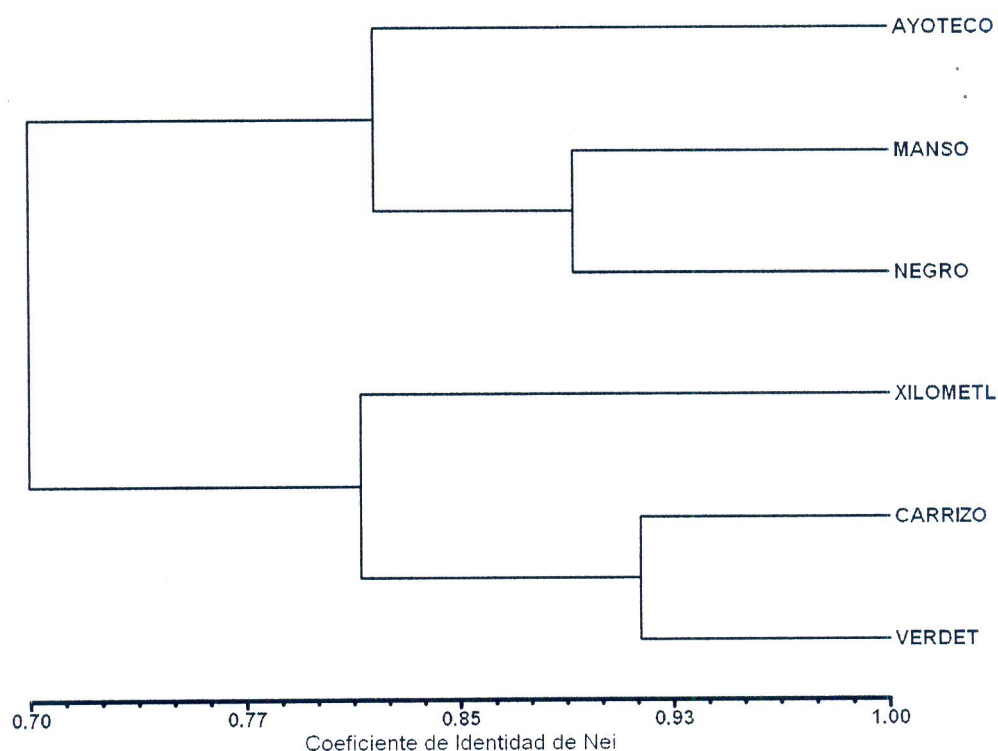


Figura 14. Dendrograma de relaciones genéticas entre poblaciones de magueyes pulqueros.

4.2.4. Contraste entre los Caracteres Morfológicos vs Marcadores Moleculares (RAPD)

Los agrupamientos hechos a partir de caracteres morfológicos, así como con los marcadores genético-moleculares (RAPD) generaron árboles que permiten agrupar a las especies o variantes analizadas. Debido a que la mayoría de los caracteres morfológicos están determinados por muchos genes y son fuertemente influenciados por las condiciones ambientales, cuando se emplean para el estudio de poblaciones podrían generar árboles erróneos o confusos. En contraste, los marcadores genético-moleculares al no ser influenciados por el ambiente, permiten obtener dendrogramas

más confiables con base en las variaciones a nivel ADN que puedan existir entre los individuos o las poblaciones evaluadas. Con base en estos argumentos se realizó una comparación entre ambos tipos de caracteres por su eficiencia para agrupar a los individuos considerados por los productores como pertenecientes a las diferentes especies y variantes de maguey pulquero.

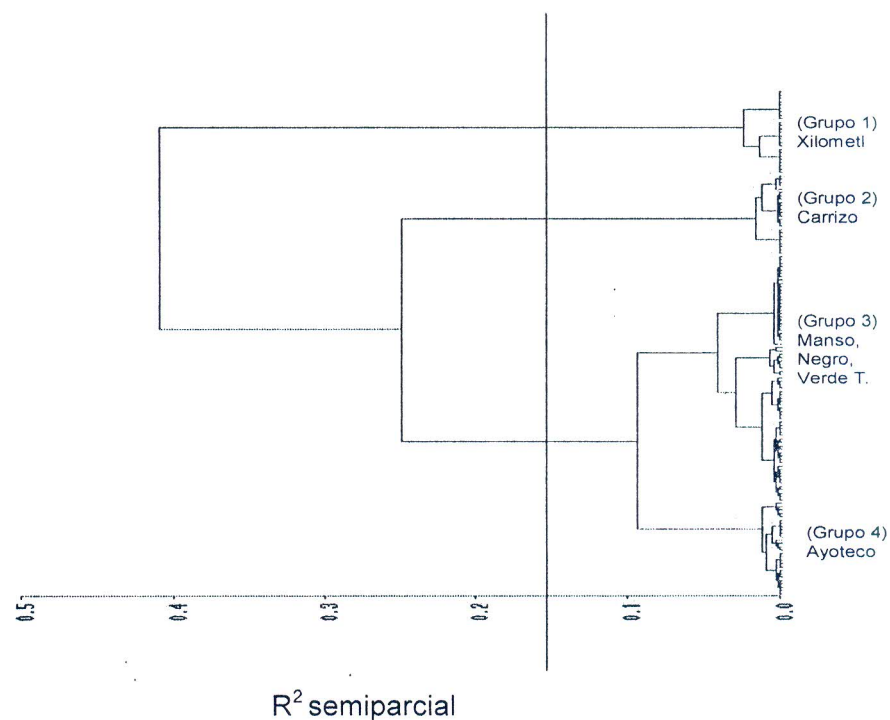


Figura 15. Dendrograma de relaciones fenotípicas entre las especies y variantes de magueyes pulqueros obtenido mediante el método de agrupamiento Ward Estándar, con base en distancias euclidianas al cuadrado.

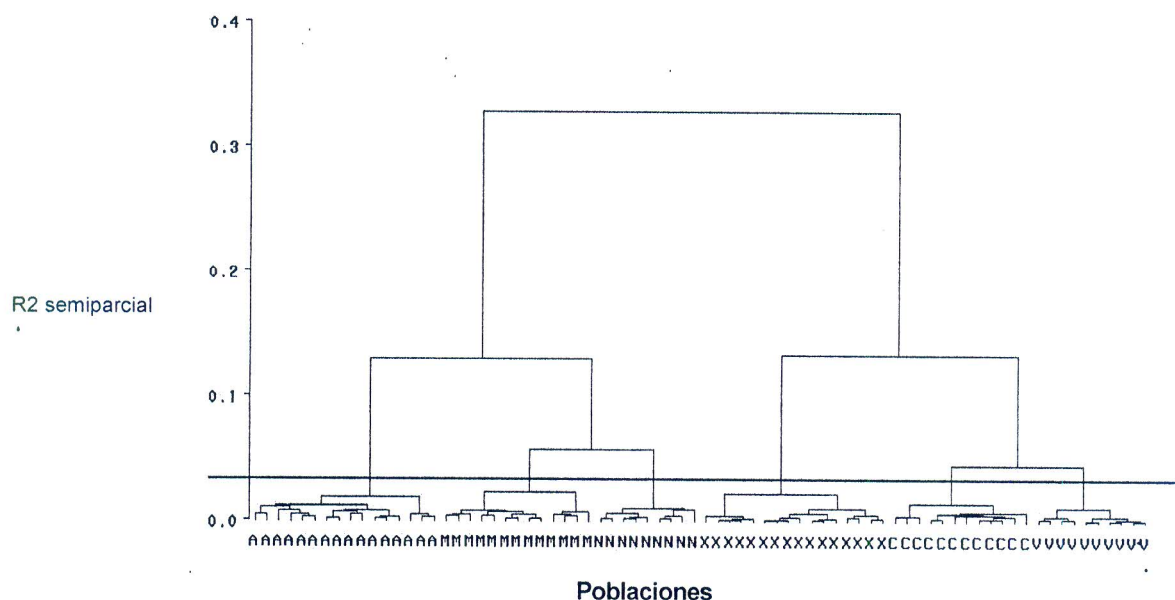


Figura 16. Dendrograma de relaciones genéticas entre las especies y variantes de magueyes pulqueros obtenido mediante el método de agrupamiento Ward Estándar, el cual utiliza las varianzas mínimas para obtener el mejor patrón de agrupamiento. Grupo A, (Maguey Ayoteco); Grupo M, (Maguey Manso); Grupo N, (Maguey Negro); Grupo X, (Maguey Xilometl); Grupo C, (Maguey Carrizo); Grupo V, (Maguey Verde Temazcalapa).

Si se compara la eficiencia de agrupamiento entre los caracteres morfológicos (Figura 15) y los marcadores moleculares (Figura 16) y se toma en cuenta que ambos árboles se generaron usando el mismo método de agrupamiento de Ward, se

observa que los caracteres morfológicos permitieron distinguir sólo 4 grupos, mezclando al menos 2 variantes y una especie. Estos resultados reflejan el efecto del ambiente sobre la expresión del fenotipo de las plantas, ya que la información genética de los magueyes Manso, Negro y Verde Temazcalapa fue muy semejante. Otra explicación es que entre algunas de las variantes de maguey pulquero hubo evolución convergente para los genes que determinan las características evaluadas, lo cual estableció cierto parecido fenotípico, lo que resultó en la generación de árboles poco confiables, con baja capacidad para discriminar entre especies y sus variantes (Figura 15). Los marcadores moleculares, en contraste, permitieron separar en forma clara a las especies taxonómicas y agrupar para cada una de ellas a las variantes seleccionadas por los productores, sin importar el número de muestras que se evaluaron. El uso de los marcadores RAPD en este estudio permitió establecer que los productores cuentan con al menos 6 variantes genéticamente diferentes de magueyes pulqueros que pueden ser utilizadas en su proceso productivo.

V. CONCLUSIONES

1. Se detectaron correlaciones positivas entre el número de hojas y la altura de planta, altura de planta y largo de hojas, altura de planta y el número de espinas laterales y número de hojas y largo de hojas.
2. Los análisis de varianza, mostraron diferencias significativas ($\alpha \leq 0.01$) entre especies y variantes para las variables: altura de planta, número de hojas, largo de hojas, ancho de hojas, número de espinas laterales y longitud de espina principal.
3. Los discriminantes morfológicos que permiten separar a las especies y variantes de magueyes pulquero en cuatro grupos son longitud de espina principal y número de espinas laterales, las cuales en conjunto explican el 94 % de la variación.
4. El análisis discriminante de los marcadores tipo RAPD permitió distinguir 6 grupos, a cada uno de los cuales pertenecen Xilometl, Verde Temazcalapa, Carrizo, Manso, Ayoteco y Negro.
5. Las poblaciones evaluadas mostraron reducida variabilidad genética.
6. El coeficiente de diversidad de Nei (H) (1973) para todos los *loci* estudiados en las seis poblaciones de magueyes pulqueros fue de 0.2757 ± 0.1971 , confirmando la reducida variabilidad existente.

7. El grado de flujo genético ($Nm = 0.2394$) fue muy bajo e indica que existe menos de un migrante por generación entre las seis poblaciones.

8. Las poblaciones que asociaron de manera más estrecha son la especie *Agave mapisaga* Trel (maguey Carrizo) y la variante Verde Temazcalapa con un valor de identidad genética del 0.9098, mismos que a su vez se relacionaron con maguey Xilometl con una similitud de 0.8224; por el otro lado hubo una asociación muy cercana entre maguey Manso y maguey Negro (0.8927), seguida de maguey Manso con maguey Ayoteco con un coeficiente de identidad de 0.8333.

9. El análisis genético-molecular, a diferencia del análisis de los caracteres morfológicos, estableció una distinción muy clara entre los materiales y una separación espacial de los mismos.

VI. PERSPECTIVAS

Los resultados generados mediante marcadores genético-moleculares ponen de manifiesto la reducida variabilidad genética presente en las poblaciones del maguey pulquero. Lo anterior, aunado al tipo de propagación que se practica y la poca atención que se ha puesto en su estudio colocan a las especies y a las variantes poblacionales en serio peligro de extinción, por lo que se debe establecer con prontitud un programa de conservación, protección y propagación de estas variantes, así como un programa de mejoramiento genético vía cruzas o variación somaclonal mediante cultivo de tejidos, para aumentar el acervo genético que actualmente está muy reducido, de acuerdo a los resultados presentados. Es de importancia realizar una prospección de materiales a nivel nacional a fin de determinar el número de las variantes y especies que se utilizan en la actualidad y conocer su situación genética poblacional para así contar con un gran número de individuos de partida para llevar a cabo un programa de mejoramiento genético asistido por marcadores moleculares. En la prospección de materiales realizada para este trabajo se encontraron y evaluaron algunos generados por los productores, mismos que deben de ser protegidos vía registros o patentes para evitar el saqueo y robo de éstos por gente ajena o extranjera, que podrían colocar a los productores bajo presiones de tipo legal, aun mayores a las que en el momento actual están siendo sometidos por parte de las industrias cervecera y tequilera.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA) (2000)

Claridades Agropecuarias. Agave tequilero, pencas que abrazan al mundo.

México, D. F. 54 p.

Ammirato P V, W R Sharp and P S Bajaj (1984) Handbook of Plant Cell Culture.

New York: McMillan Vol. 5: 206-227 p.

Bolger D J and B B Simpson (1996) Phylogeny of Agavaceae based on its ITS

rDNA sequence variation. Am J Bot 83: 1225-1235.

Bowley RS (1999) A Hitchhiker's Guide to Statistics in Plant Biology. Edit.

Ampersand Printing. Guelph, Ontario, Canada. pp: 193-221.

Chan K F and M Sun (1997) Genetic diversity and relationships detected by

isoenzyme and RAPD analysis of crop and wild species of amaranth. Teor.

Appl. Genet. 95:865-873.

DETENAL (1979) Carta Geológica. E-14 B-21 Escala 1:50 000. Dirección General

de Estudios del Territorio.

Dirección General de Geografía (1982) Carta Edafológica. E-14 B-21 Escala 1: 50 000. Secretaria de Programación y Presupuesto. México.

Dirección General de Geografía (1982) Carta de Uso de Suelo. E-14 B-21 Escala 1: 50 000. Secretaria de Programación y Presupuesto. México.

Falconer D S (1972) Introducción a la Genética Cuantitativa. Traducido por F. Márquez Sánchez. Compañía Editorial Continental S. A., México D. F., México. pp: 161-173.

García-Mas J E Graciano, M J Amanzana, A Monforte, M Oliver, J Ballester, M A Viruel y P Arús (2000) Marcadores de ADN: Conceptos, Tipos, protocolos. *En: Los Marcadores Genéticos en la Mejora Vegetal*. F. Nuez y J. Carrillo (Eds). Universidad Politécnica de Valencia. España. 579 pp

García A E (1981) Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Koppen (para adaptarla a las condiciones de la Republica Mexicana) 3ª. Ed. UNAM, México. 252 p.

Gil-Vega K, M G Chavira, O M de la Vega, J Simpson, G Vandemark (1998) Caracterización molecular de *Agave tequilana* Weber var. Azul Resumen. Revista mexicana de Fitopatología volumen 16. suplemento 1. pag. 2.

Gil-Vega K, M G Chavira, O M de la Vega, J Simpson, G Vandemark (2001) Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. *Euphytica* 119: 335-341.

Granados S D (1993) Los Agaves en México. Universidad Autónoma Chapingo. México. 252 pp.

Grandillo S and T M Fulton (2002) Approaches to gene mapping. *In* Molecular Plant Biology. Vol. 1 Practical Approaches. P.M.Gilmartin and C. Bowler, (Eds.). Oxford University Press, New York, pp. 101-136.

Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI) (1998) Cultivos Perennes en México. VII Censo Agrícola. México. 486 p.

Islam A S (2004) *In vitro* Culture, Transformation and Molecular Markers for crops Improvement. Editorial Science Publishers Inc. Enfield, New Hampshire, USA. 238 p.

Johnson D E (1998) Métodos Multivariados Aplicados al Análisis de Datos. (Traducción H. Pérez). International Thompson Editores, México. pp: 217-283, 319-395.

Labate J A (2000) Review & interpretation, Software for Population Genetic Analyses of Molecular Marker Data. *Crop Science* 40(6): 1521-1528.

- Lee M (1995)** DNA markers and plant breeding programs. *Advances in Agronomy*. Vol. 55: 265-344.
- Legaria S J P (2005)** Patrones de faseolinas y análisis RAPD en especies domesticadas de *Phaseolus*. *Rev. Fitotec. Méx.* 28 (3) 195-202.
- Loyola M E (1956)** La Industria del Pulque. Ed. Banco de México. Departamento de Investigaciones Industriales. México. 348 pp.
- Massey L K and J L Hamrick (1998)** Genetic diversity and population structure of *Yucca filamentosa* (Agavaceae). *Am J. Bot* 85: 340-345.
- Nei M (1972)** Genetic distance between populations. *The American Naturalist* 106 (949): 283-292.
- Nei M (1978)** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nei M and A K Roychoudhury (1974)** Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 76: 379-390.
- Nobel Park S (1998)** Los Incomparables Agaves y Cactus. (Traducido por Edmundo García Moya). Editorial Trillas. México. 778p.

Ramírez V R, Ortega P A, López H F, Castillo G, M Livera M, F Rincón S y F Zavala G (2000) Recursos Filogenéticos de México para la Alimentación y la Agricultura, Informe Nacional. Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas y Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. Chapingo, México. 286 p.

Ramírez J (2001) Los Magueyes Plantas de Infinitos Usos
<http://conabio.gob.mx/biodiversitas/agave.html>

Rzedowski R J y G Calderón de R (1990) Flora Fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología. Michoacán, México. 394 p.

Rivera V J J (1990) El uso del maguey (*Agave sp*) en la conservación del suelo. Tesis de Maestría en ciencias Centro de Edafología, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 172 p.

Ruvalcaba M J (1983) El Maguey Manso. Historia y Presente de Epazoyucan, Hidalgo. Colección Cuadernos Universitarios. Serie Ciencias Sociales, No. 4. Universidad Autónoma Chapingo, México. 184 p.

Salas A (2001) <http://universum.umam.mx/salas/cosecha/verde.html>.

Sahagún C J (2002) Caracteres Cuantitativos. Apuntes del curso de postgrado de Genética Cuantitativa. Programa de Postgrado en Horticultura. Universidad Autónoma Chapingo. 55p.

SAS (1999) SAS online V8. Ayudas multimedia para ver la logística del programa SAS versión 8. SAS institute. North Carolina, U. S. A.

Smith C J S and O S Smith (1992) Fingerprinting crop varieties. Advances in Agronomy. 47: 85-140.

Smith C. y E J Wood (1998) Biosíntesis. Editorial Addison-Wesley Iberoamericana, EUA. 226 p.

Sneath P H A and R R Sokal (1973) Principles of Numerical Taxonomy. H. Freeman & Company, San Francisco, Cal. U. S. A. pp: 37-55, 123-166.

Valadez E y G Kahl (2000) Huellas de ADN en Genomas de Plantas: Teoría y Protocolos de Laboratorio. Editorial Mundi-Prensa. México D. F., México. pp: 39-41, 45-52, 78-79.

Yeh F C, R-C Yai, T Boyle (1999) Popgene version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Quick User Guide. Alberta Canada. 28 p.

VIII. ANEXOS

1A. Protocolo Utilizado para la Extracción de ADN en Magueyes Pulqueros

1. Macerar 0.3 g de tejido fresco (hoja) en nitrógeno líquido sin dejar que se descongele.
2. Pasar el tejido pulverizado a un microtubo de 1.5 mL conteniendo 600 μ L de amortiguador de extracción y mezclar muy bien, agitando por unos segundos.
3. Incubar a 65 °C por 10 minutos con inversión ocasional de los tubos.
4. Adicionar 200 μ L de acetato de potasio 5 M, agitando por inversión y dejar 30 minutos en hielo.
5. Centrifugar a 15 000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente.
6. Transferir el sobrenadante a otro microtubo conteniendo 700 μ L de isopropanol frío. Mezclar por inversión y dejar a -20 °C durante 20 minutos.
7. Centrifugar 10 minutos a 13 000 xg a temperatura ambiente.
8. Eliminar el sobrenadante y disolver el precipitado en 200 μ L de solución para diluir.
9. Añadir 2 μ L de ARNasa A e incubar a 37 °C por una hora.
10. Adicionar 20 μ L de acetato de sodio 3M y 200 μ L de isopropanol frío, mezclar por inversión y dejar a -20 °C por 2 horas.

11. Centrifugar 10 minutos a 13 000 x g, a temperatura ambiente.
12. Eliminar el sobrenadante, lavar el precipitado con 200 μ L de etanol al 70 %, dejar secar la pastilla y disolver en 100 μ L de TE, almacenar a -4 °C.
13. Observaciones: en maguey la hoja se desinfectó con alcohol, luego se retiró la cutícula, se desinfectó nuevamente con alcohol al 70 % y se tomó la muestra de la capa más superficial cuidando no extraer con ella pedázos de fibra o parénquima,

2A. Reactivos Utilizados en el Proceso de Extracción de ADN

Amortiguador de extracción:

- Tris – HCl 100 mM.
- EDTA – Na₂ 50 mM.
- NaCl 500 mM.
- 2 – Mercaptoetanol 10 mM.
- SDS 1-3 %.
- pH 8.0.

Solución para diluir:

- Tris – HCl 50 mM.
- EDTA – Na₂ 10 mM.
- pH 8.0.

Amortiguador TE:

- Tris – HCl 10 mM.
- EDTA – Na₂ 1 mM.
- pH 8.0.

ARNasa A:

- 10 mg/mL en Tris – HCl 10 mM.
- NaCl 5.0 mM.
- pH 7.0.
- Antes de usar hervir durante el tiempo recomendado por el proveedor.

3A. Procedimiento para Lavar Muestras con Residuos Vegetales

1. Centrifugar a 13,000 rpm durante 2 minutos.
2. El sobrenadante transferirlo a tubos Ependorff nuevos.
3. Precipitar adicionando 20 µL de acetato de sodio 3M más 220 µL de isopropanol frío.
4. Dejar a -20 °C durante una hora.
5. Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 minutos.
6. Eliminar sobrenadante.
7. Dejar secar 30 minutos.
8. Adicionar 200 µL de solución para diluir.
9. Dejar disolver a 4 °C.

4A. Cálculos para Determinar la Concentración de ADN

La concentración se determinó en $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ con la formula siguiente:

$$\text{Concentración en } \mu\text{g} / \mu\text{L} = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{factor de dilución} / 1000$$

Para el primer dato obtenido (ejemplo) en Maguey (*Agave salmiana* Var. *Salmiana*) se calcula como sigue:

$$\text{Concentración en } \mu\text{g} / \mu\text{L} = (0.110) (50) (200) / 1000 = 1.1 \mu\text{g} / \mu\text{L}$$

Para poder llevar a $10 \mu\text{g} / \mu\text{L}$ se aplica la formula siguiente:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$V_2 = C_1 V_1 / C_2$$

Para el caso del mismo dato en maguey se tiene el resultado siguiente:

$$V_2 = (1100 \text{ ng} / \mu\text{L}) (2 \mu\text{L}) / (10 \text{ ng} / \mu\text{L}) \quad V_2 = 220 \mu\text{L}$$

Este resultado significa que al tubo Ependorff se tendrán que agregar $220 \mu\text{L}$ de agua más $2 \mu\text{L}$ del extracto de ADN.

El siguiente paso es sacar el valor máximo y mínimo:

Para este caso el valor máximo es de $1.1 \mu\text{g} / \mu\text{L}$

Mientras que el valor mínimo es de $0.09 \mu\text{g} / \mu\text{L}$

Si aplicamos la formula siguiente:

$$(1.1 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{L}) (1 \text{ ml})/ 0.09 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{L} = 24.4 \text{ } \mu\text{L}$$

Este resultado significa que al tubo Ependorff se tendrán que agregar 24.4 μL de ADN extraído más 18 μL de agua.

5A. Protocolo para Fenolizar las Muestras de Agave

1. Agregar 150 μL de TE y centrifugar.
2. Agregar 150 μL de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico (el fenol hay que manejarlo con cuidado ya que provoca quemaduras).
3. Mezclar suavemente.
4. Centrifugar 5 minutos a 13,000 x g.
5. Tomar el sobrenadante y pasarlo a un tubo nuevo (cuidar no llevarse residuos de fenol).
6. Limpiar nuevamente adicionando cloroformo (150 μL por tubo) mezclando perfectamente (el cloroformo elimina al fenol que pudiera quedar ya que el fenol inhibe a la Taq ADN polimerasa).
7. Centrifugar durante 5 minutos a 13,000 x g.
8. Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo, cuidando no extraer cloroformo.
9. Agregar 20 μL de acetato de sodio 3M más 200 μL de isopropanol frio.
10. Mezclar por inversión lenta.
11. Colocar a -20 °C durante 2 horas para precipitar.
12. Centrifugar 10 minutos a 13,000 x g.
13. Eliminar sobrenadante.

14. Lavar con etanol al 70 %, dejar secar 30 minutos en toallas absorbentes.
15. Agregar 100 μ L de TE.
16. Cuantificar la concentración de ADN mezclando 5 μ L de ADN más 995 μ L de agua.

FIGURAS:

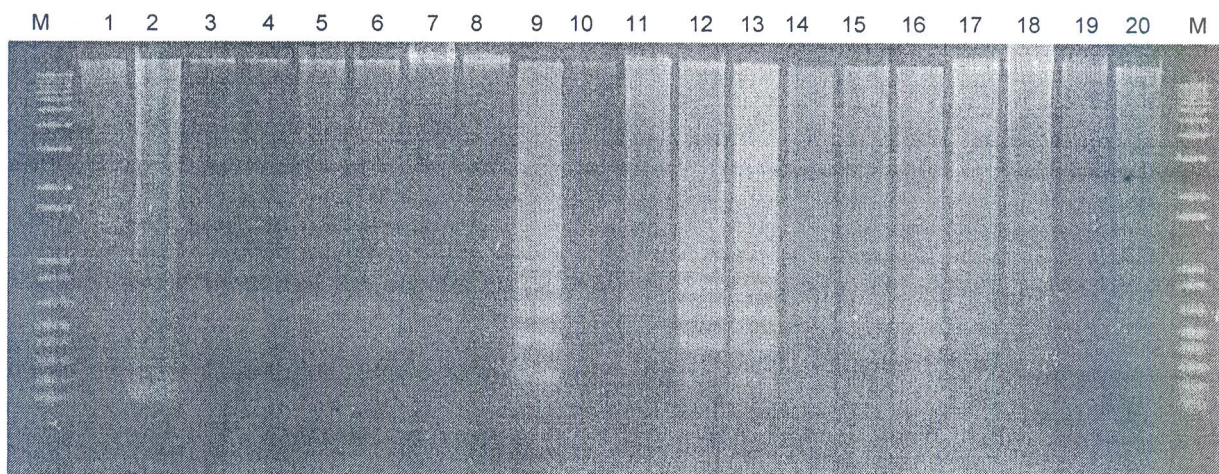


Figura 1A. Determinación de la calidad del ADN genómico. M = marcador de peso molecular 1kb. (1-20), muestras aleatorias de ADN proveniente de las 6 poblaciones de magueyes pulqueros.

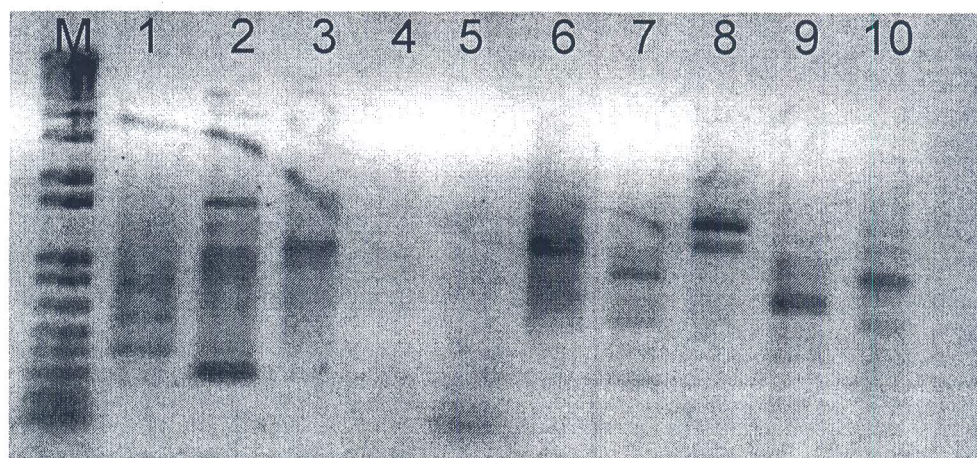


Figura 2A. Prueba del primer grupo de 20 iniciadores de la serie A de Operon (Operon Technologies® Inc, Alameda, EE.UU) en muestras aleatorias de maguey pulquero. OPA 01 (1); OPA02 (2); OPA05 (3); OPA06 (4); OPA08 (5); OPA13 (6); OPA14 (7); OPA17 (8); OPA18 (9) y OPA19 (10). M = marcador de peso molecular 1kb.

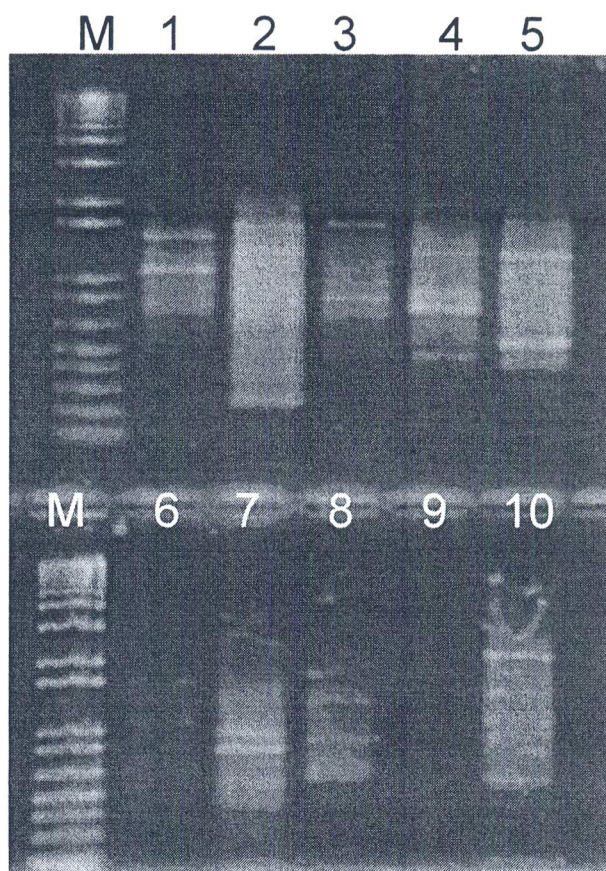


Figura 3A. Prueba de iniciadores de la serie A de Operon (Operon Technologies® Inc, Alameda, EE.UU) en muestras aleatorias de maguey pulquero. OPA03 (1); OPA04 (2); OPA07 (3); OPA09 (4); OPA10 (5); OPA11 (6); OPA12 (7); OPA15 (8); OPA16 (9) y OPA20 (10). M = marcador de peso molecular 1kb.

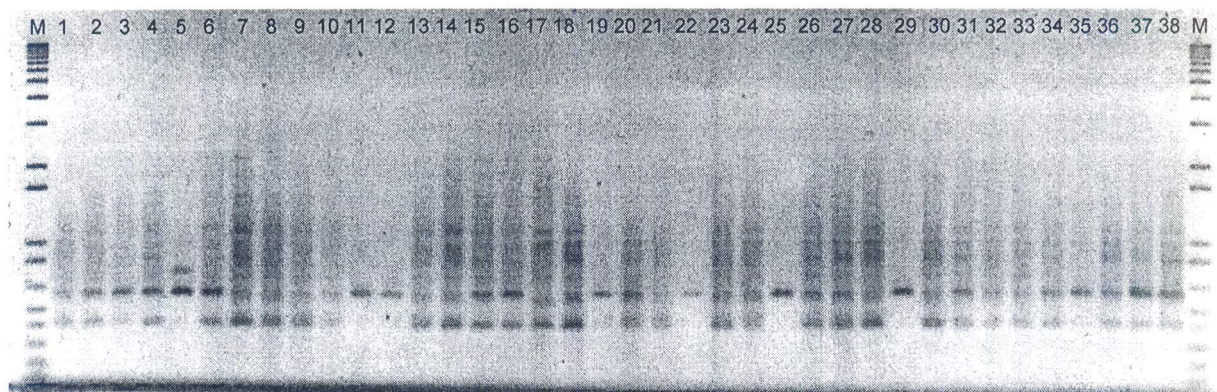


Figura 4A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con el iniciador OPA01. M = marcador de peso molecular, 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.

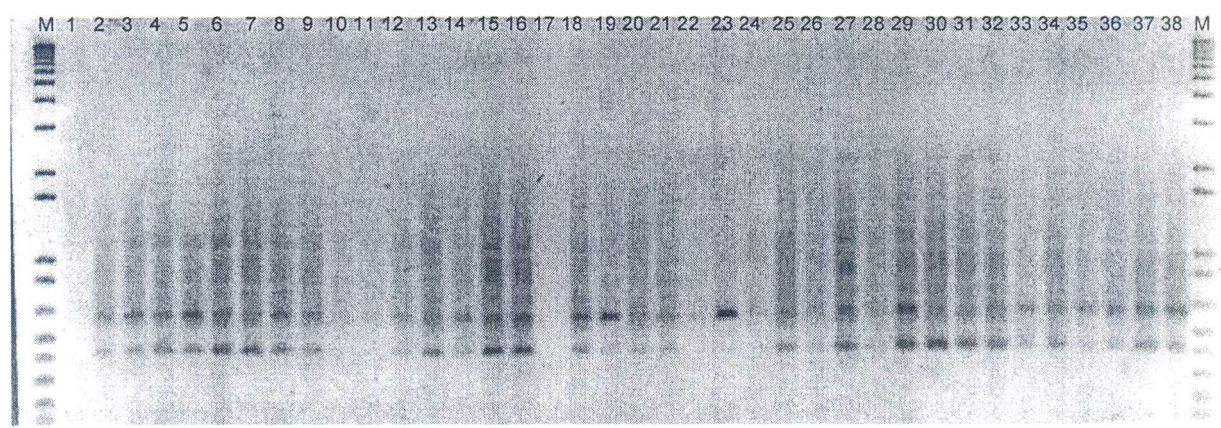


Figura 5A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con el iniciador OPA01. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 1-16, Maguey Carrizo 17-28, Maguey Verde Temazcalapa 29-38.

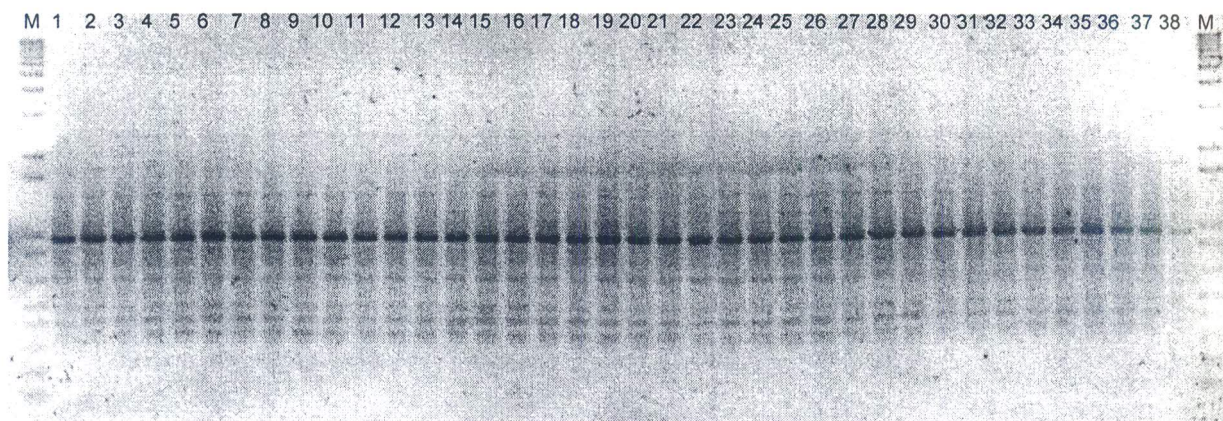


Figura 6A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con en el iniciador OPA02. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.

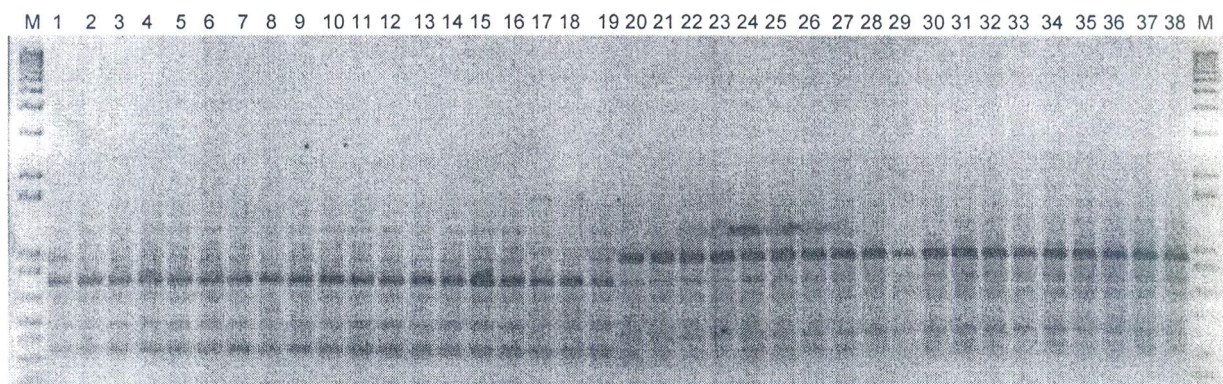


Figura 7A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con el iniciador OPA02. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 1-16, Maguey Carrizo 17-28, Maguey Verde Temazcalapa 29-38.

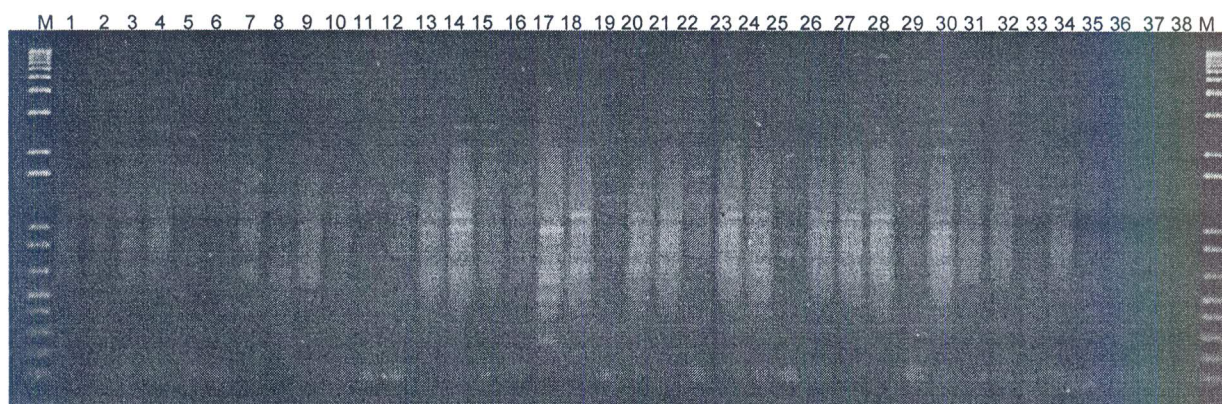


Figura 8A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con el iniciador OPA03. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.

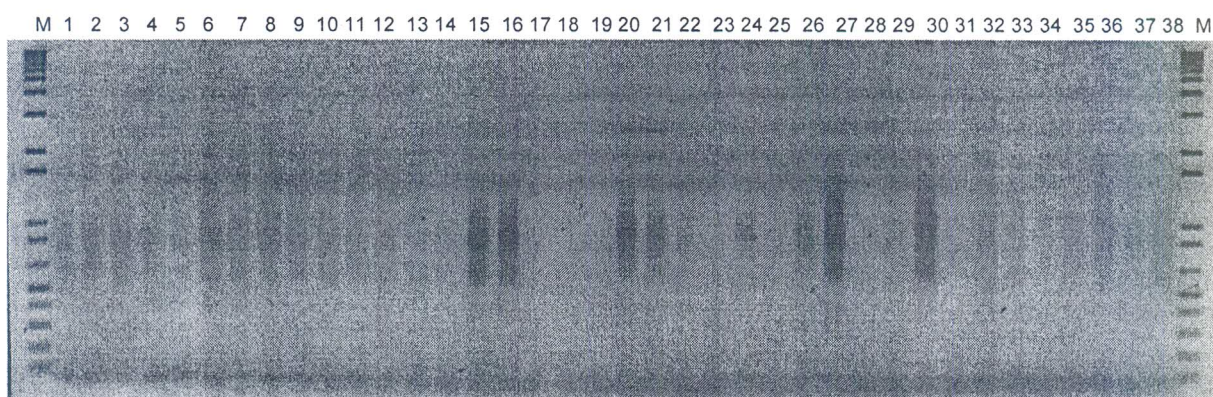


Figura 9A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con el iniciador OPA03. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 1-16, Maguey Carrizo 17-28, Maguey Verde Temazcalapa 29-38.

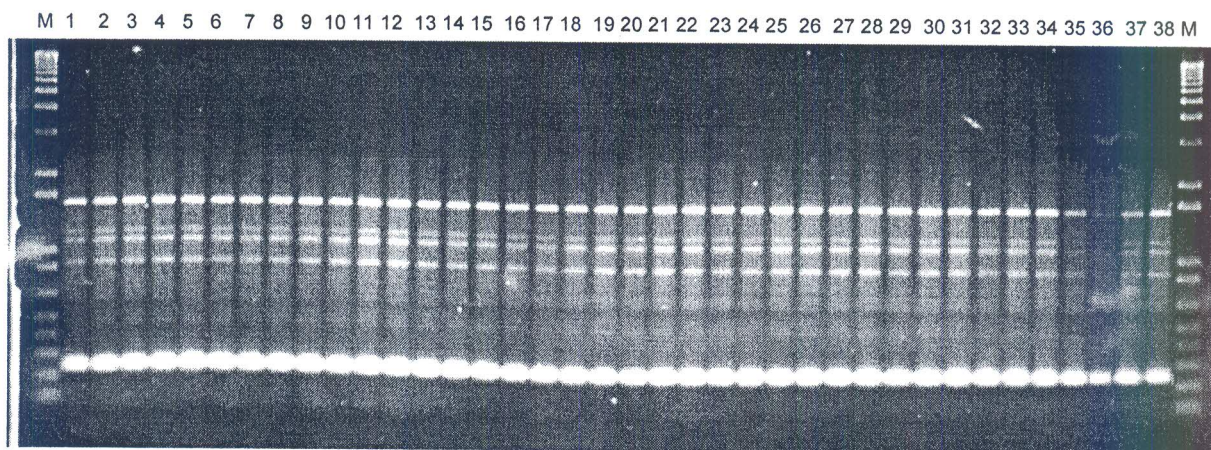


Figura 10A. Patrón de productos amplificados RÁPD en magueyes pulqueros con el iniciador OPA04. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.

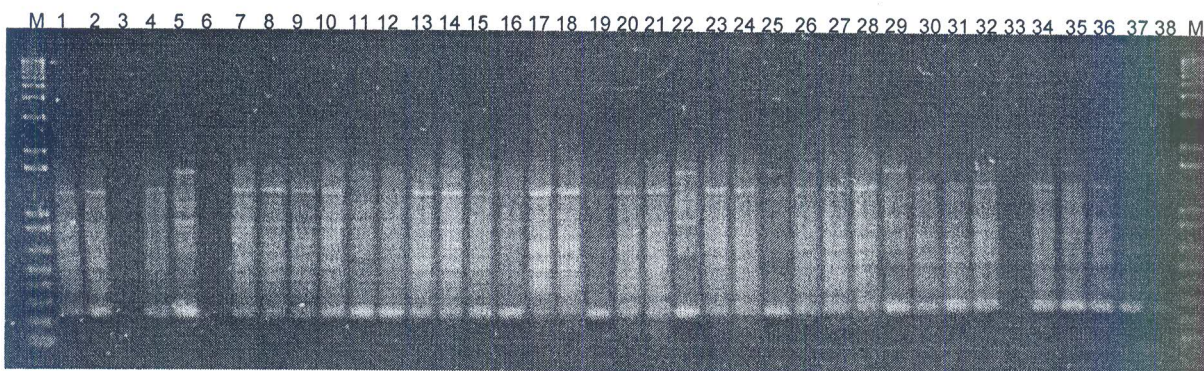


Figura 11A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con el iniciador OPA04. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 1-16, Maguey Carrizo 17-28, Maguey Verde Temazcalapa 29-38.

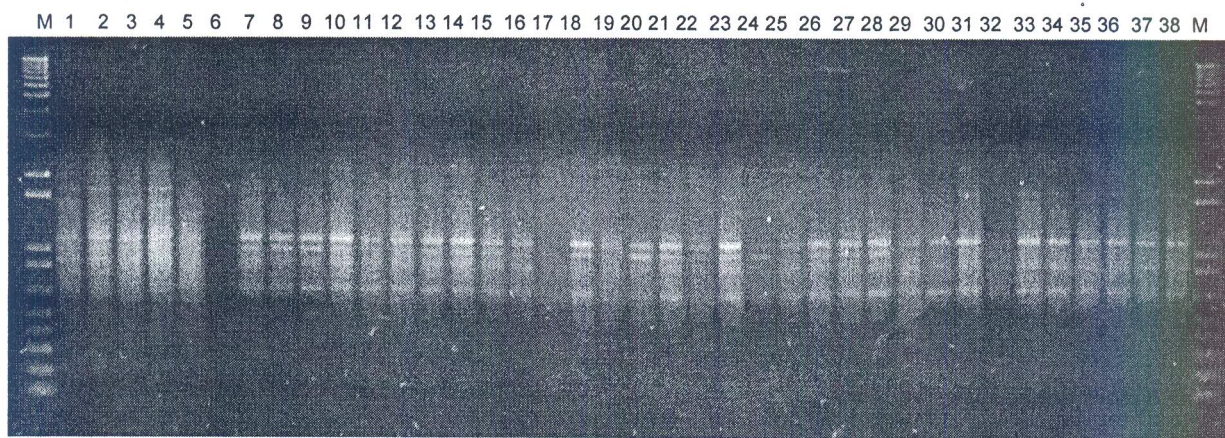


Figura 12A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con el iniciador OPA05. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.

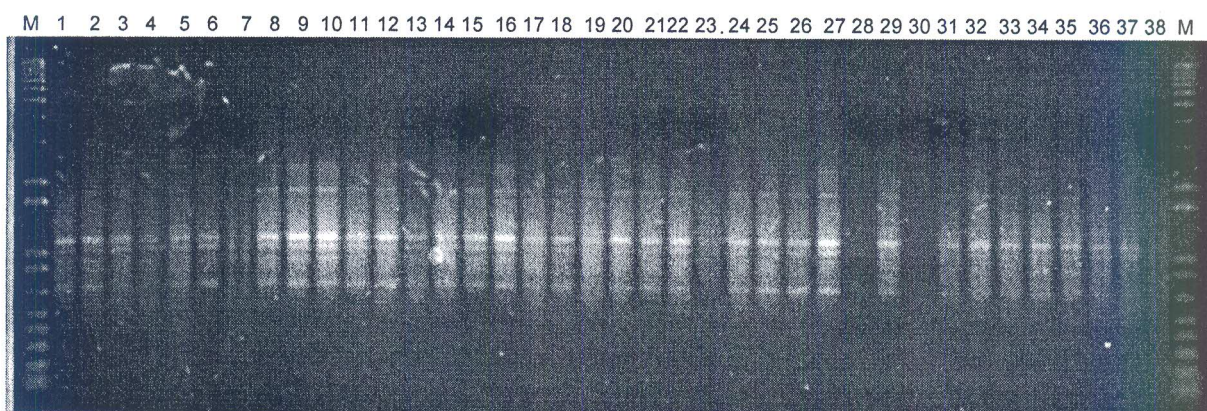


Figura 13A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con el iniciador OPA05. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 1-16, Maguey Carrizo 17-28, Maguey Verde Temazcalapa 29-38.

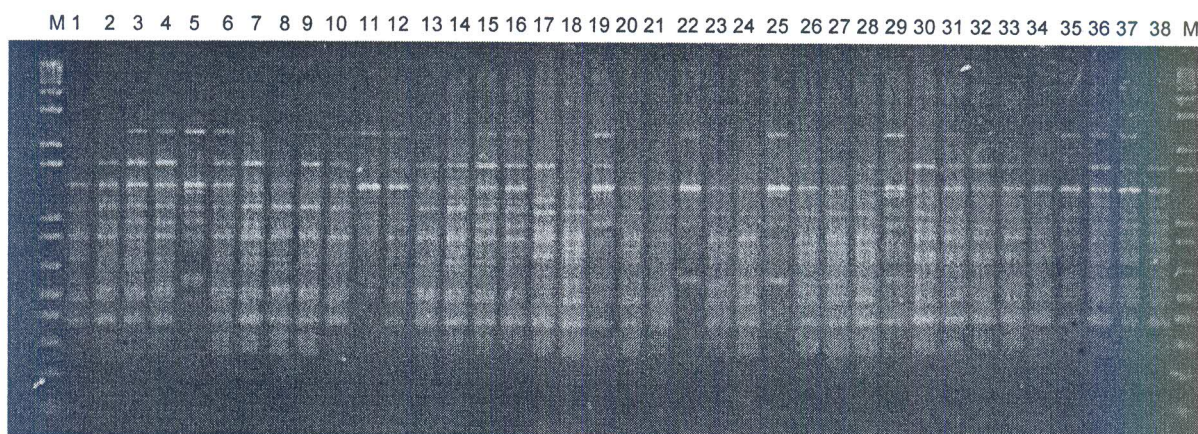


Figura 14A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con el iniciador OPA07. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.

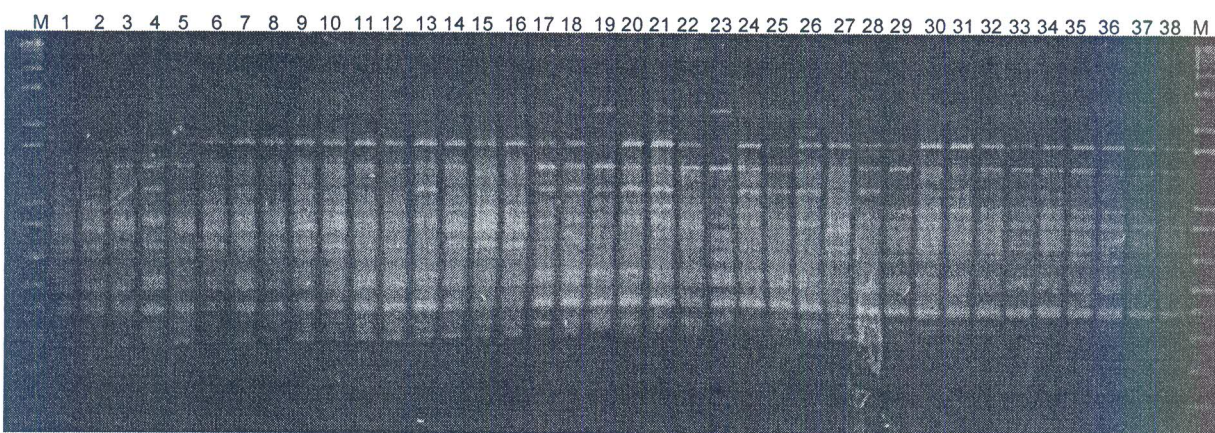


Figura 15A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con el iniciador OPA07. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 1-16, Maguey Carrizo 17-28, Maguey Verde Temazcalapa 29-38.

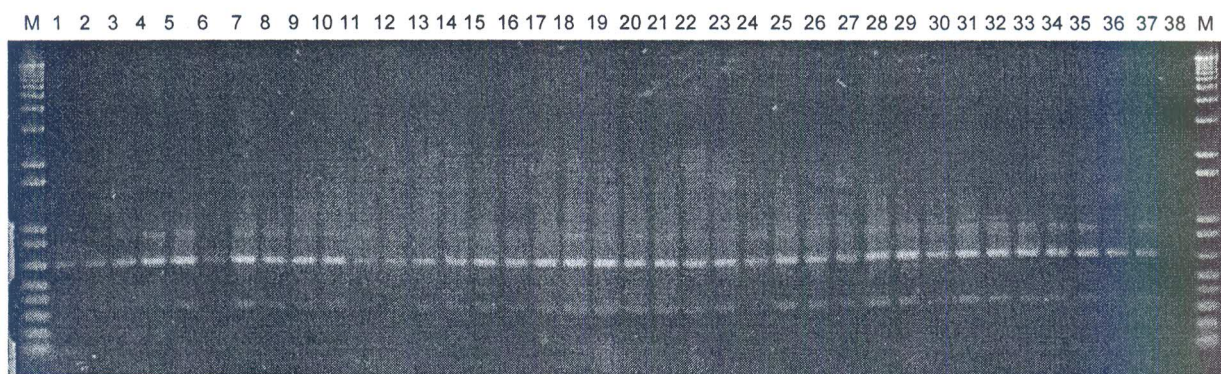


Figura 16A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA09. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.

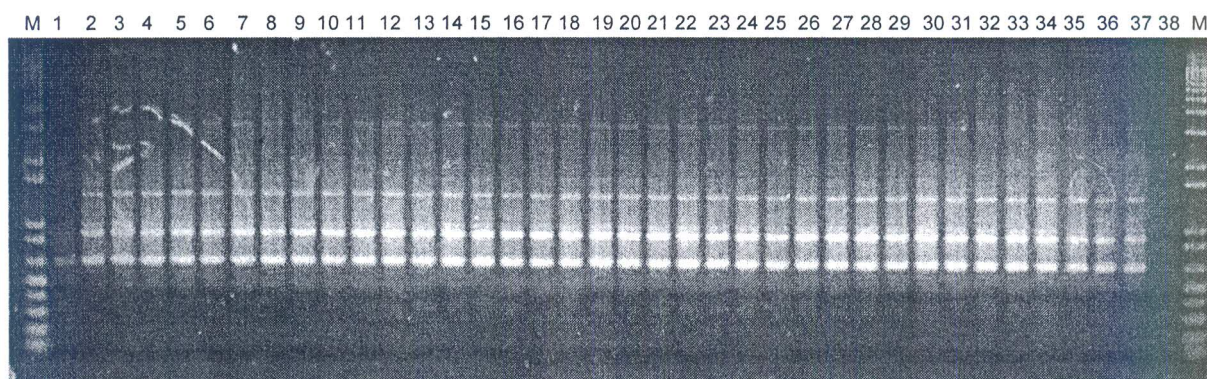


Figura 17A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA09. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 1-16, Maguey Carrizo 17-28, Maguey Verde Temazcalapa 29-38.

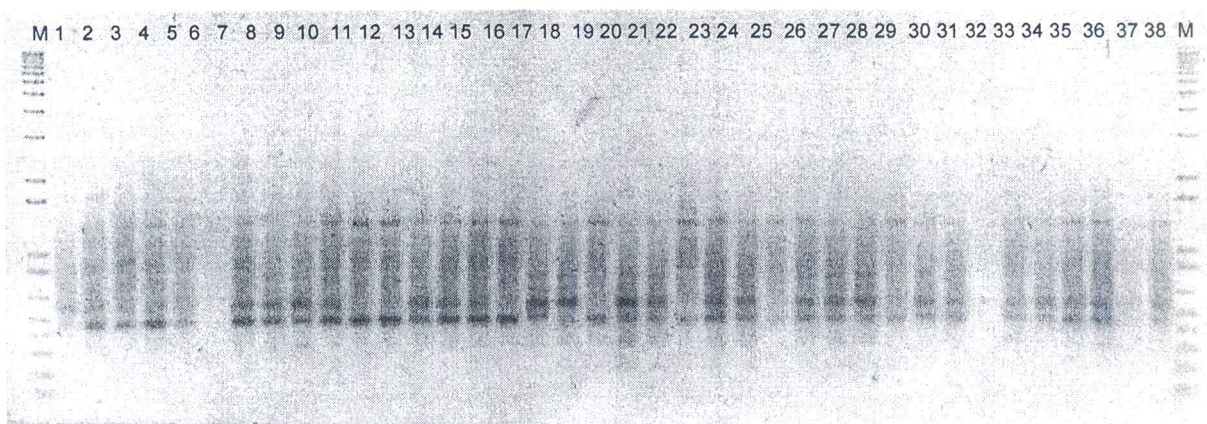


Figura 18A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA10. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.

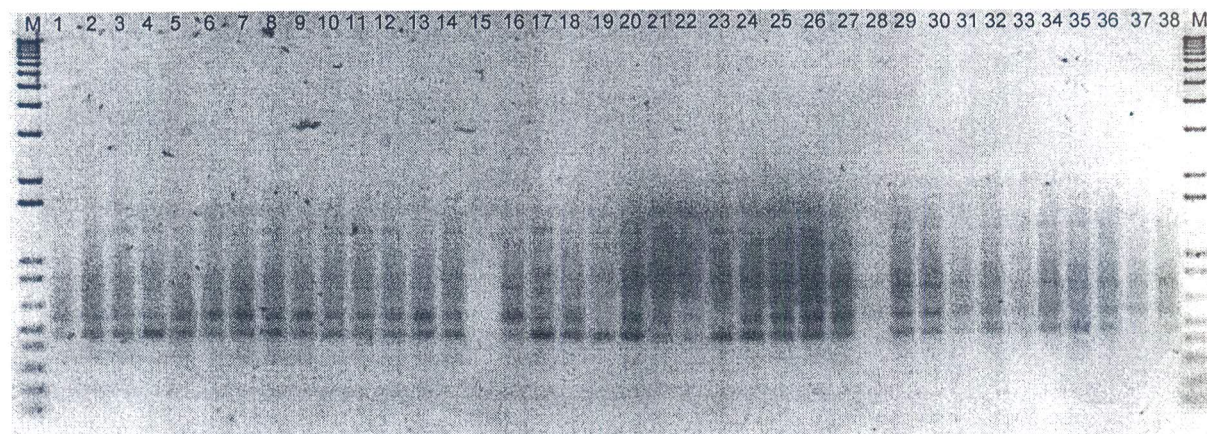


Figura 19A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA10. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 1-16, Maguey Carrizo 17-28, Maguey Verde Temazcalapa 29-38.

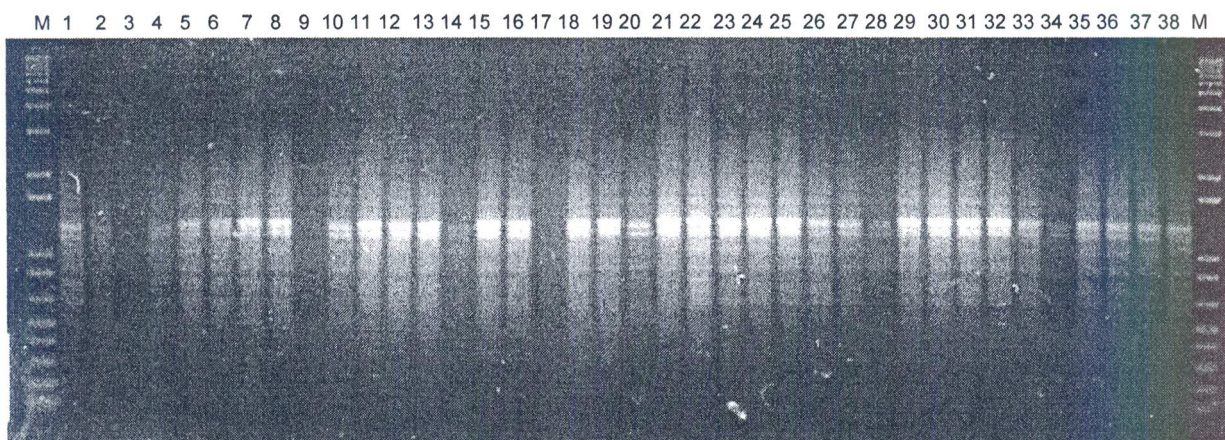


Figura 20A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA13. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.

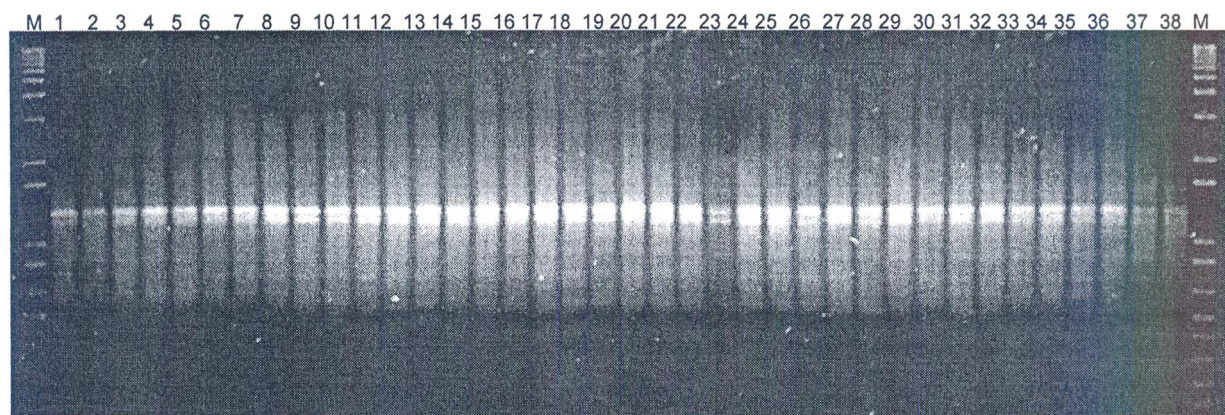


Figura 21A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA13. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 1-16, Maguey Carrizo 17-28, Maguey Verde Temazcalapa 29-38.

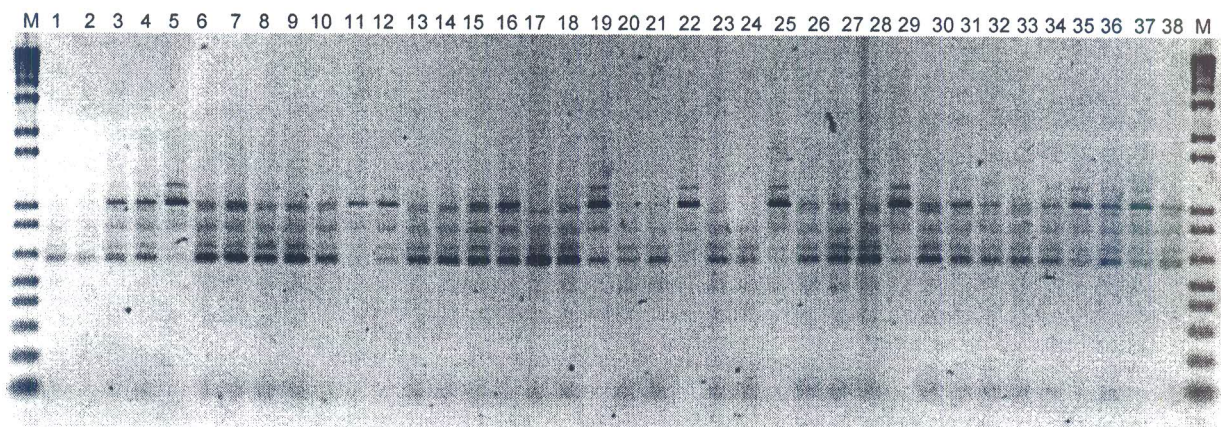


Figura 22A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA14. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.

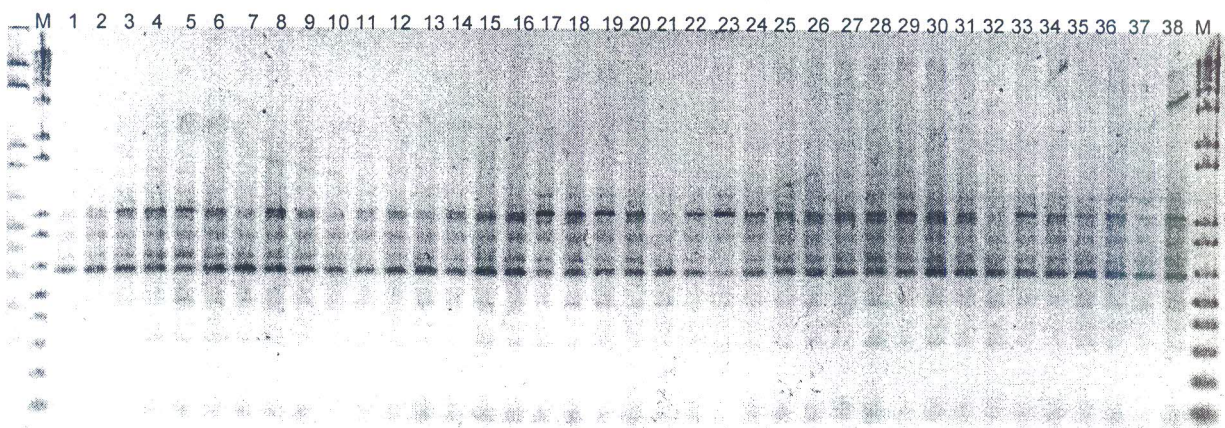


Figura 23A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA14. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 2-16, Maguey Carrizo 17-28, Maguey Verde Temazcalapa 29-38.

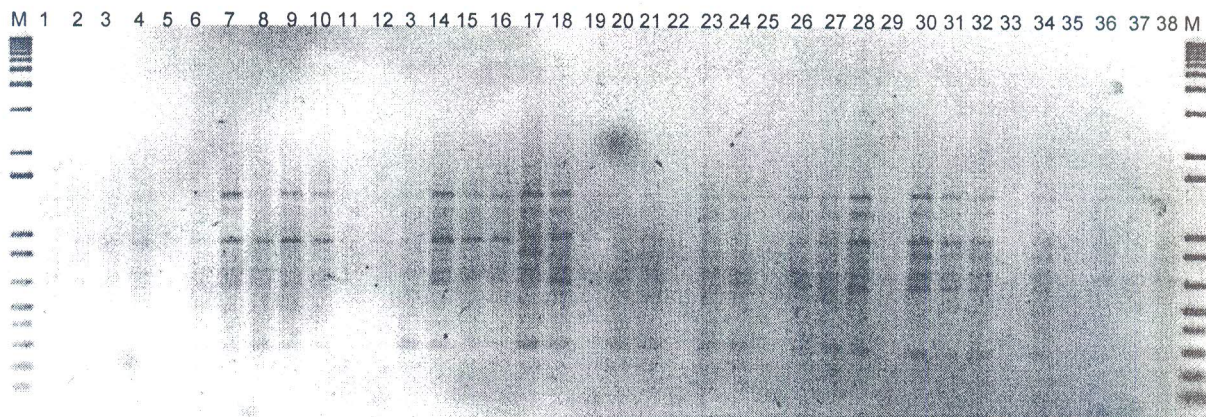


Figura 24A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA15. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.

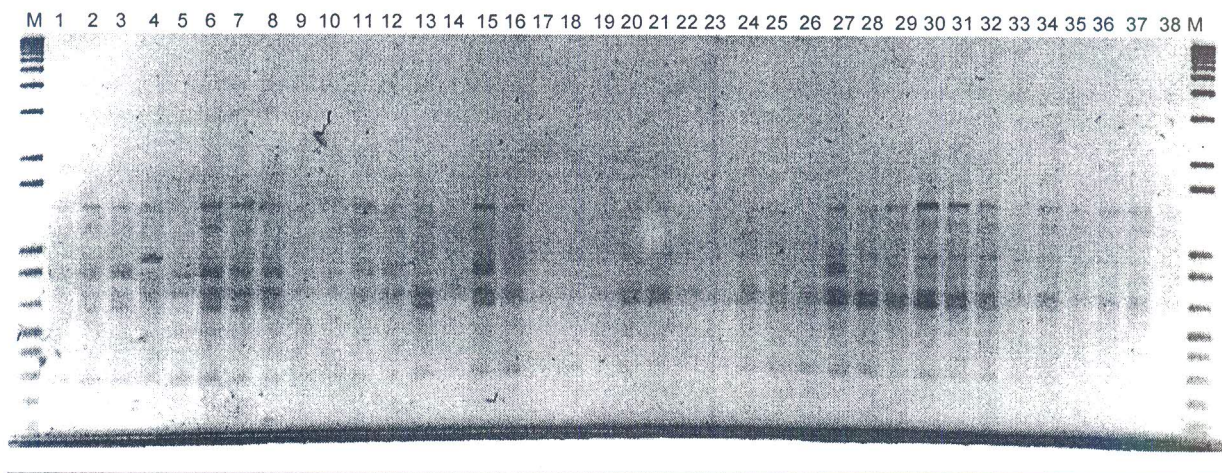


Figura 25A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA15. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 1-16, Maguey Carrizo 17-28, Maguey Verde Temazcalapa 29-38.

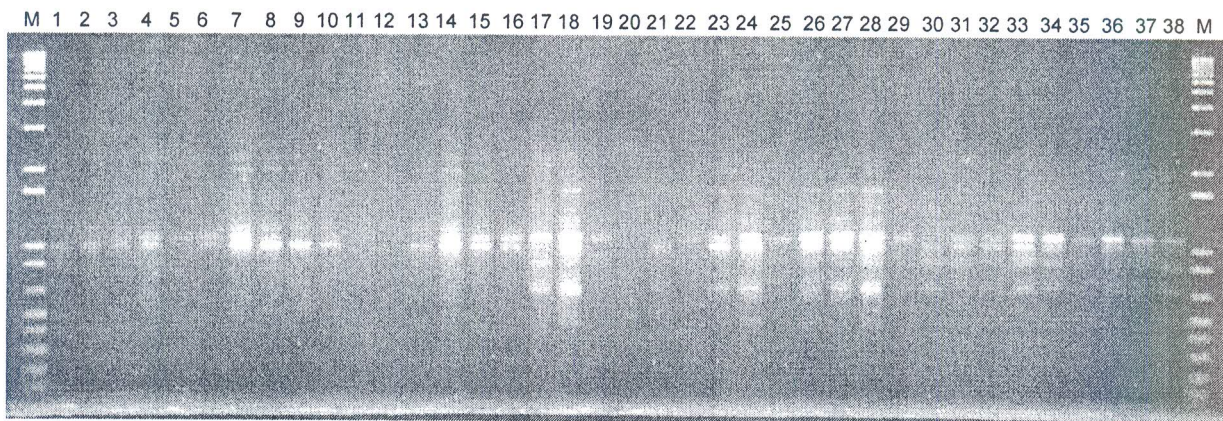


Figura 26A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA19. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.

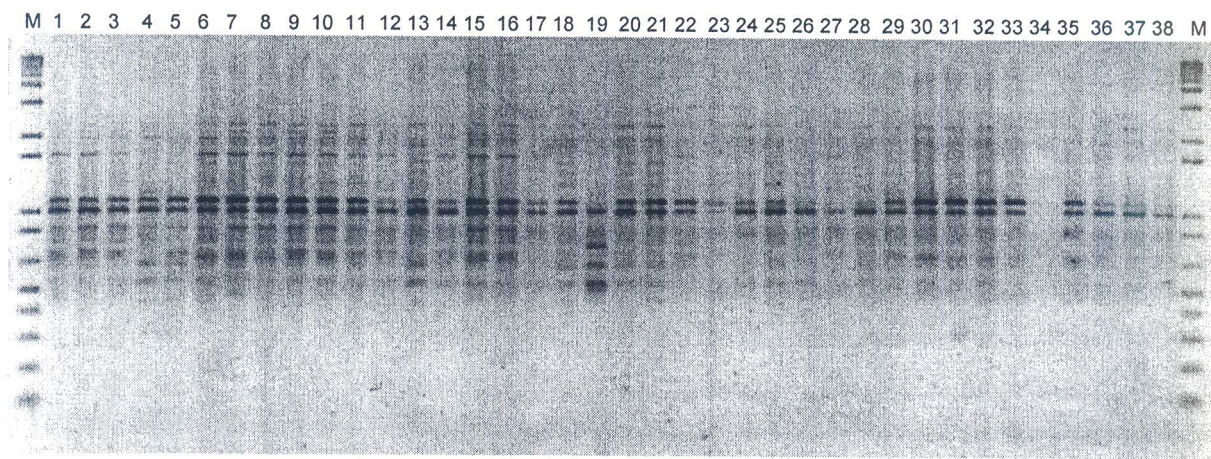


Figura 27A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA19. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 1-16, Maguey Carrizo 17-28, Maguey Verde Temazcalapa 29-38.

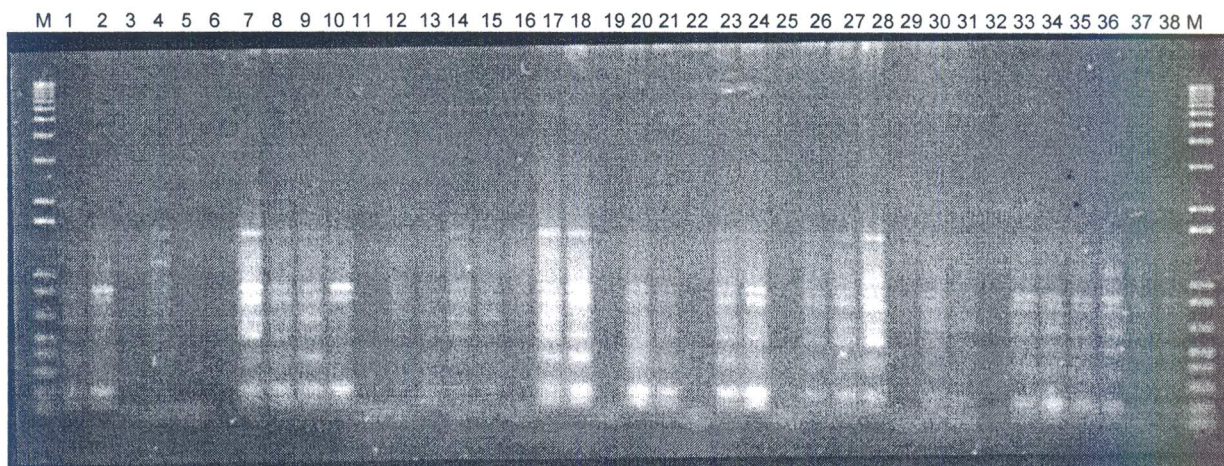


Figura 28A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA20. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Ayoteco 1-17, Maguey Manso 18-29, Maguey Negro 30-38.

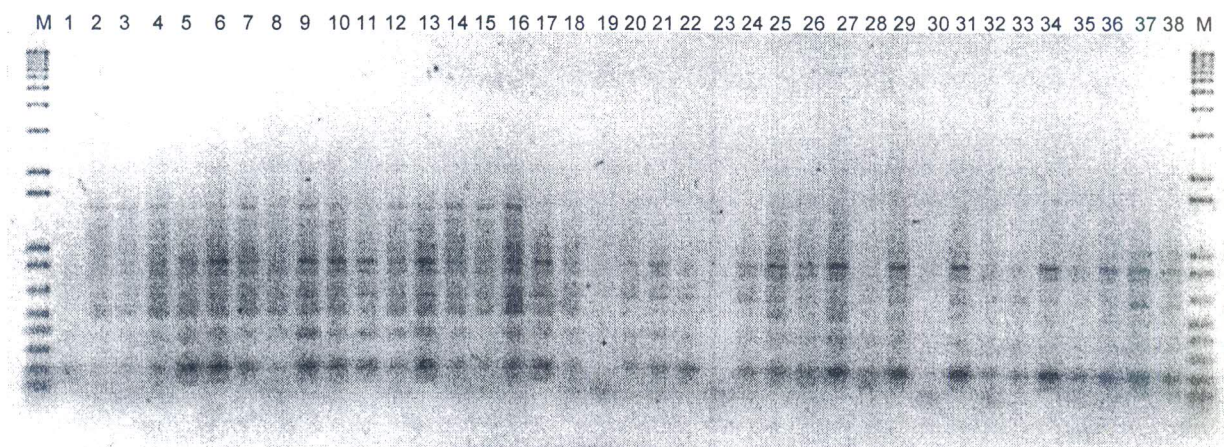


Figura 29A. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA20. M = marcador de peso molecular 1kb. Maguey Xilometl 1-16, Maguey Carrizo 17-28, Maguey Verde Temazcalapa 29-38.