



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

Departamento de Fitotecnia

Instituto de Horticultura

Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y
MOLECULAR DE CUATRO ETNOTAXA DE Maguey Pulquero
(*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck)**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

Presenta:

IMELDA ROMERO CERVANTES

Bajo la supervisión de:

Dra. MARGARITA GISELA PEÑA ORTEGA

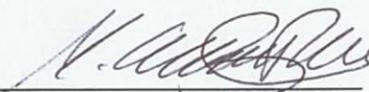


Chapingo, Estado de México, Abril 2018.

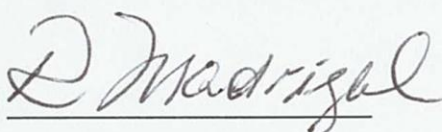
CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE CUATRO
ETNOTAXA DE MAGUEY PULQUERO (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick)

Tesis realizada por la **Ing. Imelda Romero Cervantes** bajo la supervisión del
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito
parcial para obtener el grado de:

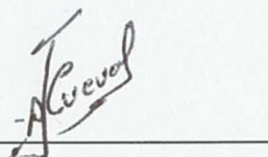
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

Director: 

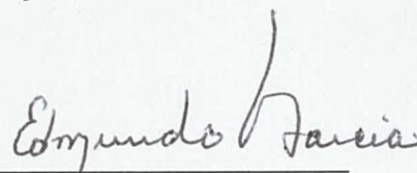
Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

Asesor: 

Dr. Remigio Madrigal Lugo

Asesor: 

Dr. Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez

Asesor: 

Dr. Edmundo García Moya

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
DEDICATORIA.....	vii
AGRADECIMIENTOS.....	viii
DATOS BIBLIOGRÁFICOS.....	ix
1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 Hipótesis.....	3
1.2 Objetivos.....	3
1.2.1 Objetivos generales.....	3
1.2.2 Objetivos particulares.....	4
2 REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 Origen y evolución del género <i>Agave</i>	5
2.2 Domesticación y humanización	5
2.3 Adaptaciones morfológicas.....	6
2.4 Variabilidad morfológica de los agaves	7
2.5 Diversidad genética en agaves.....	8
2.6 Causas de variación genética en agaves	9
2.7 Descripción de <i>A. salmiana</i> var. <i>salmiana</i>	10
2.8 Caracterización de recursos fitogenéticos	11
2.8.1 Caracterización morfológica.....	12
2.8.2 Caracterización molecular	13
2.9 Literatura citada.....	15
3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CUATRO ETNOTAXA DE MAGUEY PULQUERO (<i>Agave salmiana</i> Otto ex Salm-Dyck).....	19
3.1 RESUMEN.....	19
3.2 ABSTRACT.....	20
3.3 INTRODUCCIÓN	21

3.4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.4.1	Material experimental	22
3.4.2	Análisis estadístico	24
3.5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
3.5.1.	Estadística descriptiva	24
3.5.2.	Análisis de Componentes Principales.....	30
3.5.3.	Análisis de agrupamiento.....	32
3.6.	CONCLUSIONES	33
3.7.	LITERATURA CITADA	34
4	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CUATRO ETNOTAXA DE MAGUEY PULQUERO (<i>Agave salmiana</i> Otto ex Salm-Dyck).....	36
4.1.	RESUMEN	36
4.2.	ABSTRACT	37
4.3.	INTRODUCCIÓN	38
4.4.	MATERIALES Y MÉTODOS	40
4.4.1.	Material vegetal	40
4.4.2.	Extracción y cuantificación de ADN genómico.....	40
4.4.3.	Obtención de patrones ISSR	42
4.4.4.	Análisis estadístico	43
4.5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
4.5.1.	Análisis de agrupamiento.....	44
4.5.2.	Análisis molecular de varianza	46
4.5.3.	Descriptiva de marcadores	46
4.6.	CONCLUSIONES.....	48
4.7.	LITERATURA CITADA.....	48

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Caracteres morfológicos evaluados in situ en cuatro etnotaxa de Agave salmiana del Nanacamilpa, Tlaxcala.	23
Cuadro 2. Estadística descriptiva de la etnotaxa de agave Manso evaluada en Nanacamilpa, Tlaxcala.	25
Cuadro 3. Estadística descriptiva de la etnotaxa de agave Púa larga evaluada en Nanacamilpa, Tlaxcala.	25
Cuadro 4. Estadística descriptiva de la etnotaxa de agave Ayoteco evaluada en Nanacamilpa, Tlaxcala.	27
Cuadro 5. Estadística descriptiva de la etnotaxa de agave Chalqueño evaluada en Nanacamilpa, Tlaxcala.	28
Cuadro 6. Valores propios y proporción de la varianza total explicada por cada uno de los componentes principales en base en 30 caracteres morfológicos de A. salmiana.	31
Cuadro 7. Vectores propios entre variables morfológicas en cuatro etnotaxa de A. salmiana.	31
Cuadro 8. Iniciadores ISSR utilizados para la obtención de patrones de bandeo en cuatro etnotaxa de A. salmiana.	42
Cuadro 9. Componentes de la mezcla de reacción en cadena de la Taq ADN polimerasa (PCR), para obtención de patrones ISSR.	43
Cuadro 10. Condiciones de temperatura de los ciclos de amplificación de la PCR, para la obtención de patrones ISSR.	43
Cuadro 11. Análisis molecular de varianza (AMOVA) de cuatro etnotaxa de A. salmiana.	46
Cuadro 12. Análisis descriptivo de 22 iniciadores ISSR usados en cuatro etnotaxa de A. salmiana.	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Variación morfológica de cuatro etnotaxa de <i>A. salmiana</i> . a) Ayoteco, b) Chalqueño, c) Manso, d) Púa larga	30
Figura 2. Distribución de las unidades básicas de caracterización en el plano cartesiano de acuerdo a los componentes principales 1 y 2.....	32
Figura 3. Dendrograma jerárquico de 70 ejemplares de maguey pulquero del estado de Tlaxcala obtenido mediante la distancia taxonómica y el método de agrupamiento UPGMA.....	33
Figura 4. Dendrograma construido con la distancia de Jaccard ($\sqrt{1-S}$) y el método de agrupamiento de varianza mínima de Ward en cuatro etnotaxa de <i>Agave salmiana</i>	45
Figura 5. Patrón de bandas ISSR obtenido con el iniciador PI01 de cuatro etnotaxa (Ayoteco, Chalqueño, Manso y Púa Larga) de <i>A. salmiana</i>	48

A las personas que han trascendido en mi vida:
Andrea, Gerardo, Areli, Gerardo Jr., Vicente y Danilo. Los amo.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** y a la **Universidad Autónoma Chapingo** por la oportunidad, apoyo y confianza que me otorgaron para llevar a cabo mis estudios de Maestría.

Al jurado revisor de tesis: **Dra. Margarita Gisela Peña Ortega, Dr. Remigio Madrigal Lugo, Dr. Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez y Dr. Edmundo García Moya**, por su tiempo, paciencia y valiosa orientación y consejo para culminar este proyecto.

A la **familia del Razo**, por las facilidades, atenciones, amabilidad y disposición con la que me abrieron las puertas del Rancho San Isidro para poder llevar a cabo los estudios correspondientes.

A la **M. C. María Elisa Alvarado Cano** del Laboratorio de Mejoramiento Genético Asistido de la UACH por su asesoría y apoyo en Marcadores Moleculares.

Al **Dr. Mario Luna Cavazos** del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillos por su amabilidad y asesoría en el análisis estadístico.

A **Don Cirilo**, del Rancho San Isidro, por siempre hacer ameno el trabajo de campo.

A las **Ing. Lea Martínez Martínez y Araceli Munguia Mendez**, al **Ing. Francisco Vidal**, al **Biól. Norberto Márquez** y al **Sr. Dionicio Palafox Caballero** por su acompañamiento y apoyo en la toma de datos morfológicos.

DATOS BIBLIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Imelda Romero Cervantes

Fecha de nacimiento: 21 de noviembre de 1991

Lugar de nacimiento: Ixmiquilpan, Hidalgo.

CURP: ROCI911121MHGMRM09

Profesión: Ing. Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola

Cédula Profesional: 9903232

Desarrollo académico

Bachillerato: Colegio de Bachilleres del Estado de Hidalgo No. 1, Plantel Cardonal. Período 2006-2009.

Licenciatura: Ing. Agrónomo Especialista en Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco de Mora, Estado de México. Período: 2010-2014.



RESUMEN GENERAL

Caracterización morfológica y molecular de cuatro etnotaxa de maguey pulquero (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick)

Agave salmiana Otto ex Salm-Dyck presenta una variabilidad morfológica y genética amplia, por lo que se reconocen muchas variantes regionales, algunos autores la consideran como una especie intermedia en el proceso de domesticación. Es una especie bien adaptada a diferentes ambientes y objeto de aprovechamientos múltiples. El presente trabajo tuvo como objetivos la caracterización morfológica y molecular de cuatro etnotaxa de maguey pulquero: Ayoteco, Chalqueño, Manso y Púa Larga del municipio de Nanacamilpa, Tlaxcala y obtener la huella genética y reconocer los caracteres morfológicos discriminantes que contribuyen a la diferenciación de los etnotaxa. La caracterización morfológica se llevó a cabo mediante la evaluación *in situ* de 30 caracteres morfológicos establecidos en la “Guía Técnica para la Descripción Varietal de *Agave* spp.” del SNICS. Los resultados obtenidos fueron comparados mediante análisis multivariado, el cual permitió precisar los principales caracteres discriminantes: la longitud de la hoja, altura de roseta, relación longitud/anchura de la hoja y longitud de la espina terminal. El análisis de conglomerados jerárquicos con el método UPGMA agrupó correctamente a las plantas caracterizadas dentro de los etnotaxa.

La caracterización molecular se llevó a cabo por medio de la amplificación del ADN mediante PCR con el uso de 22 iniciadores tipo ISSR. Los resultados obtenidos mostraron variabilidad genética entre los etnotaxa del 57.64 % y dentro de los etnotaxa de 42.36 %. El análisis de conglomerados permitió agrupar a los individuos muestreados de acuerdo a su etnotaxa. Los resultados obtenidos indican que los marcadores moleculares ISSR son adecuados para identificar variación intraespecífica en *A. salmiana*. El iniciador PI01 aportó el mayor contenido de información polimórfica por lo que resultó ser el más adecuado para la identificación de la huella genética de cada etnotaxa.

Palabras clave: *Agave salmiana*, etnotaxa, caracterización, descriptores SNICS, huella genómica.

Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: Imelda Romero Cervantes
Directora de Tesis: Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

GENERAL ABSTRACT

Morphological and molecular characterization of four of maguey pulquero
(*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dick)

Agave salmiana Otto ex Salm-Dyck presents a wide morphological and genetic variation, which is why many regional variants are recognized, some authors consider it as an intermediate species in the domestication process. It is a species well adapted to different environments and object of multiple uses. The objective of this work was the morphological and molecular characterization of four etnotaxa from maguey pulquero: Ayoteco, Chalqueño, Manso and Púa Larga from the municipality of Nanacamilpa, Tlaxcala; also, to obtain the genetic fingerprint and to recognize the discriminating morphological characters that enable the differentiation of these etnotaxa. The morphological characterization was carried out through the *in situ* evaluation of 30 morphological characters established in the "Guía Técnica para la Descripción Varietal de *Agave* spp." of the SNICS. Results were compared by multivariate analysis, which allowed the determination of the main discriminating characters: leaf length, rosette height, length / width ratio of the leaf and length of the terminal spine. The analysis of hierarchical conglomerates with the UPGMA method, grouped correctly the plants characterized within the etnotaxa.

Molecular characterization was carried out with DNA amplification by PCR using ISSR type primers. The results obtained showed genetic variability among the etnotaxa of 57.64 % and within the etnotaxa of 42.36 %. Cluster analysis allowed to group the sampled individuals within their respective etnotaxa. Results indicate that the ISSR molecular markers are adequate to identify intraspecific variation in *A. salmiana*. The PI01 initiator provided the highest content of polymorphic information, which is why it was the most appropriate for the identification of the genetic fingerprint of each etnotaxa.

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

Los agaves tienen su máxima expresión morfológica, filogenética, evolutiva y cultural en México, por lo que nuestro país es considerado como centro de origen del género (García-Mendoza, 2007). La variabilidad morfológica y genética presente en los magueyes ha sido producto de la interacción entre estas plantas, el medio ecológico en el que se desarrollan y la intervención humana. García-Mendoza (2007) menciona que los magueyes poseen adaptaciones morfológicas que les permiten desarrollarse bajo condiciones adversas como sequía y altas temperaturas y que han modificado su estructura básica en respuesta a las presiones del medio.

Las especies de *Agave* en Mesoamérica fueron seleccionadas por el hombre dando pauta a nuevas combinaciones genéticas que les permitieron presentar ventajas en la producción y calidad de fibra, alimento, bebida y otros productos especiales. A medida que avanzó la civilización, se especializó también al *Agave*, con base en la selección de caracteres acordes a sus necesidades. Aunque no se conocía la genética, se fomentó, en gran medida, la diversificación del agave (Gentry, 1982)

Las especies que se propagan asexualmente, como es el caso de los magueyes, no se da la recombinación genética por lo que se creía que los descendientes eran homogéneos; sin embargo, se ha demostrado la existencia de variabilidad genética a pesar de la propagación asexual. Se considera que en los agaves los procesos de hibridación, poliploidía y multiplicación representan una ventaja evolutiva importante. La especiación en este género se originó por cambios rápidos en el genoma debido a la hibridación y a la neopoliploidia, por lo que es posible considerar que se encuentra en una etapa de evolución activa, con un alto grado de afinidad genética entre las especies (García-Mendoza, 2007).

Agave salmiana, Otto ex Salm-Dick, conocido como maguey pulquero, destaca por la abundancia de sus variantes y distribución en numerosas localidades en

México, desde Tlaxcala hasta Coahuila (Mora-López, Reyes-Agüero, Flores-Flores, Peña-Valdivia, & Aguirre-Rivera, 2011) y es sustento de numerosas familias campesinas.

El área geográfica del altiplano mexicano, en particular en el Estado de Tlaxcala, los magueyes pulqueros más demandados son el maguey Manso, por su adaptación a las condiciones climáticas de la región; el maguey Púa Larga, por ser más precoz que el Manso y porque dificulta la extracción de la cutícula (mixiote); el maguey Chalqueño y Ayoteco son menos cultivados, tienen un ciclo vegetativo más largo pero una mayor producción de aguamiel (Martínez, 2015)

Los magueyes, además de la producción de aguamiel para la elaboración de pulque, han tenido y tienen una importancia económica y cultural para numerosos pueblos indígenas y mestizos, que los han aprovechado durante siglos como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, cobijo, ornato, fibras, abono, material de construcción de viviendas y elaboración de implementos agrícolas (García-Mendoza, 2007).

Los desarrollos agroindustriales recientes han permitido obtener de los magueyes productos como el pulque enlatado, jarabe de fructosa e inulina, los cuales presentan un alto valor agregado y demanda internacional. Se ha considerado a futuro el posible aprovechamiento del maguey como una materia prima para la producción de bioetanol de primera y segunda generación (Martínez, 2015).

El Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS), no tiene registrada, hasta el momento, alguna variedad de maguey pulquero o con una categoría de certificación o calificación por lo que no existen plantaciones comerciales de alta calidad que los productores puedan aprovechar. En consecuencia, al no haber variedades registradas o semillas botánicas mejoradas, las organizaciones de productores de maguey, de acuerdo a las reglas de operación, no tienen acceso a recursos estatales ni federales (Martínez, 2015).

La globalización y la revolución biotecnológica, al inicio del siglo XXI convierten a la biodiversidad en un recurso estratégico de gran valor (Massieu & Chapela, 2002), por lo que, recursos como los magueyes se vuelven susceptibles de ser saqueados y las poblaciones humanas originarias que los han protegido y conservado podrían ser víctimas de biopiratería.

El registro de variedades de maguey, ante este panorama, se vuelve necesario de manera que se pueda proteger este recurso vegetal estratégico para que los beneficios de su aprovechamiento puedan ayudar al desarrollo de las comunidades de la región del Altiplano, las cuales durante siglos han sido las guardianas del recurso maguey.

Un primer paso para el registro de variedades es la caracterización morfológica de los recursos mediante descriptores definidos, por lo que en el presente trabajo se llevó a cabo la caracterización morfológica de cuatro etnotaxa de maguey pulquero con base en los descriptores de la *Guía Técnica para la descripción varietal de Agave* (SNICS, 2014) así como, una caracterización molecular de éstos mediante marcadores moleculares tipo Inter Secuencias Simples Repetidas (ISSR por sus siglas en inglés), con objeto de obtener las huellas genéticas con fines de protección de este recurso vegetal.

1.1 Hipótesis

Al menos, un carácter de los 30 establecidos en la Guía Técnica discriminará los cuatro etnotaxa estudiados.

Al menos uno de los iniciadores ISSR estudiados permitirá estimar la variabilidad genética existente en las poblaciones estudiadas.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivos generales

Caracterizar la morfología de cada etnotaxa de acuerdo a la Guía Técnica para la Descripción Varietal de Agave (*Agave* spp.) del SNICS.

Obtener las huellas genéticas de los cuatro etnotaxa a través de marcadores moleculares ISSR.

1.2.2 Objetivos particulares

Identificar los principales caracteres morfológicos discriminantes para la diferenciación entre los cuatro etnotaxa de maguey pulquero (Manso, Púa Larga, Ayoteco y Chalqueño).

Determinar la variabilidad genética existente entre y dentro de los cuatro etnotaxa de maguey pulquero: Ayoteco, Chalqueño, Manso y Púa Larga, producidos en el Rancho San Isidro, en Nanacamilpa, Tlaxcala.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen y evolución del género *Agave*

El origen del género *Agave sensu lato* es reciente (10 millones de años), tiempo que coincide con el proceso de aridificación de Norteamérica, por lo que se puede inferir que el motor inicial de la radiación adaptativa fue la adaptación a los nuevos hábitats áridos. En comparación con otros géneros, la tasa de especiación de los agaves es muy alta (entre 0.32 y 0.55 especies por millón de años) (Eguiarte & Souza, 2007). Los agaves son especies clave de las regiones áridas y semiáridas. México representa el centro geográfico de origen, aunque las poblaciones naturales actualmente se extienden desde el suroeste de los Estados Unidos a través de América Central, el Caribe, y en el norte de Sudamérica (García-Moya, Romero-Manzanares, & Nobel, 2011)

En las especies que se multiplican asexualmente no se da la recombinación genética por lo que se espera que los descendientes sean genéticamente idénticos entre sí, sin embargo, se ha encontrado variabilidad genética dentro de las poblaciones que han sido propagadas asexualmente. Se considera que en los agaves los procesos de hibridación, poliploidía y multiplicación vegetativa son adaptaciones evolutivas importantes que generan cambios rápidos en el genoma, por lo que es posible considerar que el género se encuentra en una etapa de evolución activa, con un alto grado de afinidad genética entre las especies (García-Mendoza, 2007).

2.2 Domesticación y humanización

El proceso de humanización de la biota presenta tres fases selectivas críticas: la recolección (de especies abundantes, persistentes, útiles y reactivas en forma positiva a la humanización); el cultivo incipiente (de especies con los mejores resultados en la recolección y que son funcionales en ambientes humanizados); y la diferenciación genética (las especies más exitosas en el cultivo se empiezan a distinguir por su morfología, fisiología y ecología de sus conespecíficas

silvestres); la domesticación es la última fase del proceso (Perales & Aguirre, 2008).

Mora-López *et al.* (2011) mencionan que, en el proceso de humanización, las tendencias de domesticación de magueyes de la sección *Salmianae* tienden hacia un mayor tamaño de la roseta y la reducción de las estructuras de protección mecánica; dichos autores encontraron que *Agave mapisaga* Trel., es la especie con mayor grado de humanización dado que manifiesta dientes pequeños y rosetas grandes, la cual está presente sólo bajo cultivo en plantaciones o en linderos de parcelas agrícolas. Por el contrario, la menos humanizada *A. macroculmis* Tod.¹, con plantas pequeñas, espinas y dientes grandes y escasamente cultivada. Por su parte *A. salmiana* se considera una especie intermedia, ya que presenta la variación morfológica más amplia y la mayor diversidad de ambientes y aprovechamientos, con extremos de variación que cubren todo el gradiente reconocido, desde las variantes pulqueras de gran tamaño (*A. salmiana* var. *salmiana*) y cultivo intenso (Macedo, 1950), hasta los magueyes silvestres de escaso tamaño y espinas prominentes (*A. salmiana* var. *ferox*).

2.3 Adaptaciones morfológicas

Las especializaciones morfológicas a las condiciones adversas consisten en modificaciones en la estructura básica de una planta, en respuesta a las presiones del medio. Los agaves poseen adaptaciones para sobrevivir en medios secos o con periodos secos, en particular en el suelo, con fuertes fluctuaciones de temperatura entre el día y la noche, las cuales tienden a limitar la pérdida de agua por transpiración y a acumularla en tejidos especializados (García-Mendoza, 2007). Algunas de estas adaptaciones son las siguientes: a) hojas suculentas: almacenan el agua en época de lluvias, la cual es utilizada durante

¹ Esta especie pasó a ser un sinónimo de *Agave atrovirens* Karw. ex Salm-Dick de acuerdo con The Plant List (2013)

la temporada de sequía en el suelo, b) sistema radical superficial: facilita la absorción de agua de lluvia, c) desarrollo de fibras en las pencas: ayudan a mantener la rigidez durante los períodos de pérdida de agua, d) presencia de dientes en el margen y una espina terminal en la penca, las cuales ayudan a captar agua e) cutícula gruesa en la epidermis de la penca f) filotaxia en roseta: evita el autosombreo de las pencas, g) metabolismo CAM: permite obtener ganancias netas de carbono con una pérdida mínima de agua.

2.4 Variabilidad morfológica de los agaves

Alfaro-Rojas, Legaria-Solano, & Rodríguez-Pérez (2007) evaluaron cinco caracteres morfológicos en magueyes pulqueros, dentro de los cuales los principales discriminantes morfológicos fueron la longitud de la espina terminal y el número de espinas laterales, los cuales representaron el 94 % de la variación morfológica total. Por su parte Rincón *et al.* (2010) estudiaron la variación morfológica de agaves utilizados para la elaboración de mezcal (*A. angustifolia* Haw²) en las variedades Espadín y Cimarrón Negro. Ellos encontraron que los caracteres más importantes para diferenciar a las variedades fueron: el ancho de la penca, el número de dientes en diez centímetros, la separación mínima entre dientes y la distancia del ápice de penca sin dientes. Mora-López *et al.* (2011) evaluaron 48 atributos morfológicos en la Sección Salmianae, de los cuales, los coeficientes de variación más altos se presentaron en los caracteres: altura de la roseta, longitud de la penca, longitud de los dientes, diámetro de la roseta, grosor de la cutícula, número de dientes y distancia entre dientes.

Avedaño-Azarrate, Iracheta-Donjuan, Gódinez-Aguilar, López-Gómez, & Barrios-Ayala (2015) hicieron una caracterización morfológica del agave papalote (*A. cupreata* Trel. & Berger) en el estado de Guerrero. De los 91 caracteres evaluados: altura de la roseta, diámetro de la roseta, diámetro del tallo, altura del cogollo, longitud del tallo y tamaño de la penca explicaron el 23.2 % de la variación total.

² Esta especie pasó a ser un sinónimo de *Agave vivipara* de acuerdo con The Plant List (2013).

2.5 Diversidad genética en agaves

Las especies de *Agave* en Mesoamérica fueron seleccionadas por el hombre y dieron lugar a nuevas combinaciones genéticas que pudieron lograrse con base en la experiencia al elegir las por sus ventajas en la producción y calidad de fibra, alimento, bebida y otros productos especiales. *Agave* y civilización se especializaron a la par, al seleccionar caracteres acordes a sus necesidades. Aunque no se conocía de genética, se fomentó en gran medida la diversificación del agave (Gentry, 1982)

Un estudio de variabilidad genética en *Agave victoriae reginae* T. Moore, especie diploide que se reproduce por semilla, Martínez-Palacios, Eguiarte, & Furnier, (1999) con isoenzimas, encontraron un promedio de polimorfismo del 83 % dentro de cada población, mientras que entre poblaciones el nivel de polimorfismo fue más alto.

La variabilidad genética encontrada en tres poblaciones de *A. angustifolia*, con marcadores moleculares tipo AFLP, fue del 82.8 % (Barraza-Morales, Sánchez-Teyer, Robert, Esqueda, & Gardea, 2006).

Dávila, Castillo, & Lauretín (2007) evaluaron la utilidad de los marcadores ISSR en el establecimiento de relaciones genéticas entre *Agave cocui* Trel., *A. angustifolia* y *A. tequilana* Weber var. Azul y exploraron la variabilidad genética existente entre los individuos de estas especies, encontraron que los marcadores moleculares tipo ISSR fueron de gran utilidad para determinar variaciones genéticas intra e inter-poblacionales en estas especies de *Agave*, obtuvieron un polimorfismo entre poblaciones del 56 % y dentro de poblaciones del 43.82 %.

Un estudio de diversidad genética de Alfaro *et al.* (2007) con marcadores tipo RAPD en seis poblaciones de maguey pulquero: Manso (*Agave salmiana* var. *salmiana*), Ayoteco (*A. salmiana* var. *Ayoteco*), Verde, Carrizo (*Agave mapisaga*), Negro y Xilometl del Nororiente del Estado de México, encontraron un total de 73.2 % de loci polimórficos entre poblaciones, mientras que dentro de las poblaciones hubo reducida variabilidad genética.

Gil-Vega, González-Chavira, Martínez de la Vega, Simpson, & Vandemark (2001), con el uso de marcadores moleculares tipo RAPD, encontraron una diversidad genética casi nula dentro de una población de *A. tequilana* cultivada en el estado de Jalisco. Este es el resultado esperado cuando se usan plantas propagadas asexualmente (Valenzuela-Zapata, 1994). Sin embargo, algunos estudios sugieren que existen diferencias genéticas entre hijuelos obtenidos asexualmente y la planta madre. Escobar (2009), mediante marcadores AFLP encontró polimorfismo del 42 % entre hijuelos obtenidos a partir de rizomas y del 40 % entre bulbillos, todos ellos procedentes de la misma planta madre.

Los patrones AFLP de dos plantas madre de henequén (*A. fourcroydes* Lem) y sus respectivos hijuelos, sugieren la existencia de variabilidad genética en la multiplicación vegetativa, mientras que el polimorfismo entre hijuelos de rizoma procedentes de distintas poblaciones fue del 83 %, el polimorfismo entre hijuelos procedentes de la misma planta fue de 20.67 % (Infante, González, Peraza-Echevarría, & Keb-Llanes, 2003)

2.6 Causas de variación genética en agaves

Los agaves se reproducen de manera sexual y se multiplican por la vía asexual. La reproducción sexual se logra mediante la polinización que efectúan algunos animales, principalmente murciélagos nectarívoros y, en menor grado, insectos y aves. La mayoría de los agaves se propaga de manera asexual, produciendo hijuelos que se desarrollan en la base de la planta, o mediante rizomas que emergen a alguna distancia de la planta madre, producen raíces y, con el tiempo, crecen de manera independiente. Los hijuelos intrafoliares se originan entre las hojas de la roseta y se desarrollan cuando se desprenden de la planta madre o ésta muere. Los bulbillos, en cambio, se originan en la inflorescencia junto a las flores (García-Mendoza, 2007).

El número cromosómico básico (x) y el haploide (n), en agaves suman 30 ($2n = 60$), por lo que se consideran organismos paleopoliploides, esto es, que a partir de estos números cromosómicos se pueden desarrollar poliploides

secundarios o neopoliploides, es decir, especies con números gaméticos que son múltiplos del número básico actual ($x=30$). Los agaves tienen cariotipos bimodales altamente asimétricos (5 cromosomas largos y 25 cortos), característica que podría estar asociada con una gran especialización morfológica y ecológica. *A. salmiana*, es una especie hexaploide ($2n=6x=180$), los poliploides en *Agave* pueden formarse por medio de gametos no reducidos y tienen ventajas sobre sus parientes diploides, ya que originan nuevos fenotipos con una mayor capacidad de adaptación y respuesta a ambientes extremos, lo que puede contribuir al éxito de los poliploides en la naturaleza o en su selección y uso en la agricultura (García-Mendoza, 2007).

Los retrotransposones son elementos móviles del genoma, los cuales al moverse dentro del mismo causan variabilidad genética. Durante su transposición, que es replicativa, estos elementos crean secuencias nuevas en el genoma, lo cual puede generar variabilidad morfológica, ya que si la inserción ocurre dentro de un gen activo éste puede perder la actividad y en caso de que ocurra dentro de algún gen inactivo, éste podría expresarse (Lightbourn & Veilleux, 2003). Bousios, Saldana-Oyarzabal, Valenzuela-Zapata, Wood, & Pearce (2007) sugieren que el retrotransposón *Teq1* ha estado activo a través de la evolución del género *Agave* proveniente de un antecesor común; de igual forma indican que bajo cierto nivel de estrés, la planta de agave induce la activación de retrotransposones que se encuentran distribuidos en todos los tejidos, generan mutaciones y causan cambios fenotípicos.

2.7 Descripción de *A. salmiana* var. *salmiana*.

La especie se caracteriza por presentar plantas de tamaño mediano a grande, con tallos cortos y gruesos, muy cercados, forman rosetas de 1.5-2 m; hojas de 100-200 x 20-35 cm, amplias lanceoladas, lineales, acuminadas, gruesas y carnosas, de color verde a glauco grisáceo, convexas profundas por debajo en la base, cóncavas a gutificadas hacia arriba, el ápice sigmoidal curvado; dientes más grandes a lo largo de la mitad de la lámina, en su mayoría 5-10 mm de largo, a 3-5 cm de distancia, de color marrón a café grisáceo, las cúspides hacia flexión

o curva, la base es ancha; espina terminal larga, robusta, subular, de 5-10 cm de largo, café oscuro, surcada arriba por más de la mitad de su longitud, largo decurrente, a veces a la mitad de la penca como un margen córneo pesado; inflorescencia fuerte, el pedúnculo estrecho imbricado con grandes brácteas carnosas, 7-8 mm de altura; panícula amplia, con 15-20 umbelas grandes descompuestas en la mitad superior del eje; flores de 80-110 mm de largo, gruesas, carnosas, amarillas sobre el ovario verde; ovario de 50-60 mm de largo, grueso, cilíndrico, con el cuello no restringido; tubo con forma de embudo grande, 21-24 mm de profundidad, 20 mm de ancho, pared gruesa entre surcos profundos; tépalos desiguales, lanceolados, enrollados hacia adentro con antesis, los externos de 21-25 x 6 mm y abultados en la base, estrechos en la parte superior, con margen involuto delgado, gáleas abruptas, las internas 2-3 mm más cortas, con quilla ancha; filamentos de 55-70 mm de largo, insertados justo por encima del medio del tubo, los de los tépalos externos frecuentes 1-3 mm más largos que otros; anteras de 30-35 mm de largo, amarillas, excéntricas; pistilos que alcanzan los estambres en la post-antesis; cápsula 5.5-7 x 2-2.2 cm, estipitada, picuda, leñosa, marrón, semilla 8-9 x 6-7 mm, negra. lacrimiforme, muesca hiliar superficial, apical (Gentry, 1982)

2.8 Caracterización de recursos fitogenéticos

El Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS, 2015) define a los recursos fitogenéticos como el material genético de origen vegetal que tiene un valor real o potencial destinado a la alimentación y la agricultura; estos recursos han sido conservados y desarrollados por los agricultores de forma tradicional y son la base para generar nuevas tecnologías y variedades.

El SNICS ha emprendido acciones para proteger los recursos y sus productos derivados (Laguna, Guadarrama-Guadarrama, Arenas-Julio, & Delgado, 2006). La Organización Mundial de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 1996) ha concientizado a las instituciones, a partir de 1960, sobre la necesidad de preservar los recursos genéticos a fin de aliviar la cada vez más grave escasez de alimentos y resguardar la variabilidad de aquellas

especies cultivadas que se encuentran en peligro de erosión en los centros de origen y diversificación.

La caracterización consiste en establecer un conjunto amplio de rasgos de un ente que permitan diferenciarlo de otros entes más o menos similares y establecer sus relaciones filogenéticas entre ellos. En el caso del germoplasma vegetal, este conjunto de caracteres debe ser capaz de diferenciar a nivel de especie, variedad botánica, variedad de cultivo o cultivar, clon (González, 2016).

Núñez-Colín & Escobedo-López (2015) mencionan que caracterizar un recurso fitogenético es determinar los atributos peculiares de dicho recurso, de modo que podamos distinguirlo con claridad de cualquier otro. El objetivo principal de la caracterización es medir la variabilidad genética de una colección mediante, el uso de descriptores definidos; otros objetivos son el establecimiento de la representatividad de la colección, la investigación de la estructura genética a través de la determinación de poblaciones identificables, la identificación de duplicados dentro de una colección y la identificación de genes especiales o alelos particulares (Franco & Hidalgo, 2003). Caracterizar a los recursos fitogenéticos es importante porque es el primer paso en el mejoramiento de los cultivos y programas de conservación y protección.

2.8.1 Caracterización morfológica

La caracterización morfológica de recursos fitogenéticos es un procedimiento que mediante el uso de descriptores definidos, permite medir y conocer la variabilidad genética del genoma de una población, diferenciar con base en la taxonomía a las plantas y seleccionar los descriptores morfológicos más adecuados, confiables y discriminantes para evaluarlas (Hernández-Villareal, 2013). Algunos caracteres pueden ser muy heredables y fáciles de observar y expresarse de la misma forma en cualquier ambiente. Las características morfológicas se utilizan para estudiar la variación genética, identificar plantas y conservar los recursos genéticos (Hernández-Villareal, 2013).

La descripción varietal es un conjunto de observaciones que permiten distinguir y caracterizar a una población de plantas que constituyen una variedad (Laguna *et al.*, 2006). Un descriptor es una característica o atributo cuya expresión es fácil de medir, registrar o evaluar y que hace referencia a la forma, estructura o comportamiento de una accesión. Los descriptores de caracterización permiten la discriminación fácil entre fenotipos. En general, son caracteres con heredabilidad alta, fáciles de detectar a simple vista y que se expresan igual en todos los ambientes (Franco & Hidalgo, 2003).

Existen distintas categorías de datos según la expresión del descriptor; éstas pueden ser cualitativas o cuantitativas. Al realizar una caracterización se espera que las características visibles de una especie sean homogéneas; sin embargo, en algunos casos éstas no se expresan con la misma intensidad. A esta diferencia en la expresión del carácter se le llama “estado del descriptor” y se registra mediante escalas de valor (Hernández-Villareal, 2013). Al realizar la caracterización se deben utilizar variables morfológicas confiables que discriminen y permitan la diferenciación entre grupos. Estas variables están ya establecidas en las llamadas “guías técnicas para la descripción varietal” expedidas por la International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV).

2.8.2 Caracterización molecular

La diversidad entre organismos es consecuencia de las diferencias en las secuencias de ADN y de los efectos ambientales. La variación genética es notable, y cada individuo de una especie, a excepción de los gemelos monocigóticos, posee una secuencia de ADN única (FAO, 2010). La caracterización de la variabilidad que no es detectable a simple vista se denomina molecular porque se refiere a la identificación de productos o funciones internas de la célula. Las técnicas para detectar esta variabilidad entran en el concepto de marcadores moleculares (Franco & Hidalgo, 2003).

Los marcadores moleculares corresponden a cualquier gen cuya expresión permite un efecto cuantificable u observable (características fenotípicas), que además puede detectarse al momento y con facilidad. Este tipo de marcadores pueden evaluarse desde que los individuos están en sus primeros estadios de desarrollo, y se pueden aplicar a todo el individuo o sólo parte de él. Se habla de marcadores genéticos cuando se transmiten según las leyes básicas de la herencia mendeliana, por lo que es importante destacar que no todos los marcadores moleculares pueden considerarse como genéticos. Existen dos tipos de marcadores moleculares: los marcadores bioquímicos (isoenzimas) y los marcadores de ADN (Solís & Andrade, 2005).

Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares son segmentos de ADN que se consideran como marcas o puntos de referencia para el análisis del genoma. Estos segmentos, por lo general, tienen variantes o sitios polimórficos que pueden ser identificados con el empleo de diferentes protocolos, y técnicas. Los marcadores moleculares o marcadores del ADN revelan sitios de variación de la secuencia de ADN. A diferencia de los marcadores morfológicos, las variaciones no se muestran por sí mismas en el fenotipo, porque pueden deberse a diferencias en un sólo nucleótido del gen o en una secuencia repetitiva del ADN. El uso de técnicas moleculares permite la estimación de la variabilidad genética dentro y entre especies para estudios poblacionales, clasificación de germoplasma y mejoramiento e identificación de genes (Rodríguez & Arencibia, 2002).

Los marcadores moleculares han revolucionado el análisis genético de plantas de cultivo donde juegan un rol central en el análisis de ligamientos, mapeos físicos, análisis de *loci* de caracteres cuantitativos (QTL, por sus siglas en inglés) y selección asistida por marcadores (Syed et al., 2005).

Inter secuencias Simples Repetidas (ISSR)

Los marcadores Inter Secuencias Simples Repetidas son un tipo de marcador molecular que permite estimar los niveles de variación entre las regiones

microsatélite que se encuentran dispersas en varios genomas, el nuclear, en particular. Estas regiones consisten en repeticiones en tándem de motivos simples como (CT)_n ó (CA)_n, ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucarionte. Las bandas que se obtienen con este marcador van de 100 a 2000 pb. La variación alélica en los ISSR consiste en la presencia o ausencia de los productos amplificados (González & Aguirre, 2007).

Los ISSR son marcadores semiarbitrarios amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de la presencia de un oligonucleótido o iniciador complementario a un microsatélite, diseñado para unirse a los motivos repetidos de di y trinucleótidos, (para evitar los mononucleótidos presentes en el cloroplasto). Los iniciadores de ISSR consisten en un motivo repetido de di- o trinucleótidos complementario a la secuencia del microsatélite. En ocasiones es posible agregar a esta secuencia un par de nucleótidos arbitrarios extras en el extremo 3' o en el 5', que jugarán el papel de “anclas” para asegurar así que la amplificación inicie siempre en el extremo 5' o en el 3' del microsatélite (Bornet & Branchard, 2001; Pradeep, Sarla, & Siddiq, 2002; Zietkiewicz, Rafalski, & Labuda, 1994). Las bandas de los ISSR son consideradas marcadores dominantes. La presencia de la banda representa el genotipo dominante (homocigoto o heterocigoto), mientras que su ausencia representa el genotipo homocigoto recesivo. Se asume que existen dos alelos por *locus* (González & Aguirre, 2007)

2.9 Literatura citada

- Alfaro-Rojas, G., Legaria-Solano, J., & Rodríguez-Pérez, J. (2007). Diversidad genética en poblaciones de Agaves pulqueros (*Agave* spp.) del Nororiente del Estado de México. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 30(1), 1–12.
- Avedaño-Azarrate, C., Iracheta-Donjuan, L., Gódinez-Aguilar, J. C., López-Gómez, P., & Barrios-Ayala, A. (2015). Caracterización morfológica de *Agave cupreata*, especie endémica de México. *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 84, 148–162.
- Barraza-Morales, A., Sánchez-Teyer, F. L., Robert, M., Esqueda, M., & Gardea, A. (2006). Variabilidad genética en *Agave angustifolia* Haw. de la Sierra Sonorense, México, determinada con marcadores AFLP. *Fitotecnica*

Mexicana, 29(1), 1–8.

- Bornet, B., & Branchard, M. (2001). Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19(3), 209–215. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF02772892>
- Bousios, A., Saldana-Oyarzabal, I., Valenzuela-Zapata, A. G., Wood, C., & Pearce, S. R. (2007). Isolation and characterization of Ty1-copia retrotransposon sequences in the blue agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) and their development as SSAP markers for phylogenetic analysis. *Plant Science*, 172(2), 291–298. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.09.002>
- Dávila, M., Castillo, M. A., & Lauretín, H. (2007). Uso de marcadores moleculares ISSR para inferir las relaciones genéticas y la variabilidad intraespecífico en *Agave*. *Revista Facultad de Agronomía*, 33, 93–111. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/274070867>
- Eguiarte, L. E., & Souza, V. (2007). Historia natural del *Agave* y sus parientes: evolución y ecología. In P. Colunga-García Marín, A. Larqué-Saavedra, L. Eguiarte, & D. Zizumbo-Villarreal (Eds.), *¡En lo Ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves* (Primera Ed, pp. 3–21). Ciudad de México.
- Escobar, G. R. E. (2009). *Estudio de la biología reproductiva y análisis molecular de la reproducción sexual y asexual de Agave tequilana Weber var. azul*. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- Food and Agriculture Organization (FAO). (1996). Informe sobre el estado de los recursos fitogenéticos en el mundo. En: Conferencia técnica internacional sobre los recursos fitogenéticos. Leipzig, Alemania. Consultado en: <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/meeting/014/aj614s.pdf>
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2010). La situación de los recursos zoogenéticos mundiales para la alimentación y la agricultura. Roma, Italia. Consultado en: <http://www.fao.org/docrep/012/a1250s/a1250s00.htm>
- Franco, T. L., & Hidalgo, R. (2003). *Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos* (No. Boletín técnico no. 8). Cali, Colombia.
- García-Mendoza, A. (2007). Los agaves de México. *Ciencias*, 87, 14–23.
- García-Moya, E., Romero-Manzanares, A., & Nobel, P. S. (2011). Highlights for *Agave* productivity. *GCB Bioenergy*, 3, 4–14. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1757-1707.2010.01078.x>
- Gentry, H. S. (1982). *Agaves of Continental North America*. Tucson, Arizona,

USA: Arizona Press.

- Gil-Vega, K., González-Chavira, M., Martínez de la Vega, O., Simpson, J., & Vandemark, G. (2001). Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. *Euphyca*, 119(3), 335–341. <https://doi.org/10.1023/A:1017553107303>
- González, A. F. (2016). *Caracterización morfológica y molecular de recursos genéticos*. León, España: Universidad de León.
- González, G. A., & Aguirre, D. X. (2007). Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs). In L. E. Eguiarte, V. Souza, & D. X. Aguirre (Eds.), *Ecología molecular* (Primera, pp. 567–571). México, D.F.: CONABIO.
- Hernández-Villareal, A. E. (2013). Caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. *Bio Ciencias*, 2(3), 113–118.
- Infante, D., González, G., Peraza-Echevarría, L., & Keb-Llanes, M. (2003). Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes*. *Plant Science*, 164(2). [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00404-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00404-1)
- Laguna, C. A., Guadarrama-Guadarrama, M. E., Arenas-Julio, Y. R., & Delgado, M. R. (2006). Aplicación de la guía de descripción varietal de dalia (*Dahlia* spp) en la caracterización de clones seleccionados. *Ciencias Agrícolas*, 4, 24–29.
- Lightbourn, G., & Veilleux, R. (2003). Retrotransposon based markers to characterize somatic hybrids and assess variation induced by protoplast fusion of monoploid potato. *Acta Horticulturae*, 619, 35–43. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.619.4>
- Macedo, E. M. (1950). *Manual del magueyero*. (E. Agrícolas, Ed.) (Primera). México.
- Martínez-Palacios, A., Eguiarte, L. E., & Furnier, G. (1999). Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert. *American Journal Botany*, 86(8), 1093–1098.
- Martínez, M. L. (2015). *Registro, certificación y manejo de vivero de maguey (Agave, salmiana Otto ex Salm Dyck subs. salmiana)*. Universidad Autónoma Chapingo.
- Massieu, Y., & Chapela, F. (2002). Acceso a recursos biológicos y biopiratería en México. *El Cotidiano*, 19(114), 72–87.
- Mora-López, J. L., Reyes-Agüero, J. A., Flores-Flores, J. L., Peña-Valdivia, C. B., & Aguirre-Rivera, J. R. (2011). Variación morfológica y humanización de la sección salmianae del género *Agave*. *Agrociencia*, 45, 465–477.
- Núñez-Colín, C. A., & Escobedo-López, D. (2015). Caracterización de germoplasma vegetal: la piedra angular en el estudio de los recursos fitogenéticos. *Acta Agrícola Y Pecuaria*, 1(1), 1–6.

- Perales, H. R., & Aguirre, J. R. (2008). Biodiversidad humanizada. In R. Dirzo, R. González, & I. March (Eds.), *Capital Natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad* (pp. 565–603). México: CONABIO.
- Pradeep, R. M., Sarla, N., & Siddiq, E. A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphyca*, 128(1), 9–17. Retrieved from <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1020691618797>
- Rincón, E. G., Rodríguez, G. B., Revuelta, A. M., Tapia, C. E., Rodríguez, D. J., Qui, Z. J., & Gutiérrez, M. A. (2010). *Caracterización morfológica de Agave angustifolia vars. Espadín (ESP) y Cimarrón Negro (CM) (Agavaceae)*. Retrieved from <https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/162/1/Benjamin13Poster.pdf>
- Rodríguez, M., & Arencibia, A. (2002). Principales tipos de marcadores del polimorfismo de los ácidos nucleicos. Técnicas analíticas. In M. T. Cornide (Ed.), *Marcadores Moleculares Nuevos Horizontes en la Genética y la Selección de las Plantas* (pp. 13–35). La Habana, Cuba: Félix Varela.
- Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS). (2014). Guía Técnica para la descripción varietal de *Agave* spp. México. Consultada en: <http://snics.sagarpa.gob.mx/dov/Documents/GUIAS/Agave.pdf>
- Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS). 2015. ¿Qué son los recursos fitogenéticos? Consultado en: <http://snics.sagarpa.gob.mx/rfaa/Paginas/recursos-fitogeneticos.aspx>
- Solís, R. L. Y., & Andrade, T. A. (2005, April). ¿Qué son los marcadores moleculares? *La Ciecía Y El Hombre*, 18(1). Retrieved from <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol18num1/articulos/moleculares/>
- Syed, N. H., Sureshsundar, S., Wilkinson, M. J., Bhau, B. S., Cavalcanti, J. J. V., & Flavell, A. J. (2005). Ty1-copia retrotransposon-based SSAP marker development in cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 110(7), 1195–1202. Retrieved from <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00122-005-1948-1>
- The Plant List (2013). Recuperado de: <http://www.theplantlist.org/>
- Valenzuela-Zapata, A. G. (1994). Los agaves tequileros. *Boletín Amaranto*, 7(3), 1–8.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics*, 20(2), 176–183. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>

3 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE CUATRO ETNOTAXA DE MAGUEY PULQUERO (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck)

3.1 RESUMEN

La interacción hombre, maguey y medio ha existido desde tiempos remotos y ha dado pie a distintas variantes de la especie *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck, mejor conocido como maguey pulquero. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la morfología de cuatro etnotaxa de maguey pulquero: Ayoteco, Chalqueño, Manso y Púa Larga del municipio de Nanacamilpa, Tlaxcala. Se evaluaron *in situ*, con base en la Guía Técnica para la Descripción Varietal de *Agave*, 30 caracteres morfológicos: ocho cuantitativos y 22 cualitativos de la planta: hojas, espinas laterales y espina terminal. Se midieron 20 plantas por etnotaxa. Los resultados obtenidos fueron comparados con un análisis multivariado y análisis de conglomerados jerárquicos. El análisis de componentes principales indicó que los primeros dos componentes principales (CP) explicaron el 62.9 % de la variación total. Las variables que más contribuyeron al CP1 fueron longitud de la hoja, altura de la roseta, relación longitud/anchura y la longitud de la espina terminal, mientras que en el CP2 el carácter más importante fue la anchura de la hoja. El análisis de conglomerados jerárquicos usando el método UPGMA agrupó correctamente a cada una de las plantas muestreadas dentro de su etnotaxa.

Palabras clave: Maguey pulquero, diversidad, morfología, descriptores SNICS.

Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: Imelda Romero Cervantes
Director de Tesis: Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF FOUR ETNOTAXA OF MAGUEY PULQUERO (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck)

3.2 ABSTRACT

The interaction of man, maguey and environment has existed since ancient times and has given rise to different variants of the species *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck, better known as maguey pulquero. The objective of this work was to characterize the morphology of four etnotaxa maguey pulquero: Ayoteco, Chalqueño, Manso and Púa Larga from the municipality of Nanacamilpa, Tlaxcala. They were evaluated in situ, based on the "Guía Técnica para la Descripción Varietal de *Agave* spp." 30 morphological characters: eight quantitative and 22 qualitative of the plant: leaves, lateral spines and terminal spine. 20 plants were measured for each etnotaxa. The results were compared with multivariate analysis and analysis of hierarchical conglomerates. The principal components analysis indicated that the first two principal components (CP) accounted for 62.9% of the total variation. The variables that contributed the most to CP1 were leaf length, rosette height, length / width ratio and length of the terminal spine, whereas in CP2 the most important character was leaf width. The analysis of hierarchical conglomerates using the UPGMA method grouped correctly each of the plants sampled within its ethnotaxa.

Keywords: Maguey pulquero, diversity, morphology, SNICS descriptors

Thesis of Master of Science in Agricultural Biotechnology. Universidad Autónoma Chapingo.

Author: Imelda Romero Cervantes

Advisor: Dr. Margarita Gisela Peña Ortega

3.3 INTRODUCCIÓN

El género *Agave* tiene una gran importancia económica y cultural; varias especies de magueyes han estado ligadas a los habitantes de Mesoamérica desde hace 10 mil años (Callen, 1967; Gentry, 1982; González, 1978). En las áreas culturales de Tula, Tulancingo y Teotihuacán existe evidencia que desde hace más de 3 mil 500 años, los magueyes se aprovechaban para obtener pulque (Parson & Parson, 1990). Debido a esta antigua e intensa relación entre los humanos y *Agave* hay variantes con importancia regional, nacional e internacional, de las cuales existe un conocimiento tradicional considerable y una variación morfológica alta (Colunga-GarcíaMarín, Estrada-Loera, & May-Pat, 1996). Un estudio sobre el grado de humanización y domesticación de la Sección *Salmiana* por Mora-López *et al.* (2011) evidencia que la intervención humana sobre los magueyes ha tenido efectos en la morfología de éstos, ya que las variedades con mayor grado de humanización y domesticación tienden a ser de mayor porte, mientras que, las estructuras de protección como las espinas laterales tienden a ser más pequeñas. Estos autores encontraron que la especie *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck mostró la variabilidad morfológica más amplia y sus variantes se localizaron en ambientes con distinto grado de humanización, desde agostaderos con aprovechamientos múltiples y áreas agrícolas.

Los estudios que se han llevado a cabo para caracterizar a los magueyes pulqueros, se encuentra el de Alfaro-Rojas *et al.* (2007), quienes evaluaron cinco caracteres morfológicos en seis poblaciones de agaves pulqueros *A. Salmiana* var. *salmiana* (Manso), *A. salmiana* var. *Ayoteco* (Ayoteco), Verde, y *A. mapisaga* Trel, Carrizo en el Nororiente del Estado de México, los principales caracteres discriminantes fueron: la longitud de la espina terminal y el número de espinas laterales. Mora-López *et al.* (2011) caracterizaron 32 variantes de la Sección *Salmiana* en las cuales se cuantificaron 48 atributos morfológicos, encontraron que los caracteres más discriminantes fueron: la altura de la roseta, longitud de la penca, diámetro de la roseta, grosor de la cutícula, número y distancia entre espinas. En el presente estudio se evaluaron 30 caracteres morfológicos en

cuatro etnotaxa de maguey pulquero, con el objetivo de caracterizar la morfología de cada etnotaxa y definir los principales atributos discriminantes.

3.4 MATERIALES Y MÉTODOS

En comparación con otros sitios productores de maguey de la región centro del país, el Rancho San Isidro, ubicado en el Municipio de Nanacamilpa de Mariano Arista, Tlaxcala, destaca por tener magueyerías de alta calidad y productividad en las cuales se llevan a cabo prácticas de cultivo uniformes, así como un control cuidadoso de las variedades de maguey que se trabajan (Madrigal-Lugo, Velázquez-Loera, García-Moya, Sánchez-Lozada, & Ramírez-González, 2014). Debido al cuidadoso establecimiento de las plantaciones de maguey pulquero que se ha llevado a cabo en el Rancho San Isidro, se eligió éste como sitio experimental para llevar a cabo la caracterización morfológica de los cuatro etnotaxa elegidos. De acuerdo a datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI, 2009) este rancho se encuentra localizado en las coordenadas 19°29'00" N y 98°32'00" O, a una elevación de 2 727 msnm, el clima de la región es Cb''b'w2(w)(i')g que corresponde a un clima templado semifrío con verano fresco largo, subhúmedo, con una temperatura media anual de 11.35 °C, enero es el mes más frío con 7.9 °C y mayo es el más cálido con 13.3 °C, por lo que se considera con poca oscilación térmica, la marcha de la temperatura es de tipo ganges. La precipitación total anual es de 753.7 mm, presenta un régimen de lluvias de verano.

3.4.1 Material experimental

El material experimental utilizado en este estudio fueron cuatro etnotaxas de maguey pulquero: Ayoteco, Chalqueño, Manso y Púa Larga, a los que se evaluaron 30 caracteres morfológicos (Cuadro 1) con base en la *Guía Técnica para la Descripción Varietal de Agave* elaborada por el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS, 2014). Se muestrearon 20 plantas por etnotaxa en el estadio de "palmilla", a excepción del Ayoteco, con sólo 10 plantas en el estadio fenológico indicado, por lo que el número total de plantas

caracterizadas fue de 70. El número de hojas por filotaxia (NHPF) se evaluó en una etapa fenológica más joven, conocida como “vara metro”.

Cuadro 1. Caracteres morfológicos evaluados *in situ* en cuatro etnotaxa de *Agave salmiana* de Nanacamilpa, Tlaxcala.

Carácter	Escala	Clave
1. Hábito de crecimiento	1=Acaulescente 2=Caulescente	HDC
2. Altura	En centímetros	ALT
3. Diámetro de la roseta	En centímetros	DDR
4. Número de pencas	Número	NDH
5. Número de pencas por filotaxia	1=2/5 2=3/8 3=4/11 4=5/14 5=6/17	NDHPF
6. Visibilidad del tallo	1=Visible 2=No visible	VIS
7. Longitud de la penca	En centímetros	LONG
8. Anchura de la penca	En centímetros	ANC
9. Relación longitud-anchura	En centímetros	RLA
10. Forma de la penca	1=Lineal 2=Espatulada 3=Deltoide 4=Lanceolada 5=Oblonga 6=Ovada 7=Otra	FOR
11. Forma del corte transversal	1=Plano 2=En forma de v 3=En forma de u 4=Cóncavo 5=Quillado 6=Obdeltado 7=Oblato 8=Hemioblato 9=Circular	FCT
12. Curvatura de la penca	1=Ausente 2=Recurvado 3=Incurvado 4=Ondulado	CUR
13. Borde de la penca	1=Liso 2=Ondulado 3=Dentado 4=Crenado	BOR
14. Textura de la penca	1=Lisa 2=Rugosa	TEX
15. Glaulescencia	1=Ausente 2=Presente	GLA
16. Color de la penca	1=Verde medio 2=Verde amarillo 3=Azul verdoso	COL
17. Intensidad del color de la penca	1=Claro 2=Medio 3=Fuerte	IDC
18. Color secundario de la penca	1=Ausente 2=Presente	CS
19. Espinas laterales	1=Ausentes 2=Presentes	EL
20. Forma de las espinas laterales	1=Recta 2=Curva 3=Ganchuda 4=Filifera	FEL
21. Perfil de la espina lateral	1=Monofurcada 2=Bifurcada 3=Trifurcada 4=Polifurcada	PEL
22. Color de las espinas laterales	1=Blanco 2=Rojo amarronado 3=Marrón medio 4=Negro	CEL
23. Uniformidad en el tamaño de las espinas laterales	1=Homogénea 2=Heterogénea	UTEL
24. Número de espinas laterales	1=Pocas 2=Medias 3=Muchas	NEL
25. Distancia entre espinas laterales	En centímetros	DEL
26. Estrías en espinas laterales	1=Ausente 2=Presente	EEL
27. Forma de la espina terminal	1=Recta 2=Curvada 3=Filiforme 4=Polifurcada 5=Curvada al final	FET
28. Longitud de la espina terminal	En centímetros	LET
29. Ciclo de inicio a floración	1=Precoz 2=Intermedio 3=Tardío	CIF
30. Prolificidad de hijuelos	1=Ausente 2=Baja 3=Media 4=Alta	PH

3.4.2 Análisis estadístico

El análisis estadístico de las mediciones obtenidas requirió el agrupamiento de los caracteres en cuantitativos: ALT, DDR, NDH, LONG, ANC, RLA, DEL y LET y cualitativos: HDC, NHPF, VIS, FOR, FCT, CUR, BOR, TEX, GLA, COL, IDC, CS, EL, FEL, PEL, CEL, UTEL, NEL, EEL, FET, CIF y PH.

El análisis multivariado de componentes principales se realizó a partir de una matriz de correlación. Para la selección de las variables morfológicas más importantes se estimaron los valores (eigenvalores) y vectores (eigenvectores) propios. Los componentes principales así obtenidos se graficaron en un plano cartesiano para observar la ordenación de las accesiones caracterizadas. El análisis de conglomerados jerárquicos se llevó a cabo con el uso de la matriz de correlación y el método de agrupamiento UPGMA, a partir del cual se generó un dendograma que permitió distinguir los grupos conformados. Para confirmar la robustez del dendograma obtenido se calculó el coeficiente de correlación cofenético. Todos estos análisis fueron realizados con el programa NTSYSpc ver. 2.20N.

3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5.1. Estadística descriptiva

El Cuadro 2 presenta la estadística descriptiva de la etnotaxa Manso, tanto para caracteres cuantitativos como cualitativos. En él se puede apreciar, que en general, el etnotaxa Manso se distingue por tener una altura promedio de 2.5 m, por lo que son consideradas plantas de tamaño medio; la longitud y ancho de las hojas es en promedio de 209.6 y 32.4 cm, lo que da como resultado una relación longitud/anchura de 5.6 cm; la longitud de la espina terminal tiene un tamaño medio de 6.9 cm; son plantas con hojas de color verde medio claro; el espaciamiento entre espinas es considerado medio; la prolificidad de hijuelos es baja y presenta un ciclo de inicio a floración intermedio, cabe señalar que el inicio de la floración indica también que un maguey está listo para ser aprovechado para la producción de aguamiel, en el caso del maguey Manso, Madrigal-Lugo et

al. (2014), mencionan que el inicio de este ciclo se da entre los nueve y diez años de edad en el maguey Manso.

Cuadro 2. Estadística descriptiva de la etnotaxa de maguey Manso evaluada en Nanacamilpa, Tlaxcala.

	CARACTERES CUANTITATIVOS					CARACTERES CUALITATIVOS		
	PROM	VAR	DESV.STD	MÁX	MÍN		MODA	DESCRIPCIÓN
ALT	250.0	195.6	14.0	280.0	230.0	HDC	1	Acaulescente
DDR	314.2	745.0	27.3	380.0	257.0	VIS	2	No visible
NDH	41.1	25.6	5.1	51.0	31.0	FOR	7	Otra
LONG	209.6	540.4	23.2	255.3	172.3	FCT	8	Hemioblato
ANC	37.4	8.4	2.9	42.0	32.3	CUR	4	Ondulado
RLA	5.6	0.5	0.7	7.2	4.6	BOR	4	Crenado
DEL	5.5	1.3	1.1	8.8	3.4	TEX	1	Lisa
LET	6.9	0.6	0.8	9.1	5.9	GLA	1	Ausente
						COL	1	Verde medio
						IDC	1	Claro
						CS	1	Ausente
						EL	2	Presentes
						FEL	3	Ganchuda
						PEL	1	Monofurcada
						CEL	4	Negro
						UTEL	2	Heterogénea
						NEL	2	Medias
						EEL	1	Ausente
						FET	1	Recta
						PH	2	Baja
						CIF	2	Intermedio
						NHPF	2	3/8

El etnotaxa Púa Larga se distinguió por tener una altura promedio de 2.53 m, considerada al igual que Manso de tamaño medio; la longitud y ancho de las hojas es en promedio de 203.8 y 41.9 cm, lo cual da como resultado una relación longitud/anchura de 4.9 cm; la longitud media de la espina terminal es de 7.6 cm; son plantas con pencas de tipo lanceolado, de color verde medio; el espaciamiento entre espinas es considerado medio; la prolificidad de hijuelos es media y presenta un ciclo de inicio a floración intermedio (Cuadro 3). Madrigal-Lugo *et al.* (2014) indican que en el etnotaxa Púa Larga el ciclo de inicio de producción de aguamiel va de los nueve a los diez años.

Cuadro 3. Estadística descriptiva de la etnotaxa de maguey Púa Larga evaluada en Nanacamilpa, Tlaxcala.

	CARACTERES CUANTITATIVOS					CARACTERES CUALITATIVOS		
	PROM	VAR	DESV.STD	MÁX	MÍN	MODA	DESCRIPCIÓN	
ALT	253.3	213.7	14.6	300.0	230.0	HDC	1	Acaulescente
DDR	321.3	812.5	28.5	380.0	272.0	VIS	2	No visible
NDH	47.1	19.8	4.5	54.0	40.0	FOR	4	Lanceolada
LONG	203.8	180.9	13.4	234.3	175.0	FCT	8	Hemioblato
ANC	41.9	10.1	3.2	47.0	36.5	CUR	4	Ondulado
RLA	4.9	0.2	0.4	5.8	3.9	BOR	4	Crenado
DEL	5.1	0.7	0.8	6.5	3.1	TEX	1	Lisa
LET	7.6	1.2	1.1	9.5	5.8	GLA	1	Ausente
						COL	1	Verde medio
						IDC	2	Medio
						CS	1	Ausente
						EL	2	Presentes
						FEL	3	Ganchuda
						PEL	1	Monofurcada
						CEL	4	Negro
						UTEL	2	Heterogénea
						NEL	2	Medias
						EEL	1	Ausente
						FET	5	Curvada al final
						PH	3	Media
						CIF	2	Intermedio
						NHPF	2	3/8

El Cuadro 4 muestra la estadística descriptiva correspondiente al etnotaxa Ayoteco, el cual presentó plantas de porte alto con una altura promedio de 3.80 m; la longitud y ancho de las pencas es en promedio de 259.2 y 38.4 cm y da como resultado una relación longitud/anchura de 6.8 cm; la longitud de la espina terminal tiene un tamaño medio de 4.2 cm; son plantas de color verde amarillo de intensidad clara; el espaciamiento entre espinas es considerado medio; la prolificidad de hijuelos es alta y presenta un ciclo de inicio a floración tardío, Madrigal-Lugo *et al.* (2014) señalan que este ciclo puede durar entre 12 y 14 años.

Cuadro 4. Estadística descriptiva de la etnotaxa de agave Ayoteco evaluada en Nanacamilpa, Tlaxcala.

	CARACTERES CUANTITATIVOS					CARACTERES CUALITATIVOS		
	PROM	VAR	DESV.STD	MÁX	MÍN	MODA	DESCRIPCIÓN	
ALT	380.1	742.3	27.2	430.0	340.0	HDC	1	Acaulescente
DDR	355.3	2303.3	48.0	450.0	310.0	VIS	2	No visible
NDH	47.0	2.9	1.7	49.0	45.0	FOR	7	Otra
LONG	259.2	235.2	15.3	286.7	237.3	FCT	8	Hemioblato
ANC	38.4	6.0	2.5	41.7	34.4	CUR	4	Ondulada
RLA	6.8	0.4	0.6	7.6	5.8	BOR	4	Crenado
DEL	3.8	0.5	0.7	4.5	2.4	TEX	1	Lisa
LET	4.2	0.9	1.0	6.3	3.2	GLA	1	Ausente
						COL		
							2	Verde amarillo
						IDC	1	Claro
						CS	1	Ausente
						EL	2	Presentes
						FEL	3	Ganchuda
						PEL	1	Monofurcada
						CEL	4	Negro
						UTEL	2	Heterogénea
						NEL	2	Medias
						EEL	1	Ausente
						FET	1	Recta
						PH	4	Alta
						CIF	3	Tardío
						NHPF	3	3/8

El Cuadro 5 muestra la estadística descriptiva de Chalqueño. Los magueyes de este etnotaxa presentaron una altura promedio de 3.55 m, lo cual indica que en general son plantas de porte alto; la longitud y ancho de las hojas es en promedio 261.3.2 y 39.4 cm, que resulta en una relación longitud/anchura de 6.7 cm; la longitud de la espina terminal en promedio mide 5.3 cm; son plantas de color verde medio, de intensidad clara; el espaciamiento entre espinas es considerado medio; la prolificidad de hijuelos es media y presenta un ciclo de inicio a floración tardío, el cual puede comenzar entre los 12 y 14 años de edad (Madrigal-Lugo et al., 2014).

Cuadro 5. Estadística descriptiva de la etnotaxa de agave Chalqueño evaluada en Nanacamilpa, Tlaxcala.

	CARACTERES CUANTITATIVOS					CARACTERES CUALITATIVOS		
	PROM	VAR	DESV.STD	MÁX	MÍN	MODA	DESCRIPCIÓN	
ALT	355.6	585.8	24.2	386.0	315.0	HDC	1	Acaulescente
DDR	350.1	1156.8	34.0	403.0	290.0	VIS	2	No visible
NDH	50.7	25.2	5.0	59.0	42.0	FOR	7	Otra
LONG	261.3	650.5	25.5	295.3	190.0	FCT	8	Hemioblato
ANC	39.4	7.1	2.7	44.3	36.0	CUR	4	Ondulada
RLA	6.7	0.7	0.8	8.0	4.3	BOR	4	Crenado
DEL	6.1	1.9	1.4	8.6	4.3	TEX	1	Lisa
LET	5.3	1.4	1.2	8.5	3.6	GLA	1	Ausente
						COL	1	Verde medio
						IDC	1	Claro
						CS	1	Ausente
						EL	2	Presentes
						FEL	3	Ganchuda
						PEL	1	Monofurcada
						CEL	4	Negro
						UTEL	2	Heterogénea
						NEL	2	Medias
						EEL	1	Ausentes
						FET	1	Recta
						PH	3	Media
						CIF	3	Tardío
						NHPF	2	3/8

Los magueyes Manso y Púa Larga tienden a ser de porte bajo y pencas con menor longitud en comparación con Chalqueño y Ayoteco, lo cual corrobora lo enunciado por Mora-López *et al.* (2011), quienes mencionan que Ayoteco y Chalqueño presentan rosetas grandes, lo cual se relaciona con un mayor grado de humanización. Las pencas más anchas las tiene Púa Larga, lo cual puede explicar el hecho de que la forma de la penca sea diferente a los demás etnotaxas; como su nombre lo indica, Púa Larga presentó la espina terminal con mayor longitud, seguido de Manso, Ayoteco y Chalqueño con espinas terminales de menor longitud en comparación a los dos primeros.

Las pencas de Manso, Chalqueño y Púa Larga, en general, son de color verde medio. Sin embargo, Púa Larga tiende a ser un poco más oscuro. Ayoteco se

diferenció de los demás por presentar pencas verde-amarillo con intensidad de color claro. Asimismo, Ayoteco produce más hijuelos, seguido de Chalqueño y Púa Larga; mientras que Manso presentó una baja producción de hijuelos. Debido al tamaño de las rosetas, Ayoteco y Chalqueño al presentar plantas más grandes, tienen un ciclo de inicio a floración tardío, el cual puede darse entre los doce y catorce años; mientras que Manso y Púa Larga son de ciclo intermedio, es decir que pueden ser aprovechados entre los nueve y diez años (Madrigal-Lugo *et al.*, 2014).

Los resultados obtenidos en cuanto al tamaño de la roseta, longitud y ancho de la penca muestran rosetas mayores a los 2.5 m de altura y pencas con longitud mayor a los 2 m y anchura mayor a los 35 cm; lo anterior difiere a lo señalado por (Gentry, 1982), quien menciona que *A. salmiana* var. *salmiana* presenta rosetas de 1.5-2 m y pencas de 100-200 x 20-35 cm. Estas discrepancias pueden deberse a la etapa fenológica y el ambiente en el que se hicieron las evaluaciones.

Diecisiete de los 30 caracteres medidos fueron invariables para los etnotaxa estudiados. Sin embargo, las observaciones hechas durante la fase de campo, evidenciaron que existen caracteres notables que permiten diferenciar a los cuatro etnotaxa. Sin embargo, dichos caracteres no son mencionados en la Guía Técnica para la descripción varietal de *Agave* spp., por lo cual no fueron considerados en el presente estudio. No obstante, sería recomendable su inclusión cuando se desea caracterizar etnotaxas de *A. salmiana*. En la Figura 1 puede apreciarse que la disposición de las pencas expuestas con respecto al cogollo o meyolote es una característica importante de diferenciación, de igual manera el ángulo en el que abren las pencas, su acomodo en el tallo y el grado de curvatura de las mismas, estas variables cumplen con las características mencionadas por Franco & Hidalgo (2003), quienes mencionan que un descriptor debe ser una característica fácil de medir, registrar o evaluar.

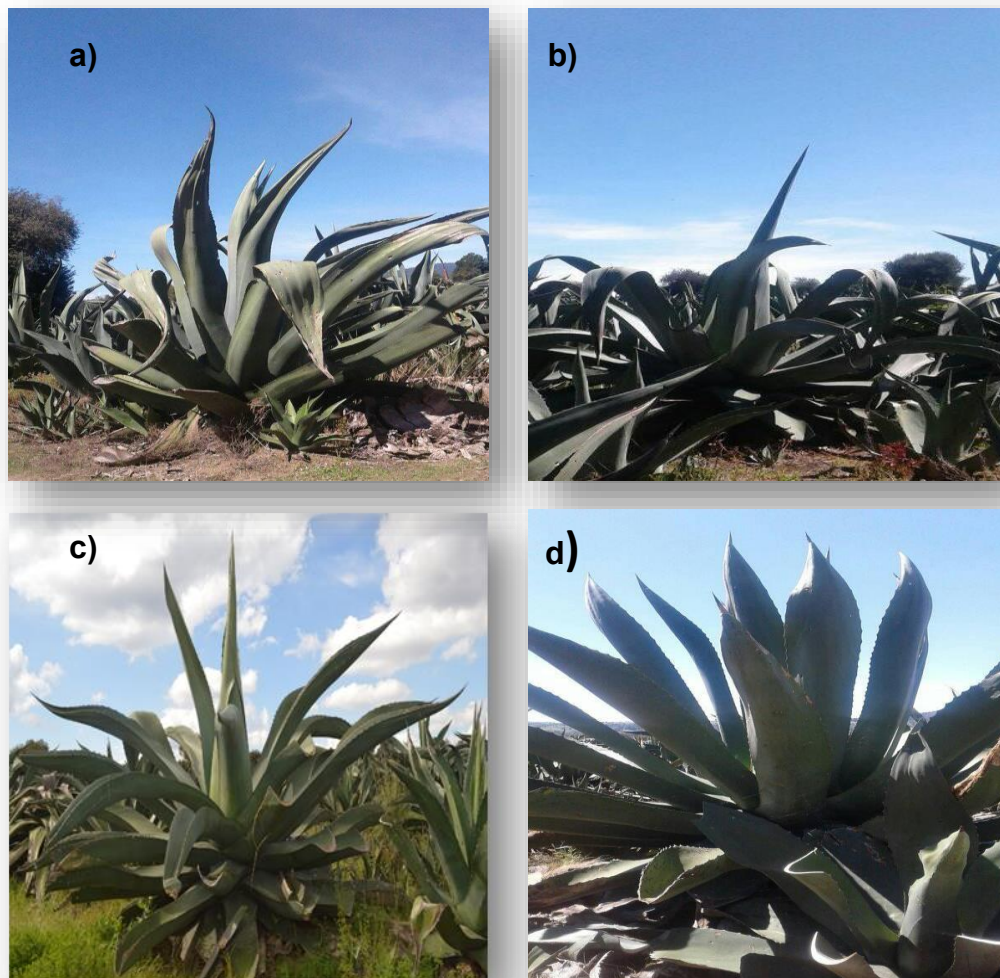


Figura 1. Variación morfológica de cuatro etnotaxa de *A. salmiana*.

a) Ayoteco, b) Chalqueño, c) Manso, d) Púa Larga

3.5.2. Análisis de Componentes Principales

El análisis de componentes principales con base en las 30 variables morfológicas evaluadas en las cuatro etnotaxas de *Agave* indicó que los primeros dos componentes principales (CP) explicaron el 62.9 % de la variación total (Cuadro 6). Las variables que más contribuyeron en cada uno de los componentes principales fueron en el CP1: longitud de la hoja (LONG), altura de la roseta (ALT), relación longitud/anchura (RLA) y la longitud de la espina terminal (LET) y en el CP2 el carácter más importante fue la anchura de la hoja (ANC) (Cuadro 7).

Alfaro-Rojas *et al.* (2007) mencionan a la longitud de la espina terminal como un carácter diferencial importante. Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los de Mora-López *et al.* (2011) al indicar que la longitud de la hoja es un carácter significativo. A diferencia de ambos autores, quienes afirman que los caracteres asociados a las espinas laterales son caracteres importantes, en el presente trabajo éstos no fueron útiles para diferenciar a los cuatro etnotaxa, esta discrepancia puede deberse a que tanto Alfaro-Rojas *et al.* (2007) como Mora-López *et al.* (2011) incluyeron en sus estudios además de *A. salmiana* a otras especies de maguey pulquero.

Cuadro 6. Valores propios y proporción de la varianza total explicada por cada uno de los componentes principales con base en 30 caracteres morfológicos de *A. salmiana*

CP	Eigenvalor	Porcentaje	Acumulado
1	3.73416870	46.6771	46.6771
2	1.298937582	16.2297	62.9068
3	1.01583304	12.6979	75.6047
4	0.84263341	10.5329	86.1376
5	0.60351195	7.5439	93.6815
6	0.31589479	3.9487	97.6302
7	0.18637409	2.3297	99.9599
8	0.00320820	0.0401	100.00

Cuadro 7. Vectores propios entre variables morfológicas en cuatro etnotaxa de *A. salmiana*.

Variable	CP1	CP2	CP3
ALT	0.8900	0.1801	0.0147
DDR	0.5637	0.3573	-0.0233
NDH	0.5105	0.5352	0.0387
LONG	0.9080	-0.0480	-0.1381
ANCH	-0.2536	0.8018	-0.2489
RLA	0.8846	-0.4132	0.0046
DEL	-0.0279	-0.1867	-0.9656
LET	-0.8317	0.0333	0.0140

En la Figura 2 se observa la distribución en los ejes cartesianos de las Unidades Básicas de Caracterización (UBC) de acuerdo a los CP1 y CP2. Debido a que el CP1 está relacionado con la longitud de la penca, altura de la planta, relación longitud y anchura de la penca y la longitud de la espina terminal, los etnotaxa

Ayoteco y Chalqueño presentaron mayor LONG, ALT y RLA, mientras que Manso y Púa Larga mostraron una mayor longitud de la espina terminal

3.5.3. Análisis de agrupamiento

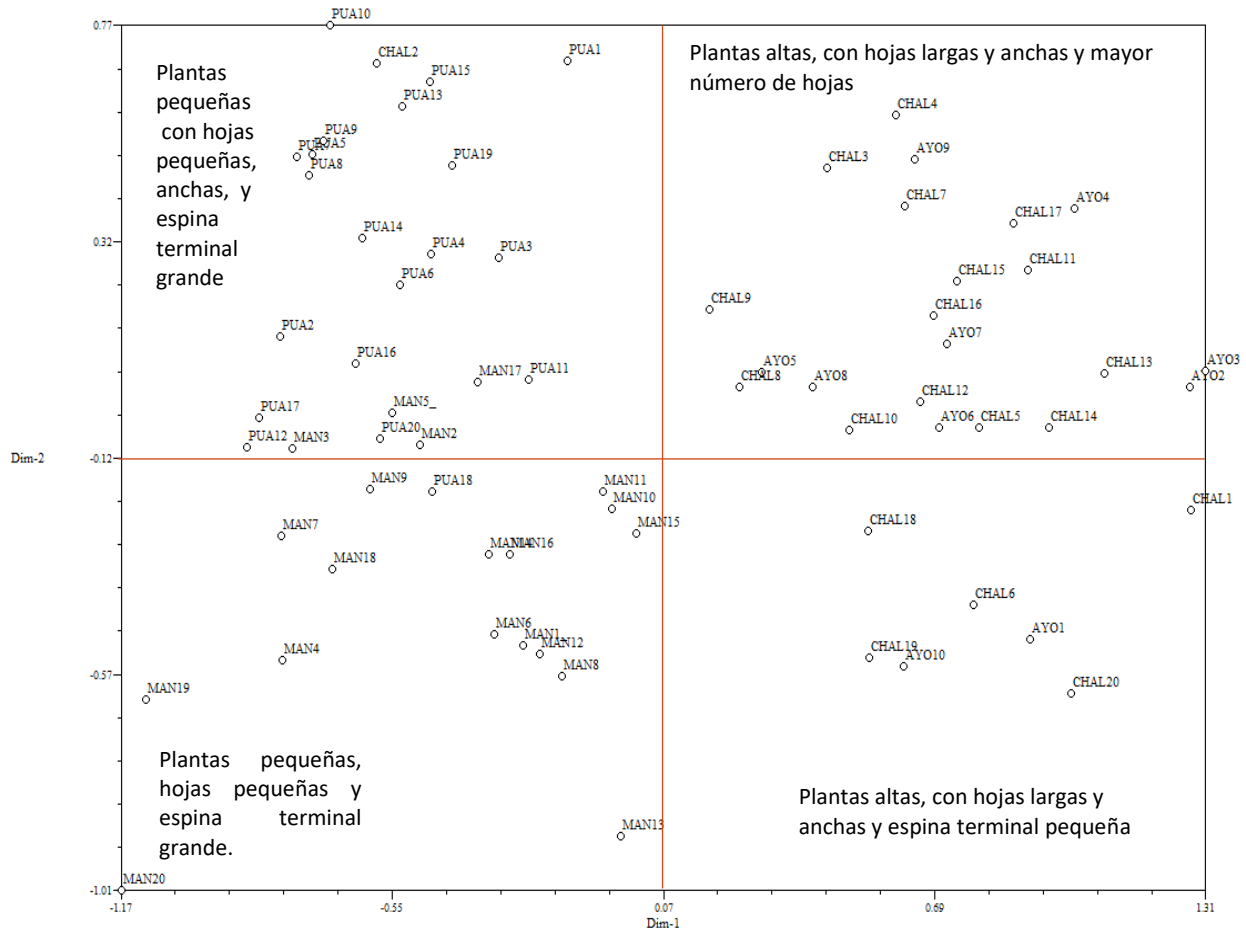


Figura 2. Distribución de las unidades básicas de caracterización en el plano cartesiano de acuerdo a los componentes principales 1 y 2.

Los resultados obtenidos en la caracterización morfológica se utilizaron para calcular la matriz de distancia taxonómica entre pares de individuos y después se aplicó el método de agrupamiento por pares con la media no ponderada UPGMA (por sus siglas en inglés Unweighted Pair Group Method) y se obtuvo un dendrograma.

A fin de corroborar la robustez del agrupamiento obtenido se procedió a estimar la matriz de valores cofenéticos y al final se llevó a cabo una prueba de Mantel

para medir la bondad de ajuste respecto a la matriz de distancias original. Estos análisis fueron hechos con los módulos SAHN, TREE, COPH y MXCOMP del programa Ntsys Ver. 2.20.

La Figura 3 muestra que a una distancia de 1.3 se formaron cuatro grupos, los cuales estuvieron en concordancia con los cuatro etnotaxa caracterizados. Así, el grupo I estuvo conformado por los 20 ejemplares muestreados de Chalqueño, mientras que el único ejemplar mal clasificado fue Man 19. El grupo II estuvo conformado por los 10 ejemplares de Ayoteco, el grupo III por los ejemplares de Púa Larga y finalmente el grupo IV por 19 de los 20 ejemplares muestreados de maguey Manso. El coeficiente de correlación cofenética obtenido fue de 0.94, lo cual es indicador de la robustez del dendrograma obtenido.

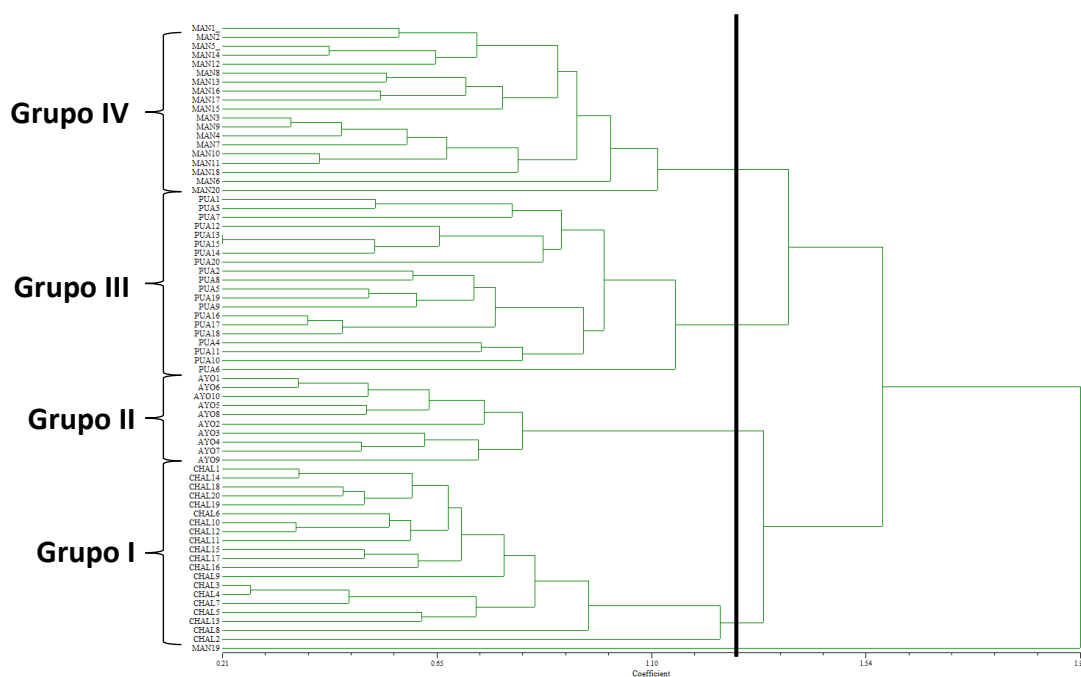


Figura 3. Dendrograma jerárquico de 70 ejemplares de maguey pulquero del estado de Tlaxcala obtenido mediante la distancia taxonómica y el método de agrupamiento UPGMA.

3.6. CONCLUSIONES

La caracterización morfológica *in situ* de *Agave salmiana* permitió detectar la variación morfológica presente en los etnotaxa evaluados de esta especie. Las

variables cuantitativas que mejor describieron dicha variación fueron: longitud y anchura de la hoja, altura de la roseta, relación longitud/anchura de la hoja y longitud de la espina terminal, por lo que se propone utilizar estos descriptores varietales para diferenciar plantas de maguey pulquero. Las observaciones de campo realizadas en el presente trabajo sugieren que caracteres como la disposición de las pencas expuestas con respecto al cogollo o meyolote, el ángulo de despliegue de las pencas, su acomodo en el tallo y el grado de curvatura de las mismas son caracteres importantes para diferenciar etnotaxas de *A. salmiana* que no se han incluido en la guía técnica del SNICS propuesta para *Agave*.

La caracterización morfológica realizada en el presente estudio permitirá contribuir a la protección legal de variedades o cultivares de uso común de este tipo de agave endémico de México, y con ello a promover su conservación y aprovechamiento sostenible.

3.7. LITERATURA CITADA

- Alfaro-Rojas, G., Legaria-Solano, J., & Rodríguez-Pérez, J. (2007). Diversidad genética en poblaciones de Agaves pulqueros (*Agave* spp.) del Nororiente del Estado de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(1), 1–12.
- Callen, E. O. (1967). Analysis of the Tehuacan Coprolites. In D. S. Byers (Ed.), *The Prehistory of the Tehuacan Valley, Vol. 1: Environment and Subsistence* (pp. 261–289). Austin, Texas: University of Texas Press.
- Colunga-GarcíaMarín, P., Estrada-Loera, E., & May-Pat, F. (1996). Patterns of morphological variation, diversity, and domestication of wild and cultivated populations of *Agave* in Yucatan, Mexico. *American Journal of Botany*, 83, 1069–1082.
- Franco, T. L., & Hidalgo, R. (2003). *Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos* (No. Boletín técnico no. 8). Cali, Colombia.
- Gentry, H. S. (1982). *Agaves of Continental North America*. Tucson, Arizona, USA: Arizona Press.
- González, Q. L. (1978). Origen de la domesticación de los vegetales en México. In L. J. Lorenzo (Ed.), *Historia de México. Tomo 1. Medio ambiente y primeras etapas* (pp. 77–92). México, D.F.: Salvat.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. 9 p. Consultado en:

http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/29/29021.pdf.

- Madrigal-Lugo, R., Velázquez-Loera, A., García-Moya, E., Sánchez-Lozada, O., & Ramírez-González, X. (2014). *El Maguey, cultivo y cultura en la región centro del país; primera etapa*. México.
- Mora-López, J. L., Reyes-Agüero, J. A., Flores-Flores, J. L., Peña-Valdivia, C. B., & Aguirre-Rivera, J. R. (2011). Variación morfológica y humanización de la sección salmianae del género Agave. *Agrociencia*, 45, 465–477.
- Parson, J. R., & Parson, M. H. (1990). *Maguey utilization in highland Central Mexico: an archaeological ethnography*. USA: University of Michigan.
- Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS). (2014). Guía Técnica para la descripción varietal de Agave spp. México. Consultada en: <http://snics.sagarpa.gob.mx/dov/Documents/GUIAS/Agave.pdf>

4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CUATRO ETNOTAXA DE Maguey Pulquero (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck)

4.1. RESUMEN

El maguey pulquero (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck) es una especie de gran importancia ecológica, económica y cultural en varias regiones de México. Esta especie se propaga vía asexual mediante hijuelos de rizoma, por lo que se considera que los descendientes son genéticamente homogéneos. Una herramienta para conocer la variación genética de las poblaciones naturales y antropogénicas son los marcadores moleculares. El objetivo de este estudio fue caracterización molecular y la obtención de las huellas genéticas de cuatro etnotaxa de maguey pulquero: Ayoteco, Chalqueño, Manso y Púa Larga del Rancho San Isidro en Nanacamilpa, Tlaxcala. La amplificación del ADN se llevó a cabo por PCR utilizando 22 iniciadores tipo ISSR. Los resultados obtenidos mostraron variabilidad genética entre los etnotaxa del 57.64 % y dentro de los etnotaxa de 42.36 %. El análisis de conglomerados agrupó a los individuos muestreados de acuerdo a su etnotaxa. Los resultados obtenidos indican que los marcadores moleculares ISSR son adecuados para identificar variación intraespecífica dentro *A. salmiana*, la presencia de polimorfismo dentro de los etnotaxa sugiere que existen mecanismos que producen variabilidad genética en esta especie a pesar de que su principal vía de propagación sea vegetativa.

Palabras clave: etnotaxa, maguey pulquero, variabilidad genética, caracterización, marcadores moleculares, ISSR.

Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: Imelda Romero Cervantes
Director de Tesis: Dra. Margarita Gisela Peña Ortega

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF FOUR ETNOTAXA OF MAGUEY PULQUERO (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck)

4.2. ABSTRACT

The “maguey pulquero” (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck) is a species of great ecological, economic and cultural importance in several regions of Mexico. This species is propagated asexually through rhizome shoots, so it is considered that the descendants are genetically homogeneous. A tool used to detect the genetic variation of natural and anthropogenic populations are molecular markers. The objective of this study was the molecular characterization and to obtain of the genetic fingerprints of four etnotaxa from maguey pulquero: Ayoteco, Chalqueño, Manso and Púa Larga from Rancho San Isidro in Nanacamilpa, Tlaxcala. DNA amplification was carried out by PCR using 22 ISSR type primers. The results obtained showed genetic variability among the etnotaxa of 57.64 % and within the etnotaxa of 42.36 %. Cluster analysis grouped the individuals sampled according to their respective etnotaxa. The obtained results indicate that the ISSR molecular markers are adequate to identify intraspecific variation within *A. salmiana*, the presence of polymorphism within the etnotaxa suggests that there might be mechanisms that produce genetic variation in this species though when its main propagation path is vegetative.

Key words: etnotaxa, maguey pulquero, genetic variability, characterization, molecular markers, ISSR.

Thesis of Master of Science in Agricultural Biotechnology. Universidad Autónoma Chapingo.
Author: Imelda Romero Cervantes
Advisor: Dr. Margarita Gisela Peña Ortega

4.3. INTRODUCCIÓN

La caracterización e identificación tradicional de variedades se ha basado en el empleo de caracteres morfológicos y agronómicos. No obstante, el uso de marcadores morfológicos en las plantas tiene muchas limitantes, pues su expresión puede estar sujeta a factores ambientales o fenológicos (Azofeifa-Delgado, 2006).

Los marcadores moleculares son más robustos e independientes de las condiciones ambientales, en contraste con los marcadores morfológicos. Los marcadores moleculares son herramientas genéticas que permiten examinar las diferencias entre individuos en muchas posiciones espaciadas aleatoriamente en todo un genoma (Singh, Mishra, Kant, & Shashi, 2008).

Los marcadores moleculares se han consolidado como una herramienta confiable en la determinación del polimorfismo genético y los niveles de diferenciación porque utilizan las diferencias existentes en la secuencia de ADN para generar perfiles o huellas genéticas únicas para cada organismo (Arnold, Rossetto, McNally, & Henry, 2002).

Los iniciadores basados en ISSR son dinucleótidos anclados en el extremo 5' o 3' y se han utilizado en estudios de impresión de huellas genómicas con alta reproducibilidad. La huella genética es una herramienta importante para la caracterización del germoplasma y el establecimiento de identidad de variedades e híbridos dentro del fitomejoramiento y el manejo de germoplasma (Charters & Wilkinson, 2000). Los ISSR se han utilizado extensamente en estudios de diversidad genética debido a su rápida implementación y bajo costo (He, & Lu, 2003; Awasthi *et al.*, 2004; Jin, Zizumbo-Villarreal, D. Colunga-GarcíaMarín, Payró, Delgado-Valerio, & Gepts, 2005) para identificar cultivares con relaciones estrechas (Carvalho *et al.*, 2004; González, Wong, Delgado-Salinas, Papa, & Gepts, 2005), estudiar procesos evolutivos, biogeografía y aspectos relacionados con la ecología de algunas especies vegetales (Liston *et al.*, 2003; Wallace, 2003). Estos marcadores son una técnica que implica el uso de secuencias de

microsatélites como iniciadores en una reacción de cadena de polimerasa para generar marcadores multilocus. Es un método simple y rápido que combina la mayoría de las ventajas de los microsatélites (SSR) y el polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP) con la universalidad del ADN polimórfico amplificado aleatorio (RAPD) (Pradeep, Sarla, & Siddiq, 2002). Se ha demostrado la utilidad del uso de marcadores ISSR para evaluar la variabilidad genética intra e inter poblacional en las especies de: *Agave angustifolia*, *Agave cocui* y *Agave tequilana* (Dávila, Castillo, & Lauretín, 2007). Sin embargo, aún es muy amplio el campo por explorar con respecto a la variabilidad que representan los agaves. Es sorprendente su respuesta a la intervención agronómica y la plasticidad genómica que poseen y que expresan después de ser sometidos a procesos de propagación masiva y más aún si estos procesos implican mayor presión ambiental como es el caso de la micropropagación o cultivo de tejidos. Existen evidencias de la presencia de variabilidad genética entre los agaves aun cuando los procesos de propagación tanto natural como artificial sean de carácter asexual (Torres, 2009). Mientras en un estudio de variabilidad en *A. tequilana* con marcadores RAPD se concluyó que se trataba de un clon con nula variabilidad genética (Gil-Vega *et al.*, 2001). Sin embargo, cuando se emplearon marcadores AFLP se detectó la presencia de variabilidad genética dentro de la población clonal (Gil-Vega, Díaz, Nava-Cedillo, & Simpson, 2006).

Los procesos de especiación implican cambios rápidos en el genoma debido a la hibridación y a la neopoliploidía, por lo que es posible considerar que el género *Agave* se encuentra en una etapa de evolución activa, con un alto grado de afinidad entre las especies (García-Mendoza, 2007).

A. salmiana, es una especie hexaploide ($2n=6x=180$); la poliploidía en *Agave* puede originarse debido a la presencia de gametos no reducidos y proporciona ventajas sobre sus parientes diploides, ya que origina nuevos fenotipos con una mayor capacidad de adaptación y respuesta a ambientes extremos, lo que puede contribuir al éxito de los poliploides en la naturaleza o en su selección y uso en la agricultura (García-Mendoza, 2007).

Un estudio de la diversidad genética en seis poblaciones de agaves pulqueros pertenecientes a las especies *A. salmiana* var. *Salmiana* (manso), *A. salmiana* var. *Ayoteco* (ayoteco), *A. mapisaga* (verde), del Nororiente del Estado de México, en el cual se usaron marcadores tipo RAPD, se encontró que el porcentaje total de loci polimórficos fue de 73.2 %, no obstante dentro de especies varió de 12.2 % para el maguey 'Verde' hasta 32.5 % en los magueyes 'Manso' y 'Ayoteco' (Alfaro-Rojas *et al.*, 2007). Por lo que el objetivo de este estudio fue caracterizar mediante el uso de marcadores moleculares tipo ISSR cuatro etnotaxa de maguey pulquero (Ayoteco, Chalqueño, Manso y Púa Larga) del Rancho San Isidro, Nanacamilpa, Tlaxcala.

4.4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.1. Material vegetal

El presente estudio de caracterización molecular de plantas de maguey pulquero fue en el Rancho San Isidro, en el Municipio de Nanacamilpa de Mariano Arista, Tlaxcala, debido a que es un rancho modelo de producción de hijuelos bajo buenas prácticas de manejo y producción y que ha abastecido a las plantaciones de maguey pulquero con más de un millón de hijuelos. Éste se localiza en las coordenadas 19°29'00" N y 98°32'00" O a una elevación de 2 727 msnm. Se tomaron muestras de 15 plantas por cada etnotaxa (60 muestras en total), las cuales se separaron en bolsas de polipapel para ser transportadas para su refrigeración al Laboratorio de Mejoramiento Genético Asistido del Departamento de Fitotecnia en la Universidad Autónoma Chapingo.

4.4.2. Extracción y cuantificación de ADN genómico

La extracción de ADN genómico se llevó a cabo mediante el método Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB por sus siglas en inglés) (Doyle & Doyle, 1987). El material vegetal se lavó con alcohol al 70 %, se despegó y desechó la cutícula cerosa de las hojas, el resto del material se escurrió en papel secante, después se pesaron 0.3 g de pencas, esto se colocó en un mortero y se pulverizó con nitrógeno líquido, el polvo resultante se transfirió a microtubos de 1.5 mL con 700

μL de amortiguador de extracción precalentado a 65 °C. Los tubos se colocaron en el termoblock nuevamente a 65 °C durante 20 minutos, una vez transcurrido este tiempo se dejaron enfriar, se agregaron 200 μL de acetato de potasio y se pusieron a enfriar en hielo durante 30 minutos, después se centrifugaron a 21 mil xg durante 20 minutos. El sobrenadante se transfirió a microtubos de 1.5 mL y se agregó un volumen de cloroformo: alcohol-isoamílico (24:1) y se agitó durante 2 minutos. A continuación, se centrifugó a 12 mil xg durante 10 minutos, se separó la fase acuosa (superior) y se colocó en otro microtubo, se agregaron 500 μL de isopropanol frio, se agitó por inversión suave hasta obtener el precipitado correspondiente a los ácidos nucleicos. Éste se colocó a -20 °C durante 30 minutos, se centrifugó a 8 mil xg por cinco minutos, se decantó el sobrenadante y con cuidado se escurrió sobre una toalla sanitaria. Se adicionaron 700 μL de STE y se dejó reposar toda la noche a 4 °C para que los ácidos nucleicos se disolvieran. Pasado este tiempo se añadieron 4 μL de RNAsa para eliminar el ARN, se mezcló suavemente y se colocó a 37 °C por una hora. Luego se agregaron 70 μL de acetato de sodio 3 M y 700 μL de isopropanol frio, se agitó suavemente hasta obtener el precipitado de ADN, se colocó a -20 °C durante 30 minutos, posterior a esto se centrifugó a 8 mil xg durante 10 minutos, se decantó con cuidado y se agregaron 500 μL de etanol al 70 % (grado reactivo) y se agitó para disolver las sales. Se centrifugó de nuevo a 8 mil xg por diez minutos, se decantó y escurrió y se dejó secar sobre una toalla sanitaria para después disolver en 100 μL de TE. La cantidad y pureza del ADN se determinó por medio de un Nanodrop Thermo Scientific Modelo LITE.

La determinación de la calidad del ADN se llevó a cabo con una electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % y se corrió por 1 hora a 180 voltios, luego el gel fue teñido con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron en un fotodocumentador Digidoc-it® Imaging System.

4.4.3. Obtención de patrones ISSR

Las huellas genéticas de los cuatro etnotaxa de maguey pulquero estudiados se obtuvieron mediante el uso de 22 iniciadores ISSR cuya secuencia y temperatura de alineamiento de muestran en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Iniciadores ISSR utilizados para la obtención de patrones de bandeo en cuatro etnotaxa de *A. salmiana*

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Ta °C
ISSR1	(CA) ₈ AAGG	60
ISSR2	(CA) ₈ AAGCT	60
ISSR3	(GA) ₈ CTC	58
ISSR4	(AG) ₈ CTC	58
ISSR5	(AC) ₈ CTA	60
ISSR6	(AC) ₈ CTG	58
ISSR7	(AG) ₈ CTG	60
ISSR8	(AC) ₈ CTT	56
ISSR9	(AG) ₈ C	52
ISSR10	(GA) ₈ T	50
LOL 2	(CT) ₈ GC	56
UBC 815	(CT) ₈ 8G	52
UBC844	(CT) ₈ AC	54
LOL 8	(GT) ₆ CC	56
PI01	(CA) ₆ AGCT	60
PI04	(CT) ₈ AGC	58
LOL 7	(GA) ₆ CC	48
UBC 847	(CA) ₈ AGG	52
PI03	AGCT(GACA) ₃	56
17898B	(CA) ₆ GT	48
UBC 866	(CTC) ₆	60
MESL1	(CA) ₆ GG	48

Ta= temperatura de alineamiento

La mezcla maestra de reacción se preparó con amortiguadores y los componentes que se detallan en el Cuadro 9. Después de agregar la ADN Taq polimerasa Invitrogen®, 22.5 µL de la mezcla se colocó en tubos de 0.2 mL previamente marcados con anterioridad y posteriormente se añadió 2.5 µL de ADN a una concentración de 10 ng/µL para después dar un volumen final de 25 µL por microtubo. Se mezcló bien por inversión y se colocaron en un termociclador TECHNE TC412.

Cuadro 9. Componentes de la mezcla de reacción en cadena de la Taq ADN polimerasa (PCR), para obtención de patrones ISSR.

Componentes de la mezcla	Concentración Inicial	Concentración Final	1 reacción (1X, 25 µL)
H ₂ O grado molecular	-	-	5.2
DNTP's	500 µM c/u	200 µM	10
Amortiguador de PCR	10X	1X	2.5
MgCl ₂	50 mM	3.0 Mm	3
Iniciador	10 ng/µL	30 ng	1.5
Enzima	5 U-µL ⁻¹	1.5 U/reacción	0.3
ADN genómico	10 ng/µL	25 ng	2.5
Total			25

La amplificación se llevó a cabo mediante el programa que se presenta en el Cuadro 10. La temperatura de alineamiento dependió de cada iniciador.

Cuadro 10. Condiciones de temperatura de los ciclos de amplificación de la PCR, para la obtención de patrones ISSR.

Fase	T °C	Tiempo	Ciclos
Predesnaturalización	93	1 min	1
Desnaturalización	93	20 seg	
Alineamiento	-	1 min	40
Extensión	72	20 seg	
Extensión final	72	6 min	1
Enfriamiento	10	∞	-

Una vez concluida la amplificación se retiraron los tubos y se conservaron a 4 °C para luego llevar a cabo la separación de los productos amplificados. La separación de fragmentos se hizo mediante electroforesis la cual se llevó a cabo en geles de agarosa al 2 %, los cuales se corrieron por 1 hora a 180 voltios. Luego se tiñeron con bromuro de etidio y se documentaron tal y como se señala en la sección de cuantificación y evaluación de la integridad del ADN.

4.4.4. Análisis estadístico

La exploración de la variabilidad genética entre y dentro de las cuatro etnotaxas de maguey pulquero estudiadas se realizó a partir de los patrones de bandeo obtenidos en los geles. Se cuantificó el número de bandas producto de cada iniciador y se asignó el valor de 1 a la presencia y 0 a la ausencia de cada banda;

con estos valores se construyó la matriz básica de datos (MBD), de la cual derivan los diferentes análisis.

Con la MBD se estimaron distintas distancias y semejanzas genéticas y, al final, se seleccionó el índice de similitud de Jaccard transformado en distancia ($\sqrt{1 - s}$), y se procedió a estimar las distancias entre pares de muestras. Con las distancias obtenidas se realizó un análisis de agrupamiento con el método de varianza mínima de Ward. Con objeto de explorar la distribución de la variabilidad genética se calculó un análisis molecular (AMOVA). De igual forma se llevó a cabo un análisis descriptivo de los marcadores moleculares con la finalidad de identificar a los más informativos y con mayor capacidad de discriminación entre y dentro de etnotaxas. Estos análisis fueron hechos con el programa InfoGen® de la Universidad de Córdoba, Argentina.

4.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5.1. Análisis de agrupamiento

Mediante la MBD se calcularon las distancias genéticas de Jaccard ($\sqrt{1 - S}$) entre pares de individuos y después se hizo un análisis de agrupamiento con el método de varianza mínima de Ward. El dendograma obtenido se muestra en la Figura 4 en la cual se puede observar que a una altura de corte de 0.9, se forman cuatro grupos. El grupo I estuvo conformado por los individuos del etnotaxa Ayoteco, el grupo II por los individuos de Chalqueño, el III por los de Manso y el IV por los de Púa Larga. La concordancia perfecta obtenida sugiere que los marcadores ISSR utilizados permitieron identificar las variaciones genéticas a nivel intraespecífico presentes entre las plantas de *Agave* muestreadas, lo cual permitió agruparlas de acuerdo al etnotaxa de procedencia. Estos resultados coinciden con los encontrados por Dávila *et al.* (2007), quienes mediante ISSRs pudieron evaluar la variabilidad genética intra e inter poblacional en las especies *Agave angustifolia*, *Agave cocui* y *Agave tequilana*. El dendrograma muestra mayor semejanza entre el grupo III y el IV con respecto al resto. Perales & Aguirre (2008) mencionan que el proceso de humanización consta de tres fases selectivas

críticas: recolección, cultivo incipiente y diferenciación genética. En agaves se ha documentado que uno de los elementos del síndrome de domesticación es el gigantismo (Colunga-Garciamarin & May-Pat, 1997); los resultados del estudio de Mora-López *et al.* (2011) indican que los etnotaxa Ayoteco y Chalqueño presentan rosetas grandes superiores los tres metros de altura. Por lo que lo anterior indica que el agrupamiento obtenido en el dendrograma en el cual se observa la clara diferenciación genética de Ayoteco y Chalqueño con respecto a Manso y Púa Larga, podría ser resultado de la selección artificial en la que el hombre tiende a escoger plantas de mayor altura ya que esto se correlaciona con una mayor producción de aguamiel. De acuerdo con Gentry (1982) y Mora-López *et al.* (2011) los cuatro etnotaxas estudiados en el presente trabajo pertenecen a la especie *A. salmiana* var. *salmiana*, cuyo etnotaxa modelo es Manso. Sin embargo, el agrupamiento obtenido sugiere que Ayoteco y posiblemente Chalqueño pudieran pertenecer a un linaje distinto a Manso.

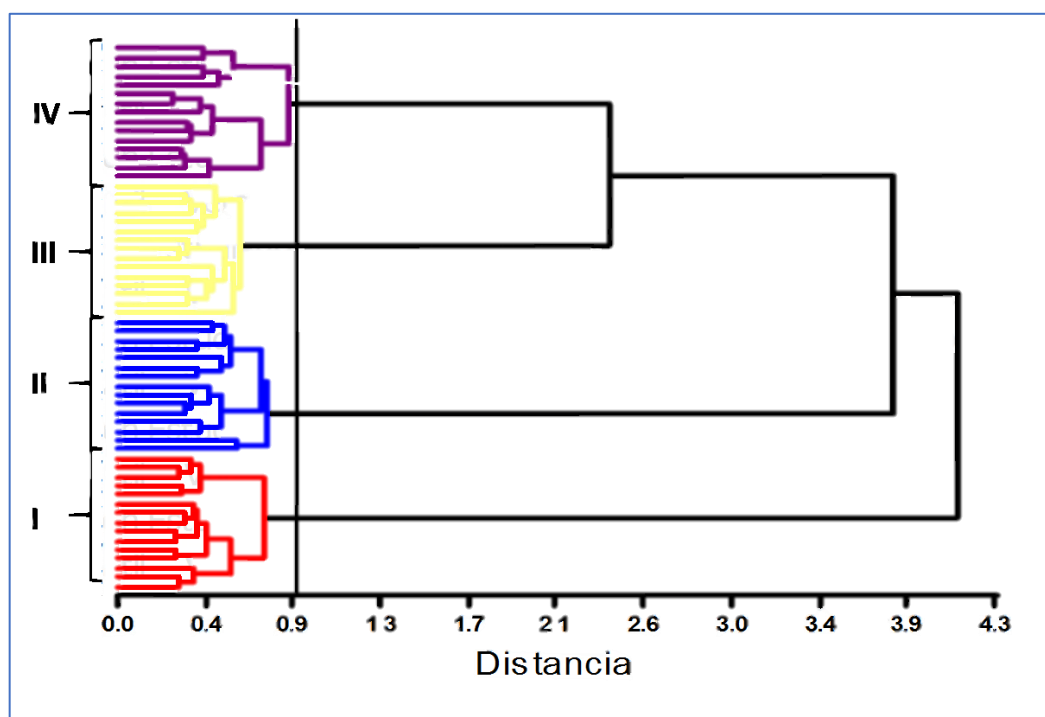


Figura 4. Dendrograma construido con la distancia de Jaccard ($\sqrt{1-S}$) y el método de agrupamiento de varianza mínima de Ward en cuatro etnotaxa de *Agave salmiana*.

4.5.2. Análisis molecular de varianza

Los resultados obtenidos en el análisis molecular de varianza (AMOVA) (Cuadro 11) muestran que si bien la mayor variabilidad genética se presentó entre etnotaxa (57.64 %), sorprendentemente el porcentaje de variabilidad dentro de los etnotaxa también fue importante (42.36 %). Ha sido una consideración generalizada que los individuos obtenidos mediante propagación vegetativa deben ser genéticamente idénticos entre sí y con respecto a la planta madre. Sin embargo, estudios previos realizados en *Agave* han sugerido que esta situación no siempre es verosímil. Así, Escobar (2009) en un trabajo con *A. tequilana* encontró un polimorfismo de 42 % entre hijuelos de rizoma y de 40 % en bulbillos con respecto a la planta madre. Estos resultados sugieren que a pesar de que el maguey pulquero se propaga vía asexual, existe un grado importante de variabilidad dentro de las poblaciones, lo que sugiere la probable ocurrencia de cambios a nivel genómico durante la etapa vegetativa de las plantas de agave debido a mutaciones puntuales, rearrreglos en el genoma, actividad de transposones y retrotransposones, entre otros (Escobar, 2009).

Cuadro 11. Análisis molecular de varianza (AMOVA) de cuatro etnotaxa de *A. salmiana*.

F.V.	GI	SC	CM	p-valor	Comp.Var.	Porcentaje
Entre etnotaxas	3	814.53	271.51	<0.0001	17.26	57.64
Dentro de etnotaxa	56	710.27	12.68	<0.0001	12.68	42.36
Total	59	1524.80	25.84		29.94	100.00

4.5.3. Descriptiva de marcadores

El Cuadro 12 presenta la descriptiva de los 22 iniciadores ISSR utilizados en este estudio para obtener los perfiles moleculares de los cuatro etnotaxa de maguey pulquero. Se generaron un total de 190 bandas de las cuales 163 fueron polimórficas, lo cual equivalió a un 85.78 % de polimorfismo. El iniciador que más bandas amplificó fue el PI01 (17 bandas) con un 34.71 % de amplificación a través de las 60 muestras, mientras que los iniciadores ISSR9 e ISSR10 fueron

los que produjeron menos bandas (3 bandas). Los iniciadores que presentaron los mayores valores de contenido de información polimórfica (PIC) fueron UBC 815, PI01, ISSR1 ISSR7 y LOL 7. Al ser éstos los iniciadores que proporcionaron mayor información genética podrían ser de gran utilidad en estudios posteriores sobre caracterización molecular de agave pulquero. La menor probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por azar fue encontrada para el iniciador PI01. Esto indica que dicho iniciador (Figura 5) además de producir el mayor número de bandas a través de muestras también mostró un alto grado de confianza en la identificación de los individuos de maguey comparados. Por lo cual se podría realizar una propuesta al SNICS para que se considerara este iniciador como referente para la caracterización molecular de agaves pulqueros con fines de protección.

Cuadro 12. Análisis descriptivo de 22 iniciadores ISSR usados en cuatro etnotaxa de *A. salmiana*.

Iniciador	Secuencia (5'-3')	BT	BP	PMF (95)	PIC	E.E.	AMP	PDICMA
ISSR1	(CA) ₈ AAGG	11	11	0.91	0.31	0.03	43.64	3.5E-13
ISSR2	(CA) ₈ AAGCT	14	14	0.86	0.20	0.03	32.02	9.4E-08
ISSR3	(GA) ₈ CTC	9	9	0.89	0.28	0.02	60.93	4.2E-10
ISSR4	(AG) ₈ CTC	5	5	0.40	0.15	0.02	87.67	5.4E-06
ISSR5	(AC) ₈ CTA	4	4	0.50	0.17	0.02	62.08	5.8E-06
ISSR6	(AC) ₈ CTG	7	7	0.86	0.23	0.02	79.76	2.6E-09
ISSR7	(AG) ₈ CTG	8	6	0.75	0.31	0.01	71.25	3.7E-08
ISSR8	(AC) ₈ CTT	9	9	0.56	0.17	0.03	78.70	3.9E-06
ISSR9	(AG) ₈ C	3	2	0.67	0.29	0.01	84.44	5.8E-07
ISSR10	(GA) ₈ T	3	2	0.33	0.19	0.02	88.33	8.4E-05
LOL 2	(CT) ₈ GC	12	11	0.67	0.22	0.03	52.22	3.4E-07
UBC 815	(CT) ₈ 8G	9	6	0.67	0.33	0.01	66.48	9.8E-08
UBC844	(CT) ₈ AC	7	6	0.57	0.16	0.03	66.43	5.9E-05
LOL 8	(GT) ₆ CC	9	7	0.56	0.23	0.03	65.19	4.3E-06
PI01	(CA) ₆ AGCT	17	17	1.00	0.33	0.01	34.71	1.7E-16
PI04	(CT) ₈ AGC	15	14	0.93	0.25	0.02	49.44	3.1E-08
LOL 7	(GA) ₆ CC	5	2	0.40	0.30	2.7E-03	79.67	3.9E-04
UBC 847	(CA) ₈ AGG	5	1	0.00	0.03	0.02	99.67	1
PI03	AGCT(GACA) ₃	12	12	1.00	0.29	0.01	45.97	1.4E-12
17898B	(CA) ₆ GT	9	7	0.78	0.27	0.01	70.00	2.7E-07
UBC 866	(CTC) ₆	8	4	0.50	0.24	0.02	83.33	2.9E-04
MESL1	(CA) ₆ GG	9	7	0.67	0.27	0.02	79.81	2.6E-07
Total		190	163				61.00	2.7E-150

BT: bandas totales, BP: bandas polimórficas, PMF(95): proporción de loci polimórficos, PIC: contenido de información polimórfica, EE:Error estándar, AMP: porcentaje de amplificación, PDICMA: probabilidad de que dos individuos compartan el mismo alelo por azar.

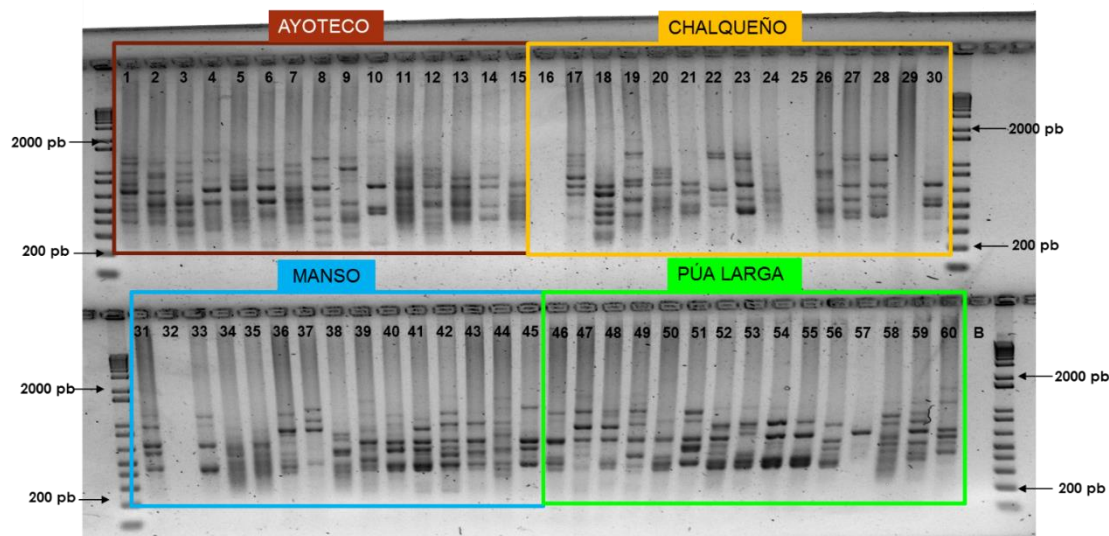


Figura 5. Patrón de bandas ISSR obtenido con el iniciador PI01 en cuatro etnotaxa (Ayoteco, Chalqueño, Manso y Púa Larga) de *A. salmiana*.

4.6. CONCLUSIONES

La variabilidad genética encontrada en los magueyes pulqueros estudiados es semejante a la encontrada en otras especies de *Agave*. Las diferencias genéticas entre individuos pertenecientes a distintos etnotaxas fueron importantes. Sin embargo, también se encontró una variación considerable entre individuos dentro de un mismo etnotaxa.

Los marcadores moleculares tipo ISSR demostraron su utilidad para estimar la variabilidad genética a niveles intraespecíficos de *Agave salmiana*, por lo que pueden ser usados para la obtención de huellas genómicas con fines de registro y protección

4.7. LITERATURA CITADA

- Alfaro-Rojas, G., Legaria-Solano, J., & Rodríguez-Pérez, J. (2007). Diversidad genética en poblaciones de Agaves pulqueros (*Agave* spp.) del Nororiente del Estado de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(1), 1–12.
- Arnold, C., Rossetto, M., McNally, J., & Henry, R. J. (2002). The application of SSRs characterized for grape (*Vitis vinifera*) to conservation studies in Vitaceae. *American Journal of Botany*, 89(1), 22–28. <https://doi.org/doi.org/10.1007/PL00002903>

- Awasthi, A. K., Nagaraja, G. M., Naik, G. V., Kanginakudru, S., Thangavelu, K., & Nagaraju, J. (2004). Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. *BMC Genetics*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-5-1>
- Azofeifa-Delgado, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221–241. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43717210>
- Carvalho, M. M., Hopkins, M. S., Mitchell, S. E., Kresovich, S., Valls, J. F. M., & Ferreira, M. E. (2004). Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. *BMC Plant Biology*, 4, 1186–1471.
- Charters, Y. M., & Wilkinson, M. J. (2000). The use of self-pollinated progenies as 'in-groups' for the genetic characterization of cocoa germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(1), 160–166. Retrieved from <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FPL00002903.pdf>
- Colunga-Garciamarin, P., & May-Pat, F. (1997). Morphological variation of henequen (*Agave fourcroydes*, Agavaceae) germplasm and its wild ancestor (*A. angustifolia*) under uniform growth conditions: diversity and domestication. *American Journal of Botany*, 84(11), 1449–1465. Retrieved from <http://www.amjbot.org/content/84/11/1449.long>
- Dávila, M., Castillo, M. A., & Lauretín, H. (2007). Uso de marcadores moleculares ISSR para inferir las relaciones genéticas y la variabilidad intraespecífico en *Agave*. *Revista Facultad de Agronomía*, 33, 93–111. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/274070867>
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11–15.
- Escobar, G. R. E. (2009). *Estudio de la biología reproductiva y análisis molecular de la reproducción sexual y asexual de Agave tequilana Weber var. azul*. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.
- García-Mendoza, A. (2007). Los agaves de México. *Ciencias*, 87, 14–23.
- Gentry, H. S. (1982). *Agaves of Continental North America*. Tucson, Arizona, USA: Arizona Press.
- Gil-Vega, K., Díaz, C., Nava-Cedillo, A., & Simpson, J. (2006). AFLP análisis of *Agave tequilana* varieties. *Plant Science*, 170, 335–341.
- Gil-Vega, K., González-Chavira, M., Martínez de la Vega, O., Simpson, J., & Vandemark, G. (2001). Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. *Euphyca*, 119(3), 335–341. <https://doi.org/10.1023/A:1017553107303>
- González, A., Wong, A., Delgado-Salinas, A., Papa, R., & Gepts, P. (2005). Assessment of Inter Simple Sequence Repeat Markers to Differentiate Sympatric Wild and Domesticated Populations of Common Bean. *Crop Science*, 45, 606–615. Retrieved from http://www.ibiologia.unam.mx/pdf/directorio/d/delgado/Gonzalezetal_02005.pdf
- Jin, Y., He, T., & Lu, B.-R. (2003). Fine scale genetic structure in a wild soybean (*Glycine soja*) population and the implications for conservation. *New*

- Phytologist*, 159, 513–519. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00824.x>
- Liston, A., Wilson, B. L., Robinson, W. A., Doescher, P. S., Harris, N. R., & Svejcar, T. (2003). The relative importance of sexual reproduction versus clonal spread in an aridland bunchgrass. *Oecologia*, 137, 216–225. <https://doi.org/10.1007/s00442-003-1332-2>
- Mora-López, J. L., Reyes-Agüero, J. A., Flores-Flores, J. L., Peña-Valdivia, C. B., & Aguirre-Rivera, J. R. (2011). Variación morfológica y humanización de la sección salmianae del género *Agave*. *Agrociencia*, 45, 465–477.
- Perales, H. R., & Aguirre, J. R. (2008). Biodiversidad humanizada. In R. Dirzo, R. González, & I. March (Eds.), *Capital Natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad* (pp. 565–603). México: CONABIO.
- Pradeep, R. M., Sarla, N., & Siddiq, E. A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphyca*, 128(1), 9–17. Retrieved from <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1020691618797>
- Singh, R. K., Mishra, G. P., Kant, A., & Shashi, B. (2008). Molecular Markers in Plants. In R. K. Singh, R. Singh, G. Ye, A. Selvi, & G. P. Rao (Eds.), *Molecular Plant Breeding: Principle, Method and Application* (pp. 35–77). Texas, USA: Studium Press LLC.
- Torres, M. M. I. (2009). *Caracterización molecular del complejo Agave durangensis por medio de marcadores ISTR*. Instituto Politecnico Nacional. Retrieved from <http://tesis.ipn.mx/handle/123456789/8069>
- Wallace, L. E. (2003). Molecular Evidence for Allopolyploid Speciation and Recurrent Origins in *Platanthera huronensis* (Orchidaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 164(6), 907–916. <https://doi.org/10.1086/378658>
- Zizumbo-Villarreal, D., Colunga-GarcíaMarín, P., Payró, de la C. E., Delgado-Valerio, P., & Gepts, P. (2005). Population structure and evolutionary dynamics of wild-weedy domesticated complexes of common bean in a Mesoamerican region. *Crop Science*, 45, 1073–1083.