



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**Patrones de Diversidad y Estructura Genética de
Agave potatorum Zucc. e implicaciones en su
manejo *in-situ***

Tesis

que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en Biosistemática y Manejo de
Recursos Naturales y Agrícolas**

Presenta

Lizeth Idalia Félix Valdez

Zapopan, Jalisco

8 de Diciembre de 2014



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**Patrones de Diversidad y Estructura Genética de
Agave potatorum Zucc. e implicaciones en su
manejo *in-situ***

Tesis

que para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias en Biosistemática y
Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas**

Presenta

Lizeth Idalia Félix Valdez

Directora

Dra. Ofelia Vargas Ponce

Co-directora

Dra. Dánae Cabrera Toledo

Zapopan, Jalisco

8 de Diciembre de 2014



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Patrones de diversidad y estructura genética en *Agave potatorum* Zucc. e implicaciones en su manejo *in-situ*.

Por:

Ing. Lizeth Idalia Félix Valdez

Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos
Naturales y Agrícolas

Aprobado por:



Dra. Ofelia Vargas Ponce
Directora de tesis e integrante del jurado

28 octubre 2014
Fecha



Dra. Dánae Cabrera Toledo
Co-directora de tesis e integrante del jurado

11 de noviembre del 2014
Fecha



Dr. Alejandro Casas Hernández
Asesor del comité particular e integrante del jurado

31 de octubre, 2014
Fecha



Dr. Lino de la Cruz Larios
Sinodal e integrante del jurado

11 noviembre de 2014
Fecha



Dra. Martha Isabel Torres Morán
Sinodal e integrante del jurado

05 Nov. 2014
Fecha

DEDICATORIA



Este proyecto profesional y personal es dedicado a:

A Dios...

Ejemplo de fuerza y sabiduría.

A mi familia...

Ejemplo de tenacidad y lucha por los sueños.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente mi agradecimiento a mi directora de tesis la Dra. Ofelia Vargas Ponce por haberme aceptado y sobre todo confiado en mí en todo momento. Quiero dar gracias a mi co-directora Dánae Cabrera Toledo por su paciencia y disposición de hacer las cosas y resolverlas. Por último a mi asesor Dr. Alejandro Casas por brindar siempre las palabras necesarias y objetivas de ver nuestro proyecto y ser ese ejemplo de calidad humana/científica. También agradecer a mis sinodales Dra. Martha Isabel Torres Morán y el Dr. Lino De la Cruz Larios por su apoyo y disposición de formar parte de este proyecto....A todos ustedes mí siempre admiración y agradecimiento.

Un muy especial agradecimiento a las personas que fueron mis maestros, sin ellos no hubiera sido posible llegar, gracias por compartir todos y cada uno de sus conocimientos y experiencia.

Un reconocimiento a Ignacio Torres, América Delgado, Anna Paisanni, Christian Martínez, Edgar Pérez, Sofía Monroy, Dr. Pablo Carrillo, Francisco Javier Rendón y Gonzalo Contreras, todos ellos son las personas que me acompañaron y fueron parte de este proyecto contribuyendo no sólo en las salidas a campo si no con sus conocimientos acerca de él. En especial quiero agradecerle a Gonzalo Contreras por su aportación en mi reencuentro con el laboratorio, te agradezco haber compartido y tenido la disposición para mostrarme lo necesario para mi trabajo en el laboratorio, por eso muchas gracias.

Gracias, a todas esas personas y familias sabias, conocidas en las salidas a campo, ya que sin ellas esto tampoco hubiera sido posible, gracias por compartimos un pedazo de su historia y vida contada por medio de las plantas.

A mis compañeros de laboratorio de Sistemática Molecular Vegetal por ayudarme y enseñarme tanto del laboratorio como de la vida, sin ustedes esto se hubiera podido realizar. Pero en especial quiero darle gracias y rendirle honor a mis ejemplos: Georgina Vargas, José Luis Villa, Isaac Sandoval, Pilar Zamora, Arizbeth Alonso, Guadalupe Munguía, gracias amigos.

También quiero agradecer a esas grandes mujeres y hermanas encontradas en este camino (Mercedes Soto, Alejandra Arceo, Pilar Zamora y Jaqueline Macías), muchas gracias por todos y cada uno de sus consejos pero sobre todo por su apoyo incondicional. Gracias AMIGAS.

Muchas gracias a todos los que estuvieron conmigo no solo en persona sino en espíritu, ustedes emprendieron este viaje junto a mí y me apoyaron en subir este barco, en las buenas y en las malas (PxS y Miguel Martínez).

Gracias familia, amigos, compañeras de casa, compañeros CUCBA-UDG, maestros, Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara, a todos gracias.

Total agradecimiento al programa de Becas para Estudios del Posgrado del CONACYT por su financiamiento, al Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara por todo el apoyo prestado, al Centro de Investigaciones en Ecosistemas (CIEco) UNAM, Campus Morelia, por su apoyo en la primer salida a campo, además un agradecimiento al Consejo Regulador del Tequila, por las atenciones y apertura de ayuda en la etapa de arranque de este proyecto.

ÍNDICE

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
CAPITULO I. Introducción general	1
Introducción	1
Antecedentes	3
Planteamiento del problema	9
Objetivo general	9
Objetivos particulares	9
Hipótesis	10
Literatura citada	11
CAPÍTULO II. Diversidad y estructura genética de <i>Agave potatorum</i>, especie mezcalera del centro-sur de México	15
Introducción	15
Materiales y métodos	17
Especie de estudio	17
Área de estudio	21
Colecta de muestras	22
Extracción de ADN y amplificación de marcadores microsatélites por PCR	23
Análisis de datos	24
Resultados	26
<i>Diversidad genética</i>	29
<i>Diferenciación y estructura genética</i>	30
<i>Similitud genética</i>	36

Discusión	39
<i>Diversidad genética</i>	39
<i>Diferenciación y estructura genética</i>	44
<i>Similitud genética</i>	47
Literatura citada	49
CAPITULO III. Conclusiones y recomendaciones	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Geles de poliacrilamida. A. Microsatélite 28, población SD ² . B. Microsatélite 11, población LP ² . C. Microsatélite 63, población SLV ³ . D. Microsatélite 5G, población XO ¹ . E. Microsatélite 2F, población Q ² . F. Microsatélite 20, población TH ² . G. Microsatélite 12, población CA ²	6
Figura 1.2. Distribución de los taxa del complejo <i>Agave potatorum</i> en Oaxaca y Puebla (García-Mendoza, 2010).	7
Figura 1.3. <i>Agave potatorum</i> Zucc. A) Roseta; B) Hoja; C) Inflorescencia; D) Bráctea del pedúnculo; E) Flor; F) Flor disecada; G) Detalle de la inserción del filamento; H) Estilo y estigma; I) Cápsula; J) Semilla (García-Mendoza, 2010).....	8
Figura 2.1. Distribución geográfica de las poblaciones estudiadas de <i>Agave potatorum</i> . TH (Tehuacán), Q (Quiotepec), MA (Machiche), LP (Las Palmas), TE (Tepeji), XO (Xochiltepec), CA (Cañada), SD (San Dionisio), LC (La Compañía), SSS (San Sebastián las Sedas), SLV (Sola de Vega) y SLA (San Luis Atolotitlán).	19
Figura 2.2. Ubicación de las poblaciones de <i>A. potatorum</i> respecto a sus provincias biogeográficas (Morrone, 2005).	21
Figura 2.3. Tipos de aprovechamiento en las poblaciones estudiadas de <i>A. potatorum</i> . A. Población silvestre sujetas a extracción (foto de Edgar Pérez-Negrón en Delgado-Lemus, 2008). B. Población silvestre sin aprovechamiento. C. Poblaciones de colección de germoplasma.	22
Figura 2.4. Representación tridimensional del tamaño por población, riqueza alélica y número de alelos únicos (estos últimos datos estimados por rarefacción) en 12 poblaciones de <i>A. potatorum</i>	31
Figura 2.5. Estimación de grupos genéticos derivados de la estructura genética en <i>Agave potatorum</i> . A) Evaluación generada por el método de Evanno <i>et al.</i> (2005) y B) Patrones de estructura genética obtenida con K= 2 (cada individuo está representado por una línea vertical con segmentos proporcionalmente a la ancestría del individuo a cada uno de los 2 grupos genéticos.	35
Figura 2.6. Fenograma con base en distancias genéticas de Nei (1972) entre poblaciones de <i>Agave potatorum</i>	37

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1. Nombres e información geográfica de las poblaciones de <i>Agave potatorum</i>	20
Cuadro 2.2. Secuencia y características de los cebadores utilizados en <i>Agave potatorum</i>	24
Cuadro 2.3. Tamaños y número de alelos observados de 7 loci microsatélites en poblaciones de <i>Agave potatorum</i>	27
Cuadro 2.4. Diversidad genética de 12 poblaciones de <i>Agave potatorum</i>	28
Cuadro 2.5. Datos de riqueza genética y prueba de rarefacción en 12 poblaciones de <i>Agave potatorum</i>	30
Cuadro 2.6. Prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg (<i>EHW</i>) en 7 loci microsatélites en <i>Agave potatorum</i>	31
Cuadro 2.7. Valores de estructuración genética mediante Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de 12 poblaciones de <i>Agave potatorum</i>	32
Cuadro 2.8. Valores de Φ_{PT} entre pares de poblaciones de <i>Agave potatorum</i> , distribuidas en los estados de Oaxaca y Puebla, México. Diagonal superior, valores de significancia.....	33
Cuadro 2.9. Proporción de ancestría estimada (<i>q</i>) para las 12 poblaciones de <i>Agave potatorum</i> (Evanno et al.2005).....	34
Cuadro 2.10. Estadísticos de endogamia en el conjunto de poblaciones (F_{IT}), dentro de cada población (F_{IS}) y entre las poblaciones F_{ST} (θ) por locus para <i>Agave potatorum</i>	36
Cuadro 2.11. Matriz de identidad genética (<i>I</i> , debajo de la diagonal) y distancia genética (<i>D</i> , encima de la diagonal) entre las poblaciones de <i>Agave potatorum</i> según Nei (1972).....	37
Cuadro 2.12. Matriz de distancia geográfica (debajo de la diagonal, representada en km) y distancia genética (encima de la diagonal) entre las 12 poblaciones de <i>Agave potatorum</i> (Mantel, 1967; Sokal, 1979).....	38

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Extracción de ADN por el método Fenol:Cloroformo: Alcohol isomílico.....	59
Anexo 2. Preparación de solución de poliacrilamida	61
Anexo 3. Tinción con sales de plata (Sanguinetti 1994).....	62

RESUMEN

El género *Agave* tiene en México su centro de origen y diversificación. El área de mayor diversidad se encuentra en la Reserva de la Biosfera del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, en los estados de Puebla y Oaxaca, donde crecen 23 especies del género, entre ellas *Agave potatorum*. Este taxón es una especie endémica de México conocida como “papalometl”, “papalomé”, “maguey papalomé”, o “tobalá”. *A. potatorum* es semélparo y autoincompatible, lo que determina dependencia para la reproducción sexual con respecto a sus polinizadores, que pueden ser murciélagos, aves y algunos insectos.. El principal aprovechamiento de la planta es para la elaboración de mezcal, producido principalmente a partir de la extracción de plantas silvestres justo antes de su floración. Debido a esta forma de aprovechamiento y a que no presentan propagación vegetativa, sus poblaciones están diezmadas y la integridad de éstas se encuentra en riesgo. En este contexto, la reducción drástica en el tamaño poblacional puede detonar procesos microevolutivos de manera relativamente rápida, que resultan en la disminución de la diversidad y la diferenciación genética entre poblaciones. El objetivo principal de este estudio es evaluar los patrones de diversidad y estructura genética en una muestra representativa de su distribución geográfica de poblaciones silvestres sujetas a extracción, silvestres sin aprovechamiento y colección de germoplasma, así como identificar poblaciones que aporten elementos importantes en el conocimiento y manejo desde el punto de vista de la conservación *in situ* de la especie. Se recolectaron muestras de tejido de hojas jóvenes en un total de 240 individuos de 12 poblaciones. El análisis genético se llevó a cabo con marcadores SSRs. Se determinó la diversidad diferenciación, estructura y similitud genética de las poblaciones. Las poblaciones analizadas presentaron valores altos de diversidad ($H_T = 0.88$), en contraste con otras especies reportadas hasta el momento. La categoría silvestre fue la más diversa ($H_e = 0.87$), pero sin diferencias significativas con respecto a las otras categorías de poblaciones analizadas (silvestres sujetas a extracción, $H_e = 0.72$ y colección de germoplasma, $H_e = 0.69$). También presentó una alta riqueza alélica ($R_A = 2.5- 3.74$) en la mayoría de sus poblaciones. El valor de estructura más alta fue dentro de las poblaciones ($\theta = 0.38$), además se encontraron valores altos de endogamia ($F_{IS} = 0.26$, $F_{IT} = 0.55$). Se encontró un valor significativo de estructura entre categorías de manejo del 3%. El análisis de asignación bayesiana generó dos grupos genéticos, en cada grupo se encontró una población silvestre sujeta a extracción. La correlación entre distancias genéticas y geográficas

no fue significativa, dato congruente con lo encontrado en el análisis bayesiano. Las poblaciones de *A. potatorum* presentan una diversidad genética alta y una diferenciación y estructura genética alta, probablemente influenciada por su biología, el manejo, tipo de hábitat y polinizadores. Al tratarse de plantas perennes de larga vida e incompatibilidad reproductiva, tienen una fuerte dependencia de los polinizadores. La alta diferenciación se observa en el bajo flujo génico, debido al efecto de la escasa visita de sus polinizadores, especialmente los murciélagos (denso-dependientes), presentándose altos valores de endogamia. Además, la posible simpatria y traslape de polinizadores con otras especies de *Agave* distribuidos a lo largo del área de distribución de la especie estudiada, puede ser otro factor que incide de manera importante sobre estos valores genéticos. De manera adicional, las poblaciones que se encuentran en hábitats con características xéricas son potencialmente más atractivas al aprovechamiento, por lo que éstas arrojan los valores genéticos más bajos, aunque no son significativos. Por lo tanto, aunque de forma no determinante, el manejo ha sido importante para la especie, ya que la constante reintroducción de individuos a su espacio natural, y su manejo no sistematizado, es decir, artesanal, aún no ha reflejado un impacto negativo sobre la diversidad genética de especie. Sin embargo, es importante prestar atención en algunas poblaciones.

ABSTRACT

The center of origin and diversification of *Agave* is in México. The region with the greatest *Agaves* species richness in Mexico is in the Tehuacán-Cuicatlán Valley biosphere reserve. This area embracing 23 species of the genus including *Agave potatorum*. This taxon is known as "papalometl", "papalomé", "papalomé maguey" or "tobalá". *Agave potatorum* is a semelparous and self-incompatible agave species endemic to the states of Oaxaca and Puebla in central Mexico. Their reproductive biology determines their dependence on pollinators, bats, birds and some insects, for sexual reproduction. One of the main uses of this plant is as input in mescal production. This production comes from the collection of wild plants just before flowering. Because of this manage and the specie not showed vegetative propagation, their populations are decimated and integrity of populations at risk. Under this approach, the drastic reduction in population size micro evolutionary processes can operate relatively quickly, resulting in decreased diversity and genetic differentiation among populations. The aim of this study was to evaluate the patterns of diversity and structure genetic in a representative sample of its range plant populations with and without exploitation and germplasm collection. Furthermore identify populations that provide important knowledge elements and managing from the standpoint of in situ conservation of the species. Tissue samples were collected from young leaves a total of 240 individuals in 12 populations. The genetic analysis was conducted with SSR markers. Genetic diversity, differentiation, structure and genetic similarity of populations were determined. The populations studied showed high values of diversity ($H_T = 0.88$), in contrast to other *Agave* species reported so far. The wild category without exploitation was the most diverse ($H_e = 0.87$), but no significant differences with regard to other categories of populations analyzed (wild subjected to extraction, $H_e = 0.72$ and germplasm collection, $H_e = 0.69$). Also showed high allelic richness ($R_A = 2.5 - 3.74$) in most populations. The highest structure value was within populations ($\theta = 0.38$). Besides we found high inbreeding levels ($F_{IS} = 0.26$, $F_{IT} = 0.55$). Significant value in structure among management categories of 3% was found. Bayesian analysis generated two genetic groups, each group with a wild population is found subject to removal. In each genetic group was found a wild population subjected to extraction. The correlation between genetic and geographic distances was not significant, consistent with the data found in the Bayesian analysis. *A. potatorum* populations have high genetic diversity, high genetic differentiation

and structure, probably influenced by their biology, management (exploitation), habitat type and pollinators. Because of the species have long-lived perennials and reproductive incompatibility, are heavily dependent on pollinators. The high differentiation observed in the low gene flow, the limited pollinator visitors, especially bats (density-dependent), showing high levels of inbreeding. Moreover, the possible sympatric pollinators and overlap with other species of *Agave* distributed throughout the range of the species studied may be another important factor about these genetic values. Additionally, the genetic values are influenced by habitat such as xeric populations, because they are potentially more attractive features of exploitation, so that they have the lowest genetic values, even though not significant. Therefore, although not decisive manner, management has been important for the species, since the constant reintroduction of individuals to their natural habitat, and its management is not systematic, ergo craft, has not reflected a negative impact on the genetic diversity of species. However, it is important to watch some populations.

CAPITULO I. Introducción general

Esta tesis analiza los factores que moldean la diversidad y estructura genética de las poblaciones silvestres de *Agave potatorum*, con especial énfasis en el manejo *in situ* que ha dado el hombre desde hace aproximadamente 90 años. En el Capítulo 1 se presenta el marco teórico general de la investigación, que aborda brevemente la importancia de la conservación de los recursos fitogenéticos, con un enfoque de la genética de la conservación. Se plantea la problemática general en el contexto del género *Agave* así como de la especie de estudio, las hipótesis y objetivos generales de la tesis. El Capítulo 2 integra los resultados obtenidos sobre la evaluación de la diversidad, diferenciación, estructura y similitud genética entre las poblaciones de *A. potatorum* sujetas a diferentes grados de aprovechamiento, utilizando marcadores moleculares microsatélites. Los resultados más importantes revelan que las poblaciones de *A. potatorum* muestran una diversidad de media a alta (H_e de 0.36 a 0.64). No obstante la relación entre H_o y H_e muestra coeficientes de endogamia significativos tanto en el interior de cada población ($F_{IS} = 0.267$, $p < 0.05$) como en el acervo total ($F_{IT} = 0.553$, $p < 0.05$). También muestra una alta estructuración entre las poblaciones ($\Phi_{PR} = 0.36$), así como un efecto incipiente de apenas el 3% de la diversidad genética estructurada entre los grupos de poblaciones por grado de aprovechamiento ($\Phi_{RT} = 0.02$). En el Capítulo 3 se presentan las conclusiones y recomendaciones generales de la tesis.

Introducción

La genética de la conservación busca cuantificar la variabilidad genética de las poblaciones silvestres y analizar su distribución dentro y entre poblaciones, con la finalidad de proponer estrategias que permitan prevenir la pérdida de la variación genética (Esquinas 1982; Freeland 2005). Los principios de esta disciplina han hecho posible la conservación más precisa de la diversidad en todos los niveles biológicos, con el fin de mantener un equilibrio ecológico (Given 1994). Bajo el supuesto de que el mantenimiento de la diversidad en los acervos genéticos de las especies favorece el potencial evolutivo y de aprovechamiento de las mismas, la conservación de la diversidad tiene un valor alto para los ámbitos genético, ecológico, económico y ético (Frankham *et al.* 2002).

El hombre modifica el entorno biológico, en donde las especies vegetales son un elemento clave, con un resultado evolutivo que puede ser positivo o negativo (Colunga-GarcíaMarín y Zizumbo-Villarreal 1993). En un sentido positivo, el hombre selecciona y promueve variantes de la especie objetivo; esto es, lleva a cabo un proceso de domesticación en el que el resultado más extremo es una dependencia completa al manejo humano de las especies domesticadas para sobrevivir y reproducirse (Brush 1991). En un sentido negativo, el hombre puede aprovechar los recursos que las plantas ofrecen (e.g. fibras, alimento, bebidas alcohólicas, entre otros) sin contemplar los posibles efectos en el potencial de regeneración de las poblaciones, lo cual frecuentemente disminuye la diversidad genética de las poblaciones (Colunga-García-Marín 1996; Casas *et al.* 1997). Los cambios pueden incrementar la variación intraespecífica o disminuirla hasta la pérdida total; esto puede variar en función de la intensidad del manejo humano y de la biología de las especies (Doebley 1993; Colunga-GarcíaMarín y Zizumbo-Villarreal 1993).

El aprovechamiento que involucre la conservación de los recursos bióticos y que asegure el mantenimiento de los procesos evolutivos de las especies en contextos sustentables, requiere del conocimiento de los factores biológicos, ecológicos y antropogénicos que actúan sobre tales recursos. Esta información es esencial para desarrollar planes eficientes de uso y conservación que permitan que continúe el proceso evolutivo en las poblaciones silvestres mientras que se aprovecha el recurso (Eguiarte y Piñero 1990). En plantas, los factores biológicos más importantes a considerar son: su sistema reproductivo, el tipo de dispersión de semilla, la forma de vida, entre otros (Hamrick y Godt, 1996). Los ecológicos incluyen las interacciones planta-animal, esto es, polinizadores y dispersores (Hamrick y Godt 1996), así como la herbivoría e interacciones planta-planta como el nodricismo (Rangel-Landa, 2009). Entre los factores antropogénicos que ocasionan la pérdida de la diversidad se encuentran la fragmentación de hábitats, la deforestación, la ganadería extensiva, el establecimiento de sistemas agrícolas comerciales y el aprovechamiento intensivo sin un adecuado manejo, entre otros (Maxted *et al.* 2002). En el contexto de esta tesis, la sobreexplotación de poblaciones silvestres a partir de la obtención de partes de plantas para materia prima o de individuos completos para ser comercializados, es una problemática central en la conservación del género *Agave*. Un caso particular es *Agave potatorum* Zucc.(ver Figura 1.3), especie silvestre que es sometida a un manejo *in situ* que consiste en la extracción de plantas completas de las poblaciones silvestres

para la elaboración de mezcal (Delgado-Lemus, 2008).

Para el aprovechamiento y conservación de agaves se han desarrollado dos estrategias de manejo: *ex situ* e *in situ* (Colunga-GarcíaMarín y Zizumbo-Villarreal 1993; Blancas *et al.* 2010). El manejo *ex situ* se realiza a partir de la propagación de semillas o partes vegetativas, así como el trasplante de individuos completos en parcelas de cultivo y producción tradicional o en banco de germoplasma de instituciones científicas, todos estos sistemas funcionan como reservorios de diversidad (Brush 1991; Colunga-GarcíaMarín y Zizumbo-Villarreal 1993, 2007; Vargas *et al.* 2007). En el ámbito del manejo *in situ*, práctica cultural que se lleva a cabo dentro del hábitat natural de las especies silvestres (Casas *et al.* 1997), los sistemas agroforestales y silvopastoriles frecuentemente funcionan como unidad de manejo y conservación donde se aprovechan los agaves para satisfacer las necesidades del hombre (Gordon y Newman, 1997; Quinkenstein 2009; Delgado-Lemus *et al.* 2014a). De acuerdo con Blancas *et al.* (2010), se pueden distinguir tres tipos generales de técnicas de manejo *in situ*: 1) Tolerancia, dirigida a dejar en pie individuos con características útiles o con fenotipos particularmente útiles o atractivos para la gente en espacios naturales que sufren perturbación; 2) Promoción, su finalidad es el incremento de la densidad y viabilidad de las plantas de interés dentro su entorno biótico y 3) Protección, ésta involucra la remoción deliberada de competidores y depredadores de la planta de interés, o la protección contra exceso de radiación o sombra, entre otras prácticas. Bajo este contexto, en el presente estudio se evalúa el efecto del manejo *in situ* en la diversidad y estructura genética de *Agave potatorum*, un recurso que a lo largo de los años se ha sometido a tasas altas de extracción forestal sin mediar ninguna forma de manejo, pero que por su importancia económica y cultural dentro de la región de estudio, en los últimos años ha contemplado la tolerancia y promoción de individuos en las poblaciones.

Antecedentes

El género *Agave*, tradicionalmente ha sido clasificado dentro de la familia Agavaceae Dumort (Gentry 1982, Eguiarte *et al.* 2000). México, es el centro de mayor riqueza y diversidad de esta familia (García-Mendoza y Galván 1995; García-Mendoza 2011). La clasificación más actual lo ubica dentro de la familia Asparagaceae Juss, aunque esta clasificación puede considerarse no representativa por los pocos géneros estudiados (APG III 2009; Chase *et al.* 2009; García-

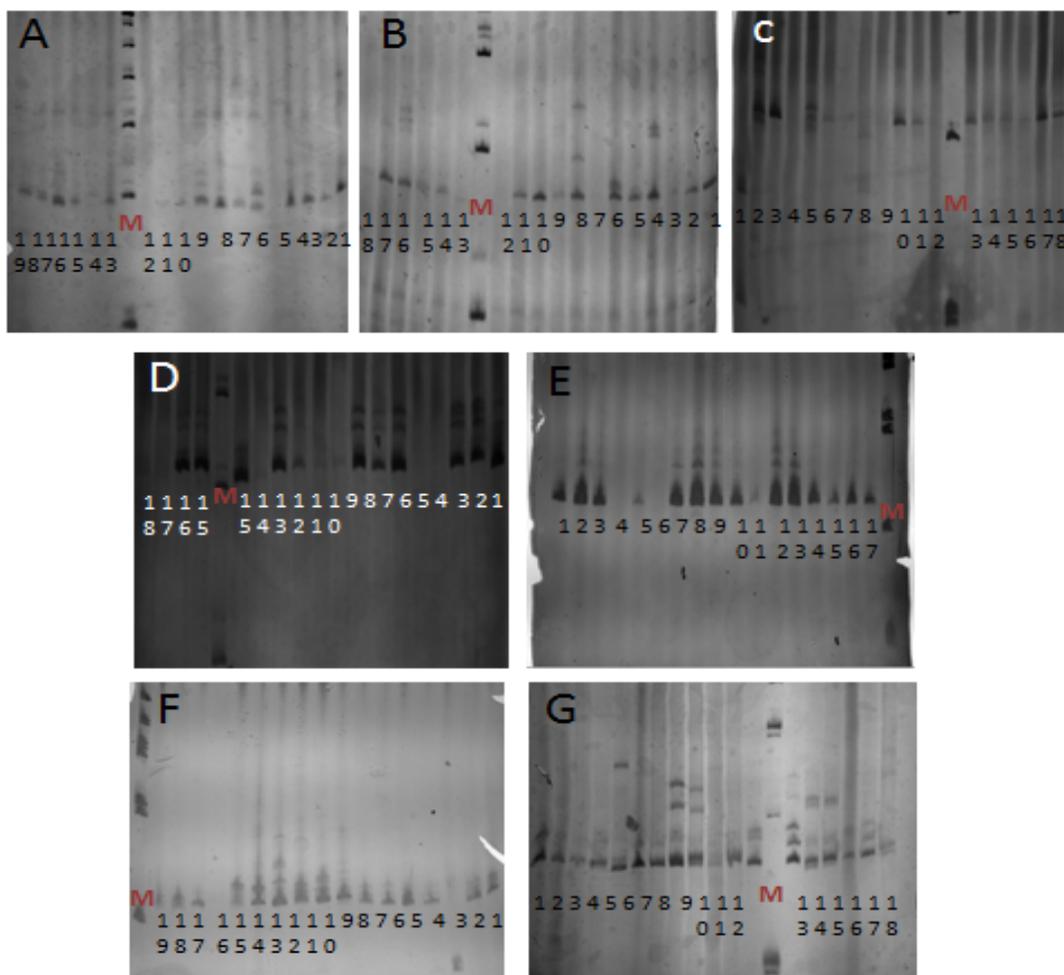
Mendoza y Chávez-Rendón 2013). *Agave* se distribuye en el Continente Americano, desde California (centro-oeste de los Estados Unidos) hasta Perú, Bolivia y Paraguay, incluyendo las islas del Caribe (Gentry 1982). La localización de las especies de *Agave* en México ocurre desde el nivel del mar hasta los 3400 msnm; los ambientes donde se encuentran son los matorrales y desiertos (68%), seguido por los bosques de *Pinus* y *Quercus* (García-Mendoza 2002).

Los agaves son plantas perennes usualmente de vida larga, con raíces fibrosas y duras, poco profundas; acaules o con tallo corto y grueso. Las plantas se encuentran solitarias o coloniales, y según la especie pueden desarrollar vástagos en la roseta. Las hojas son simples, fibrosas y rígidas, su forma varía de lineal a lanceolada u ovada y el margen puede tener dientes laterales (Gentry 1982). La reproducción de los agaves puede ser de tipo sexual (semillas) y asexual (vegetativo) (García-Mendoza 2007). Algunas especies se reproducen solamente mediante semillas y otras vegetativamente, pero la mayoría de las especies usan ambos mecanismos (García-Mendoza 2007). La reproducción vegetativa ocurre mediante la producción de vástagos (hijuelos) alrededor de la planta madre o de bulbilos (en la inflorescencia), que reproducen de manera casi idéntica las características genéticas de la planta madre (Gentry 1982). Los vástagos nacen ya sea en la base de la roseta (a partir de rizomas) o entre las hojas (axilares) o aún separados de la planta a partir de estolones (Gentry 1982). Para su aprovechamiento, la propagación clonal ha sido utilizada de forma extensiva por el hombre poniendo en riesgo la importante diversidad genética de estas plantas (Aguirre-Dugua y Eguiarte 2013), como se ha documentado en el agave azul (*Agave tequilana* Weber) y el henequén (*A. fourcroides* Lem.) (Colunga *et al.*, 1999; Vargas *et al.*, 2009).

En plantas, se ha documentado que la disminución de la diversidad genética en las especies cultivadas es un fenómeno directamente asociado al manejo, debido a la propagación de sólo algunas de las variedades o variantes (Hawkes 1983; Ladizinsk, 1987; Scheinvar 2008; Eguiarte y Zouza 2007). *Agave* representa un gran abanico en términos de diversidad en sus diferentes formas de manejo y cultivo (Eguiarte *et al.* 2000; Colunga-GarcíaMarín *et al.* 2007). Actualmente, la principal forma de aprovechamiento del género *Agave* en México es para la producción de bebidas destiladas mejor conocidas como “mezcal”, un uso que data de hace aproximadamente 400 años (Colunga-GarcíaMarín y Zizumbo-Villarreal 2007). En México,

para la producción de mezcal se utiliza una gran gama de especies de *Agave* (e.g. *A. potatorum* Zucc. García-Mendoza 2010, *A. cupreata* Trel. & Berger. Aguirre-Dugua y Eguiarte 2013; *A. angustifolia* Haw., Barraza *et al.* 2006). Se han documentado algunos casos en los que existe evidencia de una fuerte sobreexplotación, razón por la cual se han incrementado la cantidad de estudios que analizan su efecto en el contexto de la genética de poblaciones (Eguiarte *et al.* 2013). Este tipo de estudios también proveen evidencia importante para resolver problemas de identidad taxonómica, o bien determinar la fuente de germoplasma de algunas especies cultivadas de *Agave* (Aguirre 2004; Delgado-Lemus 2008; Torres 2009). Por lo tanto, la generación de esta información por medio de marcadores moleculares, permite conocer el gran acervo genético de los agaves y así plantear estrategias para su conservación.

Para el desarrollo de trabajos de genética de poblaciones se utilizan una gran gama de marcadores: dominantes (e.g. ISSR, Inter-SequenceRepeat) y codominantes (e.g. los microsatélites SSRs, Simple Sequence Repeat) (Freeland 2005). Los microsatélites son de alta utilidad para solucionar problemas relacionados con la identificación de individuos, pruebas de paternidad y maternidad, mapeo genético, reconstrucciones filogenéticas, así como evaluaciones de diversidad y subdivisión genética entre poblaciones como es el caso del presente estudio (Armour *et al.*, 1994; Hancock 1999; Freeland 2005; Eguiarte *et al.* 2007). Los SSRs son considerados una herramienta poderosa para el análisis de diversidad genética puesto que son altamente polimórficos, específicos y repetibles (Armour *et al.* 1994; Freeland 2005). En el género *Agave* se han utilizado con mayor frecuencia los marcadores dominantes como ISSR, mientras que los SSRs sólo en unos pocos estudios (Eguiarte *et al.* 2013), marcador que es utilizado en el presente estudio (Figura 1.1).



¹ Silvestre sujetas a extracción, ² Silvestre sin aprovechamiento, ³ Colección de germoplasma

Figura 1.1. Geles de poliacrilamida. A. Microsatélite 28, población SD ². B. Microsatélite 11, población LP ². C. Microsatélite 63, población SLV ³. D. Microsatélite 5G, población XO ¹. E. Microsatélite 2F, población Q ². F. Microsatélite 20, población TH ². G. Microsatélite 12, población CA ².

Agave potatorum es una especie que se utiliza principalmente para la producción de mezcal. Es considerado un taxón complejo por su alta variabilidad morfológica (Aguirre, 2004; Delgado-Lemus 2008; García-Mendoza 2010). Representa una prioridad en términos de conservación biológica, ya que su única forma de reproducción es por semilla, lo que la pone en desventaja con respecto a otras especies (Aguirre 2004; Torres 2009). El área geográfica con mayor representación de la especie es el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, constituida por climas áridos y semiáridos (García-Mendoza, 2010) (Figura 1.2). Esta área alberga una gran diversidad de especies (más de 3,000 especies, de acuerdo con Dávila et al., 2003) entre las que destacan

cactáceas sujetas a manejo humano (*Opuntia* spp., *Pachycereus weberi*, *Myrtillocactus schenkii*, *Polaskia chichi*, *P. chende*, *Escontria chiotilla*, Valiente-Banuet *et al.* 2009; Blancas *et al.* 2010). Esta región también destaca como el área con mayor diversidad de especies del género *Agave* (23 especies) en México, entre ellas se encuentran *A.americana* var. *americana* L., *A. salmiana* subsp. *tehuacanensis* (Karw. ex Salm-Dyck) García-Mend., *A. atrovirens* Karw. Ex Salm-Dyck, *Agave seemanniana* Jacobi, *A. americana* L., *A. applanata* Lem. ex Jacob, y., entre otros; todos ellos sometidos a un manejo para la elaboración de bebidas alcohólicas (García-Mendoza y Galván 1995; Blancas *et al.* 2010; Delgado-Lemus *et al.* 2014a). Para la elaboración de mezcal se destaca: *A. potatorum* Zucc, *A. americana* var *oaxacensis* Gentry, *A. macroacantha* Zucc., y *A. marmorata* Roez (Delgado-Lemus *et al.* 2014b).

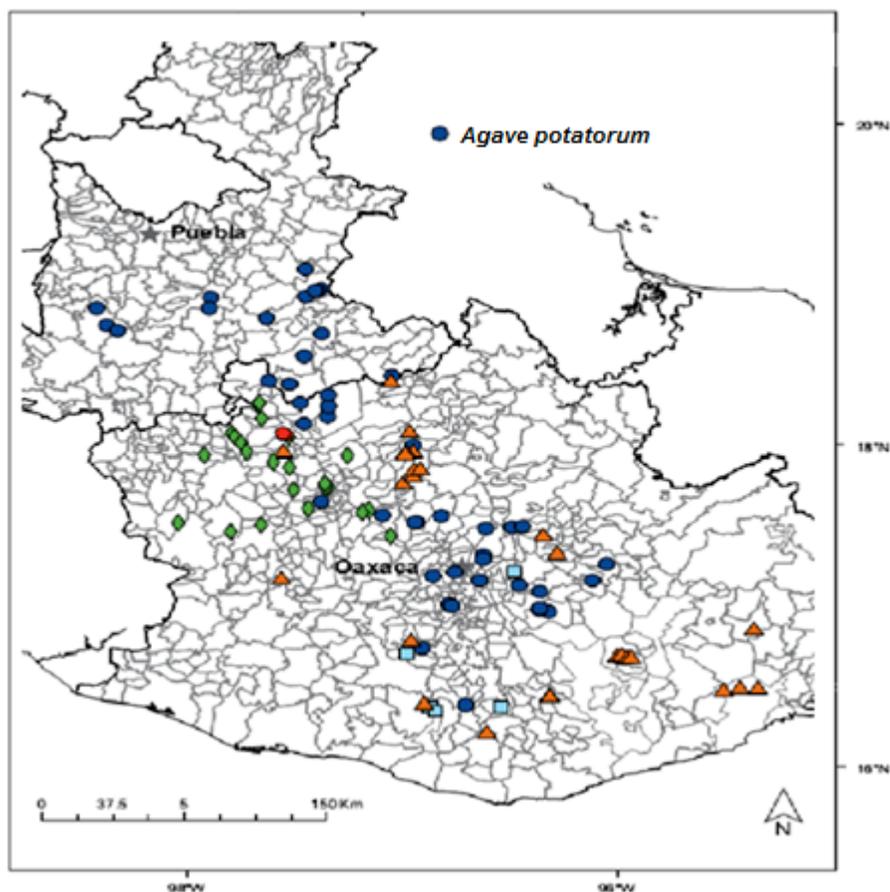


Figura 1.2. Distribución de los taxa del complejo *Agave potatorum* en Oaxaca y Puebla (Tomado de García-Mendoza, 2010).

Agave potatorum tiene importancia cultural y económica. Tanto a nivel regional, como nacional se reconoce por ser una especie mezcalera cuyo producto es de la más alta calidad. La

evaluación de la diversidad y estructura genética de *A. potatorum* bajo distintos niveles de aprovechamiento puede revelar efectos potenciales relacionados con el manejo *in situ*. Por lo tanto, este tipo de información es fundamental para conducir la discusión con respecto a las estrategias de manejo y conservación en esta especie, ya que existen pocos trabajos al respecto y bajo este mismo enfoque.

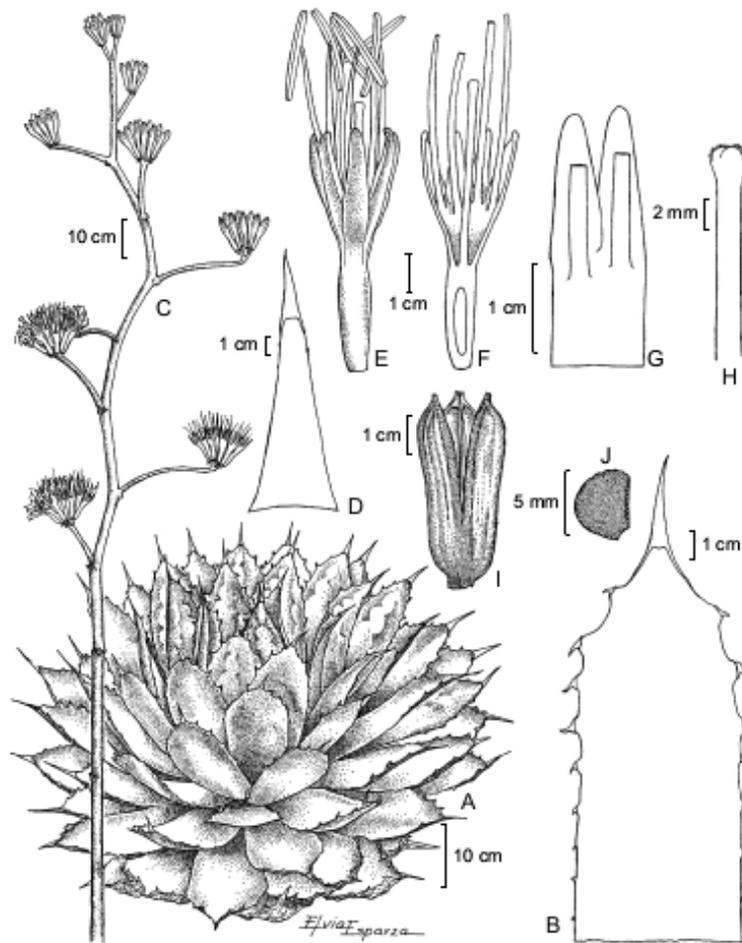


Figura 1.3. *Agave potatorum* Zucc. A) Roseta; B) Hoja; C) Inflorescencia; D) Bráctea del pedúnculo; E) Flor; F) Flor disecada; G) Detalle de la inserción del filamento; H) Estilo y estigma; I) Cápsula; J) Semilla (Tomado de García-Mendoza, 2010).

Planteamiento del problema

En la elaboración de mezcal son utilizadas varias especies de *Agave*, pero en la mayoría de los casos su aprovechamiento se realiza exclusivamente a partir de poblaciones silvestres, siendo éste el caso de *Agave potatorum*. La alta demanda del mezcal ha requerido una alta tasa de extracción de plantas completas, justo antes de la floración, dejando habitualmente pocos individuos para producir semilla. La consecuencia inmediata es una fragmentación de las poblaciones en unidades más pequeñas o bien su extinción local. La disminución del tamaño efectivo de las poblaciones, definido como el número de individuos de la población que participan en eventos de reproducción y contribuyen a la condición genética de las poblaciones (Hedrick 2000), es también un factor crítico en este proceso. En *A. potatorum* se han documentado reducciones drásticas en el tamaño poblacional, resultando en las últimas décadas en extinciones locales (Torres, 2009). Así mismo, *Agave potatorum* es una especie polinizada principalmente por murciélagos (*Leptonycteris* spp.) (Arita 1988; Eguiarte *et al.* 2000), los cuales tienen una preferencia por densidades altas de individuos por población, por lo que la reducción del tamaño de las poblaciones también afecta la frecuencia de visitas de este polinizador (Estrella 2008).

Objetivo general

Estimar los patrones de diversidad y estructura genética de *Agave potatorum* en una muestra representativa de su distribución geográfica.

Objetivos particulares

1. Comparar y discutir los parámetros de diversidad y estructura en términos de su aprovechamiento (poblaciones forestales sujetas a aprovechamiento, poblaciones silvestres no sujetas a aprovechamiento y colección de germoplasma).
2. Analizar y discutir los resultados genéticos obtenidos en términos biológicos (sistema reproductivo, el tipo de dispersión de semilla, forma de vida), ecológicos (las interacciones planta-animal, interacciones planta-planta y etnobotánico) y geográficos (comparativo de distancias genéticas vs. distancias geográficas).

3. Proponer estrategias de conservación, que ayuden al aprovechamiento sustentable y conservación de las poblaciones.

Hipótesis

Bajo el antecedente de que han ocurrido extinciones locales de poblaciones, y reducción de la densidad de individuos en poblaciones bajo extracción forestal, es posible esperar una acentuación de procesos microevolutivos como endogamia y deriva génica, que pueden llegar a incrementar los niveles de homocigosidad, disminuyendo así la diversidad genética de las poblaciones. Por esta razón, se espera encontrar una menor diversidad genética en poblaciones de *A. potatorum* que han sido sometidas a extracción constante de plantas y que los niveles bajos sean proporcionales a la magnitud de la extracción, en contraste con aquellas poblaciones en donde no existe evidencia de extracción histórica o reciente, (poblaciones silvestres sin aprovechamiento). Por contener representantes de poblaciones variadas, se espera que las colecciones de germoplasma tendrán los valores más altos del acervo total.

Por su parte, es posible que exista una falta de conectividad ocasionada por la escasez de polinizadores que resulta en un decremento del flujo genético. Este proceso se verá reflejado en valores altos de estructura genética en las poblaciones sujetas a extracción en comparación con las silvestres que no se encuentran bajo aprovechamiento y las colecciones de germoplasma. Finalmente esperamos un patrón geográfico de aislamiento por distancia en donde, la estructura incrementará conforme aumente la distancia geográfica.

Literatura citada

- Aguirre, X. 2004. Genética de poblaciones de *Agave cupreata* y *A. potatorum*: Aportaciones para el manejo y conservación de dos especies mezcaleras. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, D.F., México.
- Aguirre-Dugua, X. y Eguiarte, L.E. 2013. Genetic diversity, conservation and sustainable use of wild *Agave cupreata* and *Agave potatorum* extracted for mezcal production in Mexico. *Journal of Arid Environments* 90: 36-44.
- APG III. 2009. An update of the Angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105-121.
- Armour, J. A., Neumann, R., Gobert, S. y Jeffreys, A. J.. 1994. Isolation of human simple repeat loci by hybridization selection. *Human Molecular Genetics* 3: 599-605.
- Barraza-Morales, A., Sánchez-Teyer, F.L., Robert, M., Esqueda, M. y Gardea, A. 2006. Genetic variability in *Agave angustifolia* Haw. at the Sonoran Sierra, México, as determined by AFLP markers. *Revista Fitotecnia Mexicana* 29(1): 1-8.
- Blancas, J., Casas, A., Rangel-Landa, S., Moreno-Calles, A., Torres, I., Pérez-Negrón, E., Solís, L., Delgado-Lemus, A., Parra, F., Arellanes, Y., Caballero, J., Cortés, L. y Lira, R. 2010. Plant Management in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, México. *Economy Botany* 64: 287-302.
- Brush, S. B. 1991. A farmer-based approach to conservation crop germplasm. *Economic Botany* 45:153-165.
- Casas, A., Caballero, J., Mapes, C. y Zarate, S. 1997. Manejo de la vegetación, Domesticación de plantas y Origen de la agricultura en Mesoamérica. *Boletín de la Sociedad Botánica de Mexico*. 61: 31-47.
- Chase, M. W., Reveal, J. L. y Fay, M. F. 2009. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 132-136.
- Colunga-García Marín, P. y Zizumbo-Villarreal, D. 1993. La evolución de las plantas bajo selección artificial y manejo agrícola, en: *Cultura y Manejo Sustentable de los Recursos Naturales*, Vol. I, Leff, E. y J. Carabias. (eds). CIIH-UNAM. Miguel Ángel Porrúa. México. Pp. 123-163.
- Colunga- GarcíaMarín, P. 1996. Origen, variación y tendencias evolutivas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Colunga-GarcíaMarín, P., Coello-Coello, J., Eguiarte, L.E., Piñero, D., 1999. Isozymatic variation and phylogenetic relationships between henequén (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *A. angustifolia* (Agavaceae). *American Journal of Botany* 86: 115-123.

- Colunga-GarcíaMarín, P. y Zizumbo-Villareal, D. 2007. Tequila and other *Agave* spirits from west-central Mexico: current germplasm diversity, conservation and origin. *Biodiversity and Conservation* 16(6): 1653-1667.
- Colunga-GarcíaMarín, P., Zizumbo-Villareal D. y Torres Martínez, J. 2007. Tradiciones en el aprovechamiento de los agaves mexicanos: una aportación a la protección legal y conservación de su diversidad biológica y cultural. Pp. 229-248. En Colunga-García Marín, P., Larque Saavedra A., Eguiarte L.E., y Zizumbo-Villareal, D. (editores). 2007. En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. Centro de investigación de Yucatán A. C. Pp. 402.
- Delgado- Lemus, A., Casas, A. y Tellez, O., 2014. Distribution, abundance and traditional management of *Agave potatorum* in the Tehuacán Valley, Mexico: bases for sustainable use of non-timber forest products. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10:63
- Delgado-Lemus, A. M. 2008. Aprovechamiento y disponibilidad espacial de *Agave potatorum* en San Luis Atlotitlán, Puebla, México. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, Morelia, México.
- Doebley, J. 1993. Genetics, development and plant evolution. *Current Opinion of Genetic Development* 3: 865-872.
- Eguiarte, L.E. y Piñero P. 1990. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. *Ciencias*. Número especial 4: 34-47. En Nuñez-Farfán J. (reimpreso) y L. E. Eguiarte (editores). En *Ecología y conservación en México*. En *La evolución biológica*. Facultad de Ciencias, Instituto de Ecología, UNAM, Conabio. Pp. 371-398.
- Eguiarte, L.E., Souza, V. y Silva-Montellano, A. 2000. Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 66: 131-150.
- Eguiarte, L. E. y Souza, V. 2007. Historia natural del *Agave* y sus parientes: Evolución y Ecología. Pp. 3-21. En Colunga-García Marín, P., Larque Saavedra A., Eguiarte L.E., y Zizumbo-Villareal, D. (editores). 2007. En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. Centro de investigación de Yucatán A. C. Pp. 402.
- Eguiarte, L. E., Aguirre-Planter, E., Aguirre-Dugua, X., Colin, R., González, A., Rocha, M., Scheinvar, E., Trejo, L. y Souza, V. 2013. From isoenzymes to genomics: Populations genetic and conservation of *Agave* in México. *The Botanical Review* 79: 483-506.
- Esquinas, J.T. 1982. Los recursos fitogenéticos, una inversión segura para el futuro. Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos e Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Madrid, España. INIA.
- Freeland J.R. 2005. *Molecular Ecology*. The Open University, Milton Keynes. John Wiley & Sons Chichester, England.
- García-Mendoza, A. y Galván, R. 1995. Riqueza de las Familias Agaváceae y Nolinaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 56:7-24.

- García-Mendoza, A. J. 2002. Distribution of Agave(Agavaceae) in México. *Cactus and Succulent Journal* 74: 177-186.
- García-Mendoza, A.J. 2007. Los Agaves de México. *Ciencias* 87: 14-23.
- García-Mendoza, A.J. 2010. Revisión taxonómica del complejo *Agave potatorum* Zucc. (Agavaceae): nuevos taxa y neotipificación. *Acta Botánica Mexicana* 91: 71-93.
- García-Mendoza, A.J. 2011. Agavaceae. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. 88:1-95
- García-Mendoza, A. J. y Chávez-Rendón, C. 2013. *Agave kavandivi* (Agavaceae: grupo *Striatae*), una especie nueva de Oaxaca, México 84: 1070-1076.
- Gentry, H. S. 1982. *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press, Tucson.
- Given, D.R. 1994. *Principles and Practice of Plant Conservation*. Timber Press, Portland.
- Gordon, A.M. y Newman S.M. 1997. *Temperate Agroforestry Systems*. CAB International, Wallingford, U.K.
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W. 1996. Effects of the history traits on genetic diversity in plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 351: 1291-1298.
- Hancock, J. 1999. Microsatellites and other simple sequence: genomic context and mutational mechanisms. En: Goldstein D., Schlotterer C. (eds.). *Microsatellites evolution and applications*, Oxford University Press, New York. Pp. 1-10.
- Hawkes, J. G. (1983). *The Diversity of Crop Plants*, Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Ladizinsky, G. (1987). Pulse domestication before cultivation. *Economic Botany* 41: 60-65.
- Maxted., N., Guarino, L., Myer, L. y. Chiwona, E. A .2002. Toward methodology for on-farm conservation of plant resources. *Genetic Resources and Crop Evolution* 49: 31-46.
- Quinkenstein, A., Wöllecke, J., Böhm, C., Grünwald, H., Freese, D., Schneider, B.U., Hüttl, R.F. 2009. Ecological benefits of the agroforestry-system Alley cropping in sensitive regions of Europe. *Environmental science and Policy* 12: 1112-1121.
- Scheinvar, G. E. 2008. *Genética de poblaciones silvestres y cultivadas de dos especies mezcaleras: Agave cupreata y Agave*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Instituto de Ecología, UNAM. México. D.F., México.
- Torres, I. 2009. *Dinámica poblacional de dos morfos de Agave potatorum Zucc. en el Valle de Tehuacán: bases para su manejo sustentable*. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Valiente-Banuet, A., Solís, L., Dávila, P., Arizmendi, M.C., Silva, C., Ortega-Ramírez, J., Treviño, J., Rangel-Landa, S. y Casas, A. 2009. *Guía de la Vegetación del Valle de*

Tehuacán- Cuicatlán. UNAM. CONABIO, INAH.

Vargas-Ponce, O., Zizumbo-Villarreal, D., J. Martínez-Castillo, Coello-Coello J., y Colunga-GarcíaMarín, P.2009. Diversity and structure of landraces of *agave* grown for spirits under traditional agriculture: a comparison with wild populations of *A. angustifolia* (Agavaceae) and commercial plantations of *A. tequilana*. *American Journal of Botany* 96(2): 448-457.

CAPÍTULO II. Diversidad y estructura genética de *Agave potatorum*, especie mezcalera del centro-sur de México

INTRODUCCIÓN

El uso tradicional de especies del género *Agave* data de hace por lo menos 9000 años (Gentry 1982). El aprovechamiento histórico más común fue como alimento, luego como fibra, hasta la producción de bebidas fermentadas como el pulque y destiladas como el mezcal y el tequila (Gentry 1982; García-Mendoza 2007). Actualmente el uso principal es para la producción de bebidas (García-Mendoza 2007). La bebida alcohólica más antigua y tradicional es el pulque (Eguiarte y Souza 2007; Eguiarte *et al.* 2013), también están los derivados destilados conocidos con nombres regionales como: sotol o xotol (Desierto de Chihuahua, Eguiarte 1995), bacanora (Desierto de Sonora, Barraza *et al.* 2006) y raicilla (Jalisco, Valenzuela-Zapata *et al.* 2008). Entre los más conocidos, están el tequila (Eguiarte y Souza 2007) y el mezcal, que se producen con denominación de origen (DO) (Colunga-GarcíaMarín *et al.* 2007). La DO mezcal incluye a los estados de Oaxaca, San Luis Potosí, Jalisco, Durango, Guerrero, Tamaulipas y Zacatecas (Colunga-GarcíaMarín *et al.* 2007). No obstante, la elaboración de mezcal se realiza a partir de 42 especies de *Agave* distribuidas en el territorio mexicano, por lo cual la conservación de la diversidad del género se vuelve cada día más necesaria (Colunga-GarcíaMarín y Zizumbo-Villareal, 2007, Colunga-GarcíaMarín, *et al.* 2007).

En algunos casos la elaboración de mezcal se hace a partir de plantas silvestres (e.g. *A. potatorum* Zucc., García-Mendoza 2010; *A. cupreata* Trel.& Berger, Aguirre-Dugua y Eguiarte 2013; *A. angustifolia* Haw., Barraza *et al.* 2006). Se extraen plantas completas justo antes de su floración debido a que en esta etapa han acumulado gran cantidad de carbohidratos en el tallo (Eguiarte y Souza 2007; Delgado-Lemus 2008). La extracción de plantas en etapa reproductiva, elimina por completo la producción de polen y semillas (Aguirre-Dugua y Eguiarte 2013), por lo tanto, la disponibilidad de nuevos reclutas, así como el flujo génico entre poblaciones se ven afectadas. Esto disminuye la oportunidad de reproducción sexual y pone en riesgo la integridad de las poblaciones (Delgado-Lemus 2008; Rangel-Landa 2009; Torres 2009). Así, en el género *Agave*, se ha destacado la importancia de contar con elementos que permitan proponer acciones preventivas que mantengan la diversidad y estructura genética de las poblaciones silvestres (Eguiarte *et al.* 2013). Algunos estudios en especies usadas para la producción de destilados

muestran menor variación genética en cultivos y en poblaciones silvestres con aprovechamiento intensivo, comparado con poblaciones silvestres no aprovechadas (e.g. *A. angustifolia*, Sánchez-Teyer *et al.* 2009; Vargas *et al.* 2009; *A. parryi* Engelm., Parker *et al.* 2010; *A. cocui* Trel., Figueredo y Nassar 2011).

En este contexto, resulta pertinente la elaboración de estudios en los cuales se observe el estatus de las especies en cuestiones de variación y estructura genética, la cual es información útil para ser integrada en planes de conservación y aprovechamiento sustentable (Espinosa-Ocegueda *et al.* 2008; Eguiarte *et al.* 2013). Este enfoque permite evaluar los niveles de variación genética que contienen las poblaciones y cómo esta variación se encuentra distribuida dentro y entre las mismas (Hedrick, 2005). De esta manera se pueden observar patrones de genética de poblaciones que reflejan la historia demográfica en términos de los procesos evolutivos, e.g. flujo génico, selección natural, deriva génica y endogamia (Doebley 1993); así como biológicos, e.g. sistemas reproductivos, ciclo de vida, dispersión, etc., (Hamrick 1996; Duminil *et al.* 2007) y ecológicos, e.g. tamaño poblacional e interacciones bióticas que la moldean (Gaudeul *et al.* 2000; Freeland 2005). La reducción drástica en el tamaño poblacional puede detonar procesos como la deriva génica y endogamia de manera relativamente rápida, que tienen como efecto general la disminución de la diversidad y la consecuente diferenciación genética entre las poblaciones (Hartl y Clark 1997; Hedrick 2005).

Agave potatorum se distribuye desde el extremo oriental de la cuenca del río Balsas hasta el pie de monte de las sierras Mixtecas y montañas que rodean los Valles Centrales de Oaxaca, con mayor representación en la región fisiográfica del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Este valle es el área de mayor diversidad de *Agave* en México que alberga 23 especies (García-Mendoza y Galván 1995; Blancas *et al.* 2010). *A. potatorum* habita en sitios planos o con pendientes ligeras, sobre suelos arenosos derivados de rocas calizas, en un intervalo altitudinal de 1300 a 2400 msnm, en climas áridos y semiáridos (Vásquez 2006; García-Mendoza 2010).

Diversos estudios etnobotánicos y ecológicos con *Agave potatorum*, documentan el manejo *in situ* de algunas poblaciones cercanas al Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Delgado-Lemus 2008; Estrella-Ruíz 2008; Rangel-Landa 2009; Torres 2009), específicamente en el ejido de San Luis Atolotitlán, Puebla (Delgado-Lemus 2008; Torres 2008). En este ejido las poblaciones silvestres tienen un historial de aprovechamiento de aproximadamente 90 años

(Delgado- Lemus 2008) y no se conocen cultivos de esta especie. Un ejemplo de este aprovechamiento es el realizado en una población ubicada a 15 km del ejido, llamada por los lugareños el cerro de “La Cumbre” (Delgado-Lemus 2008). Anteriormente las plantas se extraían de otro cerro, situado al norte del ejido, llamado “El Machiche” pero hace aproximadamente ocho años las autoridades ejidales prohibieron su corte en la zona debido a la sobre-explotación (Delgado-Lemus 2008). Actualmente se estima que se extraen entre 1755 y 2170 plantas por año, tomando en cuenta que el rendimiento promedio es de un litro de mezcal por cada dos plantas y la producción anual oscila entre 3,510 y 4,340 litros de mezcal por año (Delgado-Lemus 2008).

Este manejo ha tenido efectos ecológicos negativos. Por un lado, se ha afectado la dinámica demográfica de manera significativa (Torres 2009), y por otro lado, la eficiencia reproductiva también se ha visto afectada en las poblaciones sobreexplotadas debido a que los polinizadores tienen preferencia por densidades poblacionales altas (al menos 12 individuos reproductivos) (Estrella-Ruíz 2008). El interés comercial por el mezcal elaborado a partir de esta especie ha tenido un incremento reciente, ya que no sólo los campesinos productores de San Luis Atolotitlán y zonas aledañas son consumidores. Además de ellos, su consumo se ha extendido a otras comunidades de la región y a otras regiones del país y del mundo, por medio de la comercialización por internet (Eguiarte y Souza 2007; Martínez-Gándara 2008). Esta situación ha sido determinante para la extinción de poblaciones locales y para la reducción sustancial de las poblaciones que aún existen (Delgado-Lemus *et al.* 2014a).

MATERIALES Y MÉTODOS

Especie de estudio

Agave potatorum pertenece al grupo *Hiemiflora* y su nombre proviene del latín *potator*, *-oris* bebedor (de vino) (García-Mendoza 2010), también es conocido comúnmente como “Papalometl”, “Papalomé”, “Maguey papalomé”, “Tobalá”, entre otros (Vásquez 2006). Es una planta perenne dispuesta en forma de rosetas pequeñas compactas a ampliamente esparcidas (Gentry 1982). Puede presentar de 30-60 (-100) hojas por roseta, de 15-35 cm de largo y de 8-10 cm ancho, ovadas, oblongas o lanceoladas, suculentas, erectas, flexibles a rígidas, planas o algo cóncavas hacia el ápice glaucas blancas a verdes (García-Mendoza 2010). Desarrolla una inflorescencia paniculada que alcanza de tres a seis metros de altura. Sus flores son amarillas,

frecuentemente de color verde claro a amarillo o con tonos verde a rojizo, su inflorescencia puede ser racemosa o paniculada con flores subsésiles, presentando alrededor de 11 racimos formados por 10 flores (Gentry 1982; Estrella-Ruíz 2008). Presenta un ovario ínfero trilocular (Estrella-Ruíz 2008). Es un organismo monocárpico, al parecer no presenta propagación vegetativa; sin embargo, de acuerdo a Delgado-Lemus (2008) se han observado “hijuelos” estoloníferos o “melcuates” (1-3), principalmente en aquellos individuos que fueron afectados por herbivoría o sometidos a otros tipos de estrés (García-Mendoza 2010). Florece entre los meses de agosto a diciembre (Gentry 1982; García-Mendoza 2010) y fructifica de noviembre a marzo (García-Mendoza 2010). Presenta flores perfectas y protandria (Gentry 1982), característica que limita la autofecundación y favorece la fecundación cruzada con otros individuos (Delgado-Lemus 2008). Su principal polinizador es el murciélago *Leptonycteris curasoae* (Ramírez-Pulido *et al.* 2005) ahora llamado *Leptonycteris yerbabuena* (Cole y Wilson 2006) y *Leptonycteris nivalis* (Saussure, 1860), aunque sus visitantes florales incluyen varias aves e insectos (*Apis mellifera*, *Bombus sp.*, *Tabanus sp.*) (Estrella 2008; Elizalde-Arellano *et al.* 2010). Tiene un ciclo de vida aproximado de 10 años, su principal forma de reproducción es la sexual y la asexual es un evento poco común, por ello exhibe alta variabilidad morfológica (Rangel-Landa 2009; Torres 2009) (Figura 1.3).

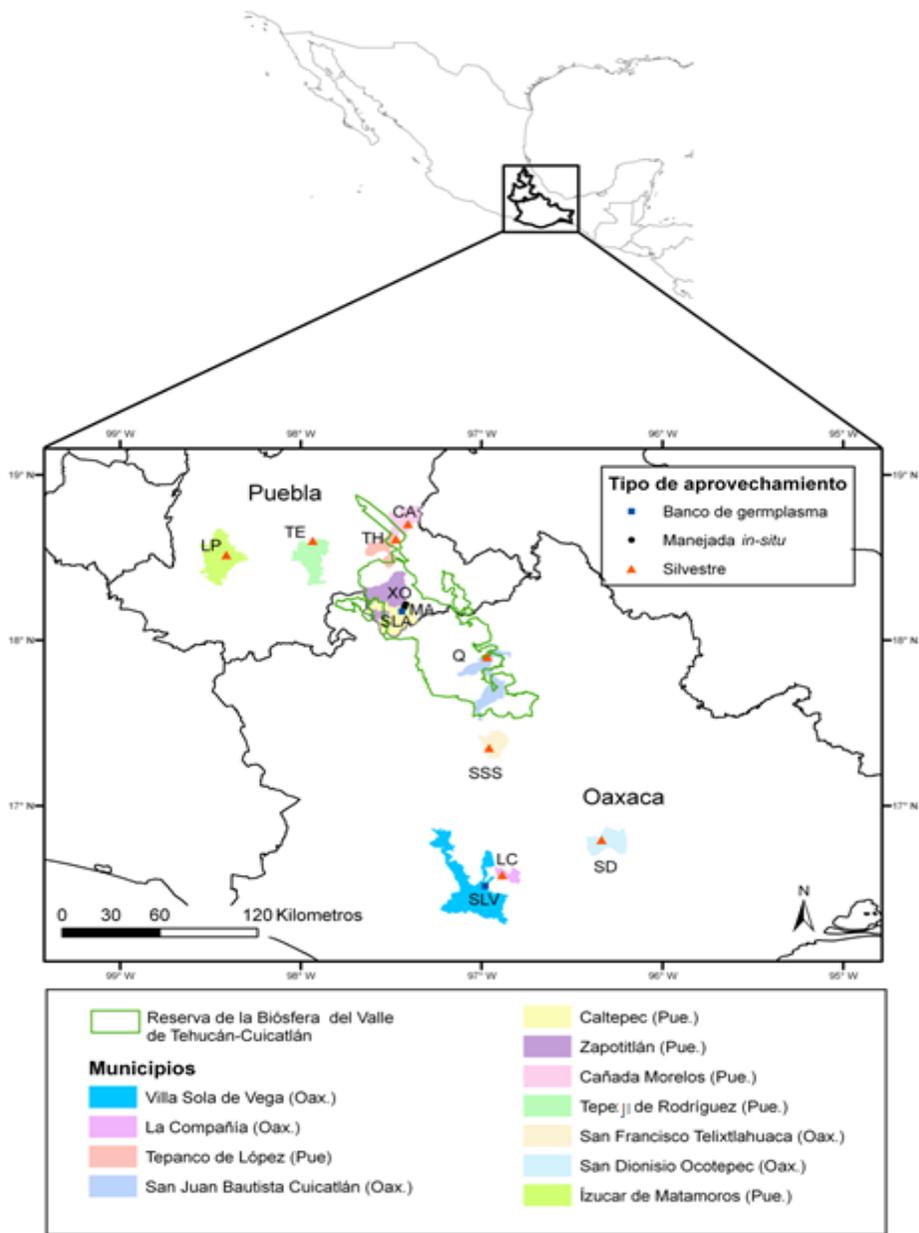


Figura 2.1. Distribución geográfica de las poblaciones estudiadas de *Agave potatorum*. TH (Tehuacán), Q (Quiotepec), MA (Machiche), LP (Las Palmas), TE (Tepeji), XO (Xochiltepec), CA (Cañada), SD (San Dionisio), LC (La Compañía), SSS (San Sebastián las Sedas), SLV (Sola de Vega) y SLA (San Luis Atolotitlán).

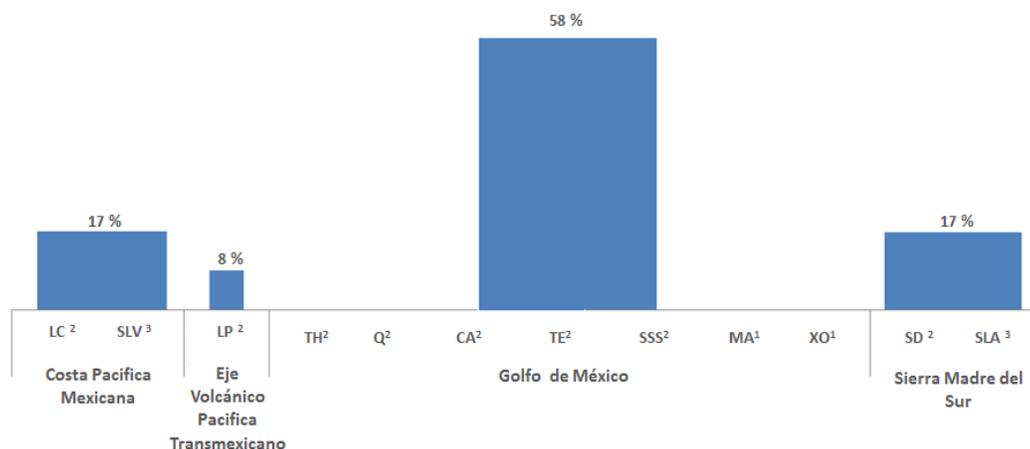
Cuadro 2.1. Nombres e información geográfica de las poblaciones de *Agave potatorum*.

Nombre de Población	Código de población	Altitud (msnm)	Estado	Municipio	Vegetación	Precipitación	Clima
Machiche	MA ¹	2305	Puebla	Caltepec	Matorral rosetófilo de <i>Dasyllirion serratifolium</i>	0-60mm	Cálido húmedo
Xochiltepec	XO ¹	2125	Puebla	Zapotitlan	Dominancia de <i>E. antisiphilitica</i>	0-60mm	Cálido húmedo
Tehuacán	TH ²	2042	Puebla	Tepango de Lopéz	Matorral roseto fillo	0-40mm	Cálido subhúmedo
Cañada	CA ²	2337	Puebla	Cañada de Morelos	Matorral Xerófilo	0-60mm	Cálido subhúmedo
Las Palmas	LP ²	1502	Puebla	Izúcar de Matamoros	Matorral Xerófilo	0-40mm	Templado subhúmedo
Tepeji	TE ²	1635	Puebla	Tepeji de Rodríguez	Matorral Xerófilo	0-60mm	Cálido subhúmedo
Quiotepec	Q ²	658	Oaxaca	San Juan Bautista Cuicatlan	Bosque tropical cauducifolio	0-40mm	Cálido subhúmedo
San Dionisio	SD ²	1715	Oaxaca	San Dionisio Ocotepc	Bosque de <i>Quercus</i> con <i>Rhus</i> , <i>Arctostaphylos</i> , <i>Dadonacea</i>	0-40mm	Semicálido subhúmedo
La Compañía	LC ²	1628	Oaxaca	La compañía	Bosque de <i>Quercus</i> con <i>Rhus</i> , <i>Vaniperus</i> , <i>Brahea</i> , <i>Cercocarpus</i>	0-60mm	Cálido subhúmedo
San Sebastián las Sedas	SSS ²	1927	Oaxaca	San Francisco Telixtlahuaca	Bosque de <i>Quercus</i> , <i>Arctostaphylos</i> , <i>Cyanothus</i> , <i>Dadonaceae</i> , <i>Lysoloma</i> , <i>Arbuthus</i>	0-60mm	Cálido húmedo
San Luis Atlotitlán	SLA ³	2000	Puebla	Caltepec	Pastizales	0-40mm	Cálido húmedo
Sola de Vega	SLV ³	1406	Oaxaca	Villa Sola de Vega	Pastizales	0-60mm	Cálido subhúmedo

¹ Silvestre sujetas a extracción, ² Silvestre sin aprovechamiento, ³ Colección de germoplasma

Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en poblaciones que representan el área completa de distribución de la especie que abarca el extremo oriental de la cuenca del río Balsas, el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, pie de monte de las sierras Mixtecas y montañas que rodean los Valles Centrales de Oaxaca (García-Mendoza 2010), ver Fig. 1.2. y 2.1. Principalmente se enfocó en la región florística del Valle Tehuacán-Cuicatlán (Rzedowski 1978), eligiendo cinco poblaciones dentro del área de la Reserva de la Biosfera y siete fuera de ella (Figura 2.1). El Valle de Tehuacán-Cuicatlán, se localiza al sur de Puebla y al norte de Oaxaca, entre 17°39' y 18°53' N y 96° 55' y 97° 44' O y con un área aproximada de 10,000 km² (Villaseñor *et al.* 1990). Su temperatura media anual es de 21 °C, una precipitación promedio de 400mm, donde predominan climas áridos y semiáridos (Villaseñor *et al.* 1990; Dávila *et al.*, 2002). El tipo de vegetación y características climáticas de las poblaciones se describen en el Cuadro 2.1. Las poblaciones estudiadas se localizan en cuatro provincias biogeográficas, una silvestre no sujeta a extracción (LP) en el Eje Volcánico Transmexicano, una silvestre también sin aprovechamiento (LC) y una colección de germoplasma (SLV) en la Costa Pacífica Mexicana, otra silvestre bajo el contexto anterior (LC) y la segunda una colección de germoplasma (SLA) se encuentran en la Sierra Madre del Sur. Por último, en la provincia del Golfo de México se encuentran siete poblaciones, las silvestres sujetas a extracción (MA y XO) y silvestres no sujetas (TH, Q, CA, TE y SSS), ver Figura 2.2.



¹ Silvestre sujetas a extracción, ² Silvestre sin aprovechamiento, ³ Colección de germoplasma.

Figura 2.2. Ubicación de las poblaciones de *A. potatorum* respecto a sus provincias biogeográficas (Morrone, 2005).

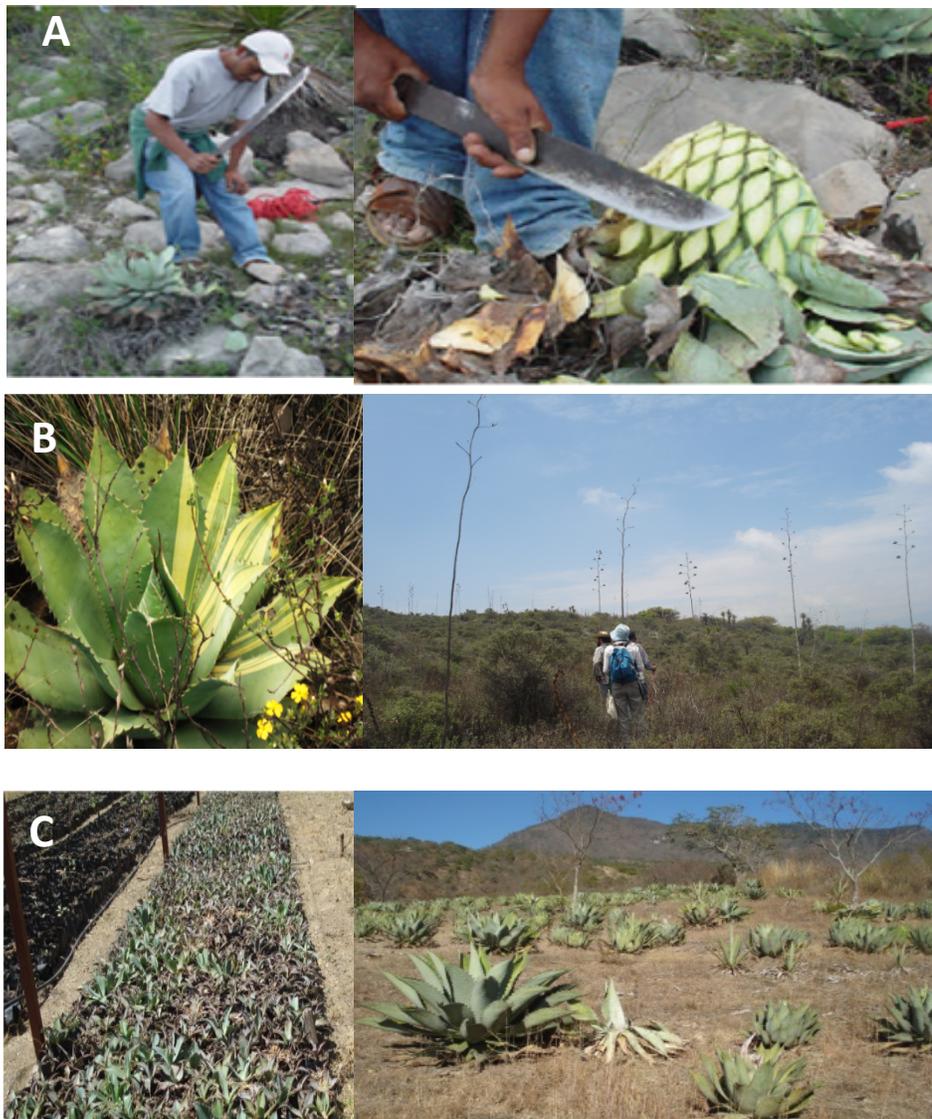


Figura 2.3. Tipos de aprovechamiento en las poblaciones estudiadas de *A. potatorum*. A. Población silvestre sujetas a extracción (foto de Edgar Pérez-Negrón en Delgado-Lemus, 2008). B. Población silvestre sin aprovechamiento. C. Poblaciones de colección de germoplasma.

Colecta de muestras

Se colectaron 240 muestras, tomando 5 cm² de la hoja más joven, que representan 20 individuos por población y un total de 12 poblaciones. Siete poblaciones proceden del estado Puebla y cinco de Oaxaca. De éstas, ocho son silvestres, esto es, no hay evidencia de su aprovechamiento, ya sea porque se encuentran en municipios no mezcaleros o porque no se ha reportado extracción de plantas en la zona. Otras dos poblaciones se encuentra sujetas a extracción para producir mezcal y dos más han sido establecidas mediante el cultivo en los sitios que denominamos aquí como colección de germoplasma. Uno ubicado en el ejido de San Luis Atlotitlán, Puebla y otro en la

cabecera municipal de Sola de Vega, Oaxaca. Según las personas responsables de ambos bancos, las plantas fueron obtenidas por medio de la recolección de semillas de origen silvestre en zonas aledañas al punto donde está establecido la colección de germoplasma. Las semillas fueron germinadas en almácigo en el invernadero y plantadas en bolsas de plástico o en suelo (Cuadro 2.1 y Figura 2.3). Las muestras de hojas para el análisis genético se etiquetaron y depositaron en bolsas con silica gel o hielo a -40°C hasta el momento de la extracción. Se registró la posición geográfica de cada población y las características de la vegetación asociada (Cuadro 2.1).

Extracción de ADN y amplificación de marcadores microsatélites por PCR

Se extrajo el ADN utilizando el protocolo de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, con algunas modificaciones para la especie de estudio (Padilla *et al.*, 2003). Posterior a ello, se hicieron diluciones de ADN a una concentración de 50-100 ng/ μl . Para la amplificación se utilizaron 7 pares de cebadores: cuatro utilizados por Lindsay *et al.* (2012), dos por Parker *et al.* (2014), y uno más diseñado para el presente estudio a partir del genoma de *A. tequilana* (Cuadro 2.2).

Los fragmentos de ADN fueron amplificados por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en una termociclador (Select Cycler, Select BioProducts). La mezcla de reacción de amplificación se ajustó a un volumen final de 12-20 μl . En general cada mezcla contenía 50-100 ng de ADN, 1 U de *Taq*polimerasa (Invitrogen y Bio Basic Inc.), 0.2 mM de cada cebador, 0.2 mM dNTP's, 2 mM de MgCl_2 ó MgSO_4 , 1X de amortiguador de reacción (Invitrogen y Bio Basic Inc.) y agua MiliQ grado molecular. También se utilizó Multiplex PCR (QIAGEN Multiplex PCR kit con TaqMan®), donde cada mezcla contenía, un volumen final de 12 μl , con 50- 100 ng de ADN, 5 μl de Multiplex PCR (QIAGEN Multiplex PCR kit con TaqMan®), 0.066 mM de cada cebador y agua MiliQ, grado molecular. La PCR se hizo bajo las siguientes condiciones, para reacciones con *Taq* polimerasa (Invitrogen y Bio Basic Inc.): un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 5 min; 35 ciclos de 3 pasos que consistieron en desnaturalización a 94°C durante 30 s, alineación a la temperatura de anclaje de cada par de cebador durante 1 min (Cuadro 2.2) y una extensión a 72°C durante 2 min, con un paso final de extensión a 72°C durante 5 min. Para las reacciones con Multiplex PCR (QIAGEN Multiplex PCR kit con TaqMan®), un paso de desnaturalización inicial a 95°C durante 15 min; 35 ciclos de 3 pasos que consistieron en desnaturalización a 94°C durante 30 s, alineación a la temperatura de anclaje de cada par de cebador durante 30 s (Cuadro 2.2) y una extensión a 72°C durante 2 min con un paso final de extensión a 60°C durante 30 min. Se utilizaron dos protocolos distintos

debido a diferencias en la calidad de ADN evaluada en las poblaciones, con calidad baja de ADN se utilizó Multiplex PCR y Taq Polimerasa para las poblaciones de mejor calidad.

Cuadro 2.2. Secuencia y características de los cebadores utilizados en *Agave potatorum*.

Locus	Ta (°C)	Secuencia del cebador (5'-3')	Motivo repetido	Tamaño aprox.(pb)				Fuente
				<i>Agave tequilana</i>	<i>Agave parryi</i>	<i>Agave palmari</i>	<i>Agave potatorum</i>	
1763	60	F:CGATCGAGGAGCTGAAGTCT R: TTCTCAGGGATGAGCCATT	(AGA) ₁₅	220	SD	SD	151-245	LANGEBIO (NO PUBLICADOS)
2F	60	F:AGCACAAGGTCGAGGAGAAG R: CGTCCTGCGAAGCTCATTAT	(CT) ₂₇	SD	260-354	SD	215-294	NO PUBLICADOS
5G	60	F: AATTCCCTTTGCAAGGCTCT R: GTGCTCGAACCTCGAAACAT	(AAG) ₆ (AG) ₆	SD	191-217	SD	190-257	NO PUBLICADOS
2-12	59	F: CGTCACCGCCAGTTAAGAG R: GTGCCCATGATCTGTGGTTG	(CT) ₇	SD	153-187	151-205	150-196	Lindsay <i>et al.</i> 2012.
3-11	59	F: TGTGGCGGCTAAAAGAAGG R: CCGATCCGGCGTAATTCTC	(AAC) ₄	SD	161-194	158-194	123-190	Lindsay <i>et al.</i> 2012.
C20	60	F:AGTTGCTGAAATCGAAGATCCG R: TCTCGTTGGATTCCGTCG	(AG) ₇	SD	214-238	204-240	164-254	Lindsay <i>et al.</i> 2012.
C28	58	F: CCTCCTGCGTAGAGGAACC R: TCTCCGTTTGAACCTCCGTG	(AAG) ₄	SD	138-195	180-192	133-209	Lindsay <i>et al.</i> 2012.

Ta: temperatura de amplificación; SD: sin datos.

Los productos de la amplificación se separaron por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida en dos condiciones; al 6% con urea 7M y 3M en Buffer TBE 1X. La concentración a 7M se utilizó en poblaciones con calidad de ADN más baja y la del 3M en poblaciones con mayor calidad de ADN. La electroforesis se realizó en una cámara de electroforesis dual (CBS Scientific) entre 210-220 Volts constantes durante 5 horas o hasta que el buffer de carga indicó una distancia de migración de aprox. 20 cm (Figura 1.1). Para la visualización de los productos de la amplificación se utilizó la técnica de tinción con nitrato de plata (Sanguinetti *et al.* 1994).

Análisis de datos

Se utilizó un sistema de fotodocumentación digital (Gel Logic 100, Kodak) para analizar los patrones de bandeo resueltos en las imágenes de los geles. Las imágenes incluyeron una columna de referencia de marcador de peso molecular (100 pares de bases, Invitrogen y Bio Basic Inc) para estimar el tamaño en pares de bases de cada una de las bandas. Los fragmentos amplificados se documentaron usando el programa Phoretix 1D v10 (Total lab Ltd.). Se construyó con los datos obtenidos una matriz de tipo codominante con los genotipos de cada individuo. Los análisis de diversidad, diferenciación, estructura y similitud genética se hicieron en tres niveles: a)

especie, en la que se agrupan las 12 poblaciones estudiadas, b) por categoría de aprovechamiento: silvestres sujetas a extracción, silvestres no sujetas a extracción, colección de germoplasma (Cuadro 2.1 y Figura 2.3) y c) por población.

Diversidad genética

La diversidad genética se estimó a través de los siguientes parámetros: i) porcentaje de loci polimórficos (P); ii) número promedio de alelos por locus (n); iii) número efectivo de alelos por locus (A_e); iv) heterocigosidad observada (H_o) y heterocigosidad esperada (H_e) según Nei (1978); v) Riqueza alélica para tamaños de muestra desiguales (Kalinowski 2004); vi) alelos únicos, (Smith y Grassle 1977; Raymond y Rousset 1995ab; Kalinowski 2004); vii) . También se realizó la prueba del equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) para evaluar posibles desviaciones a este modelo y la prueba de U de Mann-Whitney para evaluar si hay diferencias significativas en la diversidad genética entre los tipos de aprovechamiento (Hilbe 2007). Los programas utilizados fueron: TFGA v. 1.3 (Miller 2000), Arlequin v. 3.5 (Excoffier y Lischer 2010), PopGene v. 1.31 (Yeh *et al.* 1999), Statistica v. 12 (Hilbe 2007; StatSoft, Inc., 2013), Genepop v. 1.2 (Raymond y Rousset 1995ab), Sigma Plot v.11 y HP-RARE 1.0 (Kalinowski 2005).

Diferenciación y estructura genética

Los parámetros de diferenciación y estructura genética fueron evaluados con: i) índice de diferenciación (F_{ST}) de Wright (1951), también llamado θ ; con 10000 réplicas de muestreo con reemplazo para generar un intervalo de confianza (IC) del 95% (Felsenstein 1985); ii) Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para estimar la estructura genética mediante el coeficiente Φ_{st} , análogo al índice de diferenciación F_{ST} ; iii) prueba no paramétrica de probabilidad combinada de Fisher o prueba de exactitud, el cual proporciona una aproximación a la probabilidad de diferenciación interpoblacional (F_{ST}) a través de las diferencias observadas en las frecuencias alélicas (Raymond y Rousset 1995a); iv) análisis bayesiano de asignación de individuos; para ello se asumió que las poblaciones analizadas pudieran haber estado agrupadas (K) entre 1 y 12 poblaciones, el análisis se corrió 10 veces por valor de K, utilizando los parámetros recomendados por defecto como 50^4 periodos de verificación (Burn-in) y 10^6 repeticiones de la cadena de Markov (MCMC y la opción de posible mezcla entre individuos de las poblaciones). La K más probable se identificó usando el valor máximo de ΔK (Evanno *et al.*

2005); y v) análisis de endogamia dentro de las poblaciones (F_{IS}) y en el conjunto completo (F_{IT}). Se aplicó una prueba de X^2 para saber si los estadísticos F son distintos de cero (Wright 1931; Workman y Niswander 1970; Weir 1990). Los parámetros fueron obtenidos con los programas TFPGA v. 1.3 (Miller 2000), Arlequin v. 3.5 (Excoffier y Lischer 2010), Structure v. 2.3.4 (Pritchard *et al.* 2010), Genalex 6.5 (Peakall y Smouse 2005) y Structure Harvester (Earl *et al.* 2012, <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>).

Similitud genética

La similitud genética se estimó por medio de la distancia genética de Nei (D_{xy}) (1972) entre las poblaciones. Además, se representaron gráficamente con un análisis de clasificación y el método del grupo promedio con media aritmética no ponderada (UPGMA). Para obtener valores de soporte se aplicó un muestreo con remplazo (bootstrapping) y 999 permutaciones (Hedrick 2005). Por último, se realizó una prueba de Mantel (1967) para el cálculo de aislamiento por distancia. Los parámetros fueron obtenidos en el programa TFPGA v. 1.3 (Miller 2000).

RESULTADOS

En total se evaluaron 232 individuos, en promedio (N) 17 individuos por población (Cuadro 2.3 y 2.4). Se identificó un total de 102 alelos, de los cuales 18 fueron amplificados con el cebador 2F, 13 con el cebador 5G, 13 con el cebador 3-11, 13 con el cebador 2-12, 18 con el cebador C20, 11 con el cebador C28 y 16 con el cebador 1763 (Cuadro 2.3). Se encontraron 37 alelos únicos repartidos entre las 12 poblaciones. El tamaño de los alelos varió de 123 a 294 pares de bases (Cuadro 2.2 y 2.3).

Cuadro 2.3. Tamaños y número de alelos observados de 7 loci microsatélites en poblaciones de *Agave potatorum*.

Microsatélite	2F		5G		2-12		3-11		C20		C28		1763	
CODIGO DE POBLACIÓN	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N	T	N
MA ¹	215-290	6	231-243	3	178-188	4	139-151	3	228-250	3	181-190	3	157-177	4
XO ¹	270-290	2	239-254	4	150	1	143-160	3	210-228	3	133-175	2	163-221	4
TH ²	215-226	2	190-211	3	167-196	6	128-147	3	172-181	2	197-202	2	203-227	5
CA ²	220-256	5	239-243	2	175-192	4	139-155	3	236-254	4	181-190	3	163-177	3
LP ²	230-250	4	217	1	182-200	4	175-190	2	224-232	2	181-201	4	163-177	2
TE ²	246-263	3	235-247	4	175-192	4	139-151	4	240-254	3	185-209	5	155-173	4
Q ²	220-234	4	235-257	6	155-182	3	163	1	218-236	5	163-201	4	227	1
SD ²	274-290	3	239-250	5	182-200	4	139-151	3	232-250	3	185-197	3	151-163	4
LC ²	230-250	3	231-250	4	178-192	5	139-147	2	186-246	4	175-190	5	165-163	4
SSS ²	266-294	4	231-247	5	178-188	3	123-147	3	236-246	3	181-190	3	163-245	3
SLA ³	230-250	3	231-247	4	172-192	4	169-175	2	164-178	2	175-190	5	227-231	2
SLV ³	226-250	5	227-247	5	178-188	4	169-181	3	178-198	4	185-209	4	177-245	3
TA	44		46		46		32		38		43		39	
TP	215-294		190-257		150-196		123-190		164-254		133-209		151-245	
TA_e	18		13		13		13		18		11		16	

T= rango de tamaño de alelos, N=número de alelos observados, TA= total de alelos observados, TP= rango del tamaño promedio de los alelos, TA_e = número de alelos efectivo por locus. ¹Silvestre sujetas a extracción, ² Silvestre sin aprovechamiento, ³ Colección de germoplasma

Cuadro 2.4. Diversidad genética de 12 poblaciones de *Agave potatorum*.

Número ^a	Código	N	n	A _e	H _o	H _e	P	R _{Ar}	R _{Ur}	EHW	
										+	-
1	MA ¹	18	3.71	2.76	0.31	0.62	100	3.53	0.04	0	4
2	XO ¹	17	3.00	1.82	0.35	0.41	86	2.52	0.8	0	3
3	TH ²	15	3.28	2.39	0.36	0.54	100	2.97	1.44	0	2
4	CA ²	17	3.42	2.62	0.46	0.58	100	3.33	0.17	0	1
5	LP ²	17	3.00	1.90	0.35	0.36	86	2.59	0.26	0	1
6	TE ²	16	3.85	2.75	0.46	0.64	100	3.69	0.01	0	3
7	Q ²	17	4.40	2.47	0.44	0.46	71	3.15	0.66	0	3
8	SD ²	16	3.57	2.36	0.42	0.58	100	3.43	0.29	0	1
9	LC ²	16	3.85	3.03	0.44	0.64	100	3.74	0.01	0	4
10	SSS ²	17	3.42	2.66	0.41	0.63	100	3.3	0.5	0	3
11	SLA ³	16	3.14	2.48	0.42	0.55	100	3.06	0.65	0	1
12	SLV ³	18	4.00	2.77	0.44	0.58	100	3.7	0.44	0	1
Condición de aprovechamiento											
					H _o	H _i	P				
	Silvestres sujetas a extracción	40	5.28	3.57	0.34	0.72	100	4.62	1.72	0	7
	Silvestres sin aprovechamiento	156	12.28	7.88	0.41	0.87	100	8.02	4.06	0	18
	Colección de germoplasma	36	5.42	3.60	0.43	0.69	100	4.61	1.8	0	2
Acervo total											
					H _o	H _T	P				
	<i>Agave potatorum</i>	232	14.57	9.14	0.40	0.88	100			0	33

^aCódigo numérico de la población, N = Número de individuos por población, n = número de alelos promedio por locus, A_e = número efectivo de alelos por locus, H_o = Heterocigosidad observada, H_e = Heterocigosidad esperada, P = porcentaje de loci polimórficos, H_T = heterocigosidad esperada total del acervo, H_i = heterocigosidad esperada total por categoría, EHW = Prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg (+=positivamente diferente, -=negativamente diferente). R_{Ar} = media del número de alelos observados estimados por rarefacción, R_{Ur} = media del número de alelos únicos estimados por rarefacción. ¹ Silvestre sujetas a extracción, ² Silvestre sin aprovechamiento, ³ Colección de germoplasma.

Diversidad genética

El porcentaje de loci polimórficos para el acervo total y para cada una de las categorías de manejo fue de 100%. Ocho de las 12 poblaciones individuales presentaron el 100% de loci polimórficos y otras tres mostraron niveles menores de polimorfismo, la silvestre sujeta a extracción XO (86%) y las silvestres no sujetas a extracción LP (86 %) y Q (71%) (Cuadro 2.4).

El número promedio de alelos por locus para el acervo de *Agave potatorum* fue $n = 14.57$. Los valores promedio de este parámetro por categoría de aprovechamiento fueron $n = 5.28$ para las poblaciones silvestres sujetas a extracción, $n = 12.28$ para las silvestres no sujetas a extracción y $n = 5.42$ para los colección de germoplasma. Los valores promedios de n por cada población individual fluctuaron de $n = 3.00$ (XO) hasta $n = 4.40$ (Q). El estimador del número efectivo de alelos por locus en el acervo total indicó un valor de $A_e = 9.14$. El de A_e correspondiente a las poblaciones sujetas a extracción fue de $A_e = 3.57$, para las silvestres sin aprovechamiento de $A_e = 7.88$ y para los colección de germoplasma de $A_e = 3.60$. Este valor varió de $A_e = 1.82$ (XO) a $A_e = 3.03$ (LC) entre las 12 poblaciones (Cuadro 2.4).

La heterocigosidad observada para el acervo total fue $H_o = 0.40$, para el acervo sujeto a extracción de $H_o = 0.34$, para las silvestres no sujetas a extracción de $H_o = 0.41$ y para el colección de germoplasma de $H_o = 0.43$. Dentro de las 12 poblaciones los valores de H_o oscilaron entre $H_o = 0.31$ a 0.46 . La población sujeta a extracción (MA) mostró el valor más bajo y el más alto fue para la silvestre no sujeta a extracción (CA). Así mismo, la heterocigosidad esperada (Nei, 1978) en el total de las poblaciones fue $H_T = 0.88$. Los valores de heterocigosidad esperada por categoría de aprovechamiento fueron $H_i = 0.34$ en las sujetas a aprovechamiento, $H_i = 0.42$ en las silvestres no sujetas a extracción y $H_i = 0.43$ en los colección de germoplasma. Los valores de H_e para las 12 poblaciones fluctuaron de $H_e = 0.35$ a 0.64 , resultando el valor más bajo y el más alto en poblaciones silvestres (LP y TE, respectivamente), ambas en el estado de Oaxaca (Cuadro 2.4).

De acuerdo a la prueba U de Mann-Whitney, no existen diferencias significativas entre los acervos categorizados por tipo de aprovechamiento (banco, extracción, y no extracción) ($p < 0.05$) en todos los parámetros de diversidad evaluados (n , A_e , R_{Ar} , R_{Ur} , H_e , H_o y P). Se muestra

en la Figura 2.4 y Cuadro 2.5, que las poblaciones con los valores más bajos de riqueza alélica y alelos únicos son una población silvestre sin aprovechamiento (LP) y una población sujeta a extracción (XO)

Cuadro 2.5. Datos de riqueza genética y prueba de rarefacción en 12 poblaciones de *Agave potatorum*.

Códigos	R_A			R_U		
	n_T	A_M	A_{MR}	n_T	A_M	A_{MR}
MA ¹	26	3.71	3.53	1	0.14	0.04
XO ¹	19	2.71	2.52	6	0.85	0.8
TH ²	23	3.28	2.97	11	1.57	1.44
CA ²	24	3.42	3.33	1	0.14	0.17
LP ²	19	2.71	2.59	2	0.28	0.26
TE ²	27	3.85	3.69	0	0	0.01
Q ²	24	3.42	3.15	3	0.42	0.66
SD ²	25	3.57	3.43	2	0.28	0.29
LC ²	27	3.85	3.74	0	0	0.01
SSS ²	24	3.42	3.3	5	0.71	0.5
SLA ³	22	3.14	3.06	4	0.57	0.65
SLV ³	28	4	3.7	3	0.42	0.44
Total	288			38		

¹ Silvestre sujetas a extracción, ² Silvestre sin aprovechamiento, ³ Colección de germoplasma

n_T = número de alelos observados por locus. R_A = Riqueza alélica, R_U = Riqueza de alelos únicos, A_T = Total de número de alelos observados y alelos únicos, A_M = Media del número de alelos observados y alelos únicos por locus estimados, A_{MR} = Media del número de alelos observados y alelos únicos por locus estimados por rarefacción.

Por otra parte, la prueba del equilibrio de Hardy-Weinberg (*EHW*) detectó deficiencia de heterocigotos en algunos loci en las 12 poblaciones (Cuadro 2.6). Los loci con mayor desviación bajo la prueba *EHW* fueron el 2F, 5G y 2-12, en contraste con los loci C28, 2-11, C20, C28 y 1763 que se encuentran en equilibrio, excepto para el loci 1763 en la población “XO” (ver Cuadro 2.6). Las poblaciones silvestres sin aprovechamiento CA, LP y SD tienen la mayoría de sus loci en *EHW* (Cuadro 2.6) mientras que las poblaciones con mayor número de loci en desequilibrio fueron una bajo extracción (MA, 4 loci) y una silvestre no sujeta a extracción (LC, 4 loci), ambas del estado de Puebla.

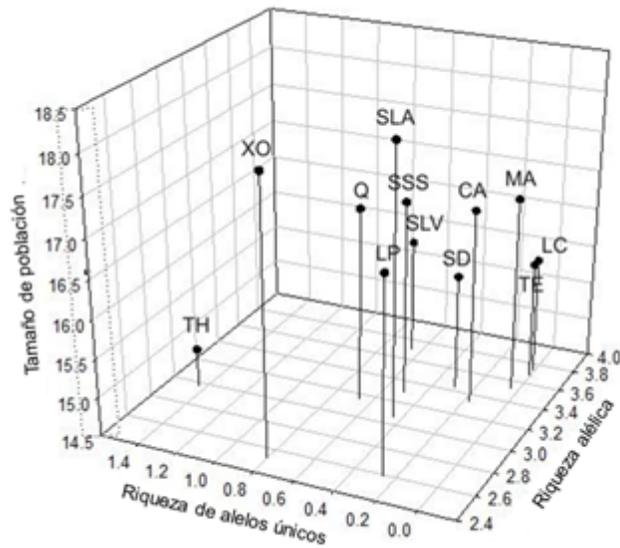


Figura 2.4. Representación tridimensional del tamaño por población, riqueza alélica y número de alelos únicos (estos últimos datos estimados por rarefacción) en 12 poblaciones de *A. potatorum*.

Cuadro 2.6. Prueba de equilibrio de Hardy-Weinberg (*EHW*) en 7 loci microsatélites en *Agave potatorum*

Código	P-val						
	Microsatélite						
	2F	5G	2-12	3-11	C20	C28	1763
MA ¹	0.0057	0.0000	0.0000	0.3786*	0.3025*	0.0114*	0.3921*
XO ¹	1.0000*	1.0000*	0.0001	N/A	1.0000*	0.0279	0.0540
TH ²	0.0001	1.0000*	0.0016	0.0581*	0.1707*	0.5427*	1.0000*
CA ²	0.6085*	0.1789*	0.5377*	0.3786*	0.1605*	0.0031	0.2804*
LP ²	0.2160*	N/A	1.0000*	0.6244*	1.0000*	0.3698*	1.0000*
TE ²	0.0490	0.0041	1.0000*	0.0738*	0.0000	0.0989*	0.0525*
Q ²	0.1510*	1.0000*	N/A	0.0336	0.6388*	0.1550*	N/A
SD ²	0.0581*	1.0000*	0.3698*	0.6244*	0.2604*	0.0413	0.1707*
LC ²	0.0017	0.0108	0.0143	0.5593*	0.0054	1.0000*	0.1534*
SSS ²	0.0121	0.0403	0.6035*	0.0021	0.6244*	0.6148*	0.1387*
SLA ³	0.2672*	0.0020	0.0044	0.3280*	0.2031*	0.2604*	0.5778*
SLV ³	0.0196	0.0738*	0.2727*	0.3109*	0.6244*	0.0469*	0.2727*

* Loci en Equilibrio de Hardy-Weinberg, $P > 0.05$; N/A = se observó solo un alelo por locus. ¹ Silvestre sujetas a extracción, ² Silvestre sin aprovechamiento, ³ Colección de germoplasma.

Diferenciación y estructura genética

El valor de diferenciación estimado según el coeficiente F_{ST} de Wright (1951) entre las 12 poblaciones de *Agave potatorum* fue de $\theta = 0.39$ ($p < 0.05$, Cuadro 2.10). La comparación pareada mostró la mayor estructura entre MA (M) y LP (S) ($\Phi_{PT} = 0.575$; $p < 0.001$), y la menor entre LC (S) y SSS (S) ($\Phi_{PT} = 0.178$; $p < 0.001$), ver Cuadro 2.8. El número de inmigrantes (N_m) promedio registrado para el acervo total fue de 0.39. En lo que respecta a las categorías establecidas, se observó que los valores de F_{ST} en acervo sujeto a extracción son $\theta = 0.32$, acervo silvestre sin aprovechamiento $\theta = 0.29$ y colección de germoplasma $\theta = 0.23$ (Cuadro 2.7)

Cuadro 2.7. Valores de estructuración genética mediante Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de 12 poblaciones de *Agave potatorum*.

En el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), se encontró que un 61% de variación

AMOVA						
Excoffier <i>et al.</i> (1992)						
Fuente	SC	g. l.	CV	MC	% V	Valores de Φ
Dentro de las poblaciones	1419.03	220	1.93	6.45	61	0.38* Φ_{PT}
Entre poblaciones	710.92	9	1.23	78.99	36	0.36* Φ_{PR}
Entre categorías de aprovechamiento	190.95	2	0.05	95.47	3	0.02* Φ_{RT}
Acervo total						0.39* Φ_{ST}
Dentro del acervo o categoría de aprovechamiento						
Silvestres sujetas a extracción						0.32* F_{ST}
Silvestres sin aprovechamiento						0.29* F_{ST}
Colección de germoplasma						0.23* F_{ST}

SC= suma de cuadrados, MC=medios cuadrados g. l.= grados de libertad, CV= componentes de la varianza, %V= porcentaje de variación, Φ_{RT} Φ_{PR} Φ_{PT} = valores de estructuración en las poblaciones. Φ_{ST} =0.010, * $p < 0.001$. F_{ST} = valores de diferenciación, * $p < 0.05$.

genética se encuentra dentro de las poblaciones, un valor de 36% entre poblaciones mientras que entre las categorías de manejo un 3.00%. Esta estructura genética en los tres niveles analizados resultó significativa ($p < 0.001$; Cuadro 2.7). Por otro lado se obtuvieron en todas las poblaciones valores significativos de endogamia en todos los loci tanto del conjunto total de poblaciones $F_{IT} = 0.55$, como del interior de ellas, $F_{IS} = 0.26$ (Cuadro 2.10).

La prueba de exactitud (Raymond y Rousset, 1995a) aplicada sobre la totalidad de los loci examinados en las 12 poblaciones indican que existen diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre pares de poblaciones (F_{ST}) con un nivel de confianza del 95 % ($p < 0.05$).

Cuadro 2.8. Valores de Φ_{PT} entre pares de poblaciones de *Agave potatorum*, distribuidas en los estados de Oaxaca y Puebla, México. Diagonal superior, valores de significancia.

Código	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MA ²	0.000	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
XO ²	0.382	0.000	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
TH ¹	0.459	0.358	0.000	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
CA ¹	0.397	0.249	0.386	0.000	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
LP ¹	0.575	0.509	0.550	0.532	0.000	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
TE ¹	0.397	0.230	0.355	0.284	0.487	0.000	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
Q ¹	0.470	0.375	0.412	0.375	0.553	0.388	0.000	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010
SD ¹	0.391	0.198	0.374	0.296	0.492	0.255	0.377	0.000	0.010	0.010	0.010	0.010
LC ¹	0.366	0.189	0.315	0.212	0.460	0.217	0.336	0.227	0.000	0.010	0.010	0.010
SSS ¹	0.423	0.250	0.379	0.288	0.526	0.320	0.397	0.313	0.178	0.000	0.010	0.010
SLA ³	0.459	0.332	0.408	0.378	0.497	0.347	0.395	0.355	0.275	0.356	0.000	0.010
SLV ³	0.515	0.358	0.448	0.416	0.533	0.376	0.468	0.404	0.338	0.315	0.318	0.000

¹Silvestre sujetas a extracción, ² Silvestre sin aprovechamiento, ³ Colección de germoplasma. $p > 0.001$

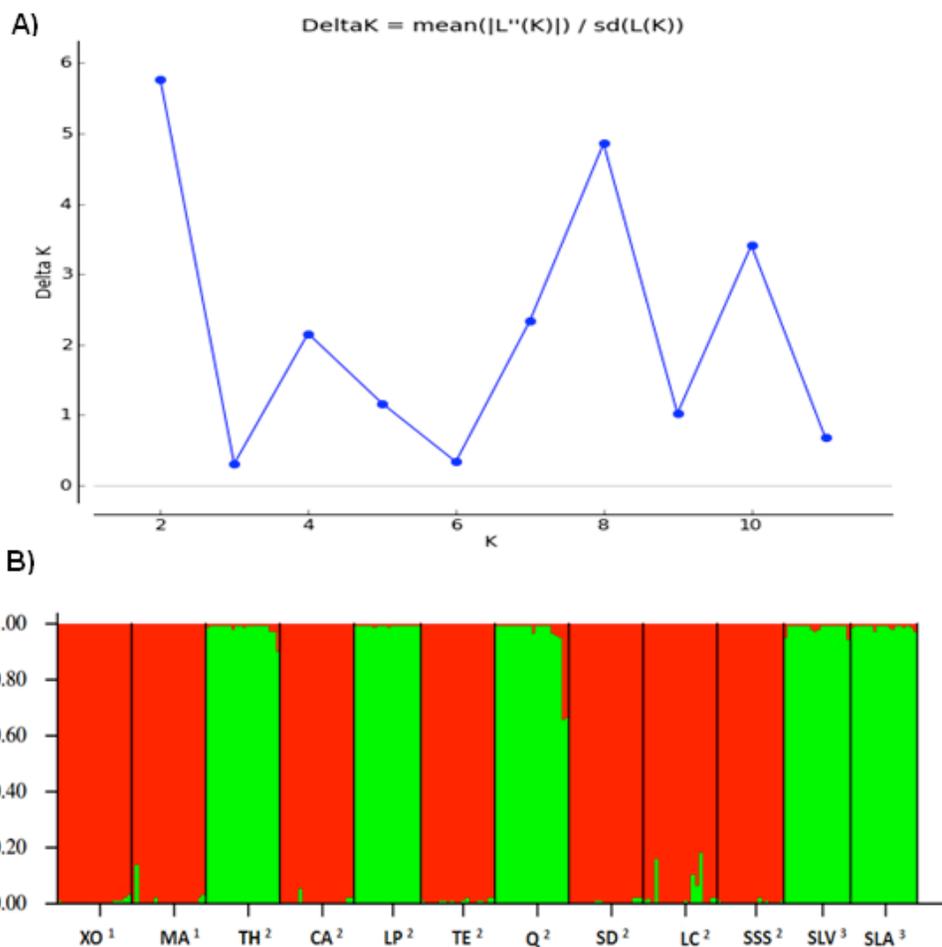
El análisis bayesiano de asignación de individuos, mostró la existencia de 2 grupos genéticos dentro de las 12 poblaciones estudiadas (Figura 2.5). El primer grupo se compone de siete poblaciones, las dos silvestres sujetas a extracción (XO, MA) y cinco silvestres sin aprovechamiento (CA, TE, SD, LC y SSS), en donde los valores de ancestría (q) oscilan de 0.956 a 0.988. El segundo grupo se integró por tres poblaciones silvestres (TH, Q y LP) y las dos de

colección de germoplasma (SLA y SLV), los valores de ancestría (q) oscilan de 0.961-0.991(Cuadro 2.9 y Figura 2.5). En detalle se aprecia que aun cuando los valores de ancestría son altos, ninguna población se comporta como una población pura, ya que no están conformadas por una proporción de haplotipos pertenecientes a la misma población al 100 %, ($q < 1$). La población LP perteneciente al acervo silvestre no sujeto a aprovechamiento muestra el valor más alto de ancestría ($q = 0.994$; grupo genético 2), seguida por una población del colección de germoplasma SLV ($q = 0.991$; grupo genético 2) y las dos poblaciones sujetas a extracción (MA, $q = 0.976$ y XO $q = 0.975$; grupo genético 1; Cuadro 2.9 y Figura 2.5).

Cuadro 2.9. Proporción de ancestría estimada (q) para las 12 poblaciones de *Agave potatorum* (Evanno et al.2005).

Código	Grupo genético	
	1	2
MA ¹	0.976	0.024
XO ¹	0.975	0.025
TH ²	0.010	0.990
CA ²	0.979	0.021
LP ²	0.006	0.994
TE ²	0.978	0.022
Q ²	0.039	0.961
SD ²	0.976	0.024
LC ²	0.956	0.044
SSS ²	0.988	0.012
SLA ³	0.014	0.986
SLV ³	0.009	0.991

¹ Silvestre sujetas a extracción, ² Silvestre sin aprovechamiento, ³ Colección de germoplasma



¹ Silvestre sujetas a extracción, ² Silvestre sin aprovechamiento, ³ Colección de germoplasma.

Figura 2.54. Estimación de grupos genéticos derivados de la estructura genética en *Agave potatorum*. A) Evaluación generada por el método de Evanno *et al.* (2005) y B) Patrones de estructura genética obtenida con $K=2$ (cada individuo está representado por una línea vertical con segmentos proporcionalmente a la ancestría del individuo a cada uno de los 2 grupos genéticos).

Cuadro 2.10. Estadísticos de endogamia en el conjunto de poblaciones (F_{IT}), dentro de cada población (F_{IS}) y entre las poblaciones $F_{ST}(\theta)$ por locus para *Agave potatorum*.

Loci	Estadísticos F		
	F_{IT}	$F_{ST}(\theta)$	F_{IS}
2F	0.5492	0.3912	0.2596
5G	0.5558	0.3992	0.2607
3-11	0.5270	0.3664	0.2535
2-12	0.5825	0.4088	0.2939
C20	0.5463	0.3771	0.2716
C28	0.5628	0.4071	0.2626
1763	0.5451	0.3734	0.2741
Promedio	0.5529	0.3893	0.2672
IC Superior	0.6227	0.4645	0.3176
IC Inferior	0.4829	0.3196	0.2120

P<0.05 significativo (prueba X^2)

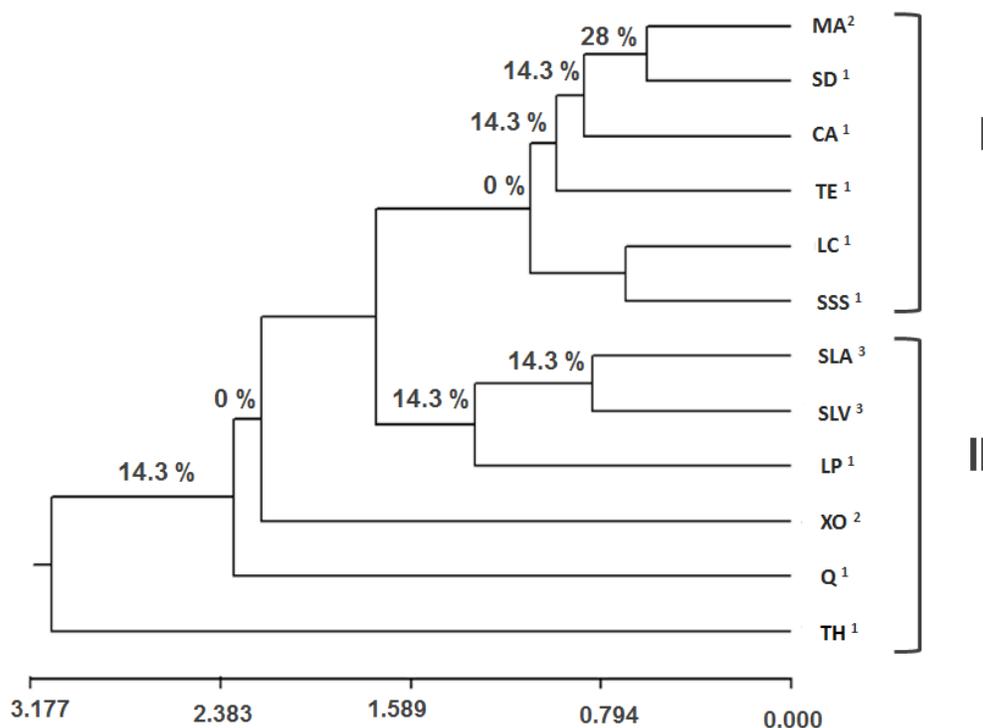
Similitud genética

La identidad genética (Nei 1972) en el acervo total de *Agave potatorum* varió de 0.001 a 0.548. De acuerdo a su aprovechamiento se observó que en las poblaciones sujetas a extracción los valores oscilaron entre 0.012 y 0.548. Entre las poblaciones silvestres no sujetas a extracción los valores de identidad fueron los mismos que en el acervo total (0.001 a 0.548) y en las de la colección de germoplasma variaron entre 0.012 y 0.435. La distancia genética D (Nei 1972) entre las 12 poblaciones fluctuó de 0.601 a 6.334. En las poblaciones sujetas a extracción los valores variaron de 0.601 a 2.992. En las silvestres sin aprovechamiento oscilaron entre $D = 0.690$ y 6.334 y en los colección de germoplasma entre $D = 0.845$ y 3.599 (Cuadro 2.11).

Cuadro 2.11. Matriz de identidad genética (*I*, debajo de la diagonal) y distancia genética (*D*, encima de la diagonal) entre las poblaciones de *Agave potatorum* según Nei (1972).

Código	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MA ¹	*****	1.329	0.958	1.567	2.513	1.907	1.398	2.372	1.109	0.953	2.798	2.992
XO ¹	0.163	*****	1.009	1.845	2.675	1.760	1.407	1.360	0.976	0.601	1.028	2.842
TH ²	0.052	0.001	*****	0.690	2.419	1.497	1.876	4.395	1.959	1.468	1.512	2.777
CA ²	0.469	0.193	0.027	*****	2.604	1.326	2.109	2.017	0.841	0.795	0.946	2.613
LP ²	0.061	0.160	0.089	0.124	*****	0.831	1.771	2.590	1.843	2.301	1.649	2.455
TE ²	0.429	0.129	0.122	0.317	0.153	*****	2.193	2.507	1.933	1.646	1.302	3.016
Q ²	0.100	0.075	0.085	0.158	0.121	0.060	*****	1.832	2.083	2.787	1.245	2.409
SD ²	0.548	0.256	0.058	0.376	0.244	0.388	0.089	*****	1.640	1.813	2.045	6.334
LC ²	0.451	0.133	0.073	0.431	0.170	0.357	0.081	0.364	*****	0.756	1.148	3.599
SSS ²	0.385	0.093	0.050	0.329	0.111	0.192	0.073	0.264	0.501	*****	0.845	2.957
SLA ³	0.192	0.081	0.049	0.144	0.247	0.220	0.223	0.148	0.265	0.171	*****	2.096
SLV ³	0.230	0.012	0.062	0.141	0.287	0.271	0.068	0.157	0.208	0.383	0.435	*****

¹ Silvestre sujetas a extracción, ² Silvestre sin aprovechamiento, ³ Colección de germoplasma.



¹ Silvestre sujetas a extracción, ² Silvestre sin aprovechamiento, ³ Colección de germoplasma

Figura 2.6. Fenograma con base en distancias genéticas de Nei (1972) entre poblaciones de *Agave potatorum*.

El análisis de agrupación generó dos grupos (I y II) con una distancia de corte de 3.09 y un valor de soporte de remuestreo (bootstrap) de 100 % (Figura 2.6). El grupo I se formó a una distancia de corte de 0.83, cinco silvestres sin aprovechamiento TE y CA de Puebla), tres SD, LC, SSS de Oaxaca y la sujeta a extracción (MA, Puebla). El segundo (II) incluyó las seis poblaciones restantes, tres de ellas silvestres no sujetas a aprovechamiento TH, Q y LP (todas del estado de Puebla), las dos de la colección de germoplasma (SLV y SLA, uno de cada estado) y una sujeta a aprovechamiento (XO, Puebla). Por otro lado, la prueba de Mantel, indicó que no existe una correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas para el conjunto total de poblaciones ($r = 0.37$, $p = 1.00$; Cuadro 2.12).

Cuadro 2.12. Matriz de distancia geográfica (debajo de la diagonal, representada en km) y distancia genética (encima de la diagonal) entre las 12 poblaciones de *Agave potatorum* (Mantel, 1967; Sokal, 1979).

Código	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MA ¹	*****	1.329	0.958	1.567	2.513	1.907	1.398	2.372	1.109	0.953	2.798	2.992
XO ¹	2.16	*****	1.009	1.845	2.675	1.76	1.407	1.36	0.976	0.601	1.028	2.842
TH ²	48.49	43.94	*****	0.69	2.419	1.497	1.876	4.395	1.959	1.468	1.512	2.777
CA ²	58.64	53.22	12.47	*****	2.604	1.326	2.109	2.017	0.841	0.795	0.946	2.613
LP ²	109.35	109.75	98.74	107.76	*****	0.831	1.771	2.59	1.843	2.301	1.649	2.455
TE ²	70.06	68.77	48.78	56.7	51.07	*****	2.193	2.507	1.933	1.646	1.302	3.016
Q ²	58.65	59.15	95.38	100.45	167.39	128.33	*****	1.832	2.083	2.787	1.245	2.409
SD ²	193.26	199.03	230.94	240.23	291.62	262.53	139.59	*****	1.64	1.813	2.045	6.334
LC ²	184.98	192.88	236.89	242.27	268.28	248.22	145.88	63.22	*****	0.756	1.148	3.599
SSS ²	103.83	106.42	147.63	156.05	201.21	173.38	61.16	90.28	85.74	*****	0.845	2.957
SLA ³	3.33	5.41	45.34	55.75	109.64	69.62	58.51	191.62	183.06	103.43	*****	2.096
SLV ³	189.98	201.15	237.35	246.67	267.91	252.06	152.32	76.51	12.42	92.37	189.34	*****

¹ Silvestre sujetas a extracción, ² Silvestre sin aprovechamiento, ³ Colección de germoplasma.

DISCUSIÓN

Diversidad genética

- **La acción de los factores biológicos y ecológicos en la diversidad genética de *Agave potatorum***

En *Agave potatorum* los valores de diversidad genética son de medios a altos ($P= 100$, $A_e= 14.67$, H_o 0.31 a 0.46 y H_e 0.36 a 0.64) congruentes con lo que se ha reportado en especies congéneres evaluadas con el mismo tipo de marcador. Estudios con microsatélites en *Agave* son pocos y el presente estudio se suma a esta corta lista. En poblaciones de *Agave parryi* del suroeste de EUA, de sistema reproductivo tanto sexual como vegetativo, se reportan valores de $P = 100\%$ y $H_e=0.62$ (Parker *et al.*, 2010). En otras dos poblaciones de esta misma especie Linsday *et al.* (2012) reporta valores que variaron de $H_e = 0.118-0.842$. Para *A. palmeri* de sistema reproductivo autoincompatible los valores reportados son ligeramente superiores $H_e = 0.209-0.871$ a *A. potatorum* aunque con un muestreo menos representativo de sólo dos poblaciones y pocos individuos (Linsday *et al.* 2012). Para *A. utahensis*, se reportan valores más bajo en dos subespecies de reproducción predominantemente asexual, *A. utahensis* subsp. *utahensis* $H_e = 0.49$ y *A. utahensis* subsp. *kaibabensis* $H_e = 0.408$ (Byers *et al.* 2014).

Otro estudio con microsatélites en *Yucca brevifolia*, planta perteneciente a las familia Asparagaceae (Chase *et al.* 2009) con poblaciones ubicadas en el desierto de Mojave en el suroeste de California, Nevada, Utah y Arizona se observaron valores de heterocigosidad superiores a los encontrados en *A. potatorum* (*Y. brevifolia* var. *brevifolia* $H_e = 0.436$ a 0.958 *Y. brevifolia* var. *Jaegeriana* $H_e = 0.592$ a 0.947 ; Flatz *et al.* 2011). Las especies de *Yucca* son exclusivamente polinizadas por polillas, lo que sugiere que la especialización de polinizadores puede evitar la hibridación entre las especies. En la mayor parte de las semillas que se han analizado de *Yucca* spp., se documenta que han sido resultado de una polinización cruzada (Pellmyr *et al.* 1997; Massey y Hamrick 1998), mecanismo de cruzamiento que también se presenta en *A. potatorum*.

En la familia Agavaceae es frecuente la presencia de los sistemas reproductivos predominantemente autocompatibles (Eguiarte *et al.* 2000), lo cual explica la posible depresión por endogamia que se ha percibido mediante el pobre desarrollo de frutos o semillas en algunas

especies (Eguiarte *et al.* 1992; Eguiarte y Piñero 1990). Aunque en otros casos como *A. angustifolia* y *A. subsimplex* especies con sistema reproductivo mixto, los entrecruzamientos generan un mayor establecimiento de frutos y semillas en contraste con las autofecundaciones manuales (Molina-Freaner y Eguiarte 2003).

Una alternativa a las pocas posibilidades de entrecruzamiento, es la propagación asexual (Eguiarte *et al.*, 2000); tanto en el género *Agave* como en *Furcraea* esta estrategia biológica ha ofrecido un escape a la semelparidad, convirtiéndolas en la práctica en plantas iteróparas (Eguiarte *et al.* 2000). En este sentido, *Agave potatorum*, sin posibilidad de propagación asexual, (Gentry 1982) depende por completo de la fecundación entrecruzada para su reproducción. En estos casos es claro que el papel de los polinizadores nocturnos como los murciélagos *Leptonycteris* spp. son clave en el éxito reproductivo de los *Agaves* (Molina-Freaner y Eguiarte 2003) . Para el caso de *A. potatorum*, se puede decir que los valores de diversidad encontrados, pueden explicarse como el resultado de un sistema reproductivo de exocruza obligada, los cuales están asociados a mantener una alta diversidad genética en las poblaciones vegetales (Hamrick y Godt 1996). Cabe resaltar que los valores de diversidad genética obtenidos en el presente estudio son muestra de procesos demográficos históricos, sin embargo, sin alternativas reproductivas, esto es, con una alta dependencia de los polinizadores, hace a *A. potatorum* una especie vulnerable.

Estudios con isoenzimas muestran que aquellas especies con características biológicas similares a *A. potatorum*, esto es, plantas de polinización cruzada, dispersadas por viento y perennes de larga vida, muestran altos valores de diversidad genética ($P = 62.4$ a 65.8 , $H_e = 0.157$ a 0.180 , Hamrick y Godt 1996). Aun cuando los SSRs e isoenzimas no son marcadores comparables por tener tasas de mutación distinta (Nybom 2004; Freeland 2005), los valores de diversidad obtenidos en *A. potatorum* en este estudio son congruentes con lo que se espera encontrar en plantas con las características biológicas mencionadas.

Algunos estudios de caso muestran que los sistemas reproductivos predominantemente autoincompatibles compensan de manera importante la baja diversidad que podría estar asociada con especies de distribución restringida. En *A. victoriae-reginae*, endémica del norte de México (Coahuila, Durango y Nuevo León) se reporta un $P = 83\%$ y heterocigosidad desde $H_e = 0.25$ a 0.43 (Martínez-Palacios *et al.* 1999). Esta especie se reproduce principalmente por semillas y tiene niveles bajos de clonalidad (Gentry 1982). También *A. lechuguilla*, restringida al desierto de

Chihuahua y con un sistema reproductivo mixto, presenta valores altos de variación genética ($P = 96$ y $H_e = 0.39$, Silva-Montellano y Eguiarte 2003b).

Cabe resaltar que aunque varias poblaciones de *A. potatorum* presentan valores altos de diversidad, hubo dos poblaciones con los niveles más bajos, LP ($H_e = 0.36$) y XO ($H_e = 0.41$), mismas que se encuentran en las zonas con menor precipitación (menos de 40 mm en el mes más seco). Las especies de *Agave* que crecen en ambientes xéricos suelen presentar niveles de variación de bajos a intermedios, como es el caso de *A. subsimplex* ($H_e = 0.144$, $P = 75.6$), *A. deserti* ($H_e = 0.186$, $P = 78$), *A. cerulata* ($H_e = 0.237$, $P = 89.8$), distribuidos en el desierto de Sonora (Navarro-Quezada et al. 2003). Parker y Hamrick (1992), mencionan que *Lophocereus schottii*, cactácea que se encuentra en ambientes xéricos (candelillar y matorral rosetófilo), presenta niveles de diversidad genética moderada ($H_e = 0.126$). Esto podría ser el resultado de un bajo establecimiento de plántulas en zonas de baja precipitación, como se ha observado en plantas suculentas (*Ferocactus achantodes* Jordan y Nobel 1981; *Beaucarnea gracilis*, Cardel et al. 1996), así como en *A. deserti* en donde los eventos de reclutamiento son muy esporádicos (Godínez-Alvarez et al. 1999). El bajo reclutamiento puede generar cuellos de botella importantes en la variación genética de las poblaciones vegetales, diversos estudios han sugerido que las semillas representan un reservorio de variación que se pierde o reduce significativamente en los ciclos de vida sucesivos a través de la selección natural, endogamia o deriva génica (Tonsor et al. 1993; Álvarez-Buylla et al. 1996; Octavio-Aguilar 2008). Es probable que un proceso de este tipo ocurra en las poblaciones de *A. potatorum* en donde los ambientes más xéricos representan una fuerte presión de selección natural en los estadios más tempranos del ciclo de vida. En este sentido, Torres (2009) contrastó la dinámica poblacional en dos sitios de *A. potatorum* que se incluyen en el presente estudio y representan las dos poblaciones manejadas (MA y XO), en donde encuentra que la población más xérica (MA) tiene una menor tasa de reclutamiento. Aunado a esto Torres identificó atributos morfológicos distinguibles de la población más mésica (XO) y sugiere que se tratan de adaptaciones a las características de sitios específicos, con un desempeño diferencial en los dos tipos de ambientes. Cabe destacar que la relación H_o-H_e en la población MA es la que presenta mayor diferencia entre sí ($H_o = 0.31$ vs $H_e = 0.62$, Cuadro 2.4), es decir, más de la mitad de los loci en esta población son homocigotos bajo el modelo del *EHW* (Cuadro 2.4), lo que indica un severo proceso de endogamia. Esto es congruente con la baja densidad de individuos

reproductivos que se observan actualmente en esta población que es de aproximadamente dos individuos por cada 1000 m² (Torres 2009).

Agave potatorum de forma general presenta valores de riqueza alélica altos, de los cuales el valor más bajo es $n = 19$ alelos (XO, silvestre sujeta a extracción; LP: silvestre sin aprovechamiento) y el más alto es $n = 28$ alelos (SLV, colección de germoplasma). En *Yucca brevifolia* (Agavaceae) encontrando de 3 hasta 23 alelos SSR, lo que se consideró como una riqueza alta (Flatz *et al.* 2011). En *A. potatorum* se observaron solo dos poblaciones con valores bajos de riqueza alélica y alelos únicos, la población silvestre no sujeta a extracción LP ($R_A = 2.59$, $R_U = 0.26$) y la población sujeta a extracción XO ($R_A = 2.52$, $R_U = 0.8$). La baja riqueza alélica y alta heterocigosidad pueden estar indicando cuellos de botella, tal es el caso de *Mammillaria huitzilopochtli* y *M. supertexta* (Solórzano *et al.* 2014; Allendorf y Luikart 2008). Los cuellos de botella encontrados en estas cactáceas distribuidas en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán son provocados por el saqueo ilegal e intensivo, la fragmentación del hábitat y la transformación de la tierra a través de los años. En este sentido, en *A. potatorum*, se encontraron dos poblaciones susceptibles por un lado al efecto del cambio de uso de suelo y fragmentación del hábitat (LP) y por otro al saqueo sistemático de individuos reproductivos (XO). En este sentido, el endemismo (García-Mendoza 2010), y explotación a la cual se ha sometido la especie (Delgado-Lemus *et al.* 2014a), según se ha reportado en las poblaciones de *A. potatorum* (Aguirre- Dugua y Eguiarte 2013; Delgado-Lemus *et al.* 2014a) podrían estar comenzando a disparar procesos de endogamia, poco flujo génico entre poblaciones, cuellos de botella y probable deriva génica. Es importante resaltar que pese a que las poblaciones de *A. potatorum* presentan endogamia y aún con pocos alelos únicos, a excepción de la población silvestre TH, su riqueza alélica es alta, por lo que contribuyen a una mayor diversidad al acervo total (Kalinowski 2004). Esto es quizá un reflejo indirecto de la adaptación y supervivencia al ambiente de *A. potatorum*, a pesar de los factores bióticos y abióticos a los que se ha enfrentado a lo largo de los años (Eguiarte y Souza 2007).

La alta endogamia que se reporta en este estudio tanto a nivel global ($F_{IT} = 0.55$), como dentro de las poblaciones ($F_{IS} = 0.26$), es posiblemente un reflejo de la baja densidad de individuos reproductivos en algunas poblaciones de la especie (Addison y Hart 2005; Torres 2009; Zamora- Bustillos *et al.* 2011). En adición, Torres (2009) menciona que el desplazamiento de las semillas de *A. potatorum* no rebasa los 50 m, por lo tanto los hijuelos se establecen relativamente

cerca de las plantas madres. De tal forma que existe la posibilidad de que la disposición espacial de plantas cercanamente emparentadas podría estar incrementando las probabilidades de endogamia, este patrón se ha observado en otras especies con sistemas autoincompatibles, por ejemplo, *Captopsis berteroniana* (Bromeliaceae; Gómez 2007) y *Quercus potosina* (Fagaceae; García 2014).

- **Impacto del aprovechamiento de *A. potatorum* en la diversidad genética**

El género *Agave* se caracteriza por ser una especie con alto potencial de aprovechamiento para producción de diferentes recursos, lo que ha generado disminución de la diversidad genética en algunas poblaciones manejadas de distintas especies (García- Mendoza 2007; Delgado-Lemus *et al.* 2014a). *Agave cocui* en Venezuela presenta valores más bajos de variabilidad genética asociado a poblaciones pequeñas en zonas áridas restringidas, pero también con sobreexplotación para la producción de bebidas fermentadas y fibras (Figueredo y Nassar 2011). Eguiarte *et al.* (2013) señalan esta tendencia de bajos niveles de diversidad en nueve especies manejadas, incluyendo también a: *A. masipaga* Trel., *A. salmaiana* Otto ex Salm., *A. angustifolia* Haw., *A. tequilana* Weber, *A. cupreata* Trel. & Berger, *A. rhodacantha* Trel. y *A. parryi* Engelm. Por último, para *A. potatorum* y *A. cupreata* se han registrado valores medios de variación genética, de cinco poblaciones en cada especie, evaluados con ISSR (Aguirre-Dugua y Eguiarte 2013). En ambas especies se concluye que a pesar de la intensidad de aprovechamiento a la que se han sometido las poblaciones, los valores de diversidad aún no lo han reflejado (Aguirre-Dugua y Eguiarte 2013; Scheinvar 2008).

En este estudio no se encontraron diferencias significativas entre las categorías de manejo establecidas respecto a los valores de riqueza alélica ajustados por el método de Kalinowski (2004), ni en sus otros parámetros de diversidad (Cuadro 2.4). A pesar de que el periodo de aprovechamiento abarca casi 100 años (desde 1915 aprox.; Delgado- Lemus *et al.* 2014.) los valores de diversidad de las poblaciones sujetas a extracción de *A. potatorum*, se han mantenido altos y cercanos a las poblaciones silvestres no sujetas a extracción y las colecciones de germoplasma. Es factible que no se hayan dado cuellos de botella genéticos, tan severos como en *A. tequilana* con $H_e = 0.118$ (Vargas-Ponce *et al.* 2009). Esta diferencia quizá se explique por el hecho de que, *A. potatorum* aún no se ha sometido a una fuerte presión de selección humana generalizada en todas sus poblaciones como en *A. tequilana* y *A. fourcroydes* (Colunga-

GarcíaMarín *et al.* 1999; Aguirre-Dugua y Eguiarte 2013). El tipo de propagación vegetativa, el manejo extensivo y la alta explotación del recurso (bebidas alcohólicas y fibras), de *A. tequilana* y *A. fourcroydes* han provocado una disminución en el desarrollo de semillas, obteniendo como resultado valores de diversidad casi nula (Gil-Vega *et al.* 2006; Colunga-GarcíaMarín *et al.* 1999).

En cambio, el aprovechamiento para la producción del mezcal producido a partir de *A. potatorum* es totalmente artesanal y solo se registra como una actividad familiar o de colaboración y compañerismo entre productores mezcaleros y peones (Delgado- Lemus 2008). En adición, se dice que el mantenimiento adecuado, esto es, extracción controlada de individuos dejando algunas plantas semilleras, permitir que se forme semilla en las poblaciones, da como resultado menor pérdida de diversidad (Moreno-Calles y Casas 2010). En *Agave parryi*, los valores de diversidad genética están en el intervalo de los encontrados en el presente estudio, sin embargo, en poblaciones sometidas a aprovechamiento la variación genética es menor ($P = 78.6$ y $H_e = 0.433$), que para poblaciones silvestres ($P = 100$ y $H_e = 0.621$) (Parker *et al.* 2010). Esto se explica probablemente por el tiempo de aprovechamiento en esta especie la cual se ha hecho desde hace 600 años (Gentry 1982), en la zona centro-norte de Arizona. Las poblaciones consideradas como colección de germoplasma alcanzaron niveles de diversidad de intermedios a altos. Los individuos provienen de recolecta de germoplasma de diversos cerros aledaños, en consecuencia la variación de este acervo es esperada. Estudios con cactáceas (*Stenocereus pruinosus* y *Stenocereus stellatus*) mencionan que es común encontrar diversidades altas en acervos que se han sometido a un manejo tradicional, en el cual exista la introducción de germoplasma de varias poblaciones o accesiones (Parra *et al.* 2008).

Diferenciación y estructura genética

La diferenciación genética entre las 12 poblaciones de *A. potatorum* es alta ($F_{ST} = 0.39$, $p < 0.05$), por arriba de lo reportado por Nybom (2004) para plantas con sistemas reproductivos de entrecruza ($F_{ST} = 0.22$), plantas perennes de larga vida ($F_{ST} = 0.19$), endémicas ($F_{ST} = 0.26$) y dispersadas por viento ($F_{ST} = 0.13$). Se ha reportado diferenciación genética significativa en especies congéneres evaluadas con diferentes marcadores, por ejemplo *A. striata* ($F_{ST} = 0.19$) y *A. striata* spp. *striata* ($F_{ST} = 0.27$) (marcadores ISSRs; Trejo 2006) y *A. victoria reginae* ($F_{ST} = 0.19$) (isoenzimas; Martínez-Palacios *et al.* 1999). Parker *et al.* (2010) utilizando microsatélites

en poblaciones silvestres de *A. parryi* encontraron valores más bajos de diferenciación ($G_{ST} = 0.120$), en esta especie se reporta un aprovechamiento de hace aproximadamente 500 años (Gentry 1982). Tanto *A. parryi* como *A. potatorum* son especies con sistemas reproductivos autoincompatibles, sin embargo *A. parryi* presenta valores más bajos de diferenciación en poblaciones silvestres que entre cultivadas ($G_{ST} = 0.36$) debido a que esta especie si se puede propagar vegetativamente (Miller y Schaal 2006; Parker *et al.* 2010). En contraste, en *Agave potatorum* la diferenciación genética entre poblaciones dentro de cada categoría de manejo es muy similar: silvestres no sujetas a extracción ($F_{ST} = 0.29$), silvestres sujetas a extracción ($F_{ST} = 0.32$, $p < 0.001$) y colección de germoplasma ($F_{ST} = 0.23$). Es probable que esto sea un reflejo generalizado del aislamiento de las poblaciones como consecuencia del decremento en la densidad de individuos reproductivos reportada para algunas de ellas y que es determinante dada la denso dependencia de los polinizadores, especialmente para sus polinizadores más eficientes (*L. yerbabuena* y *L. nivalis*) que aunque son residentes de la zona del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, debido a la explotación humana la oferta floral para ellos se ha visto mermada (Estrella-Ruiz 2008; Delgado-Lemus *et al.* 2014a).

En estudios previos de *Agave potatorum* evaluados con ISSR se encontraron valores de diferenciación muy inferiores a los encontrados en el presente estudio. Scheinvar (2008) en ocho poblaciones obtuvo una $F_{ST} = 0.07$ y en el estudio de Aguirre-Dugua y Eguiarte (2013) resultó una $F_{ST} = 0.08$ en cinco poblaciones. Estas diferencias pueden deberse a la naturaleza del marcador, ya que los valores de estimación de frecuencias alélicas son más precisos con marcadores codominantes como los SSRs (Lynch y Milligan 1994; Nybom 2004). Así mismo, este desfase de valores puede deberse a la representatividad geográfica en cada caso, así como el número de poblaciones y de individuos evaluados (Nybom 2004). Scheinvar (2008) y Aguirre-Dugua y Eguiarte (2013) contemplan menos poblaciones (ocho y cinco, respectivamente), la mayoría dentro del estado de Oaxaca. En el presente estudio incluimos 12 poblaciones (siete de Puebla y cinco de Oaxaca).

Los altos valores de diferenciación también reflejan indirectamente el tiempo en que las poblaciones se han mantenido como unidades evolutivas independientes (Hedrick 2005). En este sentido la divergencia marcada entre las poblaciones de *A. potatorum* puede estar reflejando que el origen de las mismas no es tan reciente. En *A. victoriae-reginae* también con una alta diferenciación ($F_{ST} = 0.23$) se especula un mayor tiempo de separación y/o procesos activos de

especiación (Martínez- Palacios *et al.* 1999). En contraste, en un estudio utilizando RAPDs en especies del desierto de Sonora en *A. subsimplex* ($F_{ST} = 0.08$), *A. deserti* ($F_{ST} = 0.13$) y *A. cerulata* ($F_{ST} = 0.09$), observaron valores de F_{ST} de bajos a moderados, lo cual les indicó un origen muy reciente (Navarro-Quesada *et al.* 2003).

Al analizar la estructura de manera específica entre pares de poblaciones, hubo diferencias significativas en todos los casos. Se encontraron valores fluctuantes desde $\Phi_{PT} = 0.17$ a 0.57 ($p < 0.001$), con un flujo génico promedio de $N_m = 0.39$. Sin embargo, no se encontró un patrón de aislamiento por distancia ($r = 0.37$, $p = 1$). Lo que sí se percibe es mayor estructura entre las poblaciones del estado de Puebla ($\Phi_{PT} = 0.41$ promedio de valores en Cuadro 2.8) con respecto a la estructura entre las poblaciones de Oaxaca ($\Phi_{PT} = 0.24$ promedio de valores en Cuadro 2.8). Este patrón es congruente con la baja visita de polinizadores que se ha observado en poblaciones del estado de Puebla (San Francisco Xochiltepec y Santiago Apostol Coatepec; Estrella 2008). Esto a su vez explica el hecho de que los estudios previos de *A. potatorum* mencionados anteriormente, que están concentrados principalmente en el estado de Oaxaca, presenten valores más bajos de diferenciación. Un fenómeno similar se ha observado en *A. lechuguilla* (autocompatible) en donde la visita de los polinizadores cambia a lo largo de la distribución de la especie, siendo el norte de la distribución de la especie el menos visitado que el sur, esto resulta en una mayor diferenciación entre las poblaciones del norte ($F_{ST} = 0.115$) con respecto a las del sur ($F_{ST} = 0.009$) (Silva-Montellano y Eguiarte 2003b).

En relación a los valores de estructuración obtenidos con el AMOVA, agrupando las poblaciones en tres categorías (silvestres sujetas a aprovechamiento, silvestres sin aprovechamiento y colección de germoplasma) se mostró que la mayor diversidad se encuentra dentro de las poblaciones (61%) y un 36% está repartida entre poblaciones, ambas significativas (Cuadro 2.7), dato congruente con el valor de diferenciación ($F_{ST} = 0.39$). En este análisis cabe resaltar que un 3% de la variación está repartido entre categorías ($\Phi_{RT} = 0.02$, $p < 0.001$, Cuadro 2.7). Esto significa que existe la posibilidad de que las poblaciones silvestres sin aprovechamiento tengan una divergencia incipiente con respecto a las silvestres sujetas a extracción y pudiera ser que este proceso se esté dando de modo relativamente rápido. Esta inferencia se hace debido a que este mismo nivel de estructuración (3%) entre categorías de manejo se reportó para *Agave parryi* (Parker *et al.* 2010), especie con una historia de aprovechamiento de mayor antigüedad (500 años) que *A. potatorum* (100 años) además de que la primera sí se cultiva de forma vegetativa. En este

sentido, cabría esperar que en *A. potatorum* con menor tiempo de aprovechamiento y sin posibilidades de propagación vegetativa la estructuración entre categorías fuera mayor a la de *A. parryi*.

Similitud genética

El análisis de agrupamiento y el de asignación de individuos muestran la separación de dos grandes grupos genéticos. Ambos agrupamientos coinciden en que las poblaciones MA, SD, CA, TE, LC y SSS pertenecen al mismo grupo genético, la única diferencia está en la población XO que en el análisis bayesiano está incluida en dicho grupo (Fig. 2.5 y 2.6). En el segundo grupo se encuentran las colecciones de germoplasma SLV y SLA junto con las poblaciones silvestres sin aprovechamiento LP, Q, TH y la aprovechada XO, según el análisis de agrupamiento UPGMA. La diferencia de agrupamiento con uno y otro método es importante, aun tratándose de sólo una población. Lo que es evidente en ambos es que bajo este enfoque no existe un patrón de agrupamiento de acuerdo al criterio de categoría de manejo, ya sea porque las dos sujetas a extracción se agrupen con silvestres sin aprovechamiento (Bayesiano) o porque se separen (UPGMA). La historia de aprovechamiento y la variación morfológica apoyan más al análisis de agrupamiento mostrado por el UPGMA puesto que se tiene documentado que por un largo tiempo el ejido de San Francisco Xochiltepec (XO) proveyó de plantas al ejido de San Luis Atolotitlán en donde se encuentra el colección de germoplasma SLA (Puebla) (Delgado-Lemus 2009), lo que se ve reflejado en su cercana relación en el fenograma (Figura 2.6). Por otro lado, Torres (2009) menciona que existen variantes morfológicas particulares en las poblaciones MA y XO, que se ven reflejadas en su adaptación a ambientes diferentes. La población MA se encuentra en un ambiente xérico, mientras que XO está establecida en un ambiente relativamente más húmedo en candelillar. Además la población MA ha estado sujeta a una mayor extracción de individuos debido a las propiedades organolépticas del mezcal que se produce con ellos (Delgado-Lemus 2009).

Alternativamente, la falta de patrones geográficos tanto en la prueba de Mantel como en los análisis de agrupamiento podrían estar reflejando que en general, la variación tanto genética como morfológica de *A. potatorum* es compleja. García-Mendoza (2010) hace notar que las poblaciones ubicadas en los extremos de los Valles Centrales de Oaxaca, en los distritos Mixe y Tlacolula al

este, Miahuatlán y Sola de Vega al sur presentan una mayor variación en los órganos vegetativos y reproductivos. Esto es posiblemente explicado por la floración sincronizada y simpátrica con *Agave semanniana*, sugiriendo un intercambio genético entre ellas. En este tipo de escenario, la búsqueda de patrones geográfico resulta una tarea difícil.

Literatura citada

- Addison, J.A. y Hart, M.W. 2005. Spawning, copulation and inbreeding coefficients in marine invertebrates. *Biology Letters* 1: 450-3
- Aguirre-Dugua, X. y Eguiarte, L.E. 2013. Genetic diversity, conservation and sustainable use of wild *Agave cupreata* and *Agave potatorum* extracted for mezcal production in Mexico. *Journal of Arid Environments* 90: 36-44.
- Allendorf, F. W. y Luikart, G. 2008. Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing. Oxford.
- Arita, H.T. 1988. Revisión taxonómica de los murciélagos magueyeros del género *Leptonycteris* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Acta zoológica mexicana* 29: 1-60.
- Blancas, J., Casas, A., Rangel-Landa, S., Moreno-Calles, A., Torres, I., Pérez-Negrón, E., Solís, L., Delgado-Lemus, A., Parra, F., Arellanes, Y., Caballero, J., Cortés, L. y Lira, R. 2010. Plant Management in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, México. *Economy Botany* 64:287-302.
- Byers, C., Maughan, P.J., Clouse, J. y Stewart, J. R. 2014. Microsatellite Primers in *Agave utahensis* (Asparagaceae), a Keystone Species in the Mojave Desert and Colorado Plateau. *Applications in Plant Sciences* 2 (9): 1-3.
- Cardel, Y., Rico-Gray, V., García-Franco, J.G. y Thien, L.B. 1996. Ecological Status of *Beaucarnea gracilis*, and Endemic Species of the Semiarid Tehuacán Valley, México. *Conservation Biology* 11(2). 367-374.
- Chase, M.W., Reveal, J.L. y Fay, M.F. 2009. A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 132-136.
- Cole, R. F. y Wilson, D. E. 2006. *Leptonycteris yerbabuenae*. *Mammalian Species*, 797: 1-7.
- Colunga-GarcíaMarín, P. y Zizumbo-Villareal, D. 2007. Tequila and other *Agave* spirits from west-central Mexico: current germplasm diversity, conservation and origin. *Biodiversity and Conservation* 16(6): 1653-1667.
- Colunga-GarcíaMarín, P., Coello-Coello, J., Eguiarte, L.E., Piñero, D., 1999. Isozymatic variation and phylogenetic relationships between henequén (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *A. angustifolia* (Agavaceae). *American Journal of Botany* 86: 115-123.
- Colunga-GarcíaMarín, P., Zizumbo-Villareal, D. y Torres-Martínez, J. 2007. Tradiciones en el

- aprovechamiento de los agaves mexicanos: una aportación a la protección legal y conservación de su diversidad biológica y cultural. Pp. 229-248. En Colunga-García Marín, P., Larque Saavedra, A., Eguiarte, L.E., y Zizumbo-Villareal, D. (editores). 2007. En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. Centro de investigación de Centro de investigación de Yucatán A. C. Pp. 402.
- Dávila, P., Arizmendi, M. C., Valiente-Banuet, A., Villaseñor, J. L., Casas, A. y Lira, R. 2002. Biological diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. *Biodiversity and Conservation* 11: 421-442.
- Delgado- Lemus, A., Casas, A. y Tellez, O., 2014a. Distribution, abundance and traditional management of *Agave potatorum* in the Tehuacán Valley, Mexico: bases for sustainable use of non-timber forest products. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10:63.
- Delgado-Lemus, A. M. 2008. Aprovechamiento y disponibilidad espacial de *Agave potatorum* en San Luis Atlotitlán, Puebla, México. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, Morelia, México.
- Delgado-Lemus, A., Torres, I., Blancas, J. y Casas, A. 2014b. Vulnerability and risk management of *Agave* species in the Tehuacán Valley, México. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 10:53.
- Doebly, J. 1993. Genetics, development and plant evolution. *Current Opinion of Genetic Development* 3: 865-872.
- Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Jordano, P., Salvini, D., Vendramin, G. G. y Petit, R.J. 2007. Can population genetic structure be predicted from life-history traits?. *The American Naturalist*. 5: 662-672.
- Earl, D. A. y VonHoldt, B. M. 2012. Structure Harvester: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4: 359-361.
- Eguiarte, L. E. y Souza, V. 2007. Historia natural del Agave y sus parientes: Evolución y Ecología. Pp. 3-21. En Colunga-García Marín, P., Larque Saavedra A., Eguiarte L.E., y Zizumbo-Villareal, D. (editores). 2007. En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. Centro de investigación de Yucatán A. C. Pp. 402.

- Eguiarte, L. E., Perez-Nasser, N. y Piñero, D. 1992. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. *Heredity* 69: 217–228.
- Eguiarte, L.E. 1995. Hutchinson (Agavales) vs. Huber y Dahlgren: Análisis moleculares sobre la filogenia y evolución de la familia Agavaceae *sensu* Hutchinson dentro de la monocotiledóneas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 56: 45-56.
- Eguiarte, L.E. y Piñero, D., 1990. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. *Ciencias número especial* 4:34-47. En: Núñez - Farfán J. y Eguiarte L. (comp.), 1999. *La Evolución Biológica*. Facultad de Ciencias e Instituto de Ecología, UNAM y Conabio. Pp. 371- 398.
- Eguiarte, L.E., Aguirre-Planter, E., Aguirre, X., Colin, R., González, A., Rocha, M., Scheinvar, E., Trejo, L. y Souza, V. 2013. From isoenzymes to genomics: Populations genetic and conservation of *Agave* in México. *The Botanical Review* 79: 483-506.
- Eguiarte, L.E., Souza, V., Silva-Montellano, A., 2000. Evolución de la Familia Agavaceae: Filogenia, Biología Reproductiva y Genética de poblaciones, *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 66:131-150.
- Estrella-Ruiz, J. P. 2008. Efecto de la explotación humana en la biología de la polinización de *Agave salmiana* y *Agave potatorum* en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.
- Evanno, G., Regnaut, S. y Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Excoffier, L. y Lischer, H. E. L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies; an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Figueredo, J. C. y Nassar, J.M. 2011. Population genetics of *Agave cocui*: Evidence for low genetic diversity at the southern geographic limit of genus. *Agave*. *Journal of Heredity* 102(3): 306-314.

- Flatz, R., Yoder, J. B., Lee-Barnes, E. y Smith, C. I. 2011. Characterization of microsatellite loci in *Yucca brevifolia* (Agavaceae) and cross-amplification in related species. *American Journal of Botany* 98(3): 67- 69.
- Freeland, J.R. 2005. *Molecular Ecology*. The Open University, Milton Keynes. John Wiley & Sons Chichester, England.
- García, Saira. 2014. Diversidad genética y efecto del cambio climático en la distribución de *Quercus potosina* (Fagaceae) en Sierra fría, Aguascalientes: un enfoque local para su conservación. Tesis de licenciatura. Universidad de la Sierra de Juárez. Ixtlán de Juárez, Oaxaca. México.
- García-Mendoza, A.J. 2007. Los Agaves de México. *Ciencias* 87: 14-23.
- García-Mendoza, A.J. 2010. Revisión taxonómica del complejo *Agave potatorum* zucc. (Agavaceae): nuevos taxa y neotipificación. *Acta Botánica Mexicana* 91: 71-93.
- Gaudeul, M., Taberlet, P., y Till-Bottraud, I. 2000. Genetic diversity in an endangered alpine plant, *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae), inferred from amplified fragment length polymorphism markers. *Molecular Ecology* 9 : 1625-1637.
- Gentry, H. S. 1982. *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press, Tucson.
- Gil-Vega, K., Díaz, C., Nava-Cedillo, A., Simpson, J., 2006. AFLP analysis of *Agave tequilana* varieties. *Plant Science* 170: 904- 909
- Gómez, Zanelli, 2007. Diversidad genética de una bromelia de importancia comercial. Tesis de Maestría. Instituto politécnico Nacional. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México.
- Hamrick, J.L. y Godt, M.J.W. 1996. Effects of the history traits on genetic diversity in plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 351: 1291-1298.
- Hartl, D. L. y Clark, A. G. 1997. *Principles of population genetics*. Third Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland. Massachusetts.
- Hedrick, P.W. 2005. *Genetics of populations*. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury,

Massachusetts.

- Hilbe, J. M. 2007. *Statistica 7: An Overview*. *Am. Statist.* 61: 91-9
- Jordan, P. W. y Nobel, P. S. 1981. Seedling establishment of *Ferocactus achantodes* in relation to drought. *Ecology* 62(4): 901-906.
- Kalinowski, S.T. 2004. Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. *Conservation Genetics*.5: 539–543.
- Kalinowski, S.T. 2005.HP-RARE1.0: a computer program for performing rarefaction.*Molecular Ecology Notes* (2005) 5, 187–189.
- Lindsay, D., Edwards, C., Jung, M., Bailey, P. y Lance, R.F. 2012.Novel microsatellite loci for *Agave parryi* and cross-amplification in *Agave palmeri* (Agavaceae). *American Journal of Botany* 0: 295-297.
- Mantel, B. F. J. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-232.
- Martínez-Palacios, A., Eguiarte, L. E., y Furnier, G. R. 1999. Genetic diversity of endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. *American Journal of Botany* 86: 1093-1098.
- Massey, L. K. y Hamrick, J. L. 1998. Genetic diversity and population structure of *Yucca filamentosa* (Agavaceae). *American Journal of Botany* 85: 340–345.
- Moreno-Calles, A. I. y Casas, A. 2010. Agroforestry systems: restoration of semiarid zones in the Tehuacán Valley, Central Mexico. *Ecological Restoration* 28(3):361-368.
- Morrone, J. J. 2005. Hacia una síntesis biogeográfica de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 76: 207-252.

- Navarro-Quezada, A., González-Chauvet, R., Molina-Freaner, F. y Eguiarte, L.E. 2003. Genetic differentiation in the *Agave deserti* (Agavaceae) complex of the Sonoran desert. *Heredity* 90, 220–227.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 238-292.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13: 1143-1155.
- Octavio-Aguilar, P., González-Astorga, J., Vovides, A. P. 2009. Genetic diversity through life history of *Dioon edule* Lundley (Zamiaceae, Cycadales). *Plant Biology* 11: 525-536.
- Padilla, C., Montoya, Y. y Carrillo, C. 2003. Estandarización de una prueba de PCR para la detección de *Brucella sp.* *La Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 20 (2):102-104.
- Parker, K. C, Trapnell, D. W., Hamrick, J. L., Hodgson, W. C. y Parker, A. J. 2010. Inferring ancient *Agave* cultivation practices from contemporary genetic patterns. *Molecular Ecology* 19: 1622–1637.
- Parker, K.C. y Hamrick, J. L. 1992. Genetic diversity and clonal structure in a columnar cactus, *Lophocereus schottii*. *American Journal of Botany* 79: 86–96.
- Parker, K.C., Trapnell, D. W., Hamrick, J.L., y Hodgson, W. C. 2014. Genetic and morphological contrasts between wild and anthropogenic populations of *Agave parryi* var. *huachucensis* in south-eastern Arizona. *Annals of Botany* 113: 1-14.
- Parra, F., Pérez-Nasser, N., Lira, R., Perez-Salicrup, D. y Casas, A. 2008. Population genetics and process of domestication of *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) in the Tehuacan Valley, Mexico. *Journal of Arid Environments*. 72: 1997-2010.

- Peakall, P. y Smouse, P.E. 2005. GENALEX 6: Genetic Analysis In Excel. Population Genetic Software For Teaching And Research. *Molecular Ecology Notes*: 288-295.
- Pellmyr, O., Massey, L., Feist, M. A. y Hamrick, J. L. 1997. Genetic consequences of specialization: Yucca moth behavior and self-pollination in yuccas. *Oecologia* 109:273–278.
- Petit, R., El Mousadik, A., Pons, O. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* 12: 844- 855.
- Pritchard, J. K., Wen, X. y Falush, D. 2010. Documentation for structure software: Version 2.3. University of Chicago. E. U. A.
- Ramírez-Pulido, J., Arroyo-Cabrales, J. y Castro-Campillo, A. 2005. Estado actual y relación nomenclatural de los mamíferos terrestres de México. *Acta Zoológica Mexicana* (n. s.) 21: 21-82.
- Rangel-Landa, S. 2009. Germinación y establecimiento de *Agave potatorum* Zucc. en el Valle de Tehuacán: Bases biológicas para la reforestación. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Raymond, M. L. y Rousset, F. 1995a. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.
- Raymond, M., y Rousset, F. 1995b. Genepop (version-1.2): population-genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248–249.
- Sanguinetti, C.J., Días Neto, E., Simpson, A.J.G. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17: 915-919.
- Saussure, M. de. 1860. Note sur quelques mammiferes du Mexique. *Revue et Magasin de Zoologie pure et Appliquée. Ser.2.* 12:281-293.
- Schaffer, W. y Schaffer, V. 1977. The reproductive biology of Agavaceae I: pollen and nectar production in four Arizona agaves. *The Southwestern Naturalist* 22: 157- 168.

- Scheinvar, G. E. 2008. Genética de poblaciones y biología reproductiva en especies mezcaleras. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Instituto de Ecología, UNAM. México. D.F., México.
- Smith, W. y Grassle, J.F. 1977. Sampling properties of a family of diversity measures. *Biometrics* 33: 283–292.
- Solórzano, S., Cuevas-Alducin, P. D., García-Gómez V. y P. Dávila. Genetic diversity and conservation of *Mammillaria huitzilopochtli* and *M. supertexta*, two threatened species endemic of the semiarid region of central Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: 565-575.
- StatSoft, Inc. (2013). STATISTICA (data analysis software system), version 12. www.statsoft.com.
- Tonsor, S.J., Kalisz, S., Fisher, J., Holtsford, T.P. 1993. A life-history based study of population genetic structure: seed bank to adults in *Plantago lanceolata*. *Evolution* 47: 833-843.
- Torres, I. 2009. Dinámica poblacional de dos morfos de *Agave potatorum* Zucc. en el Valle de Tehuacán: bases para su manejo sustentable. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Trejo, L. 2006. Genética de poblaciones de *Agave striata* Zucc. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, UNAM, México D.F., México.
- Valenzuela-Zapata, A. G., Regalado-Pinedo, A. y Mizoguchi, M. 2008. Influencia asiática en la producción de mezcal en la costa de Jalisco. El caso de la raicilla. México y la cuenca del Pacífico 11 (33): 91-116.
- Vargas-Ponce, O., Zizumbo-Villarreal, D., Martínez-Castillo, J., Coello-Coello, J., y Colunga-GarcíaMarín, P. 2009. Diversity and structure of landraces of *agave* grown for spirits under traditional agriculture: a comparison with wild populations of *A. angustifolia* (Agavaceae) and commercial plantations of *A. tequilana*. *American Journal of Botany* 96 (2): 448-457.
- Vásquez, G. 2006. Aprovechamiento integral del maguey pulquero (*Agave salmiana*) en Santa María Tlahuitoltepec Mixe Oaxaca. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo.

Chapingo, Estado de México.

Villaseñor, J.L., Dávila, P. y Chiang, F, .1990. Fitogeografía del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Boletín de la Sociedad Botánica de México 50: 135–149.

Wass, John. 2009. SigmaPlot 11: Now with total sigma stat integration. Scientific computing 6(1): 21.

Weir, B.S., 1990. Genetic Data Analysis. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Workman, P. L. y Niswander, J. D. 1970. Population studies on southwestern Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. American Journal of Human Genetics 22(1): 24–49.

Wright, S. 1931. Evolution In Mendelian Populations. Genetics 16 (2): 97–15.

Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. Annals of Eugenics 15: 323-354.

Yeh, F., Yang, R. C. y Boyle, J.T. 1999. Popgene version 1.31. University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Edmonton, Canada.

CAPITULO III. Conclusiones y recomendaciones

Desde la perspectiva de la variación genética, la viabilidad poblacional en *A. potatorum* no parece estar comprometida de manera alarmante. Aún las poblaciones con los valores más bajos de diversidad, la silvestre LP y la silvestre sujetas a extracción XO, presentan una diversidad alta en comparación con la del género *Agave* ($H_s= 0.19$). Sin embargo, la fragmentación y el deterioro del entorno donde se desarrollan las poblaciones son evidentes, no sólo por la actividad mezcalera, sino también por la agricultura. En este sentido los factores demográficos son con frecuencia procesos de una relevancia más inmediata en la viabilidad de las poblaciones, en comparación con los procesos genéticos. En *A. potatorum*, se han reportado tasas de crecimiento en decaimiento para las dos poblaciones, MA y XO, incluidas en este estudio.

Finalmente la alta estructuración entre las poblaciones estudiadas y la alta dependencia con sus polinizadores pone en evidencia la urgencia por implementar estrategias de reintroducción de plantas, sobre todo en aquellas poblaciones en las que se observa menor densidad de plantas, siendo este un factor determinante para la llegada de los polinizadores. Al menos deberán mantenerse 12 individuos reproductivos en un área de 2000 m². Además seguir fortaleciendo y seguimiento a estrategias implementadas por el gobierno y los productores mezcaleros. De esta manera se mantendría no solamente esta alta variación genética, sino también una alta viabilidad demográfica.

ANEXOS

Anexo 1. Extracción de ADN por el método Fenol:Cloroformo: Alcohol isomílico

Los pasos a seguir son los siguientes:

1. Macerar el tejido (100- 150 mg) con nitrógeno líquido en un mortero.
2. Transferir el polvo a un tubo eppendorf.
3. Adicionar 500 µl de buffer de extracción y agitar en vortex.
4. Adicionar 125 µl de sarkosil al 5%, agitar vortex e incubar a 65°C por 20 min.
5. Adicionar un volumen igual de Fenol- Cloroformo: Alcohol isomílico (25:24:1) y agitar en vortex.
6. Centrifugar a 12,000 rpm durante 10 min.
7. Transferir el sobrenadante a un tubo eppendorf.
8. Adicionar 0.6 volúmenes de isopropanol frío y mezclar por inversión.
9. Centrifugar a 12,000 rpm durante 5 min.
10. Tirar el sobrenadante y lavar la pastilla con 500 µl de etanol al 70% frío.
11. Centrifugar a 12,000 rpm durante 5 min.
12. Decantar el sobrenadante y secar la pastilla.
13. Disolver el ADN en 100 a 200 µl en agua de grado molecular o desionizada-destilada-esterilizada, solo si el ADN se estará utilizando constantemente, de no ser así utilizar TE.

Preparación de los reactivos y cantidades son:

Buffer de extracción

Reactivo	Cantidad (gr)
Busulfito de sodio	22.8
Tris- base	14.53
EDTA	11.17
NaCl	70.26
CTAB	12.00

Aforar a 1 litro y esterilizar.

Sarkosil al 5%

1.5 de Sarkosil, disolver el 15 ml y aforar en 30 ml.

Isopropanol y etanol frío

Mantener almacenado a -20° .

Buffer de resuspensión TE

1 ml Tris 1M pH 7.4 c.c. final 10 mM

200 μ l EDTA 0.5 M c.c. final 1 mM

70 ml Agua Destilada

Ajustar a 100 ml con agua destilada. Almacenar a 4° .

Anexo 2. Preparación de solución de poliacrilamida

Solución base de Acrilamida (19:1) 40 %

Acrilamida 38 g
Bis-acrilamida 2 g
Agua bidestilada 50 ml
Disolver y aforar a 100 ml

Poliacrilamida 6 % Urea 7M

Stock Poliacrilamida 40 % 15 ml
10X TBE 10 ml
Urea 42 g
Agua bidestilada 30 ml

Poliacrilamida 6% Urea 3M

Stock Poliacrilamida 40 % 15 ml
10X TBE 10 ml
Urea 18 g
Agua bidestilada 30 ml

Disolver poco a poco en 30 ml de agua destilada la Urea a una temperatura de 30°C hasta estar disuelta completamente. Aumentar la temperatura a 40°C (mantenerla constante) y agregar el TBE. Dejar reposar de 15-20 min y finalmente agregar la solución stock de Poliacrilamida. Dejar reposar otros 15-20 min y aforar a 100 ml.

Polimerización de los geles de acrilamida

Compuesto	Cantidad			
Poliacrilamida 3 y 6 %	30 ml	40ml	60 ml	100 ml
Persulfato de amonio	120 µl	160 µl	240 µl	400 µl
TEMED	60 µl	80 µl	120 µl	200 µl

Anexo 3. Tinción con sales de plata (Sanguinetti 1994)

Solución reveladora

Compuesto	Cantidad
Hidróxido de sodio	30 g
Formaldehído	13.5 ml
H ₂ O dd	Aforar a 1 l

Solución fijadora

Compuesto	Cantidad
Etanol	10 ml
Ácido acético glacial	5 ml
H ₂ O dd	Aforar a 1 l

Solución de nitrato de plata

Solución fijadora+ 2 gr de Nitrato de plata.

Procedimiento:

1. Poner el gel en solución fijadora 10 minutos.
2. Decantar la solución fijadora.
3. Agregar la solución de nitrato de plata y dejar 5 minutos.
4. Decantar.
5. Lavar con agua destilada por 30 segundos.
6. Agregar la solución reveladora hasta aparición de bandas.
7. Enjuagar con agua corriente.