

## DIVERSIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES DE AGAVES PULQUEROS (*Agave spp.*) DEL NORORIENTE DEL ESTADO DE MÉXICO

### GENETIC DIVERSITY IN POPULATIONS OF PULQUERO AGAVES (*Agave spp.*) IN NORTHEASTERN MÉXICO STATE

Guillermo Alfaro Rojas, Juan Porfirio Legaria Solano\* y Juan Enrique Rodríguez Pérez

Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carr. México-Texcoco. 56230, Chapingo, Edo. de México. Tel. 01 (595) 952-1642.  
\*Autor para correspondencia (jlegaria@correo.chapingo.mx)

#### RESUMEN

Se analizaron seis poblaciones de magueyes pulqueros: 'Manso' (*Agave salmiana* var. 'Salmiana'), 'Ayoteco' (*Agave salmiana* var. 'Ayoteco'), 'Verde', 'Carrizo' (*Agave mapisaga* Trel), 'Negro' y 'Xilometl', del Nororiente del Estado de México, para determinar la diversidad genética entre y dentro de las mismas, obtener las huellas genéticas correspondientes, y hacer comparaciones para diferenciar sus variantes genéticas. Se utilizaron marcadores moleculares tipo RAPD (Polimorfismos en el ADN Amplificados al Azar) y algunas variables morfológicas. El análisis de varianza mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.01$ ) entre poblaciones para: altura de planta, número de hojas, largo de hojas, ancho de hojas, número de espinas laterales y longitud de espina principal. Los discriminantes morfológicos que permitieron separar a las poblaciones en cuatro grupos, fueron: longitud de espina principal y número de espinas laterales, mismas que explicaron 94 % de la variación. El porcentaje total de *loci* polimórficos fue de 73.2 % pero dentro de poblaciones hubo reducida variabilidad genética, con porcentajes de *loci* polimórficos que variaron de 12.2 % para el maguey 'Verde' hasta 32.5 % en los magueyes 'Manso' y 'Ayoteco'. La diversidad genética de Nei (H) promedio fue de  $0.28 \pm 0.20$ , lo que confirma la baja diversidad en las poblaciones. El grado de flujo genético fue bajo ( $Nm = 0.24$ ), lo que indica que hay menos de un migrante por generación entre las seis poblaciones. El dendrograma obtenido con RAPD mostró dos grandes grupos, cada uno de los cuales incluyó tres variantes relacionadas. En el primer grupo *Agave mapisaga* Trel ('Carrizo') se relacionó con 'Verde' y con 'Xilometl', con valores de identidad de 0.91 y 0.82, respectivamente. En el segundo grupo hubo una asociación muy cercana entre el maguey 'Manso' (*Agave salmiana* var. 'Salmiana') y los magueyes 'Negro' y 'Ayoteco' (0.89 y 0.83).

**Palabras clave:** *Agave spp.*, diversidad genética, caracteres morfológicos, RAPD.

#### SUMMARY

Six populations of pulquero maguey: 'Manso' (*Agave salmiana* var. 'Salmiana'), 'Ayoteco' (*Agave salmiana* var. 'Ayoteco'), 'Verde', 'Carrizo' (*Agave mapisaga* Trel), 'Negro' and 'Xilometl' from fields located in Northeast Mexico State. Those were analyzed: to determine the genetic diversity among and within them, to obtain the corresponding genetic fingerprints, and to compare and differen-

tiated genetic variants. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers and some morphological variables were analyzed. Analysis of variance showed significant differences ( $P \leq 0.01$ ) among populations for the traits: plant height, number of leaves, leaf length and width, number of lateral thorns and length of main thorn. The morphological traits which allowed the separation of populations into four groups were: length of main thorn, and number of lateral thorns which explained 94 % of total variation. The percentage total of polymorphic *loci* was 73.2 %. Polymorphism in maguey 'Verde' was 12.2 % and in 'Manso' and 'Ayoteco', was 32.5 % thus indicating a low genetic variability within those populations. Nei's coefficient of diversity (H) of all *loci* studied in the six populations of maguey was  $0.28 \pm 0.20$ , confirming the low diversity within populations. The low level of genetic flow ( $Nm = 0.24$ ), suggests that there is less than one migrant per generation among populations. Based on Nei's genetic identity, the RAPD markers allowed the separation of the maguey populations in two large groups, each including three related variants. In group 1 *Agave mapisaga* Trel ('Carrizo') was related to 'Verde' with a value of identity of 0.91, and with maguey 'Xilometl' with a coefficient of 0.82. In group 2 a very close association between the magueyes 'Manso' (*Agave salmiana* var. 'Salmiana') and 'Negro' (0.89) was found, closely followed by 'Manso' and 'Ayoteco' (0.83).

**Index words:** *Agave spp.*, genetic diversity, morphological characteristics, RAPD.

#### INTRODUCCIÓN

México se considera centro de origen del género *Agave* (Nobel, 1998; García-Mendoza, 1995), del que según Granados (1993) existen 272 especies, mientras que otros autores reportan de 136 a 150 especies (Nobel, 1998; Rzedowski y Calderón, 1990). Las especies de *Agave* se han utilizado para satisfacer y complementar una serie de necesidades básicas como alimento, fibras, forraje, medicamento, construcción y elaboración de bebidas alcohólicas (Ramírez *et al.*, 2000). El típico maguey pulquero fue descrito por Karwinski (citado por Rzedowski y Calderón, 1990), pero existe una gran diversidad de agaves que producen aguamiel y pulque de calidad diferente. Las especies

de las cuales se obtiene el pulque son *A. salmiana*, *A. mapisaga* y *A. atrovirens*, que se distribuyen principalmente en el Valle de México, en los estados de México, Tlaxcala, Hidalgo y Puebla. En el Valle de México se cultivan principalmente *A. americana* L., *A. atrovirens* Karw., *A. mapisaga* Trel., *A. salmiana* var. 'Angustifolia' Berger y sobre todo *A. salmiana* Otto ex Salm var. 'Salmiana' (Rzedowski y Calderón, 1990).

Los agaves tienen una distribución amplia en ambientes limitantes (suelos someros, infértiles y secos), lo que puede colocarlos en peligro de extinción (García-Mendoza, 1995). El análisis de la variación genética entre y dentro de las poblaciones es de interés fundamental para su conservación y para la realización de programas de mejoramiento genético, porque proporciona estimadores de la extensión de la variación genética disponible, contribuye al monitoreo de germoplasma y permite predecir ganancias genéticas potenciales (Moreno-González y Cubero, 1993).

Los marcadores genéticos basados en el ADN ayudan a la identificación de individuos en forma precisa e independiente del ambiente, y permiten determinar relaciones genéticas entre los mismos. El marcador molecular más usado es el RAPD (Williams *et al.*, 1990), que se ha aplicado para determinar la diversidad genética de cultivos. Los RAPDs son marcadores dominantes y proporcionan un nivel de resolución equivalente a los RFLPs para determinar relaciones genéticas entre genotipos a nivel intraespecífico (dos Santos *et al.*, 1994; Hallden *et al.*, 1994; Thormann y Osborn, 1992) y posee un alto nivel de congruencia con otros sistemas de marcadores (Isabel *et al.*, 1995).

En comparación con otros géneros y especies, el nivel de conocimiento de la diversidad genética en *Agave spp* es limitado y se basa principalmente en caracteres morfológicos y citológicos (Gil-Vega *et al.*, 2001). Los datos genético-moleculares que consideran la estructura y variabilidad existente en las poblaciones de *Agave* son escasos. En *Agave tequilana* var. 'Azul' de México se estimó la variación genética presente dentro y entre campos tequileros mediante marcadores RAPDs (Gil-Vega *et al.*, 2001). se encontró que se cultivan prácticamente sólo clones con valores de disimilitud menores de 0.01. También se obtuvo la huella genómica de *Agave tequilana* var. 'Azul', cuyos RAPDs presentaron 9.8 fragmentos por reacción y sólo se detectaron dos fragmentos polimórficos (1.7 %) entre 40 individuos. Tales resultados evidencian la carencia alarmante de variación genética en *A. tequilana* var. 'Azul' cultivado, por lo que se recomienda iniciar de inmediato un programa de mejoramiento genético de la especie (Gil-Vega *et al.*, 2001).

En este estudio se evaluó la diversidad genética entre y dentro de las poblaciones de *Agave* del Nororiente del Estado de México mediante marcadores moleculares RAPDs y datos de características morfológicas, a fin de proveer información genética básica para el desarrollo de estrategias de conservación y mejoramiento genético.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

La recolección de los materiales se hizo en plantaciones particulares de maguey pulquero, de las comunidades de Santa Bárbara, Otumba, y Teacalco, municipio de Temascalapa, ambas del Estado de México. Las variables morfológicas se midieron en 25 magueyes de 10 años de edad, representativos de seis variantes y al menos dos especies de maguey; 'Manso' (*Agave salmiana* var. 'Salmiana'), 'Ayoteco' (*Agave salmiana* var. 'Ayoteco'), 'Verde' (selección del maguey pulquero de Temascalapa), 'Xilometl' (selección de maguey pulquero de Santa Bárbara), 'Negro' (selección de maguey pulquero de Santa Bárbara), y Maguey 'Carrizo' (*Agave mapisaga* Trel). Los materiales fueron identificados por los productores en cuanto a edad, nombre regional, usos, cuidados agronómicos, plagas y enfermedades que los atacan, calidad del aguamiel para pulque, rendimiento, periodos de explotación y tiempo de explotación para la extracción de penca y aguamiel.

Las muestras para la extracción de ADN fueron fragmentos de 25 g de tejido de los agaves antes descritos, y se muestrearon 16 agaves de la variante 'Xilometl', 10 de 'Verde', 12 de 'Carrizo', 16 de 'Ayoteco', 9 de 'Negro' y 13 de 'Manso', para un total de 76 muestras. Estas se guardaron en bolsas de plástico identificadas por número de planta, parcela, nombre del productor, nombre regional y nombre científico.

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con 25 repeticiones para las variables morfológicas, y la unidad experimental fue una parcela de cada material. En campo se cuantificó: altura de planta (Ap), número de hojas (Nh), longitud de hojas (Lh), ancho de hojas (Ah), número de espinas laterales (Nel) y longitud de la espina principal (Lep).

### Análisis RAPD

**Purificación de ADN genómico.** De cada planta de agave se usaron 0.3 g de tejido de hojas jóvenes y frescas, que se desinfectaron con etanol a 70 % y agua estéril. El tejido se secó antes de congelarse en N<sub>2</sub> líquido. Se purificó el ADN genómico con método de Dellaporta *et al.* (1983), ligeramente modificado. El ARN se eliminó

mediante adición de 2  $\mu\text{L}$  de una solución de 10  $\text{mg mL}^{-1}$  de ARNasa A por muestra. El ADN se resuspendió en un amortiguador TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA), y la concentración de cada muestra se cuantificó con la absorbancia a 260 nm, con un espectrofotómetro Jenway 6305 UV/vis. La calidad del ADN se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa a 0.8 % (p/v) teñidos en una solución de bromuro de etidio (0.5  $\text{mg mL}^{-1}$ ). Se hicieron diluciones del ADN a una concentración de 10  $\text{ng mL}^{-1}$ , cantidad necesaria para amplificar los RAPD.

**Condiciones de PCR.** Se probaron 20 iniciadores de la serie A de Operon (OPA01-OPA20) (Operon Technologies Alameda, CA, EE. UU.) y de ellos se seleccionaron 13 que mostraron polimorfismo y por la complejidad del patrón de bandeo para obtener los RAPDs. La mezcla de reacción se hizo en un volumen total de 25  $\mu\text{L}$ , compuesta de 4.0  $\mu\text{L}$  de agua bidestilada estéril, 10  $\mu\text{L}$  de dNTPs 500  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{L}$  de amortiguador 10X, 1.0  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM, 2.0  $\mu\text{L}$  de cada iniciador (10 pmol), 0.5  $\mu\text{L}$  de Taq ADN polimerasa (5U  $\mu\text{L}^{-1}$ ), y 5.0  $\mu\text{L}$  de ADN genómico (10  $\text{ng mL}^{-1}$ ). Las condiciones de reacción fueron: un ciclo a 94 °C, 9 min; 35 ciclos a 94 °C por 60 s, 37 °C por 60 s, 72 °C por 60 s; y un ciclo a 72 °C por 7 min. Las reacciones de PCR se hicieron en un termociclador marca Techne TC-412. Los productos se separaron en geles de agarosa a 1.2 % (p/v) con amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato, pH 7.6; 1mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ), durante 3 h a 85 v. Finalmente, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5  $\text{mg mL}^{-1}$ ) y se fotografiaron bajo luz UV con un documentador Kodak EDAS 290. Las reacciones de amplificación se repitieron al menos dos veces, sin que se presentaran discrepancias entre los patrones RAPD obtenidos.

#### Análisis estadístico

**RAPD.** Los materiales se compararon con base en similitudes y diferencias en los patrones de bandeo RAPD, al asignar un valor de 1 a la presencia de una banda y de 0 a la ausencia de la misma, suponiendo que bandas de igual peso molecular son idénticas en colectas diferentes, y así se construyó una matriz básica de datos (MBD). Con la MBD se calculó una matriz de similitud mediante el coeficiente de Jaccard (Jaccard, 1908) entre las variantes de magueyes, y con los datos resultantes se hizo un análisis de conglomerados con el método de medias aritméticas (UPGMA, Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average; Sneath y Sokal, 1973) que se representaron en un fenograma. Los datos se analizaron con los programas NTSYS versión 2.1, Tree view, Free Tree Version 0.9.1.50 (Hampl *et al.*, 2001) y SAS SYSTEM. Para el análisis genético, a las seis variantes de agave ('Ayoteco', 'Manso', 'Negro', 'Xilometl', 'Verde' y 'Carrizo') se les consideró como poblaciones. Los parámetros estimados

dentro y entre las poblaciones fueron: porcentaje de *loci* polimórficos (p), número de alelos por locus (A), número efectivo de alelos por locus (Ae), índice de Shannon (S), índice de diversidad genética de Nei (H) (Nei, 1973 y 1978), coeficiente de diferenciación genética entre las poblaciones ( $G_{ST}$ ) y número de individuos migrantes (Nm). Estos parámetros se calcularon con el programa Popgene 32 (Yeh *et al.*, 1999).

**Variables morfológicas.** Se seleccionaron las variables morfológicas a partir de una matriz de correlación de los datos. Con las variables estandarizadas se hizo un análisis de agrupamiento mediante distancias euclidianas cuadradas y la varianza mínima de Ward para la construcción de los dendrogramas, con los procedimientos PROC CLUSTER y PROC TREE de SAS ver. 8.0 (1999). Al considerar los grupos formados en el punto anterior como clases categóricas, se aplicó un análisis discriminante canónico mediante PROC DISCRIM de SAS, con el propósito de corroborar dichos agrupamientos y detectar las variables con mayor importancia en la diferenciación de los grupos generados (Bowley, 1999). Se aplicó esta misma metodología a los datos moleculares para obtener el dendrograma respectivo y poder compararlo contra el generado a partir de las variables morfológicas. Los datos se analizaron bajo un diseño experimental completamente al azar y se hizo un análisis de medias Tukey con el mismo paquete estadístico SAS Versión 8.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Datos morfológicos

**Correlaciones y análisis de varianza.** Hubo correlación positiva entre el número de hojas (Nh) y la altura de planta (Ap), resultado que se observa en las plantaciones comerciales (Cuadro 1). Las plantas que presentan mayor altura también son las que muestran un mayor número de hojas, como en las variedades 'Ayoteco', 'Xilometl' y 'Manso' (Cuadro 2).

También hubo alta correlación entre altura de planta (Ap) y largo de hojas (Lh) (Cuadro 1), lo que indica que a mayor altura de planta se espera una mayor longitud de hojas. Este comportamiento se observa claramente en el maguey 'Xilometl', variante que es la más alta y la de mayor longitud de hojas (Cuadro 2). Estas características de altura de planta, número de hojas y longitud de hojas son de particular importancia, ya que para la obtención de penca para barbacoa (platillo regional) es importante que la planta sea de hojas grandes, porque es más productiva. Además, se detectó correlación positiva y significativa entre altura de planta y número de espinas laterales (Cuadro 1), debido a que en las plantas más altas las hojas tienden a

Cuadro 1. Correlación entre variables morfológicas de las seis especies y variantes de maguey pulquero (*Agave* spp).

Variable	Nh	Lh	Ah	Nel	Lep
Altura de planta	0.308*	0.917**	0.170*	0.689**	-0.419**
Número de hojas		0.373**	0.137	0.006*	0.006*
Largo de hojas			0.164*	0.688**	-0.424**
Ancho de hojas				0.925	0.421*
Número de espinas laterales					-0.753**

\*\* Altamente significativo ( $P \leq 0.01$ ), \* Significativo ( $P \leq 0.05$ ). Nh = Número de hojas; Lh = Longitud de hojas; Ah = Ancho de hojas; Nel = Número de espinas laterales; Lep = Longitud de espina principal.

Cuadro 2. Características físicas de especies y variantes de maguey pulquero (*Agave* spp.)<sup>†</sup>.

Variante	Altura de planta (m)	Número de hojas	Largo de hojas (m)	Ancho de hojas (cm)	Número de espinas laterales	Longitud de espina principal (cm)
‘Xilometl’	4.96 a	45.64 a	2.88 a	39.41 ab	104.68 a	4.29 c
‘Ayoteco’	2.67 b	44.04 a	2.04 b	39.59 a	62.78 c	5.11 b
‘Manso’	2.58 bc	42.00 ab	1.78 c	37.56 abc	60.89 c	6.29 a
‘Verde’	2.57 bc	38.44 bc	1.78 c	37.52 abc	60.98 c	6.29 a
‘Carrizo’	2.40 c	33.64 c	1.82 c	27.22 c	91.86 b	3.88 d
‘Negro’	2.17 d	38.28 bc	1.64 c	28.76 bc	50.31 d	6.45 a
DMSH	0.19	5.20	0.18	10.67	7.65	0.39

<sup>†</sup> Medias con la misma letra en una columna son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

ser más grandes y con más espinas laterales. La correlación positiva y significativa entre número de hojas y largo de hojas indica que a mayor número de hojas mayor será la superficie para captar la luz solar.

Los análisis de varianza mostraron diferencias significativas ( $P \leq 0.01$ ) entre especies y variantes para altura de planta, número de hojas, largo de hojas, ancho de hojas, número de espinas laterales y longitud de espina principal (datos no mostrados). Las plantas más altas de maguey pulquero fueron también las que presentaron más hojas, hojas más largas y con más espinas laterales, como en el maguey ‘Xilometl’; la var. ‘Carrizo’ presentó la espina más pequeña. No hubo diferencia estadística en el ancho de las pencas en por lo menos cuatro variantes de maguey (Cuadro 2). ‘Negro’ fue el maguey más pequeño en altura pero no difiere estadísticamente en número, largo y ancho de hojas con magueyes como ‘Verde’, ‘Carrizo’ y ‘Manso’ (Cuadro 2). Por tanto, posee la ventaja de que se puede aumentar la densidad de población por hectárea para así lograr mayor cantidad de penca, o aguamiel para la industria pulquera, o para penca forrajera.

**Análisis discriminante.** Este análisis permitió establecer que el número de espinas laterales (discriminante 1) y longitud de espina principal (discriminante 2) explican 94 % de la variabilidad de los magueyes; el número de espinas laterales explicó 63 % de la variación y la longitud de

espina principal 31 %. Según la interacción de los discriminantes 1 y 2 (Figura 1), los magueyes se agrupan en cuatro grupos, de los cuales destacan los grupos 1 (‘Carrizo’), 2 (‘Negro’) y 3 (‘Xilometl’). El grupo 4 aglomeró a los magueyes ‘Manso’, ‘Ayoteco’ y ‘Verde’. Estos resultados establecen una estrecha relación entre ‘Ayoteco’ y ‘Manso’, que concuerdan con los de Rzedowski y Calderón (1990), ya que ambos son *Agave salmiana*. Aunque ‘Verde’ se confunde morfológicamente con ‘Ayoteco’ y ‘Manso’, genéticamente está alejado de ellos, según los análisis con marcadores moleculares tipo RAPD realizados en esta investigación.

Al tomar como referencia el agrupamiento dado por el método de Ward (Sneath y Sokal, 1973) y la distancia  $R^2$  semiparcial para caracteres morfológicos, se generó un dendrograma que muestra la formación de cuatro grupos (Figura 2). Se distingue primero a los magueyes ‘Xilometl’, que se separan principalmente por tamaño de planta; el grupo 2 está formado por *Agave mapisaga* Trel (‘Carrizo’), que es otra especie de agave y no presenta dudas desde el punto de vista taxonómico; el grupo 3 incluye al maguey ‘Manso’ (*Agave salmiana* var. ‘Salmiana’) y a las selecciones ‘Verde’ y ‘Negro’. Las poblaciones del grupo 3 son semejantes desde el punto de vista fenotípico, por lo que no es posible la separación de *A. salmiana* var. ‘Salmiana’ en variantes, dado que todos los individuos evaluados son fenotípicamente iguales o muy emparentados, de

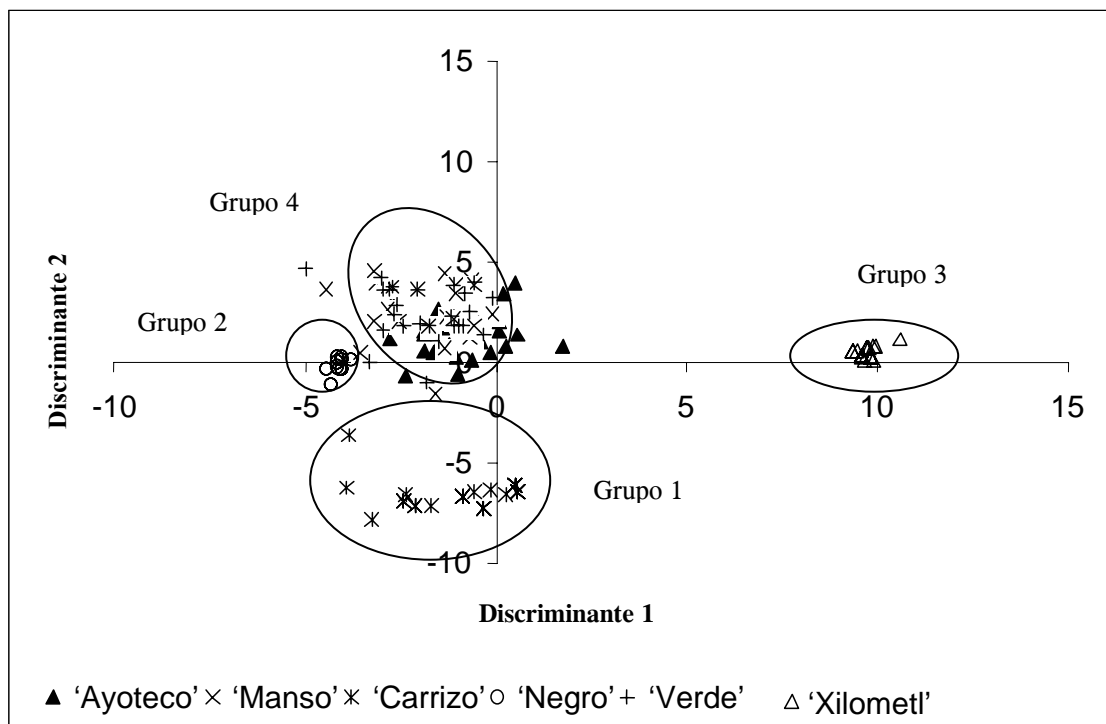


Figura 1. Patrón de agrupamiento de magueyes pulqueros de generado por los discriminantes 1 y 2. Grupo 1, 'Carrizo'; Grupo 2, 'Negro'; Grupo 3, 'Xilometl'; Grupo 4, 'Ayoteco', 'Manso' y 'Verde'. El discriminante 1 (número de espinas laterales) explica 63 % de la varianza, y el discriminante 2 (longitud de espina principal) aporta 31 %.

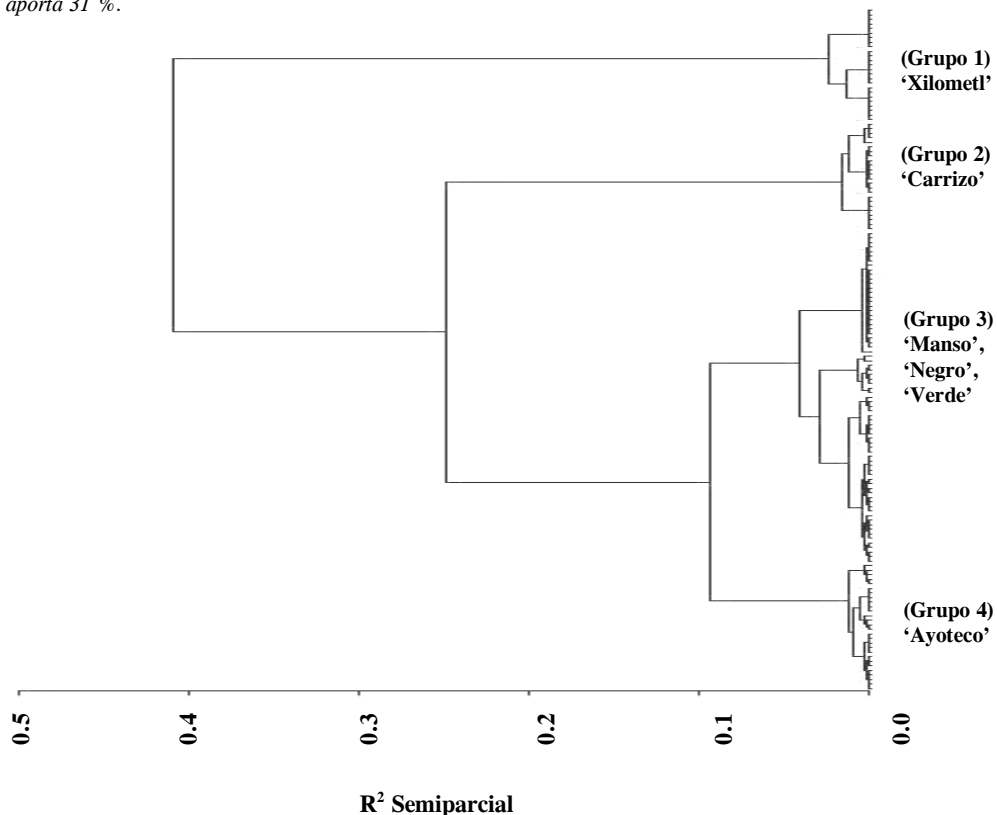


Figura 2. Dendrograma de relaciones fenotípicas entre las especies y variantes de magueyes pulqueros obtenido mediante el método de agrupamiento Ward Estándar y la distancia  $R^2$  semiparcial. Grupo 1 ('Xilometl'); Grupo 2 ('Carrizo'); Grupo 3 ('Manso', 'Verde' y 'Negro'); Grupo 4 ('Ayoteco').

modo que no es posible distinguir a las selecciones generadas por los productores. En contraste, los estudios con marcadores genético-moleculares proporcionaron resultados que permitieron separarlas de manera clara. Finalmente, el grupo 4 integró al maguey ‘Ayoteco’ (*Agave salmiana* var. ‘Ayoteco’), una variedad botánica con características fenotípicas muy particulares y aunque está muy emparentado con el maguey ‘Manso’, no se mezcla en ese grupo.

**Datos moleculares**

**Análisis por individuos en poblaciones de maguey pulquero.** El listado de iniciadores y sus secuencias, el número de productos amplificados, el polimorfismo detectado por cada iniciador por especie y el polimorfismo total por género se muestran en el Cuadro 3. De 20 iniciadores probados de la serie A de Operon, sólo 13 presentaron productos de amplificación y 10 mostraron polimorfismo. Los iniciadores OPA02 y OPA20 detectaron 100 % de polimorfismo a nivel de género, mientras que el OPA15 detectó 50 % (Cuadro 3).

Los patrones RAPD obtenidos mediante los iniciadores OPA07 (Figuras 3A y 3B), muestran la existencia de variabilidad genética entre los individuos evaluados, tanto

dentro del género como entre las especies o poblaciones. El dendrograma de relaciones genéticas entre individuos pertenecientes a especies y variantes de maguey pulquero obtenido mediante el análisis de 123 bandas (Figura 4), muestra la formación de dos grandes grupos con seis subgrupos bien definidos, que permiten distinguir a cada una de las seis variantes de maguey evaluadas: 1) ‘Ayoteco’ (*Agave salmiana* var. ‘Ayoteco’), 2) ‘Manso’ (*Agave salmiana* var. ‘Salmiana’), 3) ‘Negro’ (selección Santa Bárbara), 4) ‘Xilometl’ (selección Santa Bárbara), 5) ‘Carrizo’ (*Agave mapisaga* Trel), y 6) ‘Verde’. Es decir, el uso de marcadores RAPD’s fue eficiente para discriminar individuos de cada variante e incluirlos en grupos bien definidos. La clasificación de las variantes realizada por los productores en campo coincide en alto grado con la clasificación genético-molecular generada mediante RAPD’s.

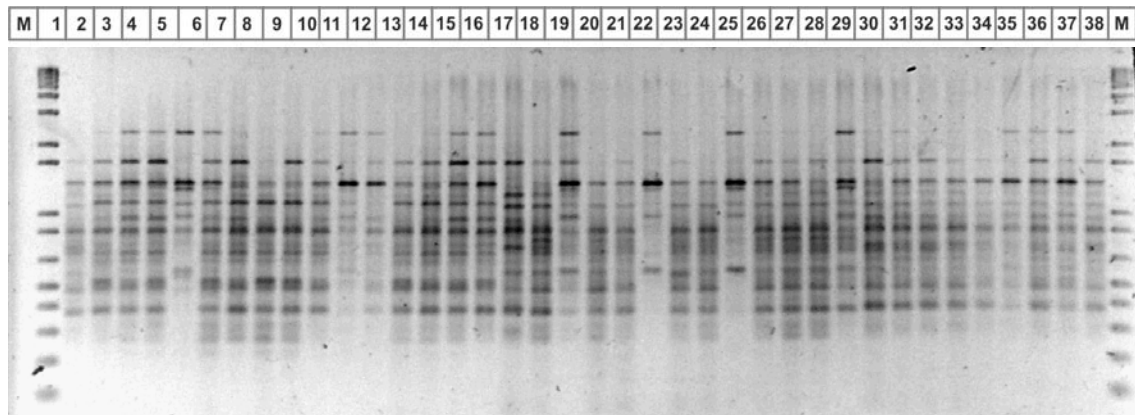
Estos grupos indican que las variantes de maguey pulquero analizadas son selecciones específicas, y que los productores han logrado obtener materiales genéticamente bien definidos y diferenciados, además de relacionarlos con características de calidad en aguamiel (como es el caso de ‘Negro’, ‘Manso’, ‘Verde’ y ‘Carrizo’) o con la cantidad de aguamiel (como es el caso de ‘Ayoteco’ y ‘Xilometl’). El dendrograma (Figura 4) también determina que

Cuadro 3. Lista de iniciadores y sus secuencias, número de productos amplificados, polimorfismo detectado por especie y polimorfismo total.

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

<sup>†</sup>NA= No amplificó.

A)



B)

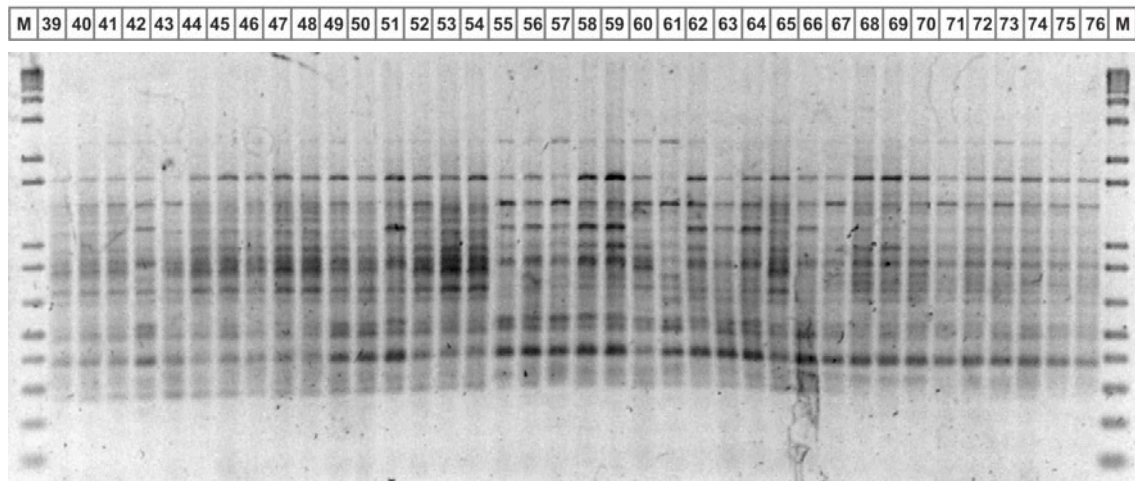


Figura 3. Patrón de productos amplificados RAPD en magueyes pulqueros con base en el iniciador OPA07. A) M = Marcador de peso molecular 1kb. 'Ayoteco' 1-17, 'Manso' 18-29, 'Negro' 30-38. B) M = Marcador de peso molecular 1kb. 'Xilometl' 39-54, 'Carrizo' 55-66, 'Verde' 66-76.

las variantes incluidas en el grupo I son 'Ayoteco', 'Manso' y 'Negro', y éstas dos últimas son las más relacionadas genéticamente. Lo anterior es particularmente cierto, ya que según otros estudios taxonómicos (Rzedowski y Calderón, 1990) tanto los magueyes 'Manso' como 'Ayoteco' se clasifican como *Agave Salmiana*, variedades 'Salmiana' y 'Ayoteco', respectivamente. La selección 'Negro' no ha sido clasificada hasta el momento, y los presentes resultados establecen que genéticamente está muy relacionada con el maguey 'Manso', por lo que pudiera ser una selección de *Agave salmiana*.

El grupo II incluyó a los magueyes 'Xilometl', 'Carrizo' y 'Verde', de los cuales 'Carrizo' y 'Verde' son los más emparentados. Los taxónomos clasifican a 'Carrizo' como *Agave mapisaga* Trel, y dado que 'Verde' está muy relacionado genéticamente con esta variante, es posible que sea una selección de la misma. Aunque desde el punto de vista morfológico los tres magueyes son diferentes, genéticamente son semejantes, quizá debido a que son selecciones para ciertas características morfológicas o bien son híbridos producto de cruas espontáneas seleccionados por los productores.

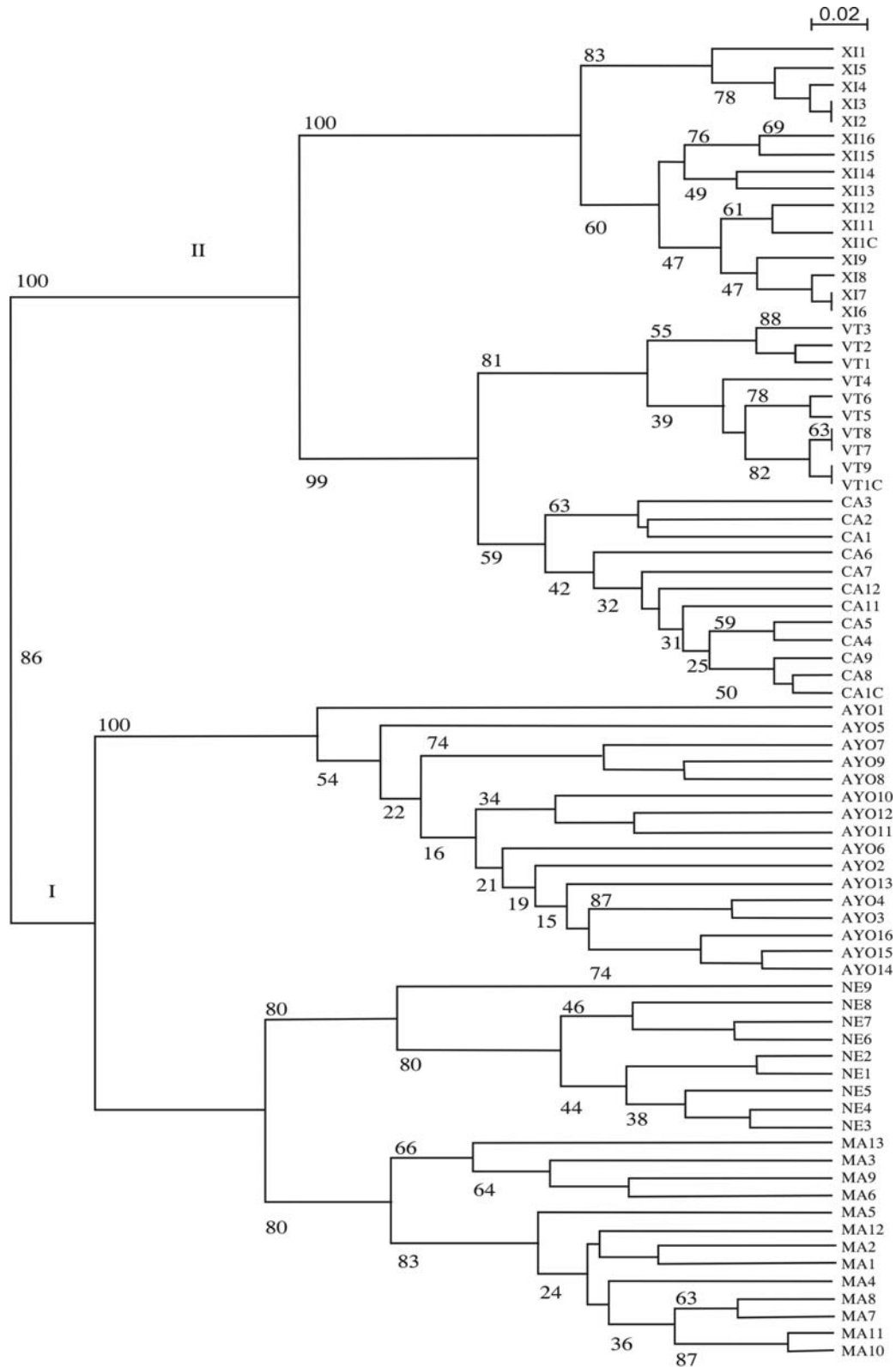


Figura 4. Dendrograma de relaciones entre individuos de variantes de maguey pulquero, generado mediante 1000 remuestros y con el coeficiente de Jaccard y 76 individuos con claves: 'Ayoteco' (AYO); 'Manso' (MA); 'Negro' (NE); 'Xilometl' (XI); 'Carrizo' (CA); y 'Verde' (VT). La línea superior indica 0.02 de disimilitud. Los números romanos indican grupos.



**Análisis de poblaciones en especies y variantes de maguey pulquero.** El porcentaje de *loci* polimórficos (P) entre las poblaciones o variantes fue de 73.2 % (Cuadro 4). Dentro de la población del maguey ‘Manso’ los individuos mostraron un polimorfismo de 32.5 %, los del maguey ‘Ayoteco’ 32.5 %, los del maguey ‘Verde’ 12.20 %, de ‘Xilometl’ 22.8 %, de ‘Negro’ 24.4 % y de ‘Carrizo’ 26.0 %. Estos valores indican que las poblaciones presentan baja variabilidad genética, y que si no se establecen estrategias de conservación en un futuro cercano podrían estar en peligro de extinción. Lo anterior es explicable por varias causas, como: la propagación vegetativa (por hijuelos), la drástica disminución del cultivo de maguey pulquero en el país, la ausencia de programas de mejoramiento genético, el nulo conocimiento de las selecciones de los productores y la actual sobreexplotación de las selecciones. El maguey ‘Manso’, el más cultivado a nivel nacional, presentó el mayor porcentaje de *loci* polimórficos (32.5), mientras que las selecciones particulares como el maguey ‘Verde’ (12.2), ‘Xilometl’ (22.8) y ‘Negro’ (24.39) presentan bajos porcentajes de *loci* polimórficos (Cuadro 4). El coeficiente de diversidad de Nei (H) (1973) para todos los *loci* estudiados en las seis poblaciones de magueyes pulqueros fue de  $0.27 \pm 0.20$  (Cuadro 4); en cada variante los coeficientes fueron:  $0.12 \pm 0.19$  para ‘Manso’,  $0.12 \pm 0.19$  para ‘Ayoteco’,  $0.04 \pm 0.11$  para ‘Verde’,  $0.08 \pm 0.17$  para ‘Negro’,  $0.08 \pm 0.17$  para ‘Xilometl’, y  $0.09 \pm 0.16$  para ‘Carrizo’. Estos valores confirman la reducida diversidad existente en las poblaciones; ‘Manso’ es el maguey que presentó la mayor diversidad, y las selecciones fueron las menos diversas. El número de alelos por locus (A) y el número efectivo de alelos (Ae) fueron semejantes para las seis poblaciones.

El Cuadro 4 también muestra que el coeficiente de diferenciación genética entre las poblaciones fue relativa-

mente alto ( $G_{ST} = 0.68$ ; 68 %), lo que indica que las poblaciones están altamente diferenciadas, posiblemente por selección dirigida de los productores que la realizaron para mejorar la calidad del pulque, penca y forraje, o la adaptabilidad de la planta a las condiciones agroecológicas.

El nivel promedio del flujo genético ( $Nm = 0.24$ ; Cuadro 4) fue muy bajo, e indica que existe menos de un individuo migrante por generación entre las seis poblaciones; esto explica el alto grado de diferenciación entre los magueyes analizados. Estos resultados son alarmantes, ya que las variantes o especies de magueyes pulqueros pueden estar en riesgo de desaparecer, ya sea por el tipo de propagación practicado o por el nulo interés por parte de las instituciones gubernamentales para realizar programas de mejoramiento genético (Gil-Vega *et al.*, 2001).

Las poblaciones pertenecientes a las dos especies conocidas de maguey pulquero, ‘Manso’ (*Agave salmiana* var. ‘Salmiana’) y ‘Carrizo’ (*Agave mapisaga* Trel) formaron dos grupos claramente diferenciados a una distancia genética de 0.42 (Figura 5). *Agave salmiana* var. ‘Salmiana’ (‘Manso’) está muy relacionado genéticamente con las variantes ‘Negro’ y ‘Ayoteco’ (0.89 y 0.83 de identidad, respectivamente); *Agave mapisaga* Trel (‘Carrizo’) se agrupó con las variantes ‘Verde’ y ‘Xilometl’, con valores de 0.91 y 0.82. Los resultados sugieren que el maguey ‘Negro’ podría considerarse como una selección de *Agave salmiana*, ya que está muy relacionado genéticamente con *A. salmiana* (Figuras 2 y 4). Las poblaciones más distantes fueron ‘Verde’ y ‘Manso’, con un valor de identidad de 0.64. Los taxónomos clasifican al maguey ‘Carrizo’ como *Agave mapisaga* Trel, y dado que el maguey ‘Verde’ está muy relacionado genéticamente con esta especie, es posible que sea una selección de la misma (Figura 5).

Cuadro 4. Diversidad genética dentro y entre las poblaciones de las variantes de maguey pulquero ‘Manso’, ‘Ayoteco’, ‘Verde’, ‘Xilometl’, ‘Negro’ y ‘Carrizo’.

Variiedad	P (%)	A	Ae	S	H	$G_{ST}$	Nm
‘Manso’	32.52	1.3252 (0.47)	1.2142 (0.36)	0.1781 (0.27)	0.1211 (0.19)		
‘Ayoteco’	32.52	1.3252 (0.47)	1.2074 (0.34)	0.1763 (0.27)	0.1191 (0.19)		
‘Verde’	12.20	1.1220 (0.33)	1.0626 (0.20)	0.0591 (0.17)	0.0384 (0.11)		
‘Xilometl’	22.78	1.2276 (0.42)	1.1473 (0.32)	0.1206 (0.24)	0.0820 (0.17)		
‘Negro’	24.39	1.2439 (0.43)	1.1446 (0.31)	0.1271 (0.24)	0.0855 (0.17)		
‘Carrizo’	26.02	1.2602 (0.44)	1.1482 (0.30)	0.1293 (0.24)	0.0860 (0.16)		
Entre poblaciones	73.17	1.7317 (0.44)	1.4822 (0.38)	0.4066 (0.28)	0.2757 (0.20)	0.6762	0.2394

P = Porcentaje de *loci* polimórficos; A = Número de alelos por locus; Ae = Número efectivo de alelos por locus; S = Coeficiente de diversidad de Shannon; H = Coeficiente de diversidad de Nei;  $G_{ST}$  = Coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones; Nm = Grado de flujo genético. Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar.

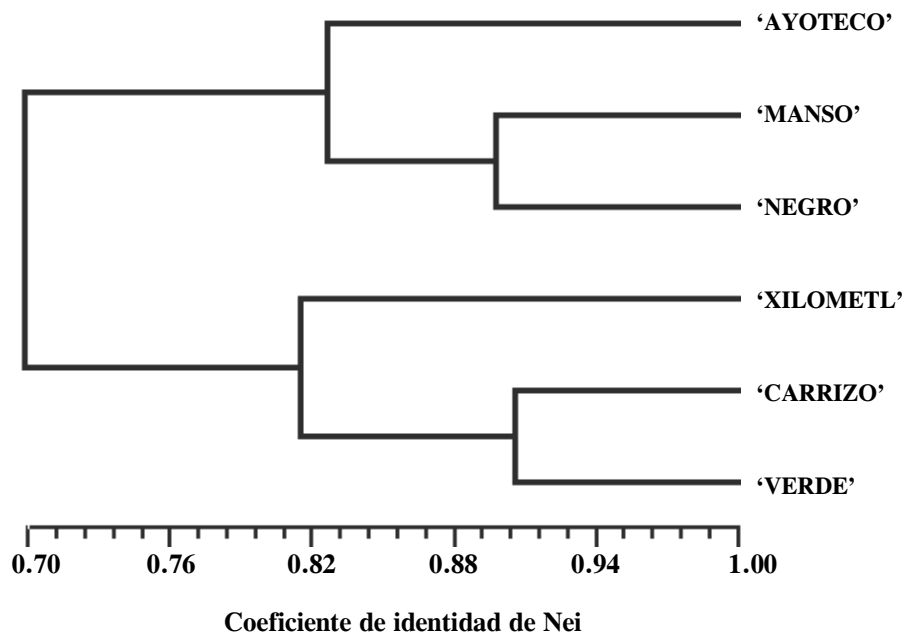


Figura 5. Dendrograma de relaciones genéticas entre poblaciones de magueyes pulqueros, con base a las identidades genéticas, obtenidas con la fórmula de Nei (1978).

Las relaciones detectadas permiten deducir que los magueyes pulqueros se han originado a partir de un ancestro común y que en algún momento de la evolución se separaron y dieron origen a las especies que actualmente se conocen. Si bien la relación genética existente entre ‘Carriizo’, ‘Xilometl’ y ‘Verde’ resultó muy estrecha, los caracteres morfológicos no permitieron establecer esta relación ya que en campo estos magueyes son muy diferentes entre sí. Se confirma así la confiabilidad de los marcadores moleculares para el análisis de poblaciones, ya que en los magueyes pulqueros permitieron la diferenciación de especies de manera clara, así como de las variantes dentro de especies. Los marcadores moleculares en general y los trece iniciadores que generaron estos patrones RAPD, explicaron la diversidad de los magueyes pulqueros y permitieron diferenciar a las especies y variantes.

**Contraste entre características morfológicas vs. marcadores moleculares (RAPD)**

Si se compara la eficiencia para agrupar entre los marcadores morfológicos (Figura 2) y los marcadores RAPD (Figura 6), y se considera que ambos dendrogramas se generaron con la distancia  $R^2$  semiparcial y el método de agrupamiento Ward Estándar, se deduce que los datos morfológicos permiten distinguir sólo cuatro grupos, porque mezclan al menos dos variantes y una especie. Esto se

atribuye al efecto del ambiente sobre el fenotipo de las plantas, ya que las variantes ‘Manso’ y ‘Verde’ son genéticamente muy diferentes pero fenotípicamente semejantes (Figuras 2 y 6). Otra posible explicación es que entre algunas variantes de maguey pulquero haya ocurrido evolución convergente para los genes que determinan las características evaluadas y así establecido cierto parecido fenotípico, lo que redundaría en la generación de dendrogramas poco confiables, con baja capacidad para discriminar entre especies y sus variantes (Figura 2). Los marcadores moleculares, en cambio, permitieron separar en forma clara a las especies taxonómicas y agrupar para cada una de ellas a las variantes seleccionadas por los productores. El uso de los marcadores RAPD’s permitió establecer que los productores cuentan con al menos seis variantes genéticamente diferentes de maguey pulquero que utilizan en el proceso productivo.

**CONCLUSIONES**

Las plantas más altas de maguey pulquero son las que presentan mayor número de hojas, hojas más largas y mayor número de espinas laterales. Los discriminantes morfológicos que permitieron distinguir mejor a las especies y variantes de magueyes pulquero, fueron la longitud de la espina principal y el número de espinas laterales, que explican 94 % de la variación. Las poblaciones de maguey

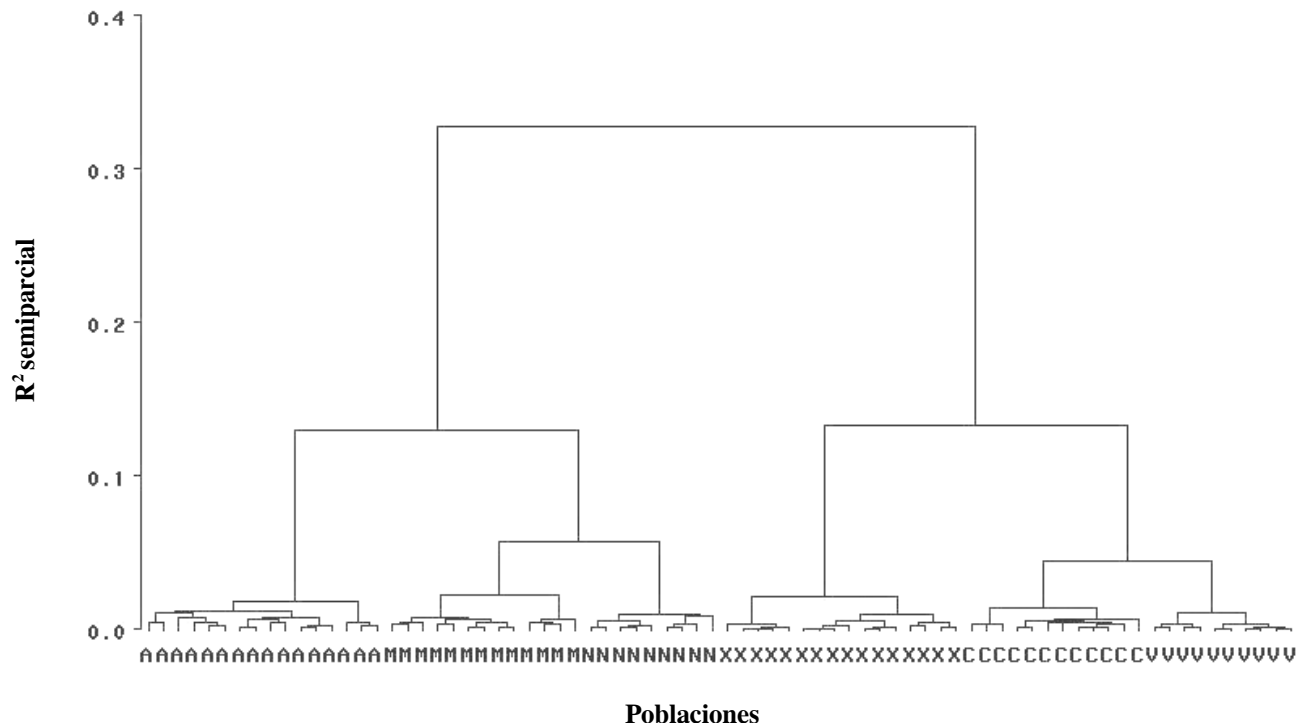


Figura 6. Dendrograma de relaciones genéticas entre las especies y variantes de magueyes pulqueros obtenido mediante el método de agrupamiento Ward Estándar y la distancia  $R^2$  semiparcial. Grupo A ('Ayoteco'); Grupo M ('Manso'); Grupo N ('Negro'); Grupo X ('Xilometl'); Grupo C ('Carrizo'); Grupo V ('Verde').

pulquero mostraron variabilidad genética reducida y bajo grado de flujo genético. Las poblaciones que se asociaron de manera estrecha con la especie *Agave mapisaga* Trel (maguey 'Carrizo') fueron las variantes 'Verde' y 'Xilometl', mientras que el *Agave salmiana* var. 'Salmiana' (maguey 'Manso') se relacionó genéticamente con 'Negro' y 'Ayoteco' (*Agave salmiana* var. 'Ayoteco').

## BIBLIOGRAFÍA

- Bowley R S (1999) A Hitchhiker's Guide to Statistics in Plant Biology. Ed. Ampersand Printing. Guelph, Ontario, Canada. pp:193-221.
- Dellaporta S L, J Wood, J B Hicks (1983) A plant DNA miniprep: version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1:19-21.
- dos Santos J B, J Nienhuis, P Skroch, J G Tivang, M K Slokum (1994) Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleraceae* L. genotypes. Theor. Appl. Genet. 87:909-915.
- García-Mendoza A (1995) Riqueza y endemismo de la familia Agavaceae en México. In: Conservación de Plantas en Peligro de Extinción: Diferentes Enfoques. E Linares, P Dávila, F Chiang, R Bye, T Elias (eds). Instituto de Biología, UNAM, México. pp:51-70.
- Gil-Vega K, M G Chavira, O M de la Vega, J Simpson, G Vandemark (2001) Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. Euphytica 119:335-341.
- Granados S D (1993) Los Agaves en México. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 252 p.
- Hallden C, N O Nilsson, I M Rading, T Sall (1994) Evaluation of RFLP and RAPD markers in a comparison of *Brassica napus* breeding lines. Theor. Appl. Genet. 88:123-128.
- Hampl V, A Pavlíček, J Flegr (2001) Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program Free Tree: application to trichomonad parasites. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:731-735.
- Isabel N, J Beaulieu, J Bousquet (1995) Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92:6369-6373.
- Jaccard P (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Soc. Vaudoise de Sci. Nat. 44:223-70.
- Moreno-González J, J I Cubero (1993) Selection strategies and choice of breeding materials. In: Plant Breeding: Principles and Prospects. M D Hayward, N O Bosermark, I Romagosa (eds). Chapman & Hall, London. pp:281-313.

- Nei M (1973)** Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70:3321-3323.
- Nei M (1978)** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89:583-590.
- Nobel P S (1998)** Los Incomparables Agaves y Cactus. Ed. Trillas. México. 778 p.
- Ramírez V P, R O Pascka, A L Herrera, F Castillo, M Livera, F Rincón, F Zavala (2000)** Recursos Fitogenéticos de México para la Alimentación y la Agricultura. Informe Nacional. Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas y Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. Chapingo, México. pp:1-100.
- Rzedowski R J, R G Calderón (1990)** Flora Fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología. Michoacán, México. 394 p.
- Statistics Analysis System (SAS) (1999)** Statistics Analysis System for Windows version 8th. SAS Institute, Inc. Cary, N.C. USA. pp:1-40.
- Sneath P H, R R Sokal (1973)** Principles of Numerical Taxonomy. H. Freeman & Co. San Francisco, Cal. U. S. A. pp:37-55, 123-166.
- Thormann C E, T C Osborn (1992)** Use of RAPD and RFLP markers for germplasm evaluation. *In: Applications of RAPD Technology to Plant Breeding*. Joint Plant Breeding Symposium Series CSSA/ASHS/AGA. pp:9-11.
- Williams J G K, A R Kubelik, K J Livak, J A Rafalski, S V Tingley (1990)** DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18:6531-6535.
- Yeh F C, R-C Yai, T Boyle (1999)** Popgene Version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. Quick User Guide. Alberta, Canada. 28 p.