



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ESTABLECIMIENTO DE UN BANCO DE GERMOPLASMA DE
AGAVE SPP.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Bióloga

PRESENTA:

Tania Kean Galeno

MODALIDAD: TESIS

DIRECTOR DE TESIS:

DR. AMAURY MARTÍN ARZATE FERNÁNDEZ

COASESOR:

DR. CARLOS JORGE AGUILAR ORTIGOZA

CAMPUS UNIVERSITARIO "EL CERRILLO", TOLUCA, MÉXICO

Resumen

En México, los Agaves tienen una gran importancia económica y cultural (Colunga-García, et al., 2009), además de ser plantas fundamentales en los ecosistemas áridos que habitan (Nobel, 1994; García-Mendoza, 2007). El aprovechamiento de la diversidad es un factor clave para la sustentabilidad de la industria de los agaves. Actualmente se buscan distintas aplicaciones para explotar este recurso sin comprometer su perseverancia en el ambiente, sin embargo, su uso se ve condicionado por la información disponible (Colunga-García, et al., 2007), por lo que en el presente trabajo se contribuye ampliando la información de las especies involucradas, y conservándolas a largo plazo, para facilitar la accesibilidad del germoplasma vegetal a los fitomejoradores, investigadores y otros usuarios.

El objetivo del presente trabajo fue establecer un banco de germoplasma *ex-situ* e *in-vitro* de las especies del género *Agave* L. distribuidas en el Estado de México, generar un mapa de distribución del género para el Estado de México y generar la huella genética de los materiales resguardados en el banco de germoplasma,

Para obtener el material vegetal que se establecería en el banco de germoplasma, así como la distribución del género *Agave* L. en el Estado de México se realizó una búsqueda en MEXU (Herbario Nacional de México) y en registros de la CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). Además de 14 colectas que cubrieron 15 municipios del Estado de México, realizadas del 03/03/2015 al 14/05/2016. Los ejemplares colectados se identificaron usando los datos tomados en campo, antecedentes de las zonas y mediante el uso de las claves de Gentry (1982), e Irish e Irish (2000), una vez identificados y etiquetados se procesaron para su establecimiento en el banco de germoplasma. Con la

información obtenida se elaboró el mapa de distribución mediante los programas de ArcGis 10.1 y Google earth 7.2.

Para generar la huella genética de las 15 especies colectadas, se extrajo el ADN de un ejemplar de cada especie mediante el método CTAB (bromuro hexadeciltrimetilamonio) (Zhou *et al.*, 1999) y se amplificó (Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR) usando cinco iniciadores RAPD (Los Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar) y cinco SSR (Secuencias Simples Repetidas).

Con los patrones de bandeo obtenidos se generaron matrices binarias, que se analizaron mediante el programa POPGENE (versión 1.32; Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta and Center for Internacional Forestry Research, AB, Edmonton, Canadá) usando el algoritmo más elemental para la matriz de distancia o UPGMA (Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average). La diferenciación genética se estimó a través de los valores de distancia genética, se obtuvieron los dendrogramas correspondientes para cada tipo iniciador además de uno integral que considero ambos iniciadores.

Como resultado de las colectas se obtuvo 35 ejemplares, de 15 especies del género *Agave* L. así como frutos y semillas de cinco especies, en conjunto con la investigación en herbarios se consideran 17 las especies del género *Agave* L. distribuidas en el Estado de México las cuales son: *Agave angustifolia*, *A. americana*, *A. angustiarum*, *A. angustifolia*, *A. applanata*, *A. attenuata*, *A. dasyliroides*, *A. filifera*, *A. ghiesbreghtii*, *A. horrida*, *A. inaequidens*, *A. lecheguilla*, *A. mapisaga*, *A. salmiana*, *A. tequilana*, *A. xylonacantha*, *A. atrovirens* y *A. deserti* (de las primeras 15 se obtuvo ejemplares durante las colectas, de las últimas 2 no fue posible).

La distribución del género *Agave* L. dentro del Estado de México se vio conglomerada en la zona noreste (en la sierra de Guadalupe) y a la zona sureste.

El banco de germoplasma planteado se elaboró *in-vitro* a partir de semillas de cinco especies las cuales fueron *Agave salmiana*, *A. horrida*, *A. angustifolia*, *A. inaequidens* y *A. attenuata* y *ex-situ* a partir de las 15 especies colectadas, es decir el banco de germoplasma elaborado comprende el 88.2% de la diversidad de especies del genero *Agave* L. distribuidas en el Estado de México.

Como resultado del análisis molecular se obtuvo que los iniciadores RAPD e SSR anclados, mostraron polimorfismo entre las 15 especies del género *Agave* L. analizadas, y permitieron la caracterización de cada una de ellas mediante su huella genética. Los dendrogramas de los iniciadores RAPD y SSR, así como del análisis integral (RAPD + SSR), mostraron grupos constantes de especies y en algunos casos fue posible relacionar genéticamente a las especies según su morfología.

Índice

Sección	pagina
Resumen	III
I. Introducción	1
II. Justificación	1
III. Objetivos.....	2
3.1 Objetivo general.....	2
3.2 Objetivos particulares.	2
IV. Hipótesis	3
V. Antecedentes	3
5.1 El género <i>Agave</i> L.	3
5.1.1 Taxonomía	4
5.1.2 Morfología del género <i>Agave</i> L.....	5
5.2 Banco de germoplasma de <i>Agave</i> L.	6
5.2.1. Diversidad genética	8
5.3 Huella genética	8
5.3.1 Marcadores genéticos	9
5.3.1.1 Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar (RAPD).....	9
5.3.1.2 Microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR)	10
5.3.2 Marcadores genéticos en el género <i>Agave</i> L.....	11
5.5 Ubicación del área de estudio el Estado de México	12
5.6 Agaves en el Estado de México	13
VI. Materiales y métodos	13
6.1 Obtención de accesiones.....	13
6.2 Trabajo de campo	13
6.3 Trabajo de gabinete	14
6.4 Banco <i>ex-situ</i>	14
6.4.1 Manejo de frutos y semillas	14

6.5 Banco <i>in- vitro</i>	15
6.5.1 Desinfestación	15
6.5.2 Establecimiento <i>in-vitro</i>	15
6.5.3 Adaptación.....	16
6.6 Extracción de ADN.....	16
6.6.1 Determinación del ADN	17
6.6.1.1 Cuantitativamente	17
6.6.1.2 Cualitativa	17
6.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	17
6.7.3 Selección de cebadores	18
6.7.4 Condiciones de amplificación	19
6.7.5 Separación de los fragmentos amplificados	20
6.7.6 Análisis de datos	20
VII. Resultados y discusiones.....	21
7.1 Revisión de Exicatas.....	21
7.2 Realización de colectas	26
7.3 Banco de germoplasma	27
7.3.1 Banco de germoplasma <i>ex -situ</i>	28
7.3.2 Banco de germoplasma <i>in- vitro</i>	34
7.4 Distribución de <i>Agave</i> spp. en el Estado de México.....	35
7.4.1 Distribución de las especies del género <i>Agave</i> L. por municipio.....	39
7.5 Huella genética	42
7.5.1 Análisis del ADN extraído	42
7.5.2 Análisis con iniciadores RAPD	43
7.5.3 Análisis con iniciadores ASSR.....	50
7.5.4 Analisis integrado con iniciadores RAPD y ASSR	57
VIII. Conclusiones	61
IX. Bibliografía.....	63

Lista de Cuadros

Cuadros	pagina
Referencias relacionadas a trabajos con marcadores genéticos moleculares en el género <i>Agave</i> L.	12
Secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación en PCR del ADN nuclear de 15 especies de <i>Agave</i> L.	18
Colectas de agaves realizadas en 15 municipios del Estado de México	27
Banco de germoplasma <i>in-vitro</i> con 5 especies de <i>Agave</i> L.	34
Pureza del ADN obtenido.....	42
Características de los fragmentos amplificados de ADN con cuatro iniciadores RAPD de 10 bases en 15 especies de <i>Agave</i> L.	44
Matriz binaria mostrando el polimorfismo generado con cuatro iniciadores RAPD de 10 bases para el análisis	45
Distancia genética de Nei (1972), entre las 15 especies del género <i>Agave</i> L., usando iniciadores RAPD de 10 bases.....	49
Distancia genética de Nei (1972), entre las 15 especies del género <i>Agave</i> , usando iniciadores RAPD de 10 bases.....	49
Características de los fragmentos amplificados de ADN con cinco ASSR de 17 bases en 15 especies de <i>Agave</i> L.....	51
Matriz binaria mostrando el polimorfismo generado con cinco iniciadores RAPD de 10 bases para el análisis molecular de 15 especies de <i>Agave</i> L. 1 = presencia de bandas específicas	51
Distancia genética de Nei (1972), entre las 15 especies del género <i>Agave</i> , usando iniciadores ASSR de 17 bases.....	56
Características de los fragmentos amplificados de ADN con RADSP (10b) e ASSR (17b) en 15 especies de <i>Agave</i> L.....	58
Distancia genética de Nei (1972), entre las 15 especies del género <i>Agave</i> L., usando iniciadores RAPD (10b) e ASSR (17b).....	59

Lista de Figuras

Figuras	pagina
Figura 1. Ejemplares colectados y resguardados en el invernadero de Recursos Genéticos den la Facultad de Ciencias Agrícolas de laUAEMex. a) <i>A. attenuata</i> , b) <i>A. horrida</i> , c) <i>A. salmiana</i> , d). <i>A. ghiesbregtii</i> y e) <i>A. xilonacantha</i>	31
Figura 2. Ejemplares colectados y resguardados en el invernadero de Recursos Genéticos den la Facultad de Ciencias Agrícolas de laUAEMex. a) <i>A.tequilana</i> , b) <i>A. aplanatta</i> , c) <i>A. angustiarum</i> , d). <i>A.mapisaga</i> , e) <i>A. angustifolia</i> y f) <i>A. inaequidens</i>	32
Figura 3. Ejemplares colectados y resguardados en el invernadero de Recursos Genéticos den la Facultad de Ciencias Agrícolas de laUAEMex. a) <i>A. americana</i> , b) <i>A. dasylirioides</i> , c) <i>A. filifera</i> , y d) <i>A. lecheguilla</i>	33
Figura 4. Ejemplares del género <i>Agave</i> L.. in-vitro obtenidos por cultivo de embriones cigóticos. a) <i>A. salmiana</i> , b) <i>A. salmiana</i> , c) <i>A. horrida</i> , d) <i>A. angustifolia</i> , e) <i>A. attenuata</i> , f) proceso de adaptación en <i>A. salmiana</i>	34
Figura 5 Mapa de la distribución de las 17 especies de <i>Agave</i> en el Estado de México ..	36
Figura 6 Distribución de las especies de <i>Agave</i> L. en el estado de México, acercamiento a la zona norte	37
Figura 7. Distribución del genero <i>Agave</i> L. en el Estado de México, acercamiento a la zona sur.	38
Figura 8 Productos de amplificación de PCR utilizando iniciadores RAPD de 10 bases en 15 especies de <i>Agave</i> L. Pares de bases (pb), Marcador de peso molecular (derecha 2000-100 pb, izquierda 700-100 pb). a) Iniciador Y24, b) Iniciador Y37.....	46
Figura 9 Productos de amplificación de PCR utilizando iniciadores RAPD de 10 bases en 15 especies de <i>Agave</i> L. Pares de bases (pb), Marcador de peso molecular (derecha 2000-100 pb, izquierda 700-100 pb). a) Iniciador Y38, b) Iniciador Y41.....	47
Figura 10 Dendrograma mostrando el agrupamiento de 15 especies del género <i>Agave</i> obtenido a partir del análisis con iniciadores RADP de 10 bases basado en la distancia genética de Nei (1972), usando el método UPGMA. (1: Subgénero <i>Agave</i> : A: Grupo <i>Rigidaeb</i>	47
Figura 10 Dendrograma mostrando el agrupamiento de 15 especies del género <i>Agave</i> L. obtenido a partir del análisis con iniciadores RAPD de 10 bases basado en la distancia genética de Nei (1972), usando el método UPGMA. (1: Subgénero <i>Agave</i> : A: Grupo <i>Rigidae</i> , C: Grupo <i>Salminae</i> , D: Grupo <i>campaniflorae</i> , F Grupo. <i>Ditepalae</i> , I: Grupo <i>Americanae</i> . 2: Subgénero <i>Littaea</i> : B. Grupo <i>Marginatae</i> , E: Grupo <i>striatae</i> , G: Grupo <i>filiferae</i> , H: Grupo <i>Amolae</i> . Altitud de colecta en msnm).	48
Figura 11 Productos de amplificación de PCR utilizando iniciadores ASSR de 17 bases en 15 especies del género <i>Agave</i> L. Pares de bases (pb), Marcador de peso molecular (derecha 2000-100 pb, izquierda 700-100 pb, a) Iniciador ASSR 02 y b) ASSR15.b	53
Figura 11 Productos de amplificación de PCR utilizando iniciadores ASSR de 17 bases en 15 especies de <i>Agave</i> L. Pares de bases (pb), Marcador de peso molecular (derecha 2000-100 pb, izquierda 700-100 pb, a) Iniciador ASSR 02 y b) ASSR15.	53

Figura 11 Productos de amplificación de PCR utilizando iniciadores ASSR de 17 bases en 15 especies del género <i>Agave</i> L. Pares de bases (pb), Marcador de peso molecular (derecha 2000-100 pb, izquierda 700-100 pb, a) Iniciador ASSR 02 y b) ASSR15.	53
Figura 12 Productos de amplificación de PCR utilizando iniciadores ASSR de 17 bases en 15 especies de <i>Agave</i> L.. Pares de bases (pb), Marcador de peso molecular (derecha 2000-100 pb, izquierda 700-100 pb, a) Iniciador ASSR15, b) iniciador ASSR20.	54
Figura 12 Productos de amplificación de PCR utilizando iniciadores ASSR de 17 bases en 15 especies de <i>Agave</i> . Pares de bases (pb), Marcador de peso molecular (derecha 2000-100 pb, izquierda 700-100 pb, a) Iniciador ASSR15, b) iniciador ASSR20.aa	54
Figura 13 Producto de amplificación de PCR utilizando iniciadores ASSR de 17 bases en 15 especies de <i>Agave</i> . Pares de bases (pb), Marcador de peso molecular (derecha 2000-100 pb, izquierda 700-100 pb, iniciador ASSR 35.b	54
Figura 13 Producto de amplificación de PCR utilizando iniciadores ASSR de 17 bases en 15 especies de <i>agave</i> . L.Pares de bases (pb), Marcador de peso molecular (derecha 2000-100 pb, izquierda 700-100 pb, iniciador ASSR 35.	55
Figura 14 Dendrograma mostrando el agrupamiento de 15 especies del género <i>Agave</i> L. obtenido a partir del análisis con iniciadores ASSR de 17 bases basado en la distancia genética de Nei (1972), usando el método UPGMA. (1: Subgénero <i>Agave</i> : A: Grupo <i>Rigidae</i> , C: Grupo <i>Salminae</i> , D: Grupo <i>campaniflorae</i> , F Grupo. <i>Ditepalae</i> , I: Grupo <i>Americanae</i> . 2: Subgénero <i>Littaea</i> : B. Grupo <i>Marginatae</i> , E: Grupo <i>striatae</i> , G: Grupo <i>filiferae</i> , H: Grupo <i>Amolae</i> . Altitud de colecta en msnm).	57
Figura 15 Dendrograma mostrando el agrupamiento de 15 especies del género <i>Agave</i> L. obtenido a partir del análisis con ambos iniciadores RAPD de 10 bases y ASSR de 17 bases basado en la distancia genética de Nei (1972), usando el método UPGMA. (1: Subgénero <i>Agave</i> : A: Grupo <i>Rigidae</i> , C: Grupo <i>Salminae</i> , D: Grupo <i>campaniflorae</i> , F Grupo. <i>Ditepalae</i> , I: Grupo <i>Americanae</i> . 2: Subgénero <i>Littaea</i> : B. Grupo <i>Marginatae</i> , E: Grupo <i>striatae</i> , G: Grupo <i>filiferae</i> , H: Grupo <i>Amolae</i> . Altitud de colecta en msnm).....	60

I. Introducción

El género *Agave* L. representa plantas de importancia económica y cultural para México, considerado como su centro de origen y diversificación. Actualmente se buscan distintas aplicaciones industriales para explotar este recurso, sin comprometer su sustentabilidad y perseverancia en el ambiente. Sin embargo, su uso se ve condicionado por la información disponible (García-Mendoza, 2002; Colunga-García, et al., 2007), por lo que en el presente trabajo se presenta un estudio sobre la distribución de las especies de *Agave* en el Estado de México y su huella genética, así mismo se plantea el establecimiento de un banco de germoplasma de *Agave* ssp. pertenecientes al Estado de México *ex-situ* e *in-vitro*, con el fin de contribuir con la conservación a largo plazo y la accesibilidad del germoplasma vegetal para los fitomejoradores, investigadores y otros usuarios.

II. Justificación

Actualmente existe una pronunciada tendencia hacia la pérdida de la variación intraespecífica de los cultivos más representativos (Bellon *et al.*, 2009). Para contrarrestarla se ha establecido una red mundial de bancos de germoplasma, con el fin de asegurar los cultivos y sus recursos genéticos. Un importante factor que impulsa la creación de estos bancos es el cambio climático, al resguardar la variación genética se procura mantener la capacidad de la vegetación para adaptarse a condiciones dinámicas e índices de cambios cada vez más rápidos (Hammer y Khoshbakht, 2010). En el género *Agave* L. la falta de variación ya ha generado pérdidas, en 1980 y 1996-1997, ocurrieron bajas en las plantaciones de *A. tequilana* relacionadas a un incremento de lluvia y altas temperaturas, exponiendo las plantaciones a patógenos, las pérdidas se reportaron en más de 25% de las plantaciones a nivel nacional (Dalton, 2005).

Existen trabajos relacionados a la baja diversidad genética intraespecífica a la que tienden las plantaciones de especies de importancia económica, a saber: *A.*

tequilana, *A. fourcroydes*, *A. salmiana* y *A. mapisaga*, la cual ha sido determinada mediante marcadores moleculares (Colunga-García *et al* 1999; Gil *et al.*, 2001; Barraza-Morales *et al.*, 2006; Rodríguez, 2008; Rojas *et al.*, 2007).

Considerando lo anterior el presente trabajo contribuye al conocimiento de las especies de *Agave* colectadas en el Estado de México el establecimiento de un banco de germoplasma para el género *Agave* L. *ex-situ* que se estableció en el invernadero de Recursos Genéticos en la Facultad de Ciencias Agrícolas e *in-vitro* en el laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMEX) así como la generación de su huella genética, a fin de conservar y utilizar la biodiversidad de Agaves presentes en el Estado de México en proyectos de investigación, mejoramiento genético y diversidad productiva.

III. Objetivos

3.1 Objetivo general

Establecimiento de un banco de germoplasma para las especies del género *Agave* L. colectadas en el Estado de México.

3.2 Objetivos particulares

- Generar un mapa de distribución para las especies del género *Agave* L. presentes en el Estado de México.
- Establecer un banco de germoplasma *Ex-situ* e *In-vitro* de las especies de *Agave* L. colectadas durante el presente trabajo.
- Generar la huella genética de las especies de *Agave* L. establecidas en el banco de germoplasma.

IV. Hipótesis

1. Es posible el establecimiento de un banco de germoplasma *ex-vitro* e *in-vitro* como medio de conservación del género *Agave* L.
2. Es posible generar un mapa de distribución para el género *Agave* distribuido en el Estado de México.
- 3.-Es posible obtener la huella genética de las especies establecidas en el banco de germoplasma.

V. Antecedentes

5.1 El género *Agave* L.

Agave Linnaeus, es un género establecido en 1753, por Linneo, actualmente se le adjudican más de 200 especies, de las cuales un 75% se encuentran en México, por lo que se le considera el centro de origen. Se distribuye desde el sur de U.S.A hasta Colombia y Venezuela incluyendo las islas del caribe (García-Mendoza, 2002).

En los Agaves, el número cromosómico básico (x) y el haploide (n) suman 30 ($2n = 60$), por lo que se consideran organismos paleopoliploides. Los Agaves tienen cariotipos bimodales altamente asimétricos (cinco cromosomas largos y veinticinco cortos) (García-Mendoza, 2007). El género *Agave* L. es considerado joven con una edad de 7.8 a 10.1 millones de años, dentro de las Agaváceas es el más diverso (Good-Avila *et al.*, 2006).

En México, los Agaves han tenido y tienen una gran importancia económica y cultural Colunga-García *et al.*, (2007) mencionan que 74 especies y veintiocho taxa infraespecíficos están reportados en México para su uso como fuente de alimento,

bebida, medicina, combustible, cobijo, ornato, fibras duras extraídas de las hojas (ixtle), abono, construcción de viviendas y elaboración de implementos agrícolas, entre otros usos, además de ser plantas fundamentales en los ecosistemas áridos que habitan, también mantienen relaciones ecológicas importantes como el mutualismo con murciélagos (Dalton, 2005; García- Mendoza, 2007; Nobel,1994).

El aprovechamiento de la diversidad biológica y cultural puede ser un factor clave para la sustentabilidad de la industria de los Agaves, si se caracteriza y utiliza la agrobiodiversidad generada durante milenios y se recrea su amplia gama de usos y procesos tradicionales

5.1.1 Taxonomía

La clasificación taxonómica del Género *Agave* L. ha sido objeto de controversias debido a su gran variación fenotípica y genotípica incluso dentro de la misma especie y de una misma población, según el Agrupamiento para la Filogenia de las Angiospermas III, 2009 (APGIII, 2009) <<The Angiosperm Phylogeny Group III, 2009,>> *Agave* L. es un género de monocotiledoneas, perteneciente a la familia Asparagaceae; sin embargo, en este trabajo se maneja por practicidad la clasificación de Cronquist, 1981.

Reino Plantae Haeckel, 1866

 División Magnoliophyta Cronquist, Takht. & Zimmerm. 1966

 Liliopsida Cronquist, Takht. & Zimmerm., 1966

 Subclase Liliidae Takht., 1966

 Orden Liliales Lindl., 1833

 Familia Agavaceae Endl., 1841

 Género *Agave* L., 1753

El género *Agave* L. fue redefinido por Gentry en 1982, quien propone la división del género en dos subgéneros, con base en su estructura floral, *Littaea* que incluye especies con una inflorescencia espiciforme subdivididas en ocho secciones o grupos que contemplan 54 especies y *Agave* con una inflorescencia paniculada, subdividida en 12 secciones que contemplan 82 especies.

Una clasificación actual usada de forma práctica divide a las agaváceas en “*Agave sensu stricto*”, referido a la agrupación tradicional del género *Agave* L. y “*Agave sensu lato*” que incluye a los géneros *Manfreda* Salisb., *Polianthes* L. y *Prochnyanthes* S. Watson, esto con base en estudios filogenéticos (Good-Avila et al., 2006).

5.1.2 Morfología del género *Agave* L.

Las plantas pertenecientes al género *Agave* L. se pueden describir a grandes rasgos como grandes hierbas suculentas, la roseta se considera perenne debido a que requiere de 8 a 20 años para madurar (Gentry, 1982).

Rosetófilas acaules o caulescentes, pocas veces herbáceas, solitarias o coloniales, iteróparas o semélparas; Tallos simples, ramificados o ausentes rizomatosos o presencia de cormo-bulbos; raíces fibrosas o carnosas; Hojas dispuestas en espiral, en el ápice del tallo o del cormo-bulbo, en rosetas densas o laxas, erectas o recurvadas, lineares, lanceoladas o deltoideas, base generalmente dilatada y carnosa; ápice con espina terminal, mucrón, margen dentado, denticulado, córneo, filífero o entero, suculentas, fibrosas o membranáceas, generalmente glabras, escabrosas o rara vez pubescentes; Inflorescencias terminales racemosas, espiciformes o paniculadas; pedúnculo con brácteas pareadas y bractéolas; Flores bisexuales, actinomorfas, solitarias o fasciculadas, pediceladas o sésiles, erectas o péndulas; epíginas o hipóginas, trimeras, perigonio gamotépalo o politépalo; 6 tépalos, biverticilados, blanquecinos, verde-amarillentos a rojizos, libres o fusionados en un perigonio tubular, infundibuliforme, hipocrateriforme, campanulado, erectos o refejos, con tricomas internos; nectarios septales; 6 estambres, biverticilados, inclusos o exertos, unidos a los tépalos en la base; filamentos filiformes o engrosados en la base, la parte media o el ápice; anteras versátiles de dehiscencia longitudinal; polen sulcado o bisulcado; ovario ínfero, tricarpelar, trilocular; óvulos anátropos, numerosos, 2-series por lóculo; estilo

incluso o exerto, filiforme o triquétero, estigma trilobado; frutos capsulares con dehiscencia loculicida; semillas lunulares, triangulares, aplanadas, angostamente aladas en la porción convexa a semiesféricas, negras, brillantes u opacas; embrión recto o ligeramente curvo; endospermo con aleurona y aceites (García-Mendoza, 2011).

5.2 Banco de germoplasma de *Agave L.*

Aunque México es un país megadiverso, actualmente permanece menos del 54% de su vegetación original, en parte debido a la pérdida acelerada de hábitats naturales, por ello es necesario crear estrategias para detener la pérdida de especies, así como para conservar su germoplasma (Eguiarte *et al.*, 2013; Nobel, 1994).

En el área de los recursos genéticos, un banco de germoplasma es un lugar destinado a la conservación de la diversidad genética, así mismo es una de las estrategias de la biología de la conservación, que implica la conservación de las distintas formas del germoplasma en ambientes controlados o semicontrolados por el hombre (Rodríguez, 2008; Engelmann, 2011). Ledig (1998) y Primark (1995) consideran que ésta estrategia es una de las mejores alternativas para conservar especies.

Los recursos fitogenéticos constituyen el material de partida para el mejoramiento de cultivos, su uso y conservación, por lo tanto, es esencial para la sustentabilidad de la civilización actual (FAO, 2014). La biotecnología vegetal ofrece una serie de técnicas que pueden ser útiles para la conservación de especies a través del establecimiento de bancos de germoplasma, entre las que destacan las relacionadas con el cultivo *in-vitro* (Engelmann, 2011; Rodríguez, 2008).

Una de las aplicaciones del cultivo *in-vitro* es la propagación masiva, técnica que permite obtener una gran cantidad de plantas en tiempos y espacios reducidos. Esta metodología se ha desarrollado ya para varias especies del género *Agave* L. y ha demostrado ser más eficiente que cualquiera de los métodos convencionales de propagación que se han manejado (Gómez *et al.*, 2008), otra aplicación del cultivo *in-vitro* es la conservación por tiempo indefinido de tejidos vivos. Éstos pueden mantenerse bajo condiciones controladas para disminuir el mantenimiento que requieren los subcultivos lo que facilita y abarata la conservación a mediano plazo de cultivos *in- vitro* de *Agave* L. (Pérez *et al.*, 2012).

Un punto importante a considerar para la conservación del género *Agave* L. es debido a que la mayoría de especies presentan cierto endemismo, por ejemplo, el 60% de las especies de Agavaceas en México, se distribuyen en zonas restringidas a áreas menores de 36,100 km² (Tambutti, 2002), considerando lo anterior y la destrucción y modificación de la flora nativa que México sufre actualmente, se ve la necesidad de generar estrategias de conservación *in-situ* y *ex-situ* para proteger la diversidad genética del género (Eguiarte *et al.*, 2013).

Instituciones como la UNAM (Universidad Nacional Autónoma del Estado de México), el CICY (Centro de Investigación Científica de Yucatán) la Universidad de Guanajuato, y empresas como Tequila Sauza, han mantenido desde hace años colecciones vivas en sus jardines botánicos o en sus colecciones de trabajo. De igual forma, el CICY (Centro de Investigación Científica de Yucatán) y la UACH (Universidad Autónoma de Chapingo) han mantenido colecciones *in-vitro* de germoplasma de henequén, mezcaleros y tequileros (Bellon *et al.*, 2009), mientras que la Universidad de Aguascalientes mantiene un banco *in-espacio vitro* de 10 especies, de interés por su explotación o por su estado de amenaza (Pérez *et al.*, 2012). El Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos (SINAREFI) de la SAGARPA ha coordinado y auspiciado la creación y mantenimiento de la una Red de Agaváceas que tiene como fin el diagnóstico del estatus del recurso en México y la

generación de su respectivo plan estratégico, entre sus estrategias, se encuentra la conservación *in-vitro* y *ex-vitro* (SINAREFI, 2015).

5.2.1. Diversidad genética

La diversidad genética o variabilidad genética, es el componente básico de la biodiversidad y se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie (Piñero et al., 2008). Es responsable de todos los procesos biológicos del planeta. La pérdida de variabilidad genética conduce a los individuos a decrecer su respuesta a cambios ambientales al ser responsable de la presencia de características diferenciales en cada individuo, conjuntamente es necesaria para contrarrestar el riesgo de la vulnerabilidad a plagas y factores ambientales diversos y para preservar los complejos de genes adaptados (Meffe y Carroll, 1997; Iglesias *et al.*, 2000).

5.3 Huella genética

Las técnicas de biotecnología vegetal a menudo requieren caracterizaciones de diversos materiales vegetales, estas caracterizaciones se llevan a cabo mediante técnicas para el análisis de genomas que permiten detectar fragmentos específicos del ADN mediante marcadores genéticos y que se conocen como “huellas genéticas”, su utilidad deriva de que facilita la comparación de partes discriminativas de secuencias del genoma específicas para diversos fragmentos de ADN (Archak, 2000). Aunque la terminología se restringe a la caracterización molecular llevada a cabo mediante el objetivo de identificación para diversas especies, se usan comúnmente para medir similitud y distancias genéticas, para el análisis genético de poblaciones, análisis fenéticos y filogenéticos, como el desarrollo de dendrogramas y análisis de componentes principales (PCA) (Weising *et al.*, 1994).

En general patrones de huellas genéticas de muestras particulares, son poco informativos por sí mismos, en lugar de ello los patrones generados se suelen comparar con otros, en este sentido los análisis estadísticos les dan un significado biológico a los patrones obtenidos (Archak, 2000; Weising *et al.*, 2005).

5.3.1 Marcadores genéticos

Un marcador genético es cualquier gen cuya expresión permite un efecto fenotípico que puede ser detectado fácilmente y es capaz de detectar variación, ya sea en una proteína o en una secuencia de ADN. los marcadores genéticos se dividen en morfológicos y moleculares, estos últimos a su vez se dividen en bioquímicos como las isoenzimas, y los marcadores que se basan en ADN como los RAPDs (Amplificación de ADN al azar), RFLP (Fragmentos de restricción polimórficos de ADN amplificados) y microsatélites SSR (Secuencias simples repetidas), entre otros (Vicente y Fulton, 2003).

La tecnología de los marcadores genéticos basados en ADN polimórfico y proteínas se utiliza ampliamente en diversas áreas de la investigación biológica y han remplazado a las estrategias clásicas para la evaluación de la diversidad (Weising *et al.*, 2005).

5.3.1.1 Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar (RAPD)

Los Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar o Random Amplified Polymorphic ADN (RAPD) son marcadores que amplifican aleatoriamente segmentos de ADN en una gran variedad de especies; se basan en la probabilidad estadística de que se presenten sitios complementarios al oligonucleótido, generalmente de 10 bases, a lo largo del genoma. El polimorfismo de los fragmentos entre los individuos se debe a cambios en la secuencia de los nucleótidos en los sitios de acoplamiento del

oligonucleótido y por inserción o deleción de los fragmentos en estos sitios (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009; Rentarúa, 2011).

Los polimorfismos producidos con esta técnica pueden resultar de cualquier cambio en la secuencia o sitio de unión del iniciador (mutación puntual), lo cual impide que el iniciador se una a la cadena, o también pueden ser el producto de cambios que alteren el tamaño o impidan la exitosa amplificación del ADN molde. Como regla general, el tamaño de las variantes se detecta muy escasamente y los productos de amplificación individuales representan un alelo por locus (Azofeifa-Delgado, 2006).

Estos marcadores son dominantes, es decir, no se pueden discernir entre los homocigotos dominantes de los heterocigotos para un segmento particular, por lo que la estimación de las frecuencias alélicas se debe hacer de manera indirecta, asumiendo equilibrio de Hardy-Weinberg (Rentarúa, 2011).

La técnica de RAPD es relativamente fácil que no necesita conocimiento previo de la secuencia del ADN, el número de *loci* que puede ser examinado es ilimitado, no requiere pruebas radioactivas, se pueden manejar iniciadores universales, tienen un costo bajo, la técnica es relativamente sencilla y se utiliza una cantidad pequeña de ADN para el análisis (Debener *et al.*, 1996; Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009; Rentarúa, 2011).

5.3.1.2 Microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR)

Las Secuencias Simples Repetidas o Short Sequence Repeats (SSR), son regiones hipervariables que se componen de secuencias motivo de pocos pares de bases (uno a cuatro, por ejemplo mononucleótidos (TT)_n, dinucleótidos (AT)_n, o tetranucleótidos (ATGC)_n) repetidas muchas veces, las cuales se asume que están azarosamente distribuidas por todo el ADN; estos *loci* se encuentran en regiones

codificantes (exones) y no codificantes (intrones), del ADN y es probable que se formen por eventos de rompimiento que generan polimorfismos con valores superiores al 90% (Azofeifa-Delgado, 2006; Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009; Rentarías, 2011).

El desplazamiento de la polimerasa durante la replicación de ADN o el deslizamiento de las cadenas, es la causa principal de la variación en el número de unidades repetidas de un microsatélite, dando como resultado el polimorfismo en el tamaño. Entre las ventajas de trabajar con microsatélites incluye la codominancia de alelos, su abundancia en el genoma en eucariotas, su distribución azarosa, alta reproducibilidad y se pueden utilizar múltiples cebadores. Entre las desventajas encontramos que no se pueden utilizar en grupos no estudiados y pueden originar alelos nulos por mutaciones. Han sido detectados en el genoma de casi todos los organismos que se han estudiado, entre ellos numerosas especies de plantas (Weising *et al.*, 2005; Rentarías, 2011).

Los microsatélites se pueden usar para los estudios de genética intra e inter específica; debido a que presentan ciertas ventajas sobre otros marcadores, por ejemplo: a) tienen el más alto polimorfismo; b) segregan de manera mendeliana y son codominantes; c) la presencia de un solo locus genético por microsatélite hace que la lectura de los fragmentos sea clara y fácil de interpretar y d) son selectivamente neutros (Vicente y Fulton, 2003; Rentarías, 2011).

5.3.2 Marcadores genéticos en el género *Agave* L.

Agave L. es uno de los géneros mexicanos de plantas con mayor número de estudios en genética de poblaciones (Eguiarte, 2013), realizados principalmente mediante marcadores moleculares, en el Cuadro 1 se muestran algunas de las

especies para las que se encuentran disponibles análisis mediante marcadores moleculares.

Cuadro 1. Referencias relacionadas a trabajos con marcadores genéticos moleculares en el género <i>Agave</i> L.		
Especie	Marcador	Referencia
<i>Agave spp.</i>	ASSRs	Rocha, 2006
<i>Agave spp.</i>	ASSRs	Dávila y Castillo, 2007.
<i>A. angustifolia</i>	ASSRs	Vargas-Ponce <i>et al.</i> , 2009.
<i>A. celsii</i>	ASSRs	Rocha, 2006
<i>A. cupreata</i>	ASSRs	Scheinvar, 2008.
<i>A. difformis</i>	ASSRs	Rocha, 2006.
<i>A. garciae-mendozae</i>	ASSRs	González, 2004.
<i>A. potatorum</i>	ASSRs	Scheinvar, 2008.
<i>A. rhodacantha</i>	ASSRs	Vargas-Ponce <i>et al.</i> , 2009.
<i>A. striata</i>	ASSRs	Trejo, 2006.
<i>A. tequilana</i>	ASSRs	Vargas-Ponce <i>et al.</i> , 2009.
<i>A. xylonacantha</i>	ASSRs	Colín, 2006.
<i>A. falcata</i>	ASSRs	Trejo, 2006.
<i>A. striata</i>	ASSRs	Trejo, 2006.
<i>A. utahensis</i>	ASSRs	Byers <i>et al.</i> , 2014.
<i>Agave spp.</i>	RAPDs	Rojas, Legaria y Pérez, 2007.
<i>A. cerulata</i>	RAPDs	Navarro-Quezada <i>et al.</i> , 2003.
<i>A. deserti</i>	RAPDs	Navarro-Quezada <i>et al.</i> , 2003.
<i>A. mapisaga var. carrizo</i>	RAPDs	Alfaro-Rojas <i>et al.</i> , 2006.
<i>A. mapisaga var. verde</i>	RAPDs	Alfaro-Rojas <i>et al.</i> , 2006.
<i>A. salmina var. ayoteco</i>	RAPDs	Alfaro-Rojas <i>et al.</i> , 2006.
<i>A. salmina var. manso</i>	RAPDs	Alfaro-Rojas <i>et al.</i> , 2006.
<i>A. salmina var. negro</i>	RAPDs	Alfaro-Rojas <i>et al.</i> , 2006.
<i>A. subsimplex</i>	RAPDs	Navarro-Quezada <i>et al.</i> , 2003.
<i>A. tequilana</i>	RAPDs	Gil-Vega <i>et al.</i> , 2001.
<i>A. mapisaga var. xilometl</i>	RAPDs	Alfaro-Rojas <i>et al.</i> , 2006.
<i>A. tequilana</i>	AFLP	Abraham-Juárez, 2009.
<i>A. fourcroydes</i>	AFLP, ISTR	Demey <i>et al.</i> , 2004

5.5 Ubicación del área de estudio el Estado de México

El Estado de México se localiza en la parte central de nuestro país, envolviendo prácticamente al Distrito Federal. Limita al norte con Querétaro e Hidalgo; al este con Tlaxcala y Puebla; al sur con el Distrito Federal, Morelos y Guerrero y al oeste con Michoacán. Está situado entre los 18° 27' y 20° 17" de latitud norte y entre los 98° 37' y 100° 27" de longitud oeste. Su extensión es de 21,461 Km² representando 1.14% del país. Está integrado por 125 municipios (INEGI, 2010 a; INEGI, 2010 b).

5.6 Agaves en el Estado de México

De los trabajos realizados que mencionan al género *Agave* L. para el Estado de México, se encuentra la obra de Gentry (1982) y la García-Mendoza y Galván (1995), de donde se obtiene un listado de 15 especies presentes en el Estado de México: *Agave angustiarium*, *A. angustifolia*, *A. applanata*, *A. attenuata*, *A. americana*, *A. bakeri*, *A. ellementiana*, *A. filifera*, *A. ghiesberbreghtii*, *A. horrida*, *A. inaequidens*, *A. lechugilla*, *A. macroculmis*, *A. mapisaga* y *A. salmiana*. Sin embargo, no existe un registro actualizado donde se describa y ubique a dichas especies.

VI. Materiales y métodos

6.1 Obtención de accesiones

Para la planeación de las colectas se revisaron los ejemplares disponibles en MEXU (Herbario Nacional de México), y registros de la CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad), que resguarda registros de varios herbarios. Con los registros obtenidos se elaboró un mapa de distribución, mediante los programas de ArcGis 10.1 y Google earth 7.2 así como con los datos procedentes de la INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía).

6.2 Trabajo de campo

En función del mapa de distribución se realizaron colectas del 03/03/2015 al 14/05/2016 en distintos municipios del Estado de México con la finalidad de obtener la mayor cantidad de especies de agaves, de cada punto de muestreo se tomaron

las coordenadas y altitud, así como los datos para su posterior identificación taxonómica, según caracteres morfológicos útiles mencionados por Gentry (1982).

6.3 Trabajo de gabinete

Los ejemplares colectados se identificaron mediante antecedentes de la zona, los datos tomados en campo, y mediante el uso de las claves de Gentry (1982), e Irish e Irish (2000), una vez identificados y etiquetados se depositaron en el invernadero de Recursos Genéticos en la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMEX).

6.4 Banco *ex-situ*

El banco de germoplasma *ex-situ* se estableció usando los especímenes colectados, de acuerdo a la normatividad de la FAO (2014). Se estableció en macetas en el invernadero de Recursos Genéticos en la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UAEMex.

6.4.1 Manejo de frutos y semillas

Los frutos y semillas colectadas en campo, se etiquetaron e identificaron, correctamente según el ejemplar y sitio de donde fueron colectados. Las muestras se trataron de acuerdo a las condiciones en las que se obtuvieron, a consideración de la madurez de las capsulas, en algunos casos fue necesario dejar secar los frutos a temperatura ambiente, hasta que fue posible la extracción de las semillas. Bajo la consideración de que las semillas de las Agaváceas son de tipo ortodoxas (Hong *et al.*, 1996), se procedió con los métodos propuestos por la FAO (2014) para su conservación como parte del banco de germoplasma. Las muestras de semillas se limpiaron manualmente, se secaron usando silica gel llevándolas hasta el punto de

equilibrio en un ambiente controlado entre 5 y 20 °C y luego se almacenaron en bolsas Ziploc, a 4°C con una humedad relativa del 15 ± 3 % (Rao, 2007; FAO, 2014). Las semillas se depositaron en un refrigerador marca General Electric^{MR} en el laboratorio de Biología Molecular Vegetal de laUAEMex.

6.5 Banco *in-vitro*

El banco de germoplasma *in-vitro* se generó a partir especímenes provenientes de semillas desinfectadas, que se obtuvieron mediante las colectas, a las semillas se les retiro el embrión y se sembró en medio MS (Murashige Skoog) (Murashige y Skoog, 1962) al 50% de su concentración con el fin de su posterior establecimiento en el invernadero de Recursos Genéticos en la Facultad de Ciencias Agrícolas de laUAEMex.

6.5.1 Desinfección

Este proceso consistió en el lavado de las semillas dentro de un recipiente con dos gotas de Tween®20 y dos gotas de jabón líquido comercial por veinte minutos en agua corriente, posteriormente dentro de la campana de flujo laminar se colocaron en un recipiente estéril con alcohol al 96% por tres minutos, se retiró el alcohol al 96% y se agregó hipoclorito de sodio al 2% manteniendo las semillas en agitación constante por 15 minutos, a su término se realizaron tres lavados con agua destilada estéril, al finalizar se cerró el recipiente y se escarificaron por 24 horas a 4°C.

6.5.2 Establecimiento *in-vitro*

Para realizar la siembra *in-vitro* los diferentes agaves se utilizaron los embriones de las semillas colectadas y desinfectadas, por lo que en condiciones asépticas se

extrajeron los embriones y se colocaron en medio MS al 50%. Una vez sembrados se resguardaron en el cuarto de incubación a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y 16/8 horas de fotoperiodo, por aproximadamente sesenta días una vez que apareció la segunda hoja se comenzó con el proceso de adaptación.

6.5.3 Adaptación

Cuando las plantas alcanzaron una altura de 5cm se comenzó con el proceso de adaptación, que consiste en colocarlas en domos con sustrato (tierra) estéril húmedo, y llevarlo al cuarto de incubación por tres semanas o más. Posterior a ello se transfirieron a macetas individuales en el invernadero de Recursos Genéticos en la Facultad de Ciencias Agrícolas de laUAEMex.

6.6 Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico se realizó usando el método CTAB (bromuro hexadeciltrimetilamonio) con ligeras modificaciones al método de Zhou *et al.* (1999). Las modificaciones consistieron en macerar 150 mg de tejido vegetal fresco en un mortero de porcelana, previamente congelado (-20°C), lavándose en tres ocasiones. El pellet se incubó con el compuesto activo de bromuro hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y nuevamente se lavó en dos ocasiones con cloroformo: alcohol isoamil, posteriormente se hizo un lavado con etanol al 96% para lograr su precipitación. Finalmente, el ADN se diluyó en una solución buffer tris- EDTA (TE) hasta 70 μl y se conservó a -20°C en un congelador marca General Electric^{MR} hasta su uso.

6.6.1 Determinación del ADN

6.6.1.1 Cuantitativamente

Para cuantificar la concentración del ADN extraído se usó un biofotómetro marca Eppendorf®, para este proceso se mezclaron 4 μL de ADN total extraído en 196 μL de agua desionizada esterilizada (MilliQ), dicha mezcla fue colocada en las celdas del biofotómetro para su lectura. Se registró la concentración en $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, la absorbancia a 230, 260, 280 y a 320 nm, así como las relaciones 260/280 y 260/230 nm para cada una de las muestras.

6.6.1.2 Cualitativa

Se realizó un análisis electroforético para comprobar la integridad del ADN extraído, para este proceso se corrieron con cada una de las especies de *Agave*, 3 μL del ADN total extraído mezclados con 3 μL de azul de bromofenol (BPB), como marcador de carga, en un gel de agarosa tipo II (Sigma-Aldrich®) al 0.8% en un sistema de electrofóresis horizontal marca Easycast™ modelo B2 conectado a una fuente de poder marca Apex™, modelo PS 304 *Minipac III* serie 85963, durante sesenta minutos a 80V y 120mA. Los resultados del corrimiento electroforético fueron visualizados en un Transiluminador marca UVP™ modelo MP20 [P/N 95-0398-01].

6.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación del ADN se realizó en un Termociclador marca Labnet International Inc. Modelo MultiGene optiMAX, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Para este proceso, el ADN se diluyó en una solución buffer de TE (10mM de Tris-HCl con 1mM EDTA pH 7.0) con el fin de obtener un volumen final de 20 μL y una

concentración final de 10ng μL^{-1} ; de igual forma, los iniciadores a una concentración de 200 μM (InvitrogenTM) fueron diluidos en una solución buffer de TE (10mM de Tris-HCl con 1 mM EDTA pH 7.0) para obtener un volumen final de 50 μL y una concentración final de 20 μM . Una vez diluidos el ADN y los iniciadores, éstos se almacenaron a -20°C en un refrigerador marca General Electric^{MR} hasta su uso.

Para la amplificación de ADN (la reacción se preparó en tubos eppendorf de 200 (μl) previamente etiquetados. La reacción contenía una concentración final: Agua 6.7 μl , 5X My Taq Reaction Buffer (BiolineTM), My TaqADN polimerasa (BiolineTM), Iniciador (20 μM) 0.2, ADN (10 ng μL^{-1}), 1.0, para un volumen final de la reacción de 10 μl . Cabe señalar que el buffer contenía 5 mM dNTPs y 15 mM MgCl_2 .

6.7.3 Selección de cebadores

Para la amplificación de ADN se probaron diez iniciadores de dos tipos: cinco iniciadores RAPD (Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar) y cinco iniciadores ASSR (Inter-Secuencias Simples Repetidas de tipo Anclado); dichos iniciadores se describen en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación en PCR del ADN nuclear de 15 especies de <i>Agave</i> L.				
<i>Nombre del iniciador</i>	<i>Tipo</i>	<i>Secuencia (5'→ 3')</i>	<i>Número de bases</i>	<i>%GC</i>
Y24	RAPD	AACCGCGCTC	10	70
Y29		TTCGGGCCGT	10	70
Y37		TAACCGCGCC	10	70
Y38		TAACCGCGCC	10	70
Y41		GCGTCCTGGG	10	80
NCADN-3'ASSR02	ASSR	(CT)7 ATC	17	47
NCADN-3'ASSR15		(CT)7 ATG	17	47
NCADN-3'ASSR20		(CT)7 GCA	17	53
NCADN-3'ASSR29		(CT)7 GTA	17	47
NCADN-3'ASSR35		(CT)7 TGA	17	47

6.7.4 Condiciones de amplificación

A continuación, se presentan las condiciones de amplificación para cada uno de los iniciadores RAPD e ASSR; se describen la Temperatura de Desnaturalización (DT), la Temperatura de Alineación (AT) y la Temperatura de Elongación o Extensión (ET) para cada ciclo de reacción. Los ciclos térmicos finalizaron para todos los iniciadores a una temperatura de 4°C para terminar la reacción.

Programa de amplificación para los Iniciadores ASSR 3'- ASSR02, 3'-ASSR15, 3'-ASSR20, 3'-ASSR29 y 3'-ASSR35:

(DT) 94°C x 9 min	}	1	ciclo	(DT) 94°C x 1 min	}	45	Ciclos	(ET) 72° C x 10 min	}	1	Ciclo
Ciclo inicial				(AT) 46 °C x 1 min				Ciclo final			

Programa de amplificación para los Iniciadores RAPD Y24, Y 29, Y37, Y38 e Y41

(DT) 94°C x 5min	}	1	ciclo	(DT) 94°C x 1 min	}	41	Ciclos	(DT) 72° C x 10 min	}	1	Ciclo
(AT) 54° C x 1 min				(AT) 54 °C x 1 min				(AT) 54°C x 1 min			
(ET) 72° C x 2 min				(ET) 72°C x 2 min				Ciclo final			
Ciclo inicial											

6.7.5 Separación de los fragmentos amplificados

La separación de los fragmentos de ADN se realizó en cámaras de electrofóresis horizontal marca Easycast™ modelo B2 que contenían 100 mL de solución buffer de 1X TAE (Tris-acetato-EDTA), usando un gel de agarosa tipo II (Sigma-Aldrich®), al 1.2%, al cual se le adicionaron 3 µL de bromuro de etidio. Las muestras se cargaron en los pozos del gel con un volumen final de 6 µL, que contenían 3 µL del producto de PCR y 3 µL del marcador de carga azul de bromofenol (BPB) para observar el corrimiento de los fragmentos de ADN. Las muestras fueron flanqueadas con dos marcadores escalera: de 2000-1000 pares de bases pb (derecha) y 700 150 pb (izquierda) (Fermentas™) para medir el tamaño de los fragmentos amplificados, posteriormente el sistema horizontal de electrofóresis fue conectado a una fuente de poder marca Apelex™, modelo PS 304 *Minipac III* y las condiciones de corriente eléctrica se realizaron a 80V y 120mA durante 100 min.

Los fragmentos amplificados fueron visualizados en un Transluminador marca UVPTM modelo MP20 (P/N 95-0398-01). Usando el mismo equipo se tomaron fotos para su posterior análisis.

6.7.6 Análisis de datos

Los patrones de bandeo resultantes de los análisis de iniciadores RAPD e ASSR se utilizaron para generar una Matriz Binaria de Datos (MBD) donde se consideró la presencia de una banda como 1 y la ausencia de la misma como 0; para este análisis sólo se contemplaron los fragmentos completamente claros. La MBD se utilizó para generar la caracterización molecular de las 15 especies del género *Agave* L. evaluadas.

Para el análisis, los iniciadores utilizados fueron agrupados de acuerdo a; grupo 1: RAPD de 10 bases, grupo 2: ASSR anclados de 17 bases y grupo 3: RAPD e ASSR anclados en conjunto. Para cada uno de los grupos formados se realizó un análisis,

el cual fue ejecutado mediante la estimación de la variabilidad genética y los parámetros que se consideraron fueron los siguientes:

La diversidad o variabilidad genética se evaluó estimando el porcentaje de polimorfismo (%P) y la heterocigocidad esperada (HE). La heterocigocidad observada (HO) no se determinó debido a que sólo se analizó un individuo por especie. La diferenciación genética se estimó a través de los valores de distancia genética.

El total de los parámetros evaluados se estimaron según Nei (1978), se usó el algoritmo más elemental para la matriz de distancia o UPGMA (Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average) y mediante el programa POPGENE (versión 1.32; Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta and Center for Internacional Forestry Research, AB, Edmonton, Canadá), (Yeh y Boyle, 1999); se obtuvieron los dendrogramas correspondientes para cada uno de los análisis.

VII. Resultados y discusiones

7.1 Revisión de Exicatas

Se obtuvo un registro que contempla Exicatas de 16 especies del género *Agave* reportadas para el Estado de México, la mayor parte del registro está basado en Castañeda, n.d.

***Agave americana* L.**

Valle de Bravo 1.3 km al O. A. Castañeda, A. García-Mendoza y F. Palma 23 (MEXU).

***Agave angustiarum* Trel.**

Santo Tomás de los Plátanos: ½Km al SE de Nuevo Santo Tomás de los Plátanos. J. L. Camarillo s/n (ENEPI).

***Agave angustifolia* Haw.**

Ixtapan de la Sal: 5 Km al SO de Ixtapan de las Sal. A. Castañeda, A. García-Mendoza y Gutiérrez 37 (MEXU); 1 Km al O de San Alejo, carretera Ixtapan de la Sal-Coatepec Harinas. A. Castañeda, A. García-Mendoza y A. Gutiérrez 100 (MEXU); 1 Km al O de san Alejo, carretera Ixtapan- Coatepec de Harinas A. Castañeda *et al.*, 6551 (MEXU); 1 km al O de San Alejo, carretera Coatepec Harinas–Ixtapan de la Sal. A. García–Mendoza, A. Castañeda y A. Tellez 6638 (MEXU). Malinalco: 1 Km al N de Malinalco, A. Castañeda, A. García-Mendoza y F. Palma 5 (MEXU). Nepantla: E. Matuda *et al.* 28372 (MEXU). Tepetlixpa: 5Km al NE de Nepantla a orillas de la carretera, entrada Hda. Machili, A. Castañeda rojas 29 (MEXU). Tlalnepantla: Cerro de la Palma (cima), 18° 53' 51" N 99° 45' 05" W, F. D. Dorantes- Hernández, I.V. Piña–Dorantes y D Tejero- Díez. 505 (MEXU). Tonicaco: Km 96 carretera Toluca-Tonicaco, después de la desviación a La Vega, mpio. Tonicaco. A. Castañeda, A. García-Mendoza, A. Gutiérrez 34 y 35 (MEXU). Villa Guerrero: puente Calderón, límites de Villa Guerrero e Ixtapan de la Sal. A. García- Mendoza, A. Gutiérrez 7 (MEXU). Zacualpan: Cerro Corona, E. Matuda. 468584 (MEXU); Cerro Corona, E. Matuda *et al.* 30355 (MEXU).

***Agave applanata* Lem. ex Jacobi**

Jilotepec: a 1Km de Arroyo Zarco, A. Castañeda, A. García-Mendoza y F. Palma 24 (MEXU); Km 96.5 de la autopista México- Querétaro, R. Galván 1352 (ENCB, San Martín de las Pirámides: Ladera SE del Cerro Gordo, R. Galván. 1352 (ENCB).

***Agave Atrovirens* Karw. ex Salm-Dyck**

Tenango del Aire: 3Km al W. A. Pineda 729 (ENCB). Texcoco, Santa Catrina. Ma. Pineda miranda *s/n* (ENCB).

***Agave attenuata* Salm-Dyck**

Amatepec: 1 Km al O de los Ocotes, 10 Km al N de Tlatlaya A. Castañeda, A. García- Mendoza y M. Flores 65 (MEXU). Tejupilco: 1 Km al E de Pantoja, carretera Sultepec – Tejupilco. A. Castañeda, A. García-Mendoza y F. Palma 11 (MEXU); 3Km al N de El Salitre, Castañeda, A. García-Mendoza y F. Palma 15 (MEXU); Peña Bonita, 10Km al W. de Nanchititla, Medrano *et al.*, 5413 (MEXU). Temascaltepec: A. Castañeda, A. García- Mendoza y M. Flores 62 (MEXU); Cascada la Campana. 5Km al SO de San Pedro Tenayac, camino a Zacazonapan. A. García- Mendoza y Alejandro Castañeda y María Flores .6129 (MEXU); 500 m al O de Temascaltepec, A. García- Mendoza y Alejandro Castañeda y María Flores.6127 (MEXU). Tlataya, 1Km al O de Los Ocotes, 10 Km al S de Tlataya, A. García- Mendoza y Alejandro Castañeda y María Flores 6133 (MEXU). Valle de Bravo, El Escondrijo, peña a 1Km al S de Valle de Bravo. A. García- Mendoza y Alejandro Castañeda y María Flores 6126 (MEXU). Valle de Bravo: Propagated in Garden of Dudley Gold, Cuernavaca; originally from Ixtapatongo, H.S. Gentry (23372) (MEXU); El Escondrijo, peña a 1Km al S de Valle de Bravo, A. Castañeda 60 (MEXU); Cerca de Santa Bàrbara, E. Matuda 29570 (ENCB, MEXU). 2.5Km al SO de Valle de Bravo. Malpaís, San Nicolás (1300 msnm). 04/01/1953 E. Matuda 27371 (MEXU). Zacazonapan, El Campanario, 3Km al O de San Pedro Tenayac, A. García- Mendoza y Vargas. G 13169 (MEXU).

***Agave dasyliroides* Jacobi & C.D. Bouché**

Malinalco: 1Km al SO de Malinalco, A. Castañeda *et al.*, 71 (MEXU); 1Km al SO de la zona Arqueológica de Malinalco, A. Castañeda 91 (MEXU); 1Km al SO de la zona Arqueológica de Malinalco, A. Castañeda, A. Gutiérrez y J. Gutiérrez 103 (MEXU); 1 Km al SO de Malinalco, cerro Orquemí y Piedra El Barrilito, A. García Mendoza. 6323 (MEXU).

***Agave deserti* Engelm.**

Ixtapaluca: Km 49 carretera México- Puebla, 8km antes del parque nacional llano grande. López, A. R. F. *et al.*, 1138 (IEB).

***Agave filifera* Salm-Dyck**

Coacalco: Cerro Tontepec, ladera W al SW de Coacalco, R. Galván 1312 (ENCB); San Cristóbal Ecatepec, Sierra de Guadalupe. R. Galván 1132 (ENCB); Tlalnepantla: Garden of Dudley Gold, Cuernavaca; originally from E side of Sierra de Guadalupe, State of Mexico, H. S. Gentry & D Gold 23384 (MEXU); Ladera SO del Cerro Largo o Cerro Colorado, A. Castañeda 74 (MEXU).

***Agave ghiesbreghtii* Lem. ex Jacobi**

Zacualpan. 10 miles N of Zacualpan. Gentry 12107, (DES, MEXU, US).

***Agave horrida* Lem. ex Jacobi**

Ocuilan: 2Km al O de Chalmita, A. Castañeda, A. Gutiérrez y S. Franco 70 (MEXU); Km 39 de la carretera México-Chalma, frente al balneario Las Peñas, A. Castañeda, A. Gutiérrez y S. Franco 102 (MEXU). Tejupilco: Sierra de Nanchititla, Fco. Glz. Medrano et al., s/n (MEXU); Km 9 carretera a Nanchititla, A. Castañeda, A. García-Mendoza y F. Palma 19 (MEXU).

***Agave inaequidens* K. Koch**

Amanalco: Rocky hill between Amanalco and Santa Maria Pipilotepec on road from Toluca to Valle de Bravo, H. E Moore & M Cetto. 100371 (MEXU); 1Km al S de San Juan Amanalco, Castañeda, A. García-Mendoza y M. Flores 58 (MEXU); 1Km al sur de San Juan Amanalco, A. Castañeda, A. García-Mendoza y M. Flores 58 (MEXU); 1km al S de San Juan Amanalco, carretera Toluca-Valle de Bravo. 19° 09'56" N; 99° 59' 12" W, A. García-Mendoza, A. Castañeda y M. Flores 6122 (MEXU). Coacalco, Cerro Tontepec, ladera W al SW de Coacalco, R. Galván 1434 (MEXU; ENCB); Cerro Tontepec, ladera W al SW de Coacalco, R. Galván 1308, 1309,1310 (ENCB). Coatepec de Harinas: río Tlapala, 18°53'51" N 99° 45' 05" O, Dorantes-Hernández, I., V.

Piña–Dorantes y D. Tejero–Díez 507 (MEXU). Huixquilucan: N de San Bartolito, terracería de San Cristóbal a Huilotiapan, R Galván 1386 (MEXU; ENCB). Ocuilan, El Pedregal 3.5 Km al N de la colonia Gustavo Baz, Castañeda, A. García-Mendoza y F. Palma 2 (MEXU); 2 Km al O de Mexicapan y a 13 de la colonia El Bosque, carretera Cuernavaca-Chalma, A. Castañeda *et al.* 66 (MEXU); M. Flores. 1287 (MEXU); 6 Km después de Ocuilan, rumbo a Cuernavaca, M. Flores *et al.* 284. (MEXU); 2 Km al O de Mexicapan y a 13 de la Col. El Bosque, brecha Cuernavaca–Chalma, A. García-Mendoza *et al.*, 6145 (MEXU). San Cristóbal Ecatepec: 1 Km al W de San Andrés de la Cañada, R, Galván 1275-a (ENCB); Sierra de Guadalupe. R. Galván 1134(MEXU). San Martín de las Pirámides; Cerro Gordo, cerca de San Juan Teotihuacan, G. Guerrero (ENCB). Temascaltepec, 20 miles NE of Temascaltepec along road to Toluca, State of Mexico. H. S Gentry 129932, 129924 (MEXU); 3 Km al O de Cerro Pelón Camino a San Pedro Tenayac, A. Castañeda, A. García- Mendoza y A. Gutiérrez 50 (MEXU); 32 Km al NE de Temascaltepec carretera Temascaltepec–Toluca, R. Galván 1329 (MEXU); 3 Km al O de Cerro Pelón camino a San Pedro Tenayac, A. García-Mendoza A. Castañeda y A. Gutiérrez 6100 (MEXU). Temascaltepec: (Neotipo) 20 miles (32 Km) NE of Temascaltepec along road to Toluca, 7500 ft. open pine slope, 7-XII-1961, H. Gentry, A. Barclay & J. Argüelles 19612 (US; MEXU, DES). Valle de Bravo: Cerro a 1 Km al N de Mesón Viejo. 19° 10' 32"N; 99° 52' 50" W, A. García-Mendoza *et al.* 6767 (MEXU); cerros 1 Km al N de Mesón Viejo. 19°10' 31" N 99° 52' 49" W. A. Castañeda *et al.* 120 (MEXU).

***Agave lecheguilla* Torr.**

San Cristóbal Ecatepec: Cerro de San Cristóbal, E. Matuda 21088 (MEXU); Cerro de Coatepec, E. Matuda 21489 (ENCB); Sierra de Guadalupe R. Galvan 1130 (MEXU). Tlalnepantla: Hill west of Mexico-Laredo highway, just north of Federal Distrito line, E. C. Ogden 5140 (MEXU); Lado SO del Cerro Largo o Cerro Colorado, A. Castañeda 75 (MEXU).

***Agave mapisaga* Trel.**

Naucalpan: cultivado, A. Chimal H. 65 (MEXU). Tlalmanalco: Alrededores de la población de Tlalmanalco, R. Galván 1318 (ENCB). Zumpango, 2Km al N de la desviación a Zumpango, carretera México-Pachuca, R. Galván 1323 (ENCB).

***Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck**

Apasco: A .R. Laguna. 8006 (MEXU). Huehuetoca: Km 58 autopista, México-Querétaro, A. Castañeda 26 (MEXU). Temascaltepec: 20Km al NE de Temascaltepec carretera Temascaltepec-Toluca, G. Flores y L. Tarpán. 823 (MEXU). Tlalnepantla: Cultivado en el Jardín Botánico de la UNAM, procedente de cultivos de Tlalnepantla, A. Gómez-Pompa. 968 (MEXU). Xalatlaco: 3Km al NO de Xalatlaco, A. Castañeda, A. García-Mendoza y F. Palma, 1 (MEXU). Zinacantepec: Loma de San Francisco, Tlacalapan, A. Castaneda, A. García-Mendoza y M. Flores 57 (MEXU).

***Agave xylonacantha* Salm-Dyck**

Tlanepantla: cerro de Acatitlan E. matuda *et al.*, 30761 (MEXU).

7.2 Realización de colectas

Las colectas se realizaron del 03/03/2015 al 14/05/2016, durante las cuales se colectaron 35 ejemplares, de 15 especies diferentes, así como frutos y semillas de cuatro especies. El criterio para la realización de las colectas se basó en las exicatas revisadas previamente, así como en la experiencia del equipo de trabajo del laboratorio de Biología Molecular Vegetal perteneciente a la Facultad de Agronomía de laUAEMex Los municipios visitados, así como las especies colectadas se pueden observar en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Colectas realizadas en 15 municipios del Estado de México					
No Colecta	Fecha	Especies	Tipo de material		Municipios muestreados
			ejemplar	semilla	
1	03/03/2015	<i>A. salmiana</i>	X	X	Ocuilan
		<i>A. horrida</i>	X	X	
		<i>A. dasylirioides</i>	X		
2	05/03/2015	<i>A. mapisaga</i>	X		Jiquipilco
3	04/04/2015	<i>A. angustiarum</i>	X		Santo Tomas de los Plátanos
		<i>A. ghiebesbenchi</i>	X		
		<i>A. attenuate</i>	X	X	
4	06/06/2015	<i>A. iniaquidens</i>	X		Tejupilco
5	04/07/2015	<i>A. angustifolia</i>	X		Ixtapan del Oro
6	31/10/2015	<i>A. angustifolia</i>	X	X	Coatepec de Harinas Zacualpan
7	07/11/2015	<i>A. inaequidens</i>	X	X	Temazcaltepec San Simón de Guerrero
		<i>A. salmiana</i>			
8	12/11/2015	<i>A. angustifolia</i>	X		Ocuilan
		<i>A. horrida</i>	X		
		<i>A. inaequidens</i>	X	X	
9	13/11/2015	<i>A. tequilana</i>	X		Malinalco
		<i>A. angustifolia</i>	X		
10	19/12/2015	<i>A. salmiana</i>	X	X	Aculco Acambay
11	16/01/2016	<i>A. salmiana</i>	X	X	Coatepec Harinas
12	10/05/2016	<i>A. americana</i>	X		Metepec
		<i>A. lecheguilla</i>	X		
13	06/05/2016	<i>A. filifera</i>	X		Coacalco
		<i>A. xylonacantha</i>	X		
14	14/05/2016	<i>A. aplanatta</i>	X		Hueypoxtla

7.3 Banco de germoplasma

A partir de las colectas realizadas se obtuvo el material para elaborar el banco de germoplasma.

7.3.1 Banco de germoplasma *ex-situ*

Se generaron 35 accesiones de ejemplares vivos y semillas para 15 especies, las cuales han sido resguardadas en el invernadero de Recursos Genéticos en la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex). En el siguiente listado se encuentran las accesiones mediante las colectas realizadas.

***Agave americana* L.**

Metepec: Infonavit San Francisco (19° 15' 57.34" N, 99° 35' 45" W), 2610 MSNM, Kean-Galeno. 35 (ejemplar vivo).

***Agave angustiarum* Trel.**

Santo Tomas de los Plátanos (19° 10' 21" N, 100° 16' 40" W), 2500 MSNM, Arzate-Fernández et al., 5 (ejemplar vivo).

***Agave angustifolia* Haw.**

Coatepec Harinas: carretera Ixtapan-Zacualpan, 500 m antes de llegar al puente Sabinos (18° 49' 3.8" N, 99° 47' 17.2" W), 1767 MSNM, Arzate-Fernández *et al.* 10 (ejemplar vivo y semillas); Ixtapan del Oro: (19° 12' 31" N, 100° 14' 33" W), 1766 MSNM, Arzate- Fernández *et al.*, 9 (ejemplar vivo); Malinalco: Palmar el Chico (18° 54' 26.06" N, 99° 32' 0.70052" W) 999 MSNM, Arzate- Fernández *et al.*, 20 (ejemplar vivo); Palmar el Chico (18° 54' 26.06" N, 99° 32' 0.70052" W), 999MSNM, Arzate- Fernández *et al.*, 21 (ejemplar vivo); Palmar el Chico (18° 54' 26.06" N, 99° 32' 0.7" W) 999 MSNM, Arzate- Fernández *et al.*, 23 (ejemplar vivo); Ocuilan: Parque Tlatucapa, Peña Redonda (18° 57' 46" N, 99° 25' 16" W), 2180 MSNSM, Arzate- Fernández *et al.*, 17 (ejemplar vivo); Zacualpan: carretera Ixtapan-Zacualpan, Piedra Parada (18° 47' 32" N, 99° 44' 22" W) 1803 MSNM Arzate-Fernández *et al.*, 11 (ejemplar vivo); carretera Ixtapan-Zacualpan, 3 km antes

de llegar a Zacualpan (18° 44' 47.3" N, 99° 45' 13.1" W) 1583 MSNM, Arzate-Fernández *et al.*, 12 (ejemplar vivo).

***Agave applanata* Lem. ex Jacobi**

Hueypoxtla: Santa Maria Ajolpan (19° 29' 25" N, 98° 55' 4'.11" W) 2600 MSNM, Arzate-Fernández Kean-Galeno y Reyes-Díaz. 33 (ejemplar vivo).

***Agave attenuata* Salm-Dyck**

Santo Tomas de los Plátanos (19° 12' 17" N, 100° 14' 48" W), 2600 MSNM, Arzate-Fernández *et al.*, 7 (ejemplar vivo y semillas).

***Agave dasylirioides* Jacobi & C.D. Bouché**

Ocuilan: Tlatucapa (18° 57' 57.3" N, 99° 25' 6.3" W), 1180 MSNM, Arzate-Fernández *et al.*, 3 (ejemplar vivo).

***Agave filifera* Salm-Dyck**

Coacalco: Cerro de Tontepec (19° 37' 05.2" N, 99° 07' 27.8" W), 2650MSNM, Arzate-Fernández Kean- Galeno y Reyes- Díaz. 31 (ejemplar vivo).

***Agave ghiesbreghtii* Lem. ex Jacobi**

Santo Tomás de los Plátanos (19° 12' 24" N, 100° 14' 36" W), 2600 MSNM, Arzate-Fernández *et al.* 6 (ejemplar vivo).

***Agave horrida* Lem. ex Jacobi**

Ocuilan: Tlatucapa (18° 57' 53.4" N, 99° 25' 0.3" W), 2190 MSNM, Arzate-Fernández *et al.*, 2 (ejemplar vivo y semillas);Tlatucapa, Peña Redonda (18 57 46 N, 99 25 16 W), 2030 MSNM, Arzate-Fernández *et al.*, 18 (ejemplar vivo).

***Agave inaequidens* K. Koch**

Ocuilan: Tlatucapa, Peña Redonda (18° 57' 57" N, 99° 25' 3" W) 2146 MSNM, Arzate-Fernández *et al.*, 19 (ejemplar vivo); Tejupilco: Colorines, Sierra de Nanchichitla (18° 49' 22.5" N, 100° 25' 28.5" W), 1521 MSNM, Arzate-Fernández *et al.*, 8 (ejemplar vivo); Temazcaltepec: Mezón Viejo (19° 10' 18" N, 99° 52' 17" W) Arzate-Fernández *et al.* 15 (ejemplar vivo y semillas).

***Agave lecheguilla* Torr.**

Toluca: Tlachaloya (19° 24' 30.6" N, 99° 41' 20.7" W), 2600 MSNM, Arzate-Fernández Kean- Galeno y Reyes- Díaz. 34 (ejemplar vivo).

***Agave mapisaga* Trel.**

Jiquipilco: El Jaral (19° 33' 26.6" N, 99° 36' 24.5" W), 2400MSNM Arzate-Fernández *et al.*, 4 (ejemplar vivo).

***Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck**

Aculco: Cerro Bimbo (20° 4' 42" N, 99° 53' 2" W), 2513 MSNM, Arzate-Fernández *et al.*, 25 (ejemplar vivo); rumbo a Acambay (19° 59' 3" N, 99° 52' 17" W), 2772 MSNM, Arzate-Fernández *et al.*, 26 (ejemplar vivo); Cerro Bimbo (19° 58' 4" N, 99° 51' 23" W) 2639 MSNM, Arzate-Fernández *et al.*, 27 (ejemplar vivo); Cerro Bimbo (20° 4' 24" N, 99° 52' 17" W), 2597 MSNM, Arzate-Fernández *et al.*, 24 (ejemplar vivo) Coatepec Harinas: El Potrerito (18° 57' 59" N, 99° 46' 24" W), 2464MSNM, Arzate-Fernández *et al.*, 28 (ejemplar vivo); Ocuilan: Tlatucapa (19° 1' 29" N, 99° 28' 5.7" W), 2595 MSNM, Arzate-Fernández *et al.*, 1 (ejemplar vivo); San Simón de Guerrero: Rumbo a Peña Redonda (18° 57' 29" N, 100° 2' 19" W), 1966MSNM, Arzate-Fernández *et al.*, 14 (ejemplar vivo y semillas).

***Agave tequilana* F.A.C. Weber**

Malinalco: Palmar el Chico (18° 54' 26.06" N, 99° 32' 0.70052" W) 999 MSNM, Arzate-Fernández *et al.*, 22 (ejemplar vivo).

***Agave xylonacantha* Salm-Dyck**

Coacalco: Cerro de Tontepec (19° 36' 34.6" N, 99° 08' 10.9" W) 2600MSNM, Arzate-Fernández Kean-Galeno y Reyes- Díaz *et al.*, 32 (ejemplar vivo).

En la Figura 1, 2 y 3 se observan especies de los especímenes colectados y resguardadas en el invernadero de Recursos Genéticos en la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMEX). (Fotos por Kean-Galeno y el equipo del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal.)



Figura 1. Ejemplares colectados y resguardados en el invernadero de Recursos Genéticos de la Facultad de Ciencias Agrícolas de laUAEMex. a) *A. attenuata*, b) *A. horrida*, c) *A. salmiana*, d). *A. ghiesbregtii* y e) *A. xilonacantha*.



Figura 2. Ejemplares colectados y resguardados en el invernadero de Recursos Genéticos den la Facultad de Ciencias Agrícolas de laUAEMex. a) *A.tequilana*, b) *A. aplanatta*, c) *A. angustiarum*, d). *A.mapisaga*, e) *A. angustifolia* y f) *A. inaequidens*.



Figura 3. Ejemplares colectados y resguardados en el invernadero de Recursos Genéticos den la Facultad de Ciencias Agrícolas de laUAEMex. a) *A. americana*, b) *A. dasylirioides*, c) *A. filifera*, y d) *A. lecheguilla*.

7.3.2 Banco de germoplasma *in-vitro*

Se estableció un banco de germoplasma *in-vitro* con ejemplares de cinco especies. Los especímenes se obtuvieron a partir de semillas adquiridas durante las colectas realizadas, el origen de las semillas y las especies se pueden observar en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Banco de germoplasma <i>in-vitro</i> con cinco especies de <i>Agave</i> L.			
Especie	N° de ejemplares establecidos	Lugar de colecta	Coordenadas
<i>A. salmiana</i>	20	Coatepec de harinas: el Potrerito	18° 57' 59" N, 99° 46' 24" N
<i>A. horrida</i>	20	Ocuilan: Tlatucapa	18° 57' 53" N, 99° 25' 0.3" W
<i>A. angustifolia</i>	20	Ocuilan: Tlatucapan	18° 57' 46" N, 99° 25' 16" W
<i>A. inaequidens</i>	15	Temazcaltepec, Mesón Viejo	19° 10' 18" N, 99° 52' 17" W
<i>A. attenuata</i>	5	Santo Tomas de los Plátanos	19° 12' 17" N, 100° 14' 48" W

En la Figura cuatro se observan las distintas especies cultivadas *in-vitro* provenientes de las semillas colectadas, los ejemplares presentados *in-vitro* en las imágenes (a, c, d, e, i,) tienen una edad aproximada de 2 meses después de iniciado su cultivo *in-vitro*, mientras que los del proceso de adaptación (f) de tres meses.



Figura 4. Ejemplares del género *Agave* L.. *in-vitro* obtenidos por cultivo de embriones cigóticos. a) *A. salmiana*, b) *A. salmiana*, c) *A. horrida*, d) *A. angustifolia*, e) *A. attenuata*, f) proceso de adaptación en *A. salmiana* (Fotos por Kean-Galeno, T.)

Con las 15 especies colectas se elaboró un banco de germoplasma *ex-situ*, además de contar con cuatro especies resguardadas como parte de un banco de

germoplasma *in-vitro*. Con el establecimiento de este banco de germoplasma se aumenta el número de bancos de germoplasma para el género *Agave* L., sumándose a los establecidos por la UNAM, el CICY, Tequila Sauza, la UACH, la Universidad de Aguascalientes, y el SINAREFI. El establecimiento de este banco de germoplasma es estratégico para conservación y estudio de la diversidad genética del género.

7.4 Distribución de *Agave* spp. en el Estado de México

Como se puede observar en la Figura 5, se muestra un mapa generado a partir del conjunto de datos obtenidos mediante las accesiones revisadas y las realizadas, en él se destaca la distribución final del género *Agave* en el Estado de México. Los mapas siguientes (Figura 6 y 7) son acercamientos de las zonas que mostraron mayor aglomeración de datos, es decir las zonas noreste (NE) y sureste (SE) del Estado de México (mapas elaborados por Kean-Galeno).

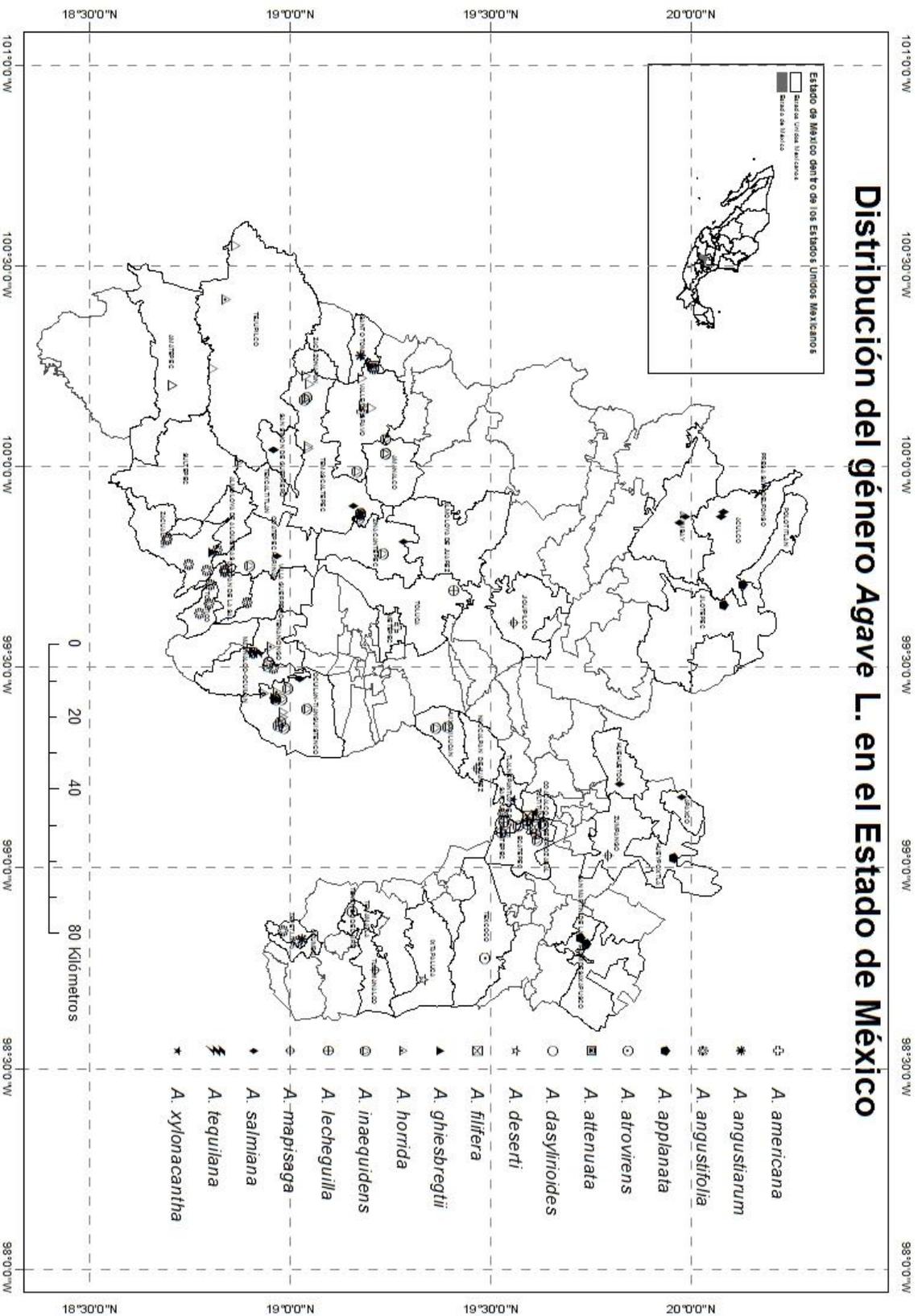


Figura 5 Mapa de la distribución de las 17 especies de *Agave* en el Estado de México

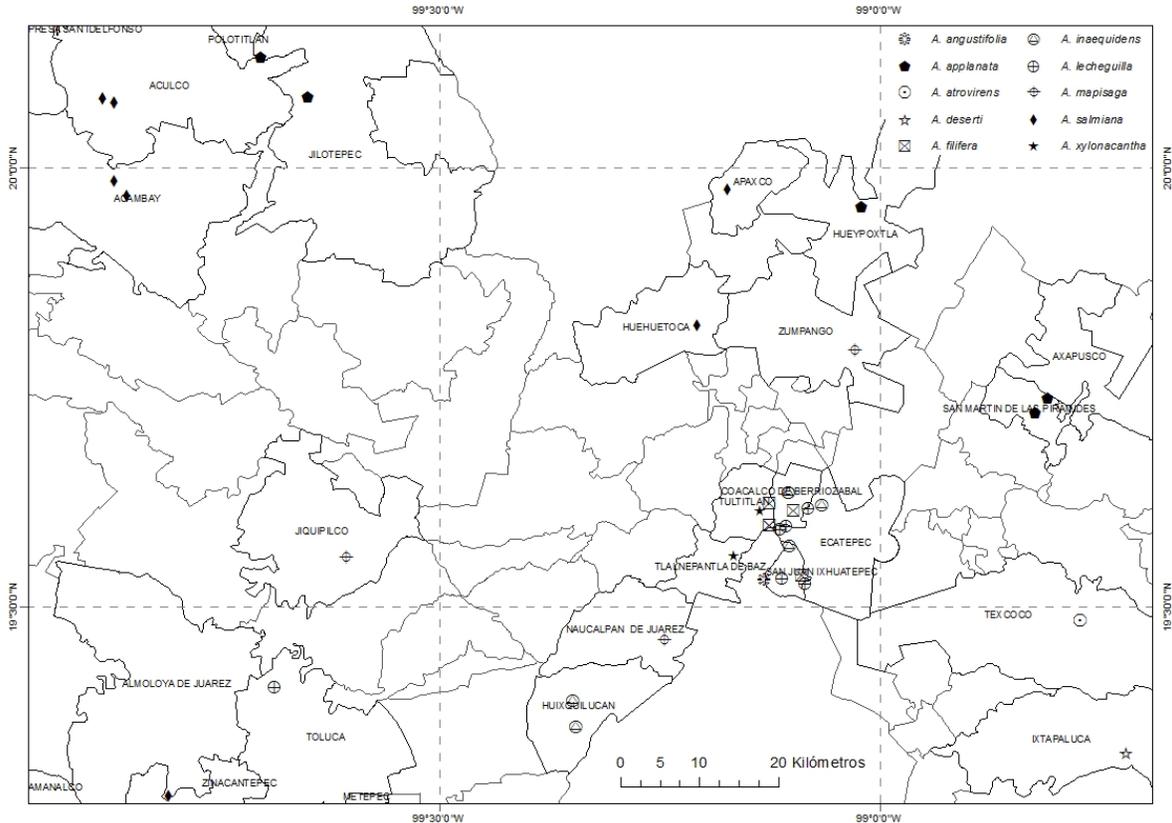


Figura 6 Distribución de las especies de *Agave* L. en el estado de México, acercamiento a la zona norte

En la zona noreste del Estado de México se puede observar una conglomeración de especies, asociadas a la Sierra Madre de Guadalupe, Área Natural Protegida, ubicada aproximadamente en el centro de la cuenca del Valle de México, la cumbre más alta alcanza poco menos de 3000 m de altitud (Méndez-De La Cruz, 1992). La biodiversidad que presenta esta zona depende de su topología abrupta (Cedillo *et al.*, 2007). Considerando que el relieve es uno de los factores determinantes para el desarrollo de meso y microclimas, por el efecto altitudinal o de pendiente además del de la variabilidad en las propiedades del suelo (Pausas y Austin, 2001; Cedillo *et al.*, 2007). Méndez -De La Cruz (1992) menciona que esta área presenta cuatro tipos de vegetación: acuática (arroyos temporales), matorral xerófilo, pastizal y bosque de encino y además presenta pendientes pedregosas, a las que se asocian afloramientos de *Agave* (Cedillo *et al.*, 2007), considerando lo anterior se puede decir que por la diversidad de condiciones esta zona es el hábitat idóneo para el

establecimiento de especies de *Agave* con requerimientos distintos, lo que justifica la biodiversidad del género en esta zona

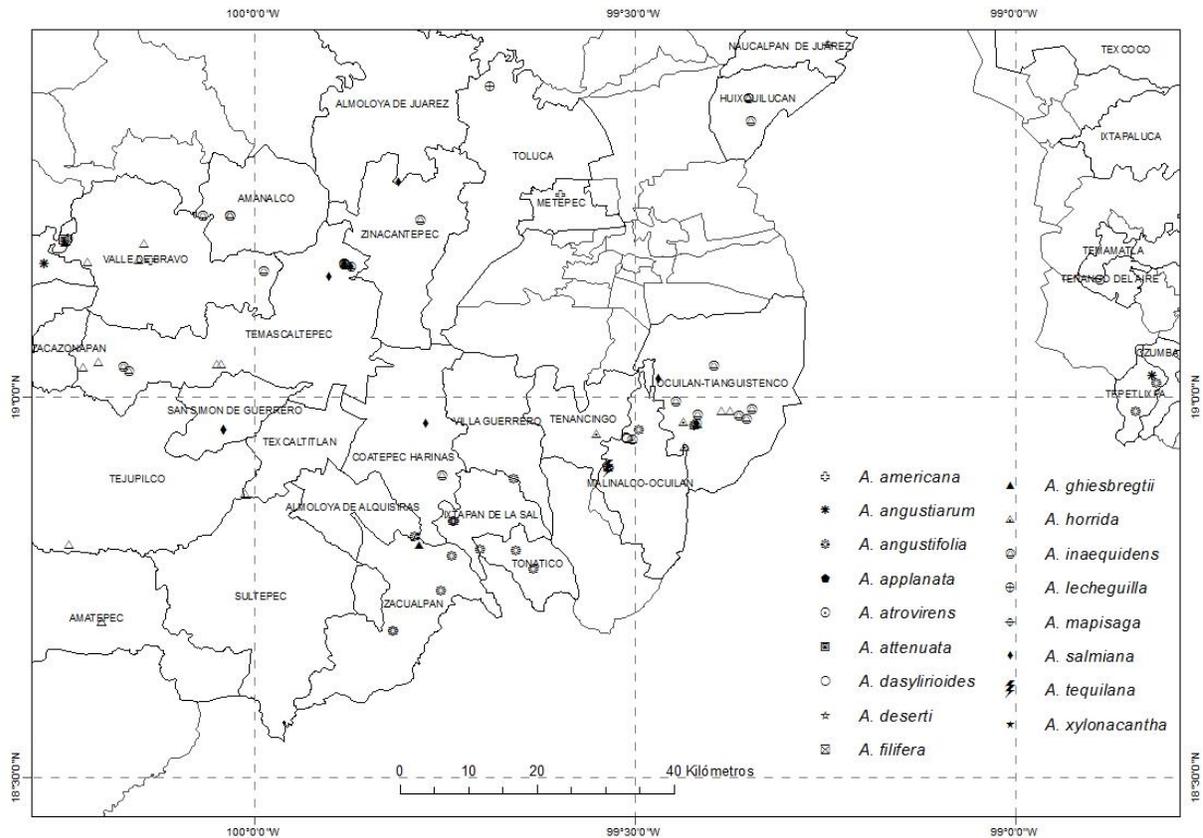


Figura 7. Distribución del genero *Agave* L. en el Estado de México, acercamiento a la zona sur.

La zona del sureste del Estado de México presentó una distribución más uniforme y una conglomeración de especies en el municipio de Ocuilán, con cinco especies. Esta zona está representada mediante el bosque mesófilo de montaña, tipo de vegetación que posee una gran diversidad biológica (Luna-Vega *et al.*, 1989).

Tambutti (2002) menciona que la diversidad de *Agave* en el país está asociada a las serranías, y que se concentra en la mixteca, entre Guerrero y Oaxaca. Es probable que la cercanía a esta zona explique la riqueza del género en la zona sureste del estado.

En ambas zonas (noreste y sureste del Estado de México) existen graves presiones demográficas que están alterando y desapareciendo la vegetación nativa, particularmente en la Sierra de Guadalupe, la deforestación y la erosión del suelo han sido las causas del gran deterioro que presenta, resultando en suelos poco profundos y vegetación introducida y perturbada (Cedillo *et al.*, 2007; Luna-Vega *et al.*, 1989).

7.4.1 Distribución de las especies del género *Agave* L. por municipio

En el Cuadro 5, se presenta un listado por municipio la distribución de las especies de *Agave*.

Cuadro 5. Distribución de especies por municipio.	
Especie	Municipio
<i>A. mapisaga</i>	Naucalpan, Tlalmanalco, Zumpango, Jiquipilco, Metepec
<i>A. filifera</i>	San Cristóbal Ecatepec, Tlanepantla, Coacalco
<i>A. lecheguilla</i>	San Cristóbal Ecatepec, Tlanepantla
<i>A. applanata</i>	Jilotepec, San Martín de las Pirámides
<i>A. atrovirens</i>	Tenango del Aire, Texcoco
<i>A. americana</i>	Valle de Bravo, Metepec
<i>A. angustiarum</i>	Santo Tomás de los Plátanos, Tepetlixpa
<i>A. dasylioides</i>	Malinalco, Ixtapan de la Sal, Ocuilan
<i>A. deserti</i>	Ixtapaluca
<i>A. attenuata</i>	Amatepec, Tejupilco, Temascaltepec, Temascaltepec, Valle de Bravo, Zacazonapan, Tlataya, Santo tomas de los Plátanos.
<i>A. angustifolia</i>	Tepetlixpa, Tonatico, Villa Guerrero, Zacualpan, Ixtapan de la Sal, Ixtapan del Oro, Ocuilan, Coatepec de Harinas
<i>A. inaequidens</i>	Amanalco, Coacalco, Huixquilucan, Ocuilan, San Cristóbal Ecatepec, Temascaltepec, Valle de Bravo, Amanalco, Coatepec de Harinas, Huixquilucan, San Francisco Coacalco, Ecatepec de Morelos, Huixquilucan
<i>A. horrida</i>	Malinalco, Ocuilan, Tejupilco
<i>A. xylocantha</i>	Tlanepantla
<i>A. ghiesbregtii</i>	Zacualpan, Santo tomas de los Plátanos
<i>A. salmiana</i>	Apasco, Huehuetoca, Temascaltepec, Tlanepantla, Xalatlaco, Zinacantepec
<i>A. tequilana</i>	Malinalco

Especies como *Agave inaequidens*, *A. attenuata* y *A. angustifolia* presentan la distribución más amplia y representativa dentro del Estado de México. *A. inaequidens* y *A. aungustifolia* son especies ampliamente cultivadas para la producción de mezcal en la zona sur del Estado de México (CONABIO, 2010),

inclusive el “Agave mezcalero”, nombre con el que se les designa de manera común a las especies del género *Agave* L. cultivadas para la elaboración de mezcal. Se encuentra actualmente en los programas de desarrollo de esta región. Donde se considera de importancia económica el cultivo y la producción del mezcal para el desarrollo económico de la zona (Gobierno del Estado de México, 2015); por otro lado *Agave attenuata* es una especie perteneciente al grupo *Amolae*, según la clasificación de Gentry (1982), este grupo se caracteriza por su potencial ornamental, lo que genera una amplia distribución para sus especies, que si bien su biología las ubica en zonas inaccesibles como estrategia de protección, también las capacita para adaptarse a gran variedad de condiciones, particularmente *A. attenuata* se destaca por su adaptabilidad a temperaturas altas y bajas así como a soportar ambientes sombreados, por lo que es una especie que se comercializado ampliamente como ornamental y es fácil encontrar en jardines (Gentry, 1982; Nobel, 1994).

En el presente estudio se contemplaron 17 especies en el Estado de México de las cuales se colectaron 15 es decir el 82%, además se agregó una especie al registro de especies presente en el Estado de México, *Agave tequilana.*, esta especie ha sido introducida recientemente en el municipio de Malinalco para su cultivo y elaboración de mezcal.

Debe considerarse que sólo existen registros para 51 municipios de 125, el hecho de que no existan registros para los municipios restantes puede deberse a la ausencia del género en dichos municipios o bien a que aún no han sido muestreados, El estado de México se encuentra dentro de un área que Golubov *et al.*, 2005) consideran de las de mayor riqueza del género *Agave* L., por lo anterior es posible considerar que el listado de especies de Agaves expuesto aquí es un factor que verifica y evidencia la existencia y la distribución del género dentro del Estado de México.

De las especies consideradas dentro de este estudio algunas se encuentran dentro de categorías de riesgo, por ejemplo, Aureoles-Rodríguez *et al.* (2008), menciona a *A. inaequidens* como una especie silvestre amenazada y la Nom-059, ubica *A. dasyliroides*, como especie amenazada y endémica, según Gentry (1982), se distribuye en el centro de México en laderas escarpadas, en los alrededores de Tepoztlan, Morelos y Cuernavaca.

Especies que han sido registradas y que no se encontraron en las colectas fueron *Agave atrovirens* y *A. deserti*.

Agave atrovirens es una especie distribuida principalmente en la zona centro de México. Gentry (1982) menciona que esta especie tiende a ser cultivado junto con *A. salmiana* por su uso compartido como cercas vivas, terrazas para la elaboración de pulque, etc. la reproducción de esta especie es únicamente sexual (por semilla), es incapaz de reproducirse mediante hijuelos, cuestión de importancia al considerar que las especies de Agaves que se cultivan, se reproducen principalmente por hijuelos. Juárez *et al.* (2014), menciona que el cultivo de Agaves para el Estado de México (agaves pulqueros), ha decrecido en un 80% Durante el periodo 1940 a 2012, por lo que es posible que especies que se cultivaban con dicho fin como *A. atrovirens* hayan disminuido sus poblaciones, dentro del Estado de México, imposibilitando la obtención de registros actuales para el presente.

Agave deserti representa un complejo de subespecies distribuidas en Baja California de donde es oriundo, por lo que no es extraño que no se haya encontrado mediante las colectas, además de poseer solo un registro para el estado. *A. deserti* alude a su afinidad por distribuirse en zonas desérticas (Gentry 1982; Navarro-Quezada *et al*, 2003).

Dentro de este trabajo no se contemplaron algunas especies de las que existen registros para el estado debido a la imposibilidad de la ubicación de sus exicatas, dichas especies fueron *Agave macroculmis* y *A. rhodacantha*, mencionadas por

Gentry (1982) y *A. ellementiana* por García-mendoza y Galván (1995), respectivamente; Vargas-Ponce, Zizumbo-Villarreal y Colunga-García (2007) mencionan sobre *A. rhodacanta* que esta especie es cultivada y usada en el centro occidente de México para la elaboración de mezcal de la misma manera *A. macroculms* se utiliza para la elaboración de bebidas destiladas. sin embargo, no hay registros de su uso dentro del Estado de México, es probable que la tendencia actual del cultivo de especies como *A. inaequidens* , *A. angustifolia* y *A. tequilana* hayan desplazado a estas especies.

7.5 Huella genética

7.5.1 Análisis del ADN extraído

Cuadro 6. Pureza del ADN obtenido		
Especie	Ng μL^{-1}	A_{260}/A_{280}
<i>A. angustifolia</i>	10.5	1.7
<i>A. horrida</i>	14.3	1.8
<i>A. salmiana</i>	21.3	1.7
<i>A. inaequidens</i>	15.9	1.8
<i>A. dasyliroides</i>	9.2	1.8
<i>A. xilonacantha</i>	9.2	1.9
<i>A. applanata</i>	10.6	1.8
<i>A. filifera</i>	27.6	1.7
<i>A. mapisaga</i>	10.3	1.8
<i>A. attenuata</i>	19.7	1.9
<i>A. tequilana</i>	10.2	2.5
<i>A. angustifolia</i>	16.9	1.7
<i>A. lecheguilla</i>	10.2	1.7
<i>A. americana</i>	9.1	1.7
<i>A. ghiesbregtii</i>	12.1	1.8

Para medir la pureza del ADN extraído, se hizo uso de la absorbancia. Se ha reportado que el ADN tiene una absorbancia máxima en 260 nm, mientras que las proteínas, las cuales son las impurezas más comunes en preparaciones de ADN, tienen una absorbancia máxima de 280 nm; esta es la razón por la cual esas dos longitudes de onda son usadas para verificar la pureza del ADN. Si

la relación está entre 1.7 y 2.0 la preparación de ADN es considerada pura, una relación menor indica impurezas proteicas o fenólicas y una relación mayor indica presencia de RNA (Müller y Schweizer 1994; Weir *et al.*, 1996).

En el Cuadro 6, se muestran los resultados de la concentración ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) y la relación A_{260}/A_{230} nm para cada una de las 15 especies de *Agave*. Se destaca así mismo una estimación de la pureza del ADN mediante la relación de la absorbancia A_{260}/A_{280} nm.

Las relaciones de absorbancia entre 260 a 280 nm variaron desde 1.7 a 2.5 Las concentraciones oscilan de 9.1 a 27.6 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ de ADN en solución. En promedio se obtuvo 13.81 $\text{ng}^{-1} \mu\text{L}$ de ADN por muestra, como se puede observar en el Cuadro 6, *A. tequilana* mostró un coeficiente 260/280 de 2.5, lo que sugiere contaminación por una alta cantidad de ARN.

La extracción de AND del tejido de plantas perenes, como las hojas de los agaves es compleja debido a la presencia de fibras, fenoles y otros compuestos orgánicos que actúan desfavorablemente durante la extracción y amplificación del ADN (Keb-Llanes *et al.*, 2002), lo cual se manifiesta principalmente en la presencia de falsos positivos. Algunos de los principales factores que afectan dicha amplificación, son la pureza, integridad y cantidad del ADN extraído, lo cual tiene que ver principalmente con el co-aislamiento de polisacáridos, fenoles y metabolitos secundarios durante la extracción de ADN, para comprobar la integridad del ADN extraído, se realizó un análisis electroforético de integridad mediante un gel de agarosa al 0.8%, en el cual las moléculas se separaron de acuerdo a su peso molecular en la corrida electroforética se observaron fragmentos claros, lo que indica que el ADN extraído fue íntegro (Solano-Flórez *et al.*, 2009) para todas las muestras de tejido de los agaves.

7.5.2 Análisis con iniciadores RAPD

De los cinco iniciadores RAPD de 10 bases (b), se consideraron solo cuatro ya que Y29 no amplificó fragmentos claros para ninguna especie, de manera que los resultados expuestos solo consideran los fragmentos amplificados por Y24, Y37,

Y38 y Y41. El número total de fragmentos reproducibles fue de 26, con un intervalo en el tamaño de los mismos de 200 a 3000 pares de bases (pb).

De los 26 fragmentos totales; el 100% fueron polimórficos. Se observó un promedio de 6.5 fragmentos por iniciador; igualmente se obtuvieron seis fragmentos específicos, ninguna banda monomórfico y un total de 32 patrones de bandeo (Cuadro 7 y 8).

Con los cuatro iniciadores, se generaron seis fragmentos específicos (Cuadro 8) en cinco de las 15 especies evaluadas; de los cuales, la especie *Agave angustifolia* presentó un fragmento específico amplificado por dos marcadores Y38 y Y24. Así mismo Y24, fue el marcador que amplificó el mayor número de fragmentos específicos (4), uno para cada una de las siguientes especies *A. angustifolia*, *A. lecheguilla*, *A. angustiarum*, *A. tequilana*, Las especies que no mostraron ningún fragmento específico fueron: *A. horrida*, *A. Salmiana*, *A. inaequidens*, *A. dasilirioides*, *A. xilonacatha*, *A. applanata*, *A. filifera*, *A. mapisaga*, *A. attenuata*, *A. americana* y *A. ghiesbregtii*.

Cuadro 7. Características de los fragmentos amplificados de ADN con cuatro iniciadores RAPD de 10 bases en 15 especies de <i>Agave</i> L.							
Iniciador	Patrones de bandeo	Fragmentos totales	Fragmentos monomórficos	Fragmentos específicos	Fragmentos polimórficos	Porcentaje de polimorfismo	Tamaño pb
Y24	13	12	0	4	12	100	300-2000
Y37	8	5	0	0	5	100	300-2000
Y38	6	5	0	2	5	100	300-2000
Y41	5	4	0	0	4	100	1000-500
Promedio	8	6.5	0	1.5	6.5	100	
total	32	26	0	6	26	-	-

Cuadro 8. Matriz binaria mostrando el polimorfismo generado con cuatro iniciadores RAPD de 10 bases para el análisis molecular de 15 especies de *Agave* L. 1 = presencia de bandas específica

Alelo	<i>A. angustifolia</i>	<i>A. horrida</i>	<i>A. salmiana</i>	<i>A. inaequidens</i>	<i>A. dasyliroides</i>	<i>A. xylonacantha</i>	<i>A. applanata</i>	<i>A. filifera</i>	<i>A. mapisaga</i>	<i>A. attenuata</i>	<i>A. tequilana</i>	<i>A. angustiarum</i>	<i>A. lecheguilla</i>	<i>A. americana</i>	<i>A. ghiesbreghtii</i>
	Y41														
A	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
B	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
C	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
D	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Y24														
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
C	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
E	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
F	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0
H	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
I	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0
J	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	1	1	0	0	1	1	1	1	1		1	1	1	0	0
M	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0
	Y37														
A	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
B	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
C	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
D	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
E	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0
	Y38														
B	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0
C	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
E	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

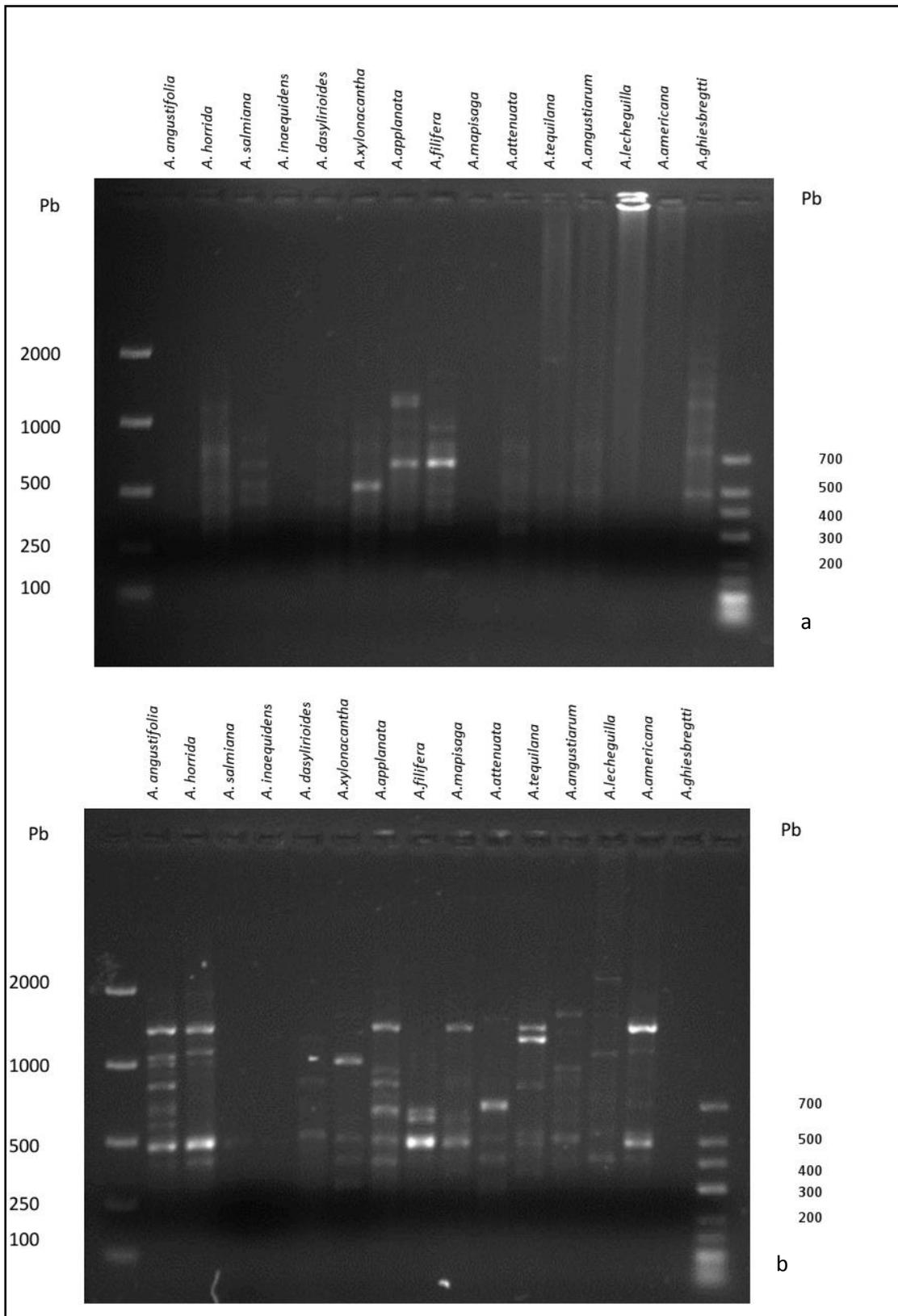


Figura 8 Productos de amplificación de PCR utilizando iniciadores RAPD de 10 bases en 15 especies de *Agave* L. Pares de bases (pb), Marcador de peso molecular (derecha 2000-100 pb, izquierda 700-100 pb). a) Iniciador Y24, b) Iniciador Y37.

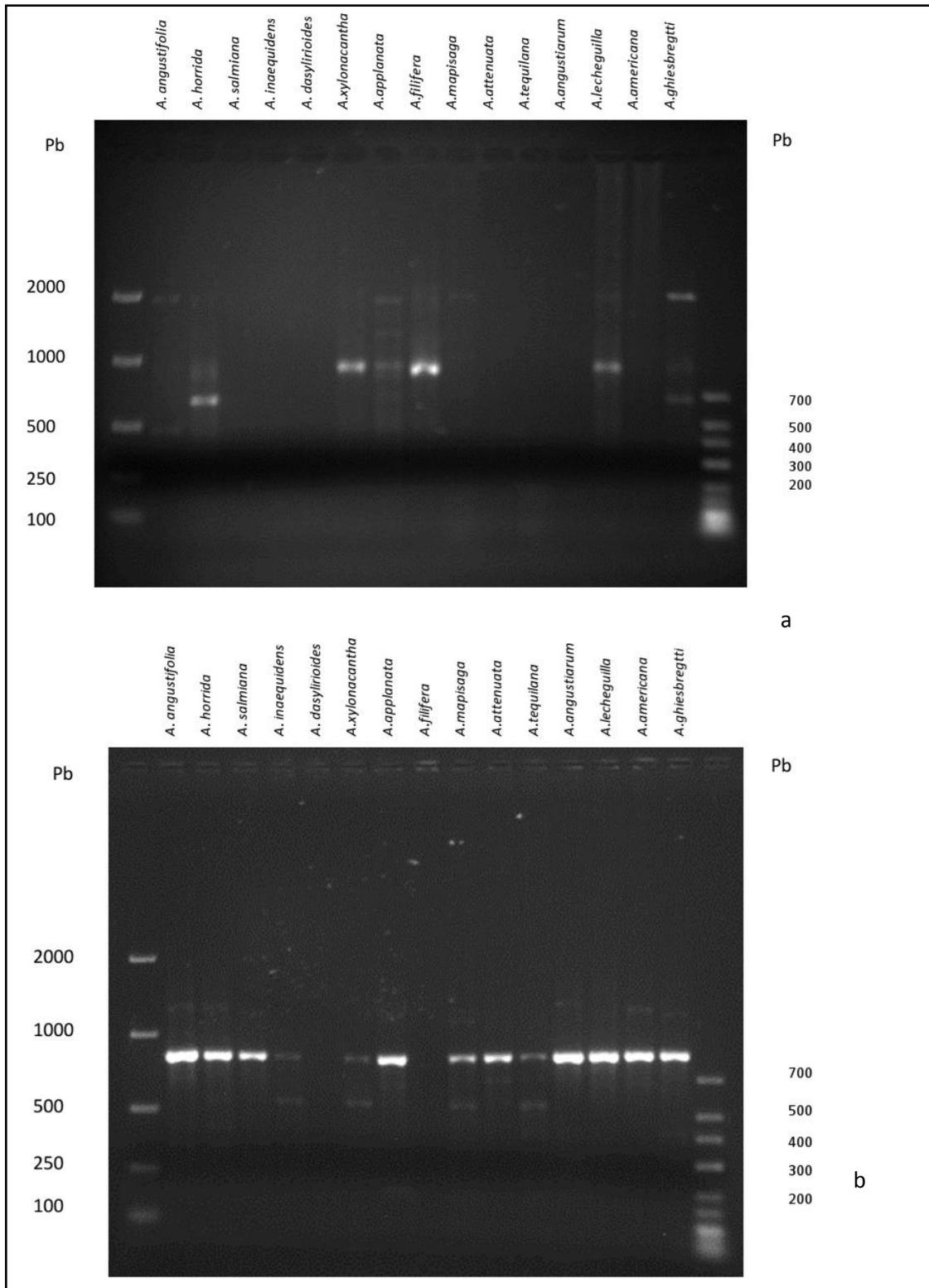


Figura 9 Productos de amplificación de PCR utilizando iniciadores RAPD de 10 bases en 15 especies de *Agave* L. Pares de bases (pb), Marcador de peso molecular (derecha 2000-100 pb, izquierda 700-100 pb). a) Iniciador Y38, b) Iniciador Y41.

El valor promedio de heterocigosis esperada para los iniciadores RAPD de 10 b fue de $H_E = 0.4912$, sugiriendo que existe diversidad genética relativamente alta entre las especies evaluadas.

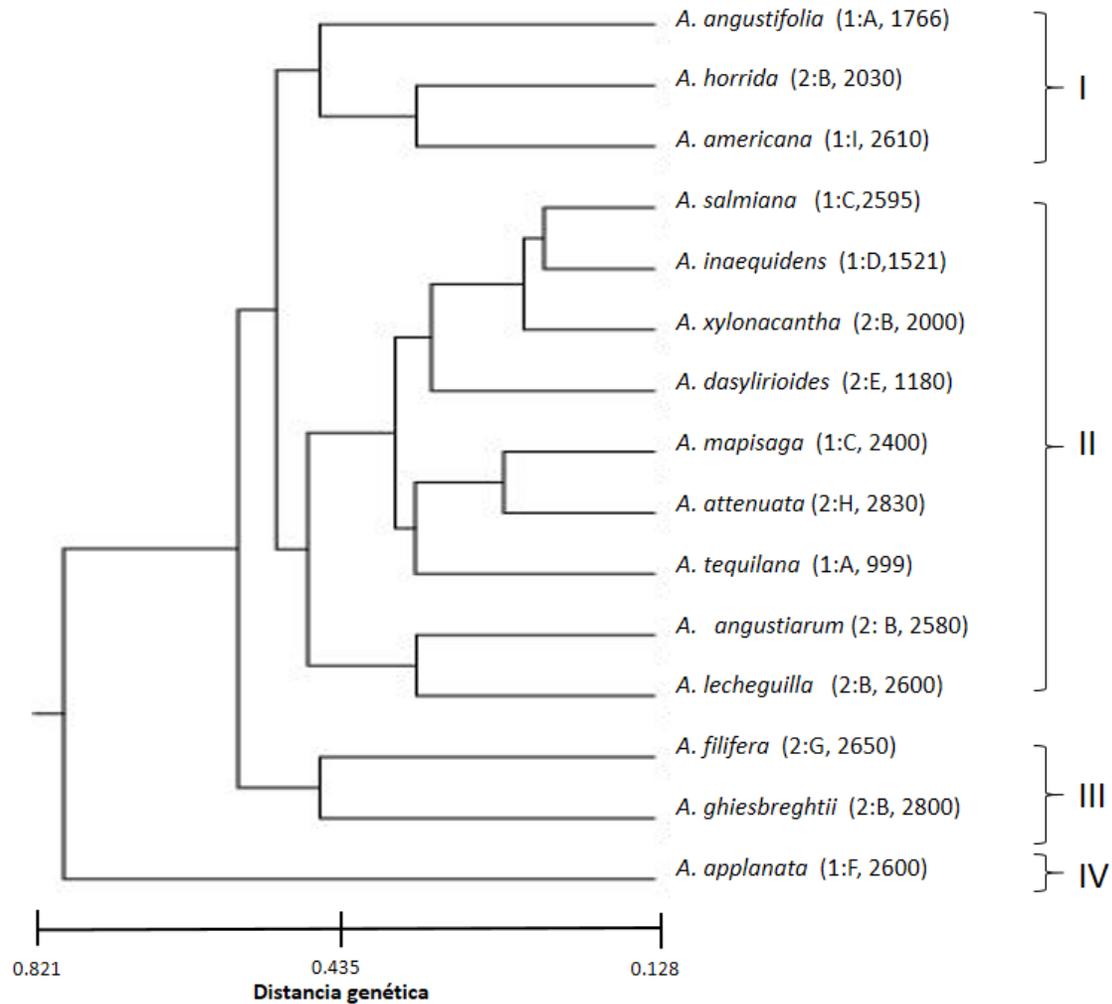


Figura 11 Dendrograma mostrando el agrupamiento de 15 especies del género *Agave* L. obtenido a partir del análisis con iniciadores RAPD de 10 bases basado en la distancia genética de Nei (1972), usando el método UPGMA. (1: Subgénero *Agave*: A: Grupo *Rigidae*, C: Grupo *Salminae*, D: Grupo *campaniflorae*, F Grupo. *Ditepalae*, I: Grupo *Americanae*. 2: Subgénero *Littaea*: B. Grupo *Marginatae*, E: Grupo *striatae*, G: Grupo *filiferae*, H: Grupo *Amolae*. Altitud de colecta en msnm).

En el análisis para RADPS de 10 bases la menor distancia genética se observa entre *Agave salmiana* y *A. inaequidens*; así como entre *A. inaequidens* y *A. xylonacantha*, en ambos casos con un valor de $D_G = 0.12787$, la mayor distancia se obtuvo entre *A. angustifolia* y *A. ghiesbreghtii*; así como entre *A. inaequidens* y *A. appanata* en ambos casos con un valor de $D_G = 0.821$.

Cuadro 9. Distancia genética de Nei (1972), entre las 15 especies del género *Agave* L., usando iniciadores RAPD de 10 bases.

	<i>A. angustifolia</i>	<i>A. horrida</i>	<i>A. salmiana</i>	<i>A. inaequidens</i>	<i>A. dasylirioides</i>	<i>A. xylonacantha</i>	<i>A. appanata</i>	<i>A. filifera</i>	<i>A. mapisaga</i>	<i>A. attenuata</i>	<i>A. tequilana</i>	<i>A. angustiarum</i>	<i>A. lecheguilla</i>	<i>A. americana</i>	<i>A. ghiesbreghtii</i>
<i>A. angustifolia</i>	****														
<i>A. horrida</i>	0.3857	****													
<i>A. salmiana</i>	0.5108	0.3857	****												
<i>A. inaequidens</i>	0.5798	0.4463	0.1278	****											
<i>A. dasylirioides</i>	0.5108	0.5108	0.2744	0.2231	****										
<i>A. xylonacantha</i>	0.3857	0.2744	0.1744	0.1278	0.2744	****									
<i>A. appanata</i>	0.5798	0.734	0.9163	0.821	0.9163	0.734	****								
<i>A. filifera</i>	0.5108	0.5108	0.3857	0.3285	0.2744	0.3857	0.5798	****							
<i>A. mapisaga</i>	0.4463	0.5798	0.3285	0.2744	0.3285	0.3285	0.3857	0.4463	****						
<i>A. attenuata</i>	0.4463	0.4463	0.3285	0.1744	0.4463	0.2231	0.5108	0.4463	0.1744	****					
<i>A. tequilana</i>	0.5108	0.5108	0.3857	0.2231	0.2744	0.2744	0.5798	0.5108	0.2231	0.3285	****				
<i>A. angustiarum</i>	0.5798	0.4463	0.2231	0.2744	0.3285	0.3285	0.6539	0.4463	0.3857	0.5108	0.3285	****			
<i>A. lecheguilla</i>	0.4463	0.3285	0.4463	0.3857	0.4463	0.3285	0.6539	0.4463	0.6539	0.5108	0.4463	0.2744	****		
<i>A. americana</i>	0.3857	0.2744	0.3857	0.3285	0.5108	0.3857	0.734	0.5108	0.4463	0.2231	0.3857	0.4463	0.3285	****	
<i>A. ghiesbreghtii</i>	0.821	0.3857	0.3857	0.3285	0.3857	0.5108	0.734	0.3857	0.734	0.5798	0.6539	0.4463	0.5798	0.5108	****

El dendrograma (Figura 10) generado con los datos RAPD de 10 pb ubicó a las especies del género *Agave* en cuatro grupos. En el grupo I se ubicaron las especies *A. angustifolia*, *A. horrida* y *A. americana*; en el grupo II: *A. salmiana*, *A. inaequidens*, *A. xylonacantha*, *A. dasylirioides*, *A. mapisaga*, *A. attenuata*, *A. tequilana*, *A. angustiarum* y *A. lecheguilla*; en el grupo III se agruparon las especies *A. filifera* y *A. ghiesbreghtii*; en el grupo IV sólo estuvo *A. appanata*

En contraparte a la clasificación de Gentry (1982), en el dendrograma generado mediante los RAPD de 10 bases, no se obtuvo una agrupación de acuerdo a sus caracteres morfológicos, agrupación esperada al considerar la morfología como un acercamiento filogenético. Wen y Hsiao (2001), mencionan que la diversidad genética está correlacionada con el origen geográfico de las especies así como sus requerimientos ambientales (Pausas y Austin, 2001), sin embargo, en el dendrograma generado no se observa relación entre la altura en la que se colectó la especie y los grupos generados, ello quizá se deba a la amplia adaptabilidad del género a distintas condiciones ambientales (Nobel, 1994), así mismo se observó una gran discriminación entre especies que pudo deberse al origen reciente del género y a los altos niveles de flujo genético intra e inter específico que presenta (Good-Avila *et al.*, 2006).

7.5.3 Análisis con iniciadores ASSR

Con los cinco iniciadores ASSR anclados de 17 bases, se obtuvo un número total de 45 fragmentos, con un intervalo en el tamaño de los fragmentos amplificados de 200 a 3000 pares de bases (pb) (Figura 11, 12 y 13).

De los 45 fragmentos totales; el 100% fueron polimórficos, con un promedio de nueve fragmentos por iniciador; se observaron siete fragmentos específicos, cero fragmentos monomórficos y 62 patrones de bandeo (Cuadro 10 y 11).

Todos los marcadores amplificaron fragmentos específicos, en total siete: *A. filifera* presentó un fragmento específico de 2000 pb. amplificado por ASSR02 e ASSR15 además de una de 700 pb amplificada por ASSR20; éste último fue el iniciador que mayor número de fragmentos específicos presentó con tres, amplificando además para *A. angustifolia* y otra para *A. tequilana*. *A. applanatta* presentó una banda

especifica amplificada por ASSR29 y *A. attenuata* presentó una banda específica amplificada por ASSR35.

Cuadro 11. Características de los fragmentos amplificados de ADN con cinco ASSR de 17 bases en 15 especies de *Agave* L.

Iniciador	Patrones de bandeos	Fragmentos totales	Fragmentos monomórficos	Fragmentos específicos	Fragmentos polimórficos	Porcentaje de polimorfismo	tamaño pb
ASSR15	12	9	0	1	9	100	2000-400
ASSR02	13	6	0	1	6	100	2000-500
ASSR20	14	10	0	3	10	100	2000-400
ASSR29	11	11	0	1	11	100	1000-400
ISRR35	12	9	0	1	9	100	1000-300
promedio	12.4	9	0	1.4	9	-	-
total	62	45	0	7	45	-	-

Cuadro 12. Matriz binaria mostrando el polimorfismo generado con cinco iniciadores RAPD de 10 bases para el análisis molecular de 15 especies de *Agave* L. 1 = presencia de bandas específicas

Alelo	<i>A. angustifolia</i>	<i>A. horrida</i>	<i>A. salmiana</i>	<i>A. inaequidens</i>	<i>A. dasyliroides</i>	<i>A. xylonacantha</i>	<i>A. applanata</i>	<i>A. filifera</i>	<i>A. mapisaga</i>	<i>A. attenuata</i>	<i>A. tequilana</i>	<i>A. angustiarum</i>	<i>A. lecheguilla</i>	<i>A. americana</i>	<i>A. ghiesbregtii</i>
	ISSR15														
A	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
B	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
E	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1
G	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
H	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
I	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0

	ISSR02														
B	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
C	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0
E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0
F	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
G	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
	ISSR20														
A	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0
B	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1
E	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
F	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0
G	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1
I	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0
	ISSR29														
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
E	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
F	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
G	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1
H	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0
I	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
J	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
K	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	ISSR35														
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0
D	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
E	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
F	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
G	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1
H	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
I	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
J	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
K	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0

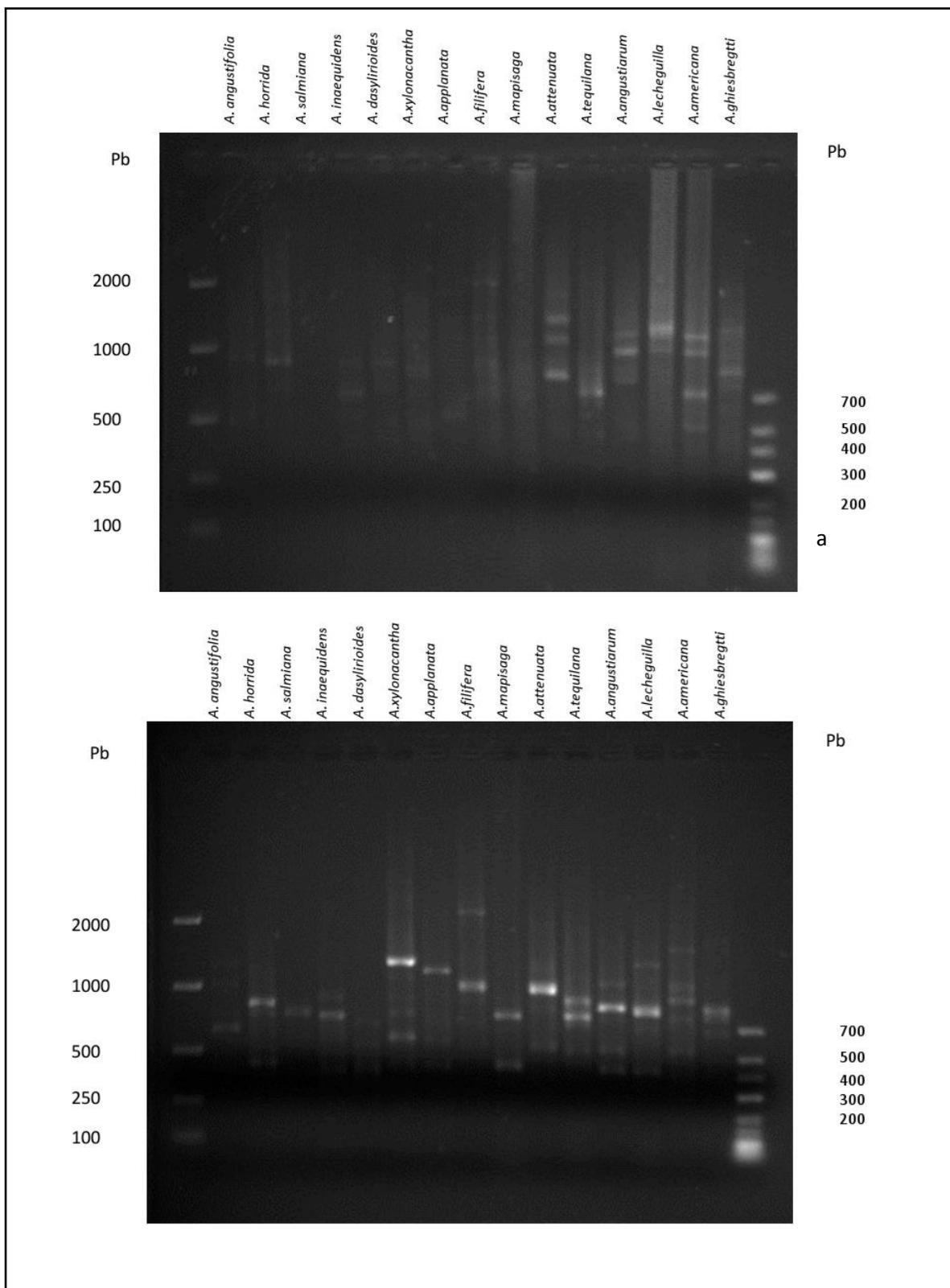


Figura 13 Productos de amplificación de PCR utilizando iniciadores ASSR de 17 bases en 15 especies de *Agave* L. Pares de bases (pb), Marcador de peso molecular (derecha 2000-100 pb, izquierda 700-100 pb, a) Iniciador ASSR 02 y b) ASSR15.

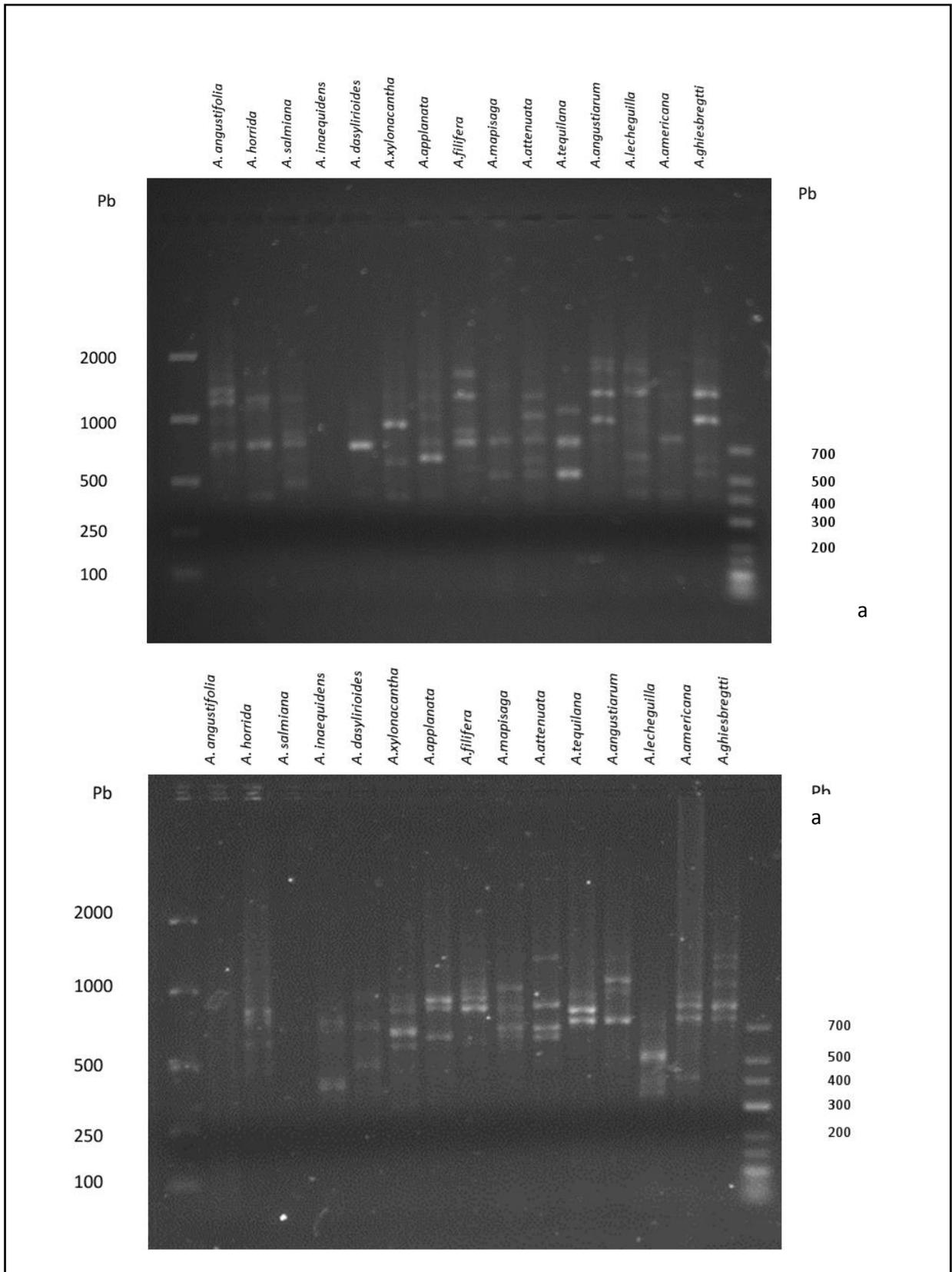


Figura 15 Productos de amplificación de PCR utilizando iniciadores ASSR de 17 bases en 15 especies de *Agave* L.. Pares de bases (pb), Marcador de peso molecular (derecha 2000-100 pb, izquierda 700-100 pb, a) Iniciador ASSR15, b) iniciador ASSR20.

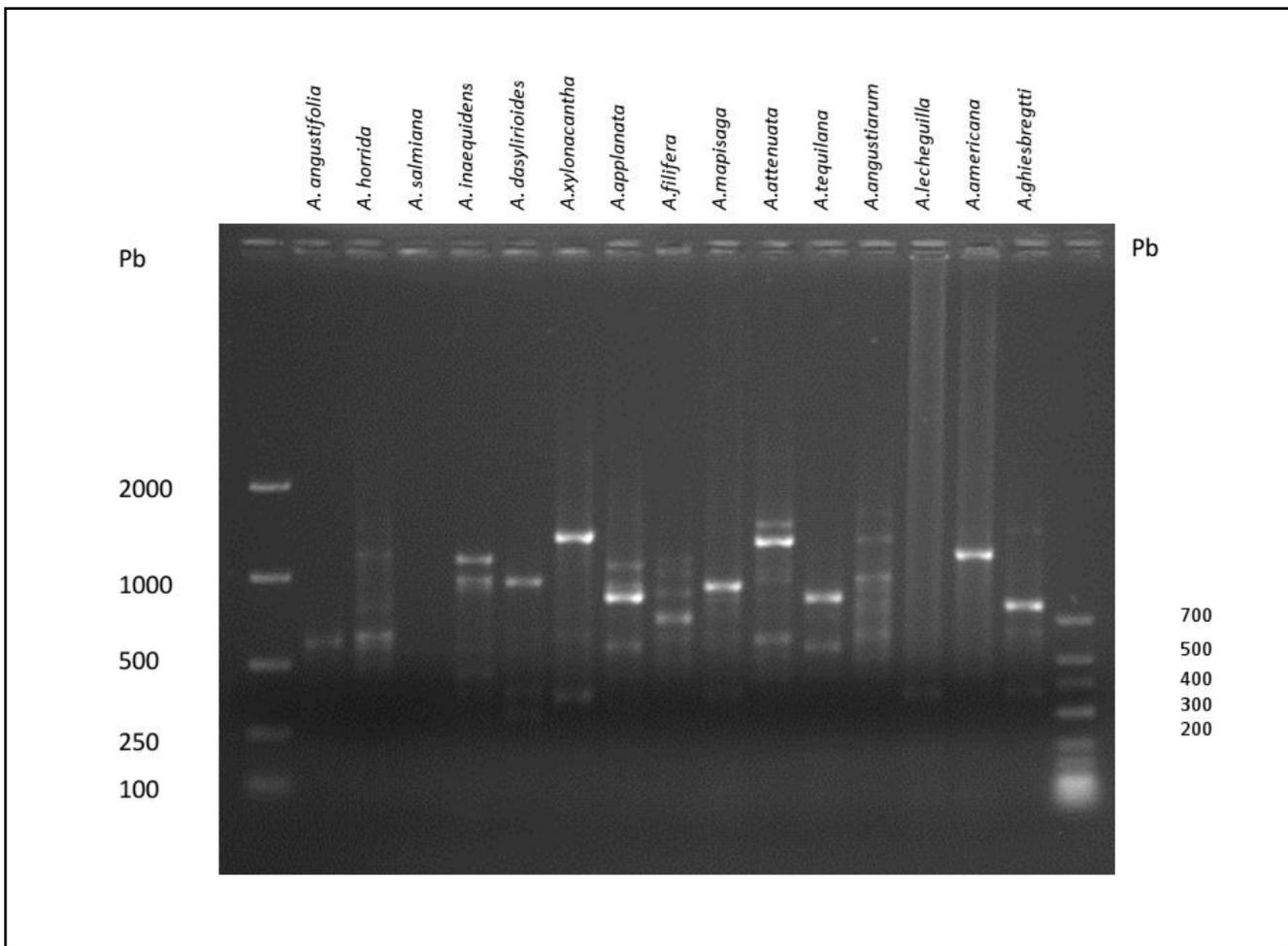


Figura 18 Producto de amplificación de PCR utilizando iniciadores ASSR de 17 bases en 15 especies de *Agave*. L.Pares de bases (pb), Marcador de peso molecular (derecha 2000-100 pb, izquierda 700-100 pb, iniciador ASSR 35.

El valor promedio de heterocigosis esperada para los iniciadores ASSR de 17 pb fue de $H_E = 0.2895$, sugiriendo que existe diversidad genética entre las especies de *Agaves* evaluadas.

En este análisis La menor distancia genética se observa entre *Agave mapisaga* y *A. dasyliroioides* con un valor de $D_G = 0.1398$, y la mayor se observa entre *A. xylonacantha*, *A. tequilana* y *A. angustiarum*; entre *A. attenuata* y *A. tequilana* así como entre *A. angustiarum* y *A. americana* con un valor de $D_G = 0.5705$ (Cuadro 12).

Cuadro 13. Distancia genética de Nei (1972), entre las 15 especies del género *Agave* L., usando iniciadores ASSR de 17 bases.

	<i>A. angustifolia</i>	<i>A. horrida</i>	<i>A. salmiana</i>	<i>A. inaequidens</i>	<i>A. dasylirioides</i>	<i>A. xylonacantha</i>	<i>A. applanata</i>	<i>A. filifera</i>	<i>A. mapisaga</i>	<i>A. attenuata</i>	<i>A. tequilana</i>	<i>A. angustiarum</i>	<i>A. lecheguilla</i>	<i>A. americana</i>	<i>A. ghiesbreghtii</i>
<i>A. angustifolia</i>	****														
<i>A. horrida</i>	0.1651	****													
<i>A. salmiana</i>	0.2177	0.1911	****												
<i>A. inaequidens</i>	0.3629	0.2733	0.2177	****											
<i>A. dasylirioides</i>	0.2177	0.1911	0.1911	0.1651	****										
<i>A. xylonacantha</i>	0.3629	0.3321	0.3947	0.4274	0.2733	****									
<i>A. applanata</i>	0.2733	0.2451	0.2451	0.3321	0.2451	0.3947	****								
<i>A. filifera</i>	0.3629	0.3321	0.2733	0.4964	0.3321	0.5705	0.3321	****							
<i>A. mapisaga</i>	0.3947	0.3629	0.1911	0.2177	0.1398	0.3947	0.4274	0.5328	****						
<i>A. attenuata</i>	0.3629	0.3321	0.3321	0.6506	0.4613	0.4964	0.5328	0.4964	0.5328	****					
<i>A. tequilana</i>	0.3023	0.3947	0.1651	0.3023	0.3321	0.5705	0.2733	0.3629	0.3321	0.5705	****				
<i>A. angustiarum</i>	0.4964	0.3947	0.5328	0.4964	0.3947	0.5705	0.6931	0.6506	0.4613	0.4274	0.8329	****			
<i>A. lecheguilla</i>	0.4274	0.3321	0.3321	0.4274	0.3321	0.3629	0.5328	0.4964	0.3947	0.4964	0.5705	0.3629	****		
<i>A. americana</i>	0.3629	0.2177	0.2733	0.2451	0.2733	0.4274	0.2733	0.3629	0.4613	0.4274	0.3023	0.5705	0.3023	****	
<i>A. ghiesbreghtii</i>	0.3321	0.3023	0.2451	0.4613	0.3629	0.4613	0.3629	0.3947	0.4964	0.3321	0.3947	0.3947	0.3947	0.4613	****

El dendrograma (Figura 9) generado con los datos ASSR colocó a las 15 especies de *Agave* L. en cuatro grupos diferentes. En el grupo I y II se generaron agrupaciones entre los subgéneros *Littaea* y *Agave*, mientras que el grupo III y IV, contemplo únicamente *Littaea*, en ambos dominó la presencia del grupo *Marginatae* grupo propuesto por Gentry (1982); en el género *Agave* L. la similitud de alelos es común entre especies que pertenecen al mismo complejo evolutivo, un sistema de especies muy relacionadas o subespecies (Gentry, 1982; Navarro-Quezada *et al.*, 2003), por lo que es probable que en nuestros resultados se observe esta relación evolutiva expresada en principio como caracteres morfológicos distintivos como hojas con un margen corneo continuo y flores pequeñas con tubos cortos y abiertos con grandes tépalos que envainan a los filamentos. *A. attenuata* es la única especie del grupo III y IV que no pertenece al grupo *Marginatae*, y que contempla características morfológicamente distintas.

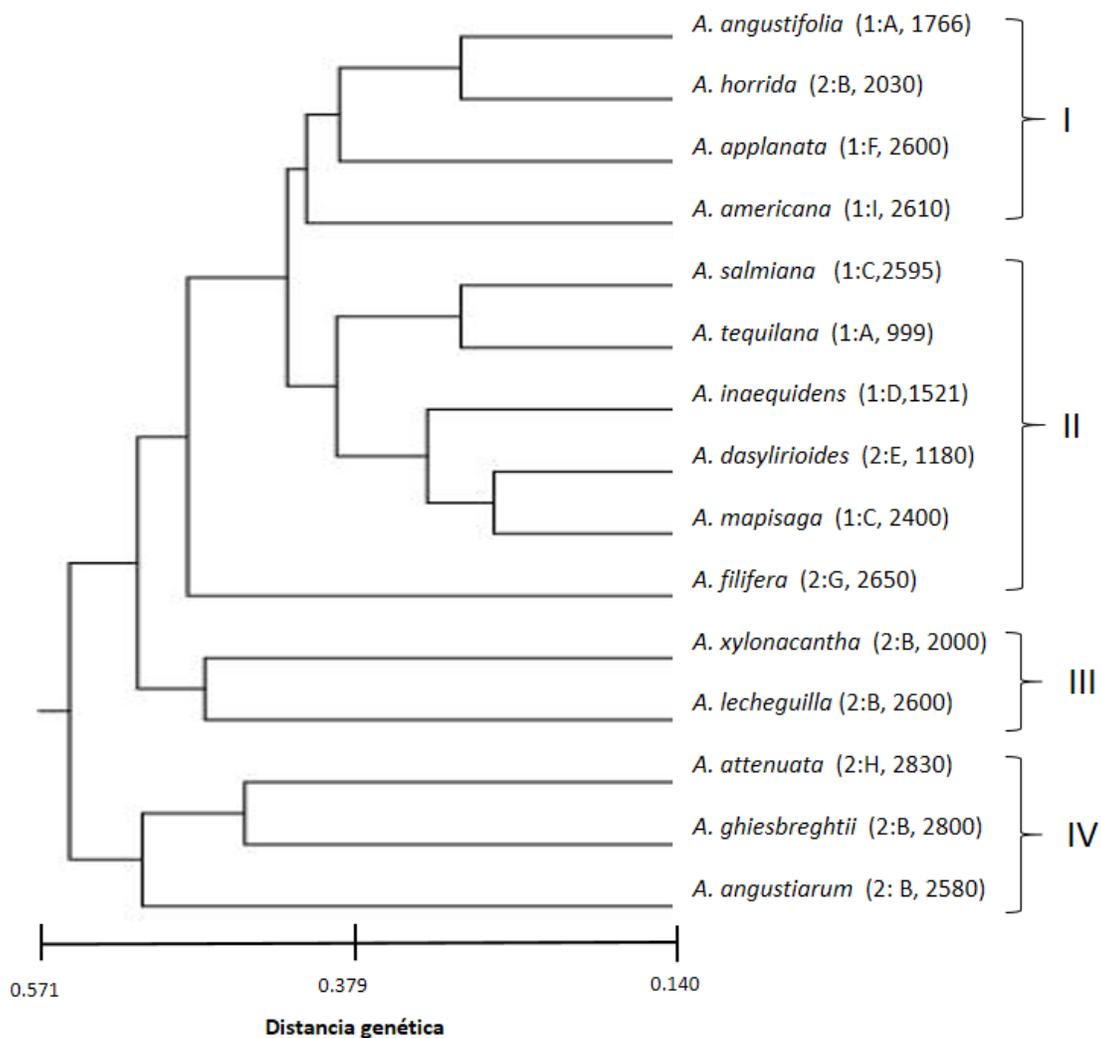


Figura 19 Dendrograma mostrando el agrupamiento de 15 especies del género *Agave* L. obtenido a partir del análisis con iniciadores ASSR de 17 bases basado en la distancia genética de Nei (1972), usando el método UPGMA. (1: Subgénero *Agave*: A: Grupo *Rigidae*, C: Grupo *Salminae*, D: Grupo *campaniflorae*, F Grupo. *Ditepalae*, I: Grupo *Americanae*. 2: Subgénero *Littaea*: B. Grupo *Marginatae*, E: Grupo *striatae*, G: Grupo *filiferae*, H: Grupo *Amolae*. Altitud de colecta en msnm).

7.5.4 Analisis integrado con iniciadores RAPD y ASSR

De modo general, los productos de PCR con los nueve iniciadores utilizados, cuatro de tipo RAPD y cinco ASSR (RAPD + ASSR), arrojaron como resultado un total de 71 fragmentos amplificados en las 15 especies evaluadas, todos los fragmentos fueron polimórficos. Con un promedio de 7.8 fragmentos por iniciador; al mismo

tiempo se generaron 13 fragmentos específicos, cero monomórficos y 94 patrones de bandeo (Cuadro 13).

Cuadro 14. Características de los fragmentos amplificados de ADN con RADSP (10b) e ASSR (17b) en 15 especies de <i>Agave</i> L.						
Iniciadores	Patrones de bandeo	Fragmentos totales	Fragmentos monomórficos	Fragmentos específicos	Fragmentos polimórficos	Porcentaje de polimorfismo
RADPS	32	26	0	6	26	100
ASSR	62	45	0	7	45	100
PROMEDIO	47	35.5	0	6.5	35.5	100
TOTAL	94	71	0	13	71	100

En el análisis integrado la menor distancia genética se observa entre *Agave inaequidens* y *A. dasylirioides*, así como entre *A. salmiana* y *A. inaequidens*, con un valor de $D_G = 0.1851$ en ambos casos, la mayor distancia genética se observa entre *A.;* *A. angustiarum* y *A. applanata* con un valor de $D_G = 0.7363$ El valor promedio de heterocigosis esperada fue de $H_E = 0.3154$, sugiriendo que existe una alta diversidad genética entre las especies de *Agave* evaluadas (Cuadro12).

El dendrograma (Figura 15) generado con los datos de ambos iniciadores RAPDs y ASSR agrupó a las 15 especies de *Agave* en cuatro grupos diferentes.

Cuadro 15. Distancia genética de Nei (1972), entre las 15 especies del género *Agave* L., usando iniciadores RAPD (10b) e ASSR (17b)

	<i>A. angustifolia</i>	<i>A. horrida</i>	<i>A. salmiana</i>	<i>A. inaequidens</i>	<i>A. dasylirioides</i>	<i>A. xylonacantha</i>	<i>A. applanata</i>	<i>A. filifera</i>	<i>A. mapisaga</i>	<i>A. attenuata</i>	<i>A. tequilana</i>	<i>A. angustiarum</i>	<i>A. lecheguilla</i>	<i>A. americana</i>	<i>A. ghiesbreghtii</i>
<i>A. angustifolia</i>	****														
<i>A. horrida</i>	0.2373	****													
<i>A. salmiana</i>	0.3114	0.2553	****												
<i>A. inaequidens</i>	0.434	0.3309	0.1851	****											
<i>A. dasylirioides</i>	0.3114	0.2924	0.2196	0.1851	****										
<i>A. xylonacantha</i>	0.3709	0.3114	0.3114	0.3114	0.2737	****									
<i>A. applanata</i>	0.3709	0.3915	0.434	0.4785	0.434	0.5015	****								
<i>A. filifera</i>	0.4125	0.3915	0.3114	0.434	0.3114	0.5015	0.4125	****							
<i>A. mapisaga</i>	0.4125	0.434	0.2373	0.2373	0.2022	0.3709	0.4125	0.5015	****						
<i>A. attenuata</i>	0.3915	0.3709	0.2924	0.5015	0.4125	0.434	0.525	0.434	0.3507	****					
<i>A. tequilana</i>	0.456	0.3915	0.3114	0.3915	0.3915	0.5015	0.5991	0.456	0.4125	0.434	****				
<i>A. angustiarum</i>	0.4785	0.5015	0.456	0.4125	0.456	0.525	0.7363	0.6251	0.6251	0.5991	0.6251	****			
<i>A. lecheguilla</i>	0.3915	0.5015	0.3709	0.456	0.3709	0.2737	0.525	0.5738	0.434	0.5491	0.525	0.3309	****		
<i>A. americana</i>	0.3709	0.3915	0.3507	0.434	0.3114	0.3709	0.5491	0.456	0.3709	0.3507	0.3309	0.525	0.3114	****	
<i>A. ghiesbreghtii</i>	0.5348	0.4642	0.4198	0.4198	0.3566	0.4417	0.4872	0.4417	0.5848	0.6108	0.4872	0.4198	0.4642	0.4872	****

Existen muchos autores que coinciden en afirmar que si el enfoque del estudio es observar las diferencias entre individuos a nivel de nucleótidos, mientras mayor sea el número de fragmentos o *loci* que se muestren mayor será la confiabilidad de los resultados (Koskinen *et al.*, 2004; Nybon, 2004), en este sentido el dendrograma consenso (ASSR+ RAPD) sería el análisis de mayor confiabilidad, sin embargo Nei (1978), estimó que en la construcción de un dendrograma basado en distancias genéticas para un grupo de especies, a partir de un solo individuo por especie será más confiable en la obtención de la topología entre más bajos sean los niveles de heterocigosidad, condición que cumple el dendrograma basado en ASSR, que mostro los niveles más bajos de heterocigosidad y la mayor relación taxonómica entre los grupos generados.