

Diversidad genética de maguey (*Agave spp.*) en las sierras y llanuras del norte de Guanajuato

Andrés Mandujano Bueno^{1§}

José Luis Pons Hernández¹

Roberto Paredes Melesio²

Paul García Meza³

¹Campo Experimental Bajío-INIFAP. Carretera Celaya-San Miguel de Allende km 6.5, Celaya, Guanajuato, México. CP. 38110. Tel. 01(800) 0882222, ext. 85269. (mandujano.andres@inifap.gob.mx; pons.joseluis@inifap.gob.mx). ²Investigador hasta el 16 junio de 2017. (paredes.roberto59@gmail.com).

³Técnico extensionista MasAgro-Guanajuato. Av. Irrigación 102-A, Col. Monte Camargo. Celaya, Guanajuato, México. CP. 38010. Tel. 01(461) 6226500, ext. 8290. (pul.gm4@gmail.com).

§Autor para correspondencia: mandujano.andres@inifap.gob.mx.

Resumen

Los agaves, especies endémicas de América con centro de origen en México son plantas de ambientes semiáridos como el de las Sierras y Llanuras del norte de Guanajuato. En esta subprovincia se ubican los dos municipios de Guanajuato con denominación de origen mezcal (DOM), que igual que el tequila es bebida destilada de agave con creciente popularidad dentro y fuera del país demandando más materia prima e industrialización de procesos incluyendo el monocultivo de especies nativas o introducidas de agave, lo cual reduce su variabilidad genética, poniendo en riesgo su diversidad en la región. El objetivo de la investigación fue identificar las especies de agave mezcalero y su diversidad genética en las sierras y llanuras del norte de Guanajuato, para generar información base para implementar proyectos de divulgación, conservación, protección y aprovechamiento racional del agave, así como para revalorar este valioso recurso, sobre todo en los municipios de San Felipe y San Luis de la Paz donde se cuenta con DOM. De 2014 a 2015, en campo se identificaron, caracterizaron taxonómicamente y colectaron muestras de especies de agave distribuidas en la región. Posteriormente en laboratorio, se analizaron empleando marcadores ISTR de ADN, se calculó la diversidad genética de Nei. La caracterización taxonómica permitió identificar nueve especies de agave y el análisis de diversidad determinó que las poblaciones de agave de las sierras y llanuras del norte de Guanajuato están poco diferenciadas. 19% de la variación detectada pertenece a diferencias entre especies, el resto 81% representa diversidad genética dentro de las especies estudiadas.

Palabras clave: agave, diversidad genética, marcadores ISTR.

Recibido: enero de 2018

Aceptado: marzo de 2018

Introducción

La diversidad genética de las especies, es la razón principal para que un determinado taxón tenga oportunidad de evolucionar bajo condiciones cambiantes del ambiente a presiones de selección (Eguiarte *et al.*, 1999). Los niveles de diversidad genética o variabilidad genética de una población están definidos por cuatro factores principales: capacidad de dispersión o migración, los mecanismos de reproducción y de cruzamiento de la especie, la deriva genética y la selección natural, de éstos, los mecanismos de reproducción y entrecruzamiento, son los que en mayor medida determinan el nivel de variabilidad genética en las poblaciones vegetales naturales (Silvertown y Charlesworth, 2001), dando como resultado la gran diversidad de especies.

Gracias a la gran variabilidad genética de especies y ecosistemas, México es un país megadiverso y centro de origen de varias especies vegetales, con más de 75% de endemismos (aproximadamente 150 especies) figura agave, que es el más grande género de la familia *Agavaceae*, originaria de Mesoamérica (García-Mendoza, 2002), donde estas plantas fueron una de las primeras en ser aprovechadas por sus pobladores (10 000-8 000 AC) como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, cobijo, etc, propiciando mediante la selección humana que México se convirtiera en centro de domesticación y diversificación del agave (Aguirre *et al.*, 2001; García, 2007).

El proceso de domesticación del agave en México dio lugar a tres grupos de especies de agave: silvestres o cimarrones, semi cultivados y cultivados (Parra y Tortolero, 2015), de acuerdo con lo anterior, en el estado de Guanajuato diferentes autores (Gentry, 1982; Parra, 2002; Parra, 2004; Hernández *et al.*, 2012; García, 2014; Gámez, 2014) han reportado la presencia de 22 especies del género agave, de las que, 25% pertenecen al grupo de agaves silvestres que se distribuyen de manera natural principalmente en la región semiárida del norte de Guanajuato incluidos San Felipe y San Luis de la Paz municipios con denominación de origen mezcal (DOM) y que al igual que en el Altiplano Potosino-Zacatecano han evolucionado como vegetación nativa y su aprovechamiento ha sido mediante la recolección, siendo el caso del *Agave Salmiana* subsp. *Crassispina*, *Agave scabra potosiensis* y *Agave lechuguilla*.

En el norte de Guanajuato, los agaves silvestres conviven con especies semicultivadas de agave que han sido traídos de otras zonas del país y han sido establecidos en obras de conservación de suelo y agua, y al igual que en el resto del estado, se han establecido como cercas vivas alrededor de las propiedades de quienes los aprovechan por su aguamiel, pulque, forraje, fibras, etc., en este grupo está *Agave salmiana* subsp. *salmiana*, el *Agave mapisaga* spp *mapisaga* y el *Agave americana* subsp. *americana*, *Agave inaequidens*, entre otros. En Guanajuato la especie cultivada de *Agave* de mayor importancia es *Agave tequilana* weber Var. Azul, la cual es una especie perteneciente al 75% de las especies introducidas, cuya distribución se da en el suroeste del estado, en los municipios con denominación de origen tequila (DOT).

El tequila y el mezcal son bebidas destiladas de agave, símbolos de la mexicanidad, que en los últimos años han ganado popularidad dentro y fuera del país demandando mayor abasto de materia prima para soportar el incremento en la producción (Eguiarte y González, 2007), que está basado en esquemas sostenibles que disminuyan impactos sociales, económicos y ambientales. Una explotación irracional del agave puede generar problemas de degradación ambiental como erosión, fragmentación del hábitat y pérdida de la diversidad genética (Bellon *et al.*, 2009).

La reducción de la variabilidad genética de los agaves y en general de las especies genera susceptibilidad a ataques de plagas y enfermedades, así como poca flexibilidad ante cambios climáticos que aumentan el riesgo de su extinción (Erazo y Cárdenas, 2013). El conocimiento y comprensión de la variabilidad genética de las especies de cualquier región es vital para: determinar su riqueza y distribución, planear estrategias de aprovechamiento y conservación, así como para disminuir los efectos negativos causados por la proliferación de patógenos, especies invasoras y la introducción de variedades mejoradas y modificadas genéticamente sobre las poblaciones de plantas y animales nativas (Piñero *et al.*, 2008).

En este sentido, los marcadores moleculares son potentes herramientas biotecnológicas para el conocimiento de la diversidad biológica (Espinel y Aragonés, 1997). Estos, se pueden definir como secuencias específicas de ácido desoxirribonucleico (ADN) con una ubicación determinada (*locus*) en un cromosoma, cuya herencia genética o efecto puede ser cuantificable u observable (Dreisigacker, 2013). Existen dos tipos de marcadores moleculares los bioquímicos (proteínas e izoenzimas) y los marcadores de ADN, estos últimos están basados en el análisis de las diferencias o similitudes en pequeñas secuencias de ADN entre individuos y poseen ventajas como que: trabajan directamente con la base genética de las variaciones, poseen alto grado de polimorfismo, son fenotípicamente neutros, no son afectados por la etapa de crecimiento de los individuos, son independientes a la época del año en que se realiza el análisis, son una técnica no destructiva por la pequeña cantidad de material que utilizan, su costo es relativamente bajo y son accesibles (Godoy, 2009).

Las técnicas empleadas por los marcadores moleculares de ADN son diversas y dan origen al nombre de los diferentes tipos que existen, algunos ejemplos de ellos son: polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR), amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites (RAMPO), secuencias inversas repetidas y marcadas (ISTR), etc. (Rallo *et al.*, 2002). Los ISTR son marcadores dominantes basados en retrotransposones, que son secuencias que se auto-repican y reinsertan en diferentes partes del genoma vía ácido ribonucleico (ARN), juegan un rol importante en la mutación, evolución y organización de los seres vivos (Torres *et al.*, 2006).

En comparación con otros marcadores los ISTR presentan ventajas como su aplicación a un amplio espectro de organismos, alta reproductibilidad, utilizan iniciadores universales, no requieren gran calidad ni cantidad de ADN, amplifican un gran número de *loci* (5-100), no es necesaria la radioactividad para su visualización y detectan un polimorfismo considerable (Demey *et al.*, 2004; Torres, 2009).

Algunos de estos marcadores moleculares han sido empleados para el estudio de la diversidad genética del agave, por ejemplo, Cuevas y Flores (2006) utilizaron la técnica AFLP para comparar diferentes especies y variedades de agave con *Agave tequilana* Weber Var. Azul encontrando que dicha especie comparte relaciones genéticas estrechas con *Agave angustifolia* Haw y grandes diferencias con especies y variedades de *A. americana* L., *A. sisalana* Perrine ex Engelm, *A. salmiana* Otto et Salm., *A. potatorum* Zucc. y *A. karwinskii* Zucc. Esta misma técnica fue utilizada por Barraza *et al.* (2006) para analizar la variabilidad genética de las poblaciones de *Agave angustifolia* Haw. de la sierra sonorensis de México encontrando altos niveles de variabilidad.

Por su parte Torres (2009) empleando la técnica ISTR caracterizó poblaciones de distribución natural y un lote de plántulas de vivero de *Agave durangensis* para determinar su variabilidad genética, encontrando la existencia de gran diversidad genética al interior de dichas poblaciones y plántulas, sugiriendo a *Agave durangensis* como un complejo de agave y no como una especie. Infante *et al.* (2006) comparó los resultados de variabilidad genética de diferentes especies de agave empleando dos técnicas diferentes: AFLP y ISTR, encontrando una correlación de 0.9018 entre las distancias generadas con AFLP e ISTR lo que demuestra que ambos tipos de marcadores poseen altos niveles de confiabilidad para ser utilizados como método para estudiar la variabilidad genética entre diferentes o una misma especie del género agave.

El objetivo de esta investigación consistió en identificar las especies de agave mezcalero y determinar su variabilidad genética en las zonas de alta y buena aptitud potencial para el desarrollo de especies mezcaleras de agave (Gámez *et al.*, 2014) en la subprovincia fisiográfica de sierras y llanuras del norte de Guanajuato.

Materiales y métodos

Las sierras y llanuras del norte de Guanajuato es una subprovincia fisiográfica de la Mesa Central Mexicana que ocupa cerca de 38% del territorio (13 001 km²) del estado de Guanajuato cubriendo 20 municipios de la región centro-norte de la entidad, extendiéndose a parte de los estados de San Luis Potosí y Querétaro. Esta subprovincia se caracteriza por su clima semiárido, paisajes dominados por sierras abruptas, barrancas, cañadas y mesetas de origen volcánico, con elevaciones entre 1 000 y 3 300 msnm, así como vegetación de matorral xerófilo compuesto principalmente por mezquites, huizaches, nopales y magueyes.

De 2014 a 2015 se realizaron recorridos en poblaciones silvestres, magueyerías establecidas con fines de reforestación y conservación del suelo, magueyerías localizadas en márgenes de caminos o borderías de parcelas de cultivo, así como en plantaciones comerciales de agave localizadas sobre la superficie clasificada con alta y buena aptitud potencial para el desarrollo de especies mezcaleras de agave (Gámez *et al.*, 2014). Cada sitio de muestreo fue georreferenciado con un geoposicionador (Garmin-20[®]).

Empleando las claves de Gentry (1982) así como referencias visuales de las colecciones digitales de agave de Julia Etter y Martin Kristen se identificaron taxonómicamente las diferentes especies de agave encontradas en cada sitio y se colectó una muestra de material vegetal que consistió en un trozo de 100 g de la parte basal de una hoja. Las muestras fueron conservadas en hielo hasta su congelación a -80 °C en un ultra-congelador REVCO[®] para posteriormente ser procesadas en el laboratorio de Marcadores Moleculares del Campo Experimental Bajío del INIFAP.

Se utilizó el protocolo CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) (Doyle y Doyle, 1987) modificado con STE (cloruro de sodio-tris-EDTA) (Falcón y Valera, 2007) y se realizaron tres modificaciones: 1) eliminar dos veces el sobrenadante; 2) mantener por 15 min el tubo eppendorf después de agregar la RNAasa y la proteinasa; y 3) diluir el ADN en TE-1X, en solución de sales a baja molaridad. La calidad de extracciones de ADN se comprobó con un espectrofotómetro Nano Drop 8000[®] usando parámetros de pureza de 1.8 a 2.1 µg ml⁻¹ a 260/280 nm de longitud de onda y una concentración mayor a 50 µg ml⁻¹, que mediante dilución fue homogenizada a 15 µg ml⁻¹.

La calidad de las diluciones se comprobó mediante la electroforesis de 4µl de ADN genómico en combinación con 3µl de Biotina® como buffer de carga y un marcador Lambda λ a concentración de 25µg ml⁻¹ en geles de Agarosa al 1.5% por 35 min a una potencia constante de 130V en el equipo Power Pac 3000® usando como buffer de corrida TBE 1X. Los geles resultantes fueron teñidos con bromuro de etidio y fotografiados con rayos UV con el transiluminador Bio Rad®.

Las secuencias y combinaciones de los marcadores ISTR empleados para determinar la variabilidad genética de los agaves mezcaleros en las sierras y llanuras del norte de Guanajuato, fueron las mismas que utilizó Torres (2009) en el complejo de *Agave duranguensis* y Montalvo *et al.* (2010) en plántulas de *Pilosocereus* sp. Estas secuencias se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Secuencia de los marcadores ISTR utilizados por Torres (2009) y Montalvo *et al.* (2010).

Iniciador (Torres, 2009)		Iniciador (Montalvo <i>et al.</i> , 2010)	
Secuencia	Nom.	Secuencia	Nom.
d5' (TTACCTCCTCCA TCT CGT AG) 3'	F9	d5' (GTC GAC ATG CCA TCT TTC) 3'	F3
d5' (TAA GCA AGC ATC TCG GAG) 3'	F10	d5' (TAT AGT ACC TAT TGG GTG) 3'	F4
d5' (ATC AGC AAG GTC TGT AAA GC) 3'	B1	d5' (ATA TAT GGA CTT AAG CAA GC) 3'	F5
d5' (GGT TCC ACT TGG TCC TTA G) 3'	B6 _I	d5' (GTA TTG TAC GTG GAT GAC ATC) 3'	F6
d5' (ATA CCT TTC AGG GGG ATG) 3'	B8	d5' (ATT CCC ATC TGC ACC ATT) 3'	B3
d5' (GCA CTC CAC CAA GAA TAC C) 3'	F1	d5' (ATA TAT GGA CTT AAG CAA GAC) 3'	B6 _{II}

F= adelante; B= atras.

Las combinaciones de los iniciadores fueron las siguientes: F9/B6_I, F10/B1, F1/B6_I, F10/ B6_I, F10/B8 (Torres, 2009) y F3/B3, F4/B3, F5/B3, F6/B3, F6/B6_I (Montalvo *et al.*, 2010). Además, se probaron combinaciones formadas usando iniciadores de ambos autores: F6/B8, F6/B6_{II}, F5/B8, F5/ B6_{II}, probando en total 14 combinaciones.

Para encontrar las temperaturas óptimas de alineación (TM, en inglés temperature melting) se probaron las 14 combinaciones de iniciadores en el ADN de las especies *Agave salmiana* y *Agave americana* utilizando temperaturas de alineación: 40, 45, 50, 55, 60 y 65 °C, en 40 ciclos.

Para la amplificación de los ISTR a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó un volumen de mezcla de 25 µl compuesta por 10.8 µl de agua destilada estéril, 2.5 µl de buffer 10X, 2 µl de DNTP'S a 2.5µM, 1.5 µl de MgCl₂, 5 µl de la combinación de oligonucleótidos a 5 µM, 0.2 µl de ADN Taq Polimerasa y 3 µl de ADN genómico a 15 ng µl⁻¹. La PCR se realizó con un termociclador (applied biosystems®). El perfil de los ciclos de temperatura de la PCR fue de cinco minutos a 94 °C, seguidos de 40 ciclos conformados por: un minuto a 94 °C, un min a las temperaturas de alineamiento de 45 a 60 °C y un min y medio a temperatura de extensión de 72 °C, y finalmente cinco minutos más a 72 °C.

La separación de los fragmentos amplificados de ADN se realizó en gel de poliacrilamida al 6%, mediante electroforesis utilizando una cámara vertical UBIBA-K0322SEV a una potencia constante de 250 V durante 1 h y 25 min empleando 12 µl del producto resultante de la PCR y 8 µl del marcador de peso molecular de 25 pb (low weight). Los geles resultantes fueron teñidos con bromuro de etidio y digitalizados mediante una foto documentador Bio Rad®.

Con los resultados de la digitalización y empleando el software CrossChecker se construyó una matriz binaria (1 presencia de la banda, 0 ausencia) que posteriormente se utilizó para realizar los análisis estadísticos mediante el programa Popgene versión 1.31, calculando para cada especie y considerando todas las poblaciones: n_a o número de alelos observados, n_e = número de alelos efectivos (Kimura and Crow, 1964), h = diversidad génica de Nei (1973), I = índice de información de Shannon (Lewontin, 1972), número de loci polimórficos, porcentaje de loci polimórficos, finalmente con la matriz de distancias se construyó un dendrograma que presenta la diversidad encontrada.

Para el análisis de diversidad genética las subespecies de *Agave* encontradas en la subprovincia de las sierras y llanuras del norte de Guanajuato, fueron incluidas en los complejos: *Agave americana*, *Agave applanata*, *Agave mapisaga*, *Agave salmiana*, *Agave tequilana* y otras especies donde se incluyó a: *Agave desmettiana*, *Agave weberi* y *Agave lechuguilla*. Tomando como base las distancias genéticas Insegadas de Nei calculadas para los complejos y empleando el método Upgma (unweighted pair group method with Arithmetic Mean) modificado del procedimiento Neighbor de Phylip versión 3.5 se generaron un dendrograma y un filograma de la diversidad genética de especies de agave en las sierras y llanuras del norte de Guanajuato

Resultados y discusión

La caracterización taxonómica de las plantas de agave localizadas en las sierras y llanuras de Guanajuato, permitió la identificación de nueve especies de las que cuatro se distribuyen de manera natural: *Agave salmiana* subsp. *salmiana*, *Agave salmiana* subsp. *crassispina*, *Agave aplanata* y *Agave lechuguilla* y cinco han sido introducidas de diferentes regiones del país: *Agave americana* subsp. *americana*, *Agave americana* spp. *protoamericana*, *Agave mapisaga* spp. *mapisaga*, *Agave tequilana* y *Agave weberi*. Los resultados de la identificación taxonómica de agave en las sierras y llanuras del norte de Guanajuato concuerdan con lo encontrado por Herrera, quien, en su reporte para la aceptación de San Felipe dentro de la zona de protección por la denominación de origen del mezcal, además de las mencionadas reporta las especies *Agave asperrima* (posiblemente se refiere a *A. scabra*), *Agave tequilana* Weber var. *azul* y *Agave angustifolia* (IMIPE, 2004).

Aunque en el presente estudio no se colectaron muestras de *Agave angustifolia*, se conoce que la venta del quiote cocido de esta especie es una fuente de ingresos para algunas localidades de la región, además, por su alto contenido de azúcar y su amplia distribución (Parra *et al.*, 2010) es una especie “comodín” en varios estados con denominación de origen mezcal, por lo que, estratégicamente para la producción de mezcal en Guanajuato, es recomendable promover el establecimiento de plantaciones con esta especie en los municipios mezcaleros San Felipe y San Luis de la Paz (Parra, 2018. Com. Per.).

Por otro lado, la utilización de las especies de *Agave* sp. encontradas en las sierras y llanuras del norte de Guanajuato, según los pobladores, concuerdan con Shneibar (2008) quien menciona que las especies *Agave americana* subsp. *americana*, *Agave salmiana* subsp. *Crassispina* y *Agave salmiana* subsp. *salmiana* han sido reportadas con uso para producción de mezcal debido posiblemente a que la región de estudio se encuentra muy cerca de la zona mezcalera del altiplano Potosino donde el uso de estas especies es frecuente (Aguirre, 2001).

En total se colectaron muestras de ADN de 54 individuos, incluido los de las especies *Agave americana* var. *marginata* y *Agave desmettiana* que fueron colectadas en Celaya, Guanajuato para emplearlas como testigo en los estudios de diversidad genética.

La estandarización de las modificaciones del protocolo CTAB modificado con STE permitió la obtención de concentraciones de ADN de agave de 100 a 1 000 $\mu\text{g ml}^{-1}$, con un grado de pureza entre 1.8 y 2.09 $\mu\text{g ml}^{-1}$ a una longitud de onda de A_{260}/A_{280} nm.

En base al número de bandas polimórficas y a su grado de polimorfismo se determinó que las mejores combinaciones de iniciadores ISTR fueron: F10/B8 y F9/B6_I que ya habían sido probadas por Torres (2009) en el complejo de *Agave durangensis*, F5/B3 y F6/B3 que de igual manera fueron probadas por Montalvo *et al.* (2010) en plántulas de *Pilosocereus* sp. y F6/B6_{II} y F5/B6_{II} que fueron probadas en el presente estudio con buenos resultados. Las mejores temperaturas de alineación para estas combinaciones se encontraron a 45, 50 y 60 °C (Cuadro 2).

Cuadro 2. Presencia, grado de polimorfismo y temperaturas de alineamiento de las combinaciones de iniciadores ISTR en agave.

Combinación	TM	Total de bandas	Bandas polimórficas	Polimorfismo (%)
F6/B6 _{II}	45	21	19	90
F10/B8	50	18	16	88
F5/B3	50	18	16	88
F9/B6 _I	45	15	13	86
F5/B6 _{II}	60	23	20	86
F6/B3	50	20	17	85
Total/promedio	-	125	101	87

Se comprobó la reproductibilidad de los marcadores ISTR en el género *Agave*, esto concuerda con lo encontrado por (Eguiarte *et al.* 1999; Torres *et al.*, 2006; Scheinbar 2008; Torres *et al.*, 2008; Torres, 2009) así como la reproductibilidad en el género agave de las secuencias ISTR utilizadas en *Pilosocereus* sp. por Montalvo *et al.* (2010). Infante *et al.* (2006) demostró en un análisis para discriminar especies de *Agavaceae* con marcadores ISTR y AFLP, que los marcadores ISTR mostraron un alto grado de polimorfismo, así como la combinación F2 y B1A con un alto poder discriminatorio. Las combinaciones mostraron patrones de amplificación para las especies de agave, así como para la especie *Agave americana* var. *marginata* usada como ADN control (Figura 1).

Los resultados del análisis de diversidad (Cuadro 3) indican que de un total de 148 loci amplificados, a partir de las seis combinaciones de marcadores ISTR, los valores de loci polimórficos varían de 42.57% para el complejo de *Agave tequilana* a 83.78% para el complejo de *Agave salmiana*. Asimismo, el índice de Shannon para estos dos complejos varía de 0.2188 para el complejo *Agave tequilana* a 0.3254 para el complejo *Agave salmiana*. Lo anterior, indica que estos dos complejos son los de mayor contraste en las sierras y llanuras del norte de Guanajuato.

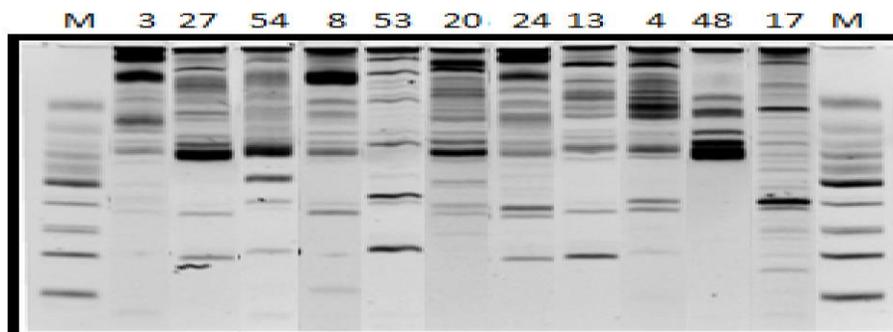


Figura 1. Patrón de amplificación de ADN con la combinación de marcadores ISTR F5/B3 para las especies: *Agave americana* spp. *Americana* (3), *Agave americana* spp. *protoamericana* (27), *Agave americana* var. *marginata* (54), *Agave aplanata* (8), *Agave desmettiana* (53), *Agave lechugilla* (20), *Agave mapisaga* spp. *mapisaga* (24), *Agave salmiana* spp. *crassispina* (13), *Agave salmiana* ssp. *salmiana* (4), *Agave tequilana* (48), y *Agave weberi* (17). La M indica el marcador Low Weight de 25 pares de bases.

De igual manera, los análisis estadísticos de la variación genética por complejo (Cuadro 3), indican que el complejo *Agave tequilana* con un coeficiente de diferenciación génica (G_{st}) de Nei (1973) de 0.1449 es el complejo con menos variación genética del total de la variabilidad entre todos los complejos, lo cual sería esperado debido a que varias de las muestras se colectaron de plantaciones destinadas a la producción industrial de tequila. Por el contrario, el complejo *Agave Salmiana* con 0.201 es el complejo con mayor diversidad genética debido a que las subespecies incluidas en este género son las de mayor distribución en la subprovincia de las sierras y llanuras del norte de Guanajuato e incluso las que presentan mayor distancia entre sus poblaciones.

Cuadro 3. Estadísticos de la variación génica por complejo, obtenidos con 148 loci mediante el programa POPGENE.

Población <i>Agave</i>	N	na	ne	G_{st}	I	# Loci polimórficos	% Loci polimórficos
<i>americana</i>	13	1.7432	1.2888	0.191	0.3068	110	74.32
<i>aplanata</i>	3	1.4324	1.2596	0.1563	0.3251	64	43.24
<i>mapisaga</i>	5	1.473	1.2525	0.1533	0.2348	70	47.3
<i>Salmiana</i>	20	1.8378	1.3007	0.201	0.3254	124	83.78
<i>Tequilana</i>	5	1.425	1.2458	0.1449	0.2188	63	42.57
Otras	8	1.7703	1.3067	0.2003	0.321	114	77.03
Todas	54	1.9662	1.3125	0.2119	0.3474	143	96.62

na= número de alelos observados; ne= número de alelos efectivos (Kimura and Crow, 1964); h= diversidad génica de Nei (1973); I= índice de información de Shannon (Lewontin, 1972).

En este sentido, se destaca que el proceso de domesticación de las especies, en este caso del *Agave*, actúa como cuello de botella en la pérdida de genes (polimorfismos) que son necesarios para sobrevivir en condiciones adversas. Es esta razón por la que el *Agave tequilana* es totalmente dependiente de la mano del hombre y no tendría nada que hacer en el norte de Guanajuato (a pesar del sueño de algunos agroindustriales), mientras que toma

relevancia la conservación y propagación intensiva de especies silvestres de *Agave* como: *Agave salmiana* subsp. *crassispina*, *Agave scabra potosiensis* y especies semicultivadas como *Agave salmiana* subsp. *salmiana*, *Agave mapisaga* y *Agave americana* var. *americana* (Parra, 2016. Com. Per.).

Como respuesta a la creciente presión por el recurso agave como materia prima para la elaboración de mezcal en la zona con DOM y la presión ya existente de “quioteros”, “barbacolleros”, “chinculeros” y el ganado que reducen las existencias de agave en la región.

Por otro lado, los resultados encontrados utilizando los marcadores ISTR en agave anterior concuerdan con lo encontrado por Torres *et al.* (2012) quienes utilizando este tipo de marcadores moleculares en *Agave duranguensis* reportaron grandes niveles de polimorfismo (24.18 a 61.5%) con 91 loci amplificados, con índice de Shannon de 0.1208 a 0.3435 y diversidad genética (h) de 0.0807 a 0.2337. Además, los valores reportados por estos autores en su estudio son similares a los que se encontraron para el complejo otras especies donde se incluyeron: *Agave desmettiana*, *Agave weberi* y *Agave lechuguilla*.

Al considerar el total de complejos en el análisis de diversidad genética (Cuadro 4) se genera un coeficiente de diferenciación génica G_{st} de 0.1859 que indica que los complejos de agave de las sierras y llanuras del norte de Guanajuato están poco diferenciados, y que aproximadamente 19% de la variación detectada se debe a diferencias entre especies, el resto 81% representa diversidad genética dentro de las especies estudiadas. Además, el valor de flujo génico (Nm) encontrado entre complejos de 2.1892 indica que los complejos de agave de las sierras y llanuras del norte de Guanajuato presentan una tendencia a la homogeneización ya que según Wright (1931) “un flujo génico mayor de 1 conduce a la homogenización de las poblaciones”. Lo anterior, puede estar influenciado entre otras cosas por cuestiones antropogénicas derivadas de los tipos de aprovechamientos realizados por la población de las sierras y llanuras del norte de Guanajuato.

Cuadro 4. Análisis de diversidad génica de Nei en poblaciones subdivididas, obtenidos con 148 loci en las especies de agave mediante el programa POPGENE.

Estadístico	N	Ht	Hs	G_{st}	Nm	# Loci polimórficos	% Loci polimórficos
Media	54	0.2143	0.1745	0.1859	2.1892	143	96.62
Desviación estándar		0.0213	0.014				

Nm= flujo génico estimado a partir de: G_{st} or G_{cs} . Eg; $Nm = 0.5(1 - G_{st})/G_{st}$; (McDermott y McDonald, 1993).

En los valores originales de Identidad y distancia genética incesgada de Nei generados mediante el programa POPGENE (Cuadro 5) se observa que las distancias entre las especies estudiadas son muy bajas, posiblemente se trate de alguna variación dentro de la especie de *Agave salmiana*, o bien, algunas poblaciones clasificadas como *A. salmiana* sean en realidad otra especie como *Agave americana*.

Cuadro 5. Medidas originales de identidad genética y distancia genética insesgada de Nei, mediante el programa POPGENE.

Poblaciones <i>Agave</i>	1 americana	2 applanata	3 mapisaga	4 salmiana	5 tequilana	6 otras
1 americana	****	0.9623	0.926	0.9859	0.9385	0.9792
2 applanata	0.0384	****	0.8999	0.9624	0.9172	0.9543
3 mapisaga	0.0769	0.1054	****	0.9304	0.8841	0.9215
4 salmiana	0.0142	0.0383	0.0721	****	0.9445	0.9872
5 tequilana	0.0635	0.0865	0.1232	0.0571	****	0.9483
6 otras	0.021	0.0468	0.0818	0.0129	0.0531	****

Identidad genética de Nei son los valores arriba de la diagonal y los de abajo son la distancia genética de Nei.

Tomando como base la construida con la distancia genética Insegada de Nei calculada para los complejos y empleando el método UPGMA modificado del procedimiento Neighbor de Phylip Versión 3.5 se generaron un dendrograma y un filograma de la diversidad genética de especies de agave en las sierras y llanuras del norte de Guanajuato , donde en ambos se puede observar que el complejo *Agave salmiana* es genéticamente parecido con los complejos *Agave americana*, otros agaves y con el complejo *Agave applanata*, mientras que con los complejos *Agave tequilana* y *Agave mapisaga* presenta diferencias genéticas más grandes, incluso con el complejo *Agave mapisaga* las diferencias genéticas son muy marcadas (Figura 2).

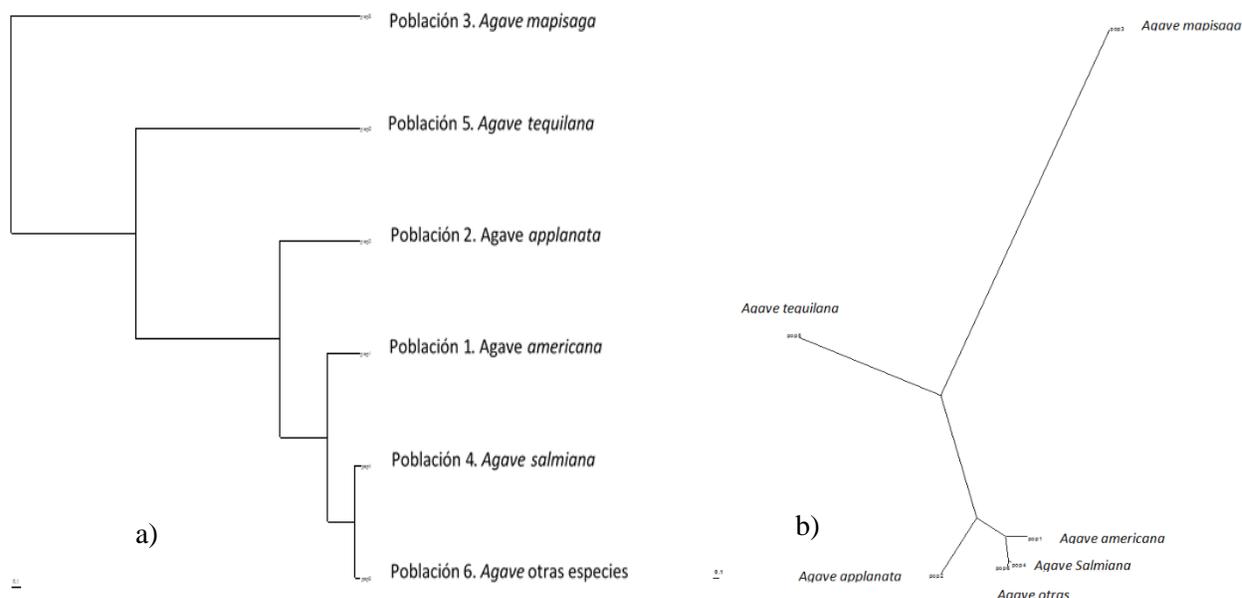


Figura 2. a) dendrograma; y b) filograma de la diversidad genética de especies de agave en las sierras y llanuras del norte de Guanajuato basado en la distancia genética insesgada de Nei (1972), con el método UPGMA modificado del procedimiento Neighbor de Phylip versión 3.5.

Conclusiones

Según la identificación taxonómica empleando las claves de Gentry 1982, en las sierras y llanuras de Guanajuato se identificaron nueve especies de agave de las cuales *Agave salmiana* spp. *salmiana*, *Agave americana* spp. *americana* y *Agave salmiana* spp. *crassispina* son las de mayor distribución en esta subprovincia fisiográfica.

Seis de las 14 combinaciones de marcadores ISTR empleadas en el presente estudio mostraron adecuados patrones de amplificación para estudiar la diversidad genética de las especies de agave encontradas en las sierras y llanuras del norte de Guanajuato.

Las poblaciones de agave de las sierras y llanuras del norte de Guanajuato están poco diferenciadas. Aproximadamente 19% de la variación detectada se debe a diferencias entre especies, el resto 81% representa diversidad genética dentro de las especies estudiadas.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Consejo de Ciencia y Tecnología del estado de Guanajuato (CONCYTEG) por el financiamiento para la ejecución del proyecto: identificación y diversidad genética de especies de agave mezcalero en las sierras y llanuras del norte de Guanajuato, que dio origen a la presente información.

Literatura citada

- Aguirre, R. J. R.; Charcas, S. H. y Flores, F. J. L. 2001. El maguey mezcalero potosino. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología. San Luis Potosí, SLP, México. 87 p.
- Barraza, M. A.; Sánchez, T. F. L.; Robert, M.; Esqueda, M. y Gardea, A. 2006. Variabilidad genética en *Agave angustifolia* Haw de la Sierra Sonorense, México, determinada con marcadores AFLP. *Rev. Fitotec. Mex.* 29(1):1-8.
- Bellón, M. R.; Barrientos, P. A. F.; Colunga, G. P.; Perales, H.; Reyes, A. J. A.; Rosales, S. R. y Zizumbo V. D. 2009. Diversidad y conservación de recursos genéticos en plantas cultivadas. *Capital natural de México*, vol. II: estado de conservación y tendencias de cambio. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 355-382 pp.
- Cuevas, F. X. M. y Flores, B. E. P. 2006. Distancias genéticas entre *Agave tequilana* Weber var. Azul y especies y variedades afines. *Scientia-CUCBA*. Guadalajara, Jal. 231-249 pp.
- Demey, J. R.; Gámez, E.; Molina, S. and Infante, D. 2004. Comparative study of the discriminating capacity of AFLP and ISTR markers for genetic analysis of *Agave fourcroydes*. *Plant Mol. Biol. Reporter.* 22(1):29-35.
- IMIPE (Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial). 2004. Modificación a la declaración general de protección de la denominación de origen Mezcal. *Diario Oficial de la Federación (DOF)*.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochemical Bulletin.* 19(1):11-15.

- Dreisigacker, S. 2013. Sistemas de marcadores genéticos en el mejoramiento de trigo. *In*: Reynolds, M.; Pask, A.; Mullan, D. y Chávez, P. (Eds). Fitomejoramiento fisiológico I: enfoques interdisciplinarios para mejorar la adaptación del cultivo. Centro Internacional de Maíz y Trigo (CIMMYT). El Batán, Estado de México. 140-152 pp.
- Erazo, P. M. y Cárdenas, R. R. 2013. Ecología impacto de la problemática ambiental actual sobre la salud y el ambiente. Ecoe ediciones. Colombia. 63-85 pp.
- Eguiarte, L. E. 1999. Una guía para principiantes a la genética de poblaciones. *In*: la evolución biológica. Núñez-Farfán J. y Eguiarte, L. E. (Eds.). Facultad de Ciencias, Instituto de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 35-50 pp.
- Eguiarte, F. L. E. y González, G. A. 2007. De genes y magueyes estudio y conservación de los recursos genéticos del tequila y el mezcal. Ciencias. México, DF. 28-35 pp.
- Espinel, S. y Aragonés, A. 1997. Mejora genética de *Pinus radiata* D. Don. En el país Vasco. Situación actual. Cuadernos de la Sección Forestal. Madrid, España. 5:109-110 pp.
- Falcón, L. I. y Valera, A. 2007. Extracción de ácidos nucleicos. *In*: Eguiarte, L.; Souza, V. y Aguirre, X. (Comps.). Ecología molecular. Instituto Nacional de Ecología (INE)- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). México, DF. 499-516 pp.
- García, M. A. J. 2007. Los agaves de México. 2007. Ciencias. México, DF. 14-23 pp.
- García-Mendoza, A. 2002. Distribution of the genus *Agave* (Agavaceae) and its endemic species in México. *In*: Cactus and Succulent J. 74(4):177-187.
- García, M. P. 2014. Diversidad genética de los agaves mezcaleros del municipio de San Felipe, Guanajuato. Tesis ingeniería. División de Agronomía, departamento de botánica. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). Saltillo, Coahuila. 78 p.
- Gámez, V. A. J. 2013. Informe técnico primera etapa del proyecto inventario, potencial productivo y calidad industrial de las especies de agave mezcalero en Guanajuato. INIFAP, Celaya, Guanajuato, México. 45 p.
- Gámez, V. A. J. 2014. Informe técnico final del proyecto inventario, potencial productivo y calidad industrial de las especies de *Agave* mezcalero en Guanajuato. INIFAP, Celaya, Guanajuato, México. 31 p.
- Gentry, H. S. A. 1982. *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press. Tucson. 670 p.
- Godoy, J. A. 2009. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas*. 18(1):23-33.
- Hernández, S. L.; Pantoja, H. Y. y Martínez, M. 2012. Estudio de caso: plantas útiles y distribución potencial de las forrajeras, medicinales y de uso múltiple. *In*: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). La biodiversidad en Guanajuato, estudio de estado Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO)-Instituto de Ecología del estado de Guanajuato (IEE). México. 274-289 pp.
- Infante, D.; Molina, S.; Demey, J. R. and Gámez, E. 2006. Asexual genetic variability in *Agavaceae* determined with Inverse sequence tagged-repeats and amplifications fragment length polymorphis analysis. *Plant Mol. Biol. Reporter*. Ottawa, Canada. 205-217 pp.
- Kimura, M. and Crow, J. F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*. 49(4):725-738.
- Lewontin, R. 1972. The apportionment of human diversity. *Evol. Biol*. 6(1):381-398.

- Mandujano, B. A. 2012. Viabilidad del agave como alternativa para controlar la desertificación de la microcuenca Laguna de Guadalupe, Gto. Tesis Maestría en Ciencias en Gestión Integrada de Cuenca. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro, Querétaro. 1-32 pp.
- Montalvo, F. G.; Ortíz, G. M.; Quiala, M. E.; Keb-Llanes, M.; Rojas, L. E.; Bautista, A. M.; Esquivel, M. A.; Quiroz, M. A.; Rohde, W. y Sánchez, T. L. F. 2010. Primer reporte del empleo de marcadores ISTR en cactaceae (*Pilosocereus* sp.). Rev. Col. Biot. 12(2):223-229.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. 70(12):3321-3323.
- Parra N. L y Tortolero L A. 2015. Manual del maguey pulquero en Guanajuato. Informe de Investigación de la escuela de desarrollo integral agropecuario de la Universidad Politécnica del estado de Carchi. Tulcán. Ecuador. 25 pp.
- Parra, N. L. 2004. Informe final “el centro de propagación de agave del estado de Guanajuato (CEPAEG)”. <http://www.intranetfgp.com/siac/2001/111-00/informe%20final/informe%20anual%20cepaeg.doc>.
- Parra, N. L. 2002. Informe anual de avence “el centro de propagación de agave del estado de Guanajuato (CEPAEG)”. <http://www.intranetfgp.com/SIAC/2002/111-00/informe%20final/documentos%20informe%20final/informe%20final.pdf>.
- Piñero, D. 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. In: Soberón, J.; Halffter, G. y Llorente, J. (Eds). Capital natural de México, vol. I: conocimiento actual de la biodiversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). México, DF. 437-494 pp.
- Rallo, P.; Belaj, A.; De la Rosa, R. y Trujillo, I. 2002. Marcadores moleculares. Córdoba, España. <http://www.extremadura21.com/cau-dal/hemeroteca/mayo-junio-2000/almazara/almazara1.htm>.
- Shneibar, G. E. 2008. Genética de poblaciones silvestres y cultivadas de dos especies mezcaleras: *Agave cupreata* y *Agave potatorum*. Tesis de Maestría de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México, D. F. 191 p.
- Silvertown, J. W. and Charlesworth, D. 2001. Introduction to plant population biology. Blackwell Science. 125 pp.
- Torres, M. M. I.; Almaraz, A. N. and Escoto D. M. 2012. Review article: ISTR, a retrotransposons-based marker to assess plant genome variability with special emphasis in the genera *zea* and *agave*. Am. J. Plant Sci. 3(12A):1820-1826.
- Torres, M. M. I. 2009. Caracterización molecular del complejo *Agave durangensis* por medio de marcadores ISTR. Tesis doctoral. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, Instituto Politécnico Nacional (IPN). México, D. F. 109 p.
- Torres, M. M. I.; Almaraz, A. N.; Velazco, R. A. P.; Hernández, V. V.; Orea, L. G.; Cifuentes, D. A. and Oliver, S. C. 2008. Taxonomic significance of ISTR to discriminate species in *Agavaceae*. Am. J. Agric. Biol. Sci. 3(4):661-665.
- Torres, M. M.; Morales, R. M.; Cruz, L. L. y Villalobos, A. A. 2006. Identificación de polimorfismo entre hijuelos y plantas micropagadas de *Agave tequilana* y *Agave cocui* usando ISTR. Scientia Centro Universitario de Ciencias Biológicas Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. México. 8(2):203-206.
- Wright, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. Genetics. 16(2):97-159.