



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

**GENÉTICA DE POBLACIONES
SILVESTRES Y CULTIVADAS
DE DOS ESPECIES MEZCALERAS:
Agave cupreata y *Agave potatorum***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)

P R E S E N T A:

BIOL. ENRIQUE SCHEINVAR GOTTDIENER

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS**

MÉXICO D.F

MAYO, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM.

Al programa de Becas para Estudios del Posgrado del CONACYT

Al Proyecto Conabio CS016 “Genética de poblaciones en viveros de *Agave cupreata* e impacto de los planes de manejo en la diversidad y estructuración de esta especie” con el cual se financió gran parte de este trabajo.

Al Proyecto Semarnat-Conacyt CO1-0246/A-1 “Ecología, genética y biología de la conservación de las poblaciones del género *Agave* de la reserva de la Biósfera de la Barranca de Mezitlán” con la que se realizó otra parte de este trabajo.

Proyecto Semarnat-Conacyt CO1-46475 “Diversificación de Angiospermas de México, relojes moleculares, tasas de especiación, biomecánica y espacios ecológicos”

A los miembros del Comité Tutorial: Dr. Luis E. Eguiarte, Dr. Alejandro Casas, Dr. Francisco Molina.

A los demás miembros del Jurado: Dr. Daniel Piñero y Dra. Martha Rocha.

A los técnicos del laboratorio de Evolución Molecular y Experimental sin los cuales este trabajo no hubiera sido posible: Laura Espinoza Azuar y Erika Aguirre Planter por su incomparable apoyo en el montaje, diseño y realización de las técnicas moleculares y por compartir y enseñar sus conocimientos desinteresadamente en todo momento, Rodrigo González Chauvet por su empeño y dedicación en las colectas de campo, Manuel Rosas por su esmerado apoyo en el trabajo de laboratorio y Aldo Valera por las primeras enseñanzas y arranque inicial de este trabajo. A la Dra. Alejandra Vázquez Lobo del laboratorio de Genética y Evolución del Instituto de Ecología por todo su apoyo en la implementación de las metodologías de extracción de ADN.

A los Maestros Mezcaleros: Agustín Correa Granados del palenque “Puerto del Bálsamo”, Gro; Salatiel Molina del palenque “La Mata de Otate”, Gro; Lorenzo Ángeles Mendoza, del palenque “Real Minero”, Oax.; y a la SSS Sansekan Tinemi, GEA

A Jorge Larson y Xitlaly Aguirre de la Conabio, por todas las facilidades brindadas durante el desarrollo de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la que debo toda mi formación (también la académica).

A Niza porque estuviste empujando, soportando y apoyándome en todo momento. Sin la chume, *no mas no*.

A mis papás Elma y Paulo, por estar siempre conmigo. A mis compañeros y hermanos (a los que cada día admiro más) Ernesto y Esther por todas sus enseñanzas (y porque ya dejaron de crecer). A mi abuela, la Dra. vovó Leia, a quien admiro profundamente (no solo por la biología) y que me muestra *a naturaleza* desde antes de que aprendiera a hablar.

Mis mas sinceros agradecimientos a mis maestros y jefes Luis y Valeria, por todo su apoyo, enseñanza, comprensión, motivación, tiempo, confianza y dirección. Porque no les basta dirigir un trabajo de tesis sino que se empeñan en la formación integral de sus estudiantes, involucrándonos en todas las labores de un investigador (incluyendo su maravillosa colección de mezcales) Mil Gracias!! (nos vemos en el doctorado).

A mis súper tutores Dr. Alejandro Casas y Dr. Francisco Molina por su inmensa disposición, comentarios, revisiones y valiosas aportaciones. Al Dr. Daniel Piñero por sus atinados y valiosos comentarios.

A Todo el Laboratorio de Evolución molecular, a quien realmente debo el haber podido hacer este trabajo, de quienes aprendí más de lo que un posgrado pueda enseñar y con quienes compartí todos los momentos de esta tesis (desde los mas sublimes hasta los mas perversos): Nuria (que conocí con trencitas y uniforme) por todas las increíbles discusiones, las chelas y risas; Lau por tus sabios regaños, apapachos, pláticas e invaluable ayuda en el laboratorio; Erika por la motivación, disposición a escucharnos, comentarios y ayuda en los diseños experimentales (y en las traducciones); René “*little hills*” (alias el cerros), por tus interminables pero valiosos choros, vales mil!!; Jaime Búfalo Bill, por todo lo que me enseñaste (sin albur) y por tus días de 36 horas que siempre te permiten ayudarnos a todos; Rodrigo (el sensei automotriz) por las largas pláticas en las salidas al campo y en el laboratorio y por el Cinito del Tio; Ana Escalante porque siempre estuviste dispuesta a echarme la mano, por todas las pláticas y porque me enseñaste a no prejuizar; Germán porque en toda discusión siempre me mostrabas la otra cara de la moneda; Andrea y sus bacterias carnívoras por todas las pláticas e intercambio de música; Sandra porque siempre estuviste con disposición de platicar, enseñar y ayudarme; Laura Trejo por todas las discusiones; Celeste por su perseverancia y por aguantarme; Esmeralda por mostrarme el “increíble” mundo de los emoticonos; Richard por todas las largas discusiones y puntos de vista; Manuel (la nenita uno) por toda la chamba con que me ayudaste; Roberto (la nenita dos) por los chistes y discusiones planta animal (para no decir polinizaciones); Morena y Eria por enseñarme lo que sí es trabajar en equipo; Karla, Alejandra, Alexander, Julia, Marco, Yislem, Miguel El Changoleón y por supuesto al enanito fantasma que siempre le puso un toque de emociones fuertes al laboratorio.

Al Tio Come y a la Logia de los Mezcólatras por enseñarme el mundo y los principios del mezcal tradicional.

A toda(s) lavanda(s) a quienes siempre voy a agradecer porque han estado desde que tengo memoria: Bicho, Lev, Chabela, Fabián Huevotas, Alejandra, Natalia, Gabits, Wilis, Alf, Los Físicos Huevones Iván, Rubén y Fabián, Xitlali, Amparo, Aída, Sandra, Carlita, Alejandra, Yuri, Nacho, Mónica, Irina, Nely, Ramadán y Mónica, Troll, Matas, Polina, Geovas y Niza.

A las memorias de la cafetera del Laboratorio de Evolución Molecular (*no has muerto camarada!*) y del HHH Café de las Tentaciones (*Requiescat In Pace*). Al Dios del PCR (ante todo).

A mi abuelo
(Gracias Zeide)

RESUMEN

El género *Agave* es un grupo muy diverso de origen reciente que se distribuye en Norte, Centro y Sudamérica, con mayor presencia en México, convirtiéndolo en centro de origen y diversificación del grupo. *Agave cupreata* y *A. potatorum* son dos especies de reproducción exclusivamente sexual ampliamente utilizadas en la elaboración de mezcal en los estados de Guerrero y Oaxaca. La elaboración de esta bebida requiere de la cosecha de la planta antes de finalizar el desarrollo de su escape floral, impidiendo la reproducción de estas plantas y representando un riesgo potencial a su conservación. En este trabajo analizamos la diversidad y estructuración genética de poblaciones silvestres y de vivero de *A. cupreata* y de *A. potatorum* mediante marcadores moleculares ISSR. Determinamos las distancias que separan a sus poblaciones y buscamos esclarecer sus relaciones de similitud. Utilizando cuatro iniciadores logramos la amplificación de 90 loci polimórficos. En el caso de ambas especies encontramos poblaciones genéticamente diversas con poca diferenciación entre sus poblaciones ($He=0.34$ y 0.31 , $P = 93\%$, $F_{ST} = 0.07$ y 0.10 para *A. cupreata* y *A. potatorum* respectivamente) posiblemente debido a sus sistemas de reproducción y a su reciente origen. El 81.26% de la variación se encuentra al interior de las poblaciones, mientras que apenas el 5% de la variación explica la diferencia entre especies. Los valores de diferenciación total ($F_{ST}=0.1224$) y las distancias genéticas de Nei (0.02 entre las especies y con promedio de 0.06 y 0.03 para las poblaciones) son relativamente bajas. Pensamos que estos valores confirman la idea de que constituyen un grupo de origen muy reciente en proceso actual de divergencia. Encontramos que las regiones de Guerrero y Oaxaca con mayor tradición en la producción de mezcal presentan una ligera disminución de su diversidad genética (particularmente en polimorfismo). En las poblaciones de *A. cupreata* región de Chilapa Guerrero se detectaron señales de flujo genético con *A. potatorum*, posiblemente debido al manejo actual que pudiera estar repercutiendo en la diversidad genética de las poblaciones de *A. cupreata*. En términos genéticos, la conservación de estas especies presenta un panorama relativamente positivo, sin embargo, la disminución del tamaño de las poblaciones, la quema de cuevas por temor a los “murciélagos-vampiro” y la desaparición de otros polinizadores ya está poniendo en riesgo la gran diversidad genética de las poblaciones de *A. cupreata* y *A. potatorum*.

ABSTRACT

The genus *Agave* is a very diverse group of recent origin that is distributed in North, Center and South América, with greater presence in Mexico, making this country the center of origin and diversification of the group. *Agave cupreata* and *A. potatorum* are two species with exclusively sexual reproduction, broadly used in mezcal elaboration in the states of Guerrero and Oaxaca. The elaboration of this alcoholic beverage requires the harvesting of the plant before inflorescence development is completed, preventing this way plant reproduction and representing a potential risk for its conservation. In this study we analyzed the genetic diversity and structure of wild and breeding ground populations of *A. cupreata* and *A. potatorum* with the use of ISSR molecular markers. We estimated the distances that separate their populations and searched to clarify their relationship. Ninety polymorphic loci were amplified using four primers. In both species we found genetic diverse populations, with low diversity among their populations, ($H_e=0.34$ and 0.31 , $P = 93\%$, $F_{ST} = 0.07$ and 0.10 for *A. cupreata* and *A. potatorum* respectively) possibly due to their reproductive system and their recent origin. 81.26% of variation is found within populations, while barely 5% of variation is explained by variation between species. Values of total population differentiation ($F_{ST}=0.1224$) and Nei genetic distances (0.02 between species and an average of 0.06 and 0.03 for populations in both species) are relatively small. We suggest that these species have had a recent origin and are in an active process of diversification. We found that the regions from Guerrero and Oaxaca with more tradition in mezcal production show a slight decrease in genetic diversity (particularly in polymorphism). In populations of *A. cupreata* from the region of Chilapa Guerrero, signals of gene flow with *A. potatorum* were detected, possibly due to the effects of current management in genetic diversity of *A. cupreata* populations. In genetic terms, conservation of these species presents a slightly positive picture, nevertheless, the decrease in population sizes, the burning of caves, caused by fear of the “vampire-bats” and the extinction of other pollinators are increasing the loss of the current genetic diversity of *A. cupreata* and *A. potatorum* populations.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN 1

ANTECEDENTES 3

LA FAMILIA AGAVACEAE Y LOS AGAVES 3

GRUPOS HIEMIFLORAE Y CRENATAE (SENSU GENTRY) 8

AGAVE CUPREATA 10

AGAVE POTATORUM 11

EL MEZCAL 15

EL PROCESO DEL MEZCAL 15

EL MEZCAL DE TEQUILA Y LA PÉRDIDA DE DIVERSIDAD 18

MEZCAL TRADICIONAL, DENOMINACIÓN Y NORMA 20

LA GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN 23

LOS MARCADORES MOLECULARES 25

LOS ISSR 27

OBJETIVOS 29

METODOLOGÍA 30

SELECCIÓN DE MUESTRAS 30

EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES 32

ANÁLISIS DE LOS DATOS 34

RESULTADOS 37

LOCI POLIMÓRFICOS 37

FRECUENCIAS ALÉLICAS 37

DIVERSIDAD GENÉTICA 40

DIVERSIDAD ENTRE ESPECIES 42

DIVERSIDAD ENTRE POBLACIONES DE *A. CUPREATA* 43

DIVERSIDAD ENTRE POBLACIONES DE *A. POTATORUM* 44

ESTRUCTURACIÓN / DIFERENCIACIÓN 45

AISLAMIENTO POR DISTANCIA 49

AISLAMIENTO POR DISTANCIA EN *A. CUPREATA* 49

AISLAMIENTO POR DISTANCIA EN *A. POTATORUM* 51

AISLAMIENTO POR DISTANCIA ENTRE GRUPOS 53

AGRUPAMIENTO BAYESIANO DE POBLACIONES 55

AGRUPAMIENTO BAYESIANO ENTRE ESPECIES 56

AGRUPAMIENTO BAYESIANO EN *A. CUPREATA* 58

AGRUPAMIENTO BAYESIANO EN *A. POTATORUM* 59

DISCUSIÓN 62

LOS ISSR Y SU POLIMORFISMO 62

DIVERSIDAD GENÉTICA 64

DIVERSIDAD EN *A. POTATORUM* 67

DIVERSIDAD EN *A. CUPREATA* 68

ESTRUCTURACIÓN / DIFERENCIACIÓN GENÉTICA 69

A. CUPREATA 71

A. POTATORUM 73

CARACTERES DE HISTORIA DE VIDA 75

CONCLUSIONES 76

APÉNDICES

APENDICE I. BIOLOGÍA REPRODUCTIVA EN AGAVE 78

APÉDICE II. LOS ORÍGENES DEL MEZCAL 80

APÉNDICE III. PROTOCOLOS DE LABORATORIO 83

MÉTODO “MINI-PREP” DE EXTRACCIÓN DE ADN (VAZQUEZ LOBO, 1996) 83

MÉTODO “MINI-PREP” DE EXTRACCIÓN DE ADN (VÁZQUEZ-LOBO, 1996, MODIFICADO POR VALERA, 2007) 83

ELIMINACIÓN DE RNA (VAZQUEZ LOBO, 1996) 84

BUFFER DE EXTRACCIÓN CTAB2X 85

BUFFER DE EXTRACCCION CTAB 85

BUFFER DE EXTRACCION STE 86

LIMPIEZA DE PROTEINAS EN DNA CON FENOL-CLOROFORMO 86

BUFFER DE ELECTROFORÉSIS TAE 86

APÉNDICE IV. FÓRMULAS UTILIZADAS 87

**APÉNDICE V. FRECUENCIAS GENOTÍPICAS, ALÉLICAS Y
HETEROCIGOSIS POR LOCI 89**

APÉNDICE VI. VALORES DE SIGNIFICANCIA R&R 99

APENDICE VII. VALORES DE F_{ST} POR LOCI 101

BIBLIOGRAFÍA 103

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Número total de especies de Agavaceae (sensu Dahlgren *et al.*,1983) y su endemismo en México 4
- Tabla 2.** Resumen de los estudios de genética de poblaciones para el género *Agave* 7
- Tabla 3.** Especies con reportes de uso para mezcal 22
- Tabla 4.** Heterocigosis (*He*) y porcentaje de loci polimórficos (%*P*) de especies en riesgo o algún estatus de conservación 24
- Tabla 5.** Resumen de algunos marcadores moleculares utilizados en genética de poblaciones 26
- Tabla 6.** Poblaciones utilizadas en el estudio 32
- Tabla 7.** Iniciadores de ISSR utilizados 33
- Tabla 8.** Condiciones de reacción y programa de amplificación de PCR para los 4 iniciadores utilizados 33
- Tabla 9.** Prueba exacta de diferenciación de los 90 loci para los principales grupos a analizar 37
- Tabla 10.** Prueba exacta de diferenciación entre pares de poblaciones 40
- Tabla 11.** Heterocigosis esperada y porcentaje de loci polimórficos con el criterio del 95% 41
- Tabla 12.** Valores de Theta y Nm para los principales grupos estudiados 45
- Tabla 13.** Comparación pareada de las poblaciones de *A. cupreata* y *A. potatorum* estudiadas 47
- Tabla 14.** Valores promedio de estructuración y número de migrantes obtenidos a partir de las comparaciones pareadas 48
- Tabla 15.** Distancias entre poblaciones 50
- Tabla 16.** Correlaciones entre Distancias genéticas o Número de migrantes y distancias geográficas de los principales grupos de *A. cupreata* 51
- Tabla 17.** Distancias genéticas de Nei (diagonal superior) y distancias geográficas en km (diagonal inferior) entre las poblaciones de *A. potatorum* 52
- Tabla 18.** Valores de verosimilitud, varianza, alfa y estructuración de la corrida de mayor valor de verosimilitud de las 30 realizadas en cada población posible K de 1 a 15 para todas las poblaciones 56
- Tabla 19.** Proporción de alelos pertenecientes a cada uno de los dos grupos más probables 57
- Tabla 20.** Valores de verosimilitud, varianza, alfa y estructuración de la corrida de mayor valor de verosimilitud de las 30 realizadas en cada población posible K de 1 a 15 para todas las poblaciones de *A. cupreata* 58

- Tabla 21.** Proporción de alelos pertenecientes a cada uno de los dos grupos más probables de *A. cupreata* 59
- Tabla 22.** Valores de verosimilitud, varianza, alfa y estructuración de la corrida de mayor valor de verosimilitud de las 30 realizadas en cada población posible K de 1 a 15 para todas las poblaciones de *A. potatorum* 60
- Tabla 23.** Porcentaje de pertenencia de cada población de *A. potatorum* a cada uno de los dos agrupamientos más probables 61
- Tabla 24.** Número de loci polimórficos por iniciador 62
- Tabla 25.** Equivalencias entre los loci obtenidos por Aguirre Dugua (2004) y este estudio para los iniciadores 846 y 857 63
- Tabla 26.** Valores de estructuración pareada (F_{ST}) de cada población de *A. cupreata* en orden ascendente 72
- Tabla 27.** Valores de estructuración pareada (F_{ST}) por población en orden ascendente 74

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa de Distribución del género *Agave* 4
- Figura 2.** *Agave cupreata* y *A. potatorum* en el Jardín Botánico de la UNAM. 9
- Figura 3.** Imágenes de *Agave cupreata* 12
- Figura 4.** Imágenes de *Agave potatorum* 13
- Figura 5.** Denominaciones de origen para el género *Agave*: Mezcal, Tequila y Bacanora 19
- Figura 6.** Esquema de amplificación de ISSR 28
- Figura 7.** Ubicación de las Poblaciones analizadas y de otras reportadas 31
- Figura 8.** Fotografía de ADN total en gel de agarosa con bromuro de etidio 33
- Figura 9.** Loci amplificados con los iniciadores 811 y 846 en individuos de *A. cupreata* y *A. potatorum* 38
- Figura 10.** Loci amplificados con los iniciadores 857 y 841 en individuos de *A. cupreata* y *A.* 39
- Figura 11.** Ubicación geográfica de las poblaciones 42
- Figura 12.** Heterocigosis esperada y porcentaje de loci polimórficos promedio para las dos especies estudiadas (a y b) y para los tres grupos principales (c y d) 43
- Figura 13.** Heterocigosis esperada promedio en las poblaciones de *A. cupreata*. 44
- Figura 14.** Heterocigosis esperada promedio en las poblaciones de *A. potatorum* 45

- Figura 15.** Análisis de varianza de los valores de estructuración de los loci de *A. cupreata* y las poblaciones de *A. potatorum* 46
- Figura 16.** Porcentaje de fuente de variación entre *A. cupreata* y *A. potatorum* 48
- Figura 17.** Porcentaje de variación entre las poblaciones de *A. cupreata* según su origen (vivero o silvestre) 48
- Figura 18.** Dendrograma utilizando el algoritmo UPGMA basado en las distancias genéticas de Nei (1972) para las poblaciones de *A. cupreata* 50
- Figura 19.** Correlación vía Mantel de Distancias Geográficas (km) y Genéticas (Nei, 1972) para las poblaciones de *A. cupreata* 51
- Figura 20.** Correlación vía Mantel de Distancias Geográficas (km) y número de migrantes efectivos por generación (N_m) para las poblaciones de *A. cupreata* 51
- Figura 21.** Dendrograma usando el algoritmo UPGMA basado en las distancias genéticas de Nei (1972) para las poblaciones de *A. potatorum* 52
- Figura 22.** Correlación vía Mantel de Distancias Geográficas (km) y Genéticas (Nei, 1972) para las poblaciones de *A. potatorum* 53
- Figura 23.** Correlación vía Mantel de Distancias Geográficas (km) y número de migrantes efectivos por generación (N_m) para las poblaciones de *A. potatorum* 53
- Figura 24.** Correlación entre la distancia genética y distancia geográfica de las poblaciones de *A. cupreata* y *A. potatorum* mediante la prueba de Mantel 53
- Figura 25.** Correlación entre el flujo génico por generación y la distancia geográfica de *A. cupreata* y *A. potatorum* mediante la prueba de Mantel 53
- Figura 26.** Dendrograma utilizando el algoritmo UPGMA basado en las distancias de Nei (1972) de todas las poblaciones de *A. cupreata* y *A. potatorum* 54
- Figura 27.** Parámetros clave para una de las corridas con 60,000 iteraciones 55
- Figura 28.** Número de agrupamientos con mayor verosimilitud para todas las poblaciones (*A. cupreata* y *A. potatorum*) obtenido mediante el método de Evanno y Goudet 57
- Figura 29.** Porcentaje de pertenencia de cada individuo a cada una de las dos agrupaciones más probables (Evanno y Goudet) según el análisis mediante el programa structure 57
- Figura 30.** Número de agrupamientos con mayor verosimilitud para las poblaciones de *A. cupreata* obtenido mediante el método de Evanno y Goudet (2005) 58

Figura 31. Porcentaje de pertenencia de cada individuo de *A. cupreata* a cada una de las tres poblaciones más probables (método Evanno y Goudet) según el programa Structure 59

Figura 32. Número de agrupamientos con mayor verosimilitud para las poblaciones de *A. potatorum* obtenido mediante el método de Evanno y Goudet (2005) 60

Figura 33. Porcentaje de pertenencia de cada individuo de *A. potatorum* a cada una de las dos poblaciones más probables (método Evanno y Goudet) según el structure 60

Figura 34. He para todos los estudios realizados con ISSR en el género *Agave* 65

Figura 35. Correlación entre la heterocigosis esperada y el porcentaje de loci polimórficos de especies de *Agave* estudiadas mediante ISSR 66

Figura 36. Valores de composición de elementos más probables según el programa Structure y sus valores de Heterocigosis esperada y porcentaje de loci polimórficos en poblaciones de *A. potatorum* 68

Figura 37. Valores de composición de elementos más probables según el programa Structure y sus valores de Heterocigosis y Polimorfismo en poblaciones de *A. cupreata* 69

Figura 38. Valores de F_{ST} obtenidos para el género *Agave* 70

Figura 39. Distancias genéticas de Nei obtenidas con ISSR entre poblaciones de *Agave* y entre especies de *Agave* 71

Figura 40. Correlación entre la diversidad genética y la estructuración 75

INTRODUCCIÓN

Con una reciente y sorprendente diversificación de hace apenas 11.8 millones de años (Flores Abreu, 2007), se originó uno de los grupos de plantas de mayor uso en el mundo prehispánico: el *Agave*.

Esta planta ha sido ampliamente utilizada fermentando su savia para la elaboración del pulque (bebida de los dioses), cociendo su cuerpo para comerlo como dulce (mexcalli), cortando sus largas inflorescencias para la construcción, raspando sus hojas para obtener fibra y cociendo y destilando su cuerpo para hacer mezcal (Bruman, 1945; B. de Barrios, 1971; Gentry, 1982; Valenzuela-Zapata, 1995; García Mendoza, 1998; Colunga-García, 1999; Valenzuela-Zapata y Nabham, 2003).

El mezcal (el tequila) es una bebida obtenida partir de la destilación de los productos de la fermentación de los cuerpos cocidos bajo tierra de diversas especies de *Agave*. Esta bebida es y ha sido sinónimo de diversidad en todos sus sentidos: por el número de especies que se utilizan (más de 21 especies), ambientes en los que se desarrollan (áridos, semiáridos, boscosos o semi tropicales), regiones de producción (norte, centro, sur), procesos con los que se elabora e incluso formas y costumbres de beberlo (Valenzuela-Zapata, 1995; Valenzuela-Zapata y Nabham, 2003 Conabio, 2006;). La época moderna, por su parte, ha sido sinónimo de pérdida de diversidad en todos los sentidos: económico y cultural con la salvaje embestida de la globalización y biológico con la pérdida de ecosistemas, relaciones ecológicas y número de especies (INIFAP, 1996; Conabio, 1998;). Como ejemplo podemos mencionar el caso del Tequila: originalmente elaborado a partir de diversas variedades y especies, actualmente es elaborado a partir de una sola: *A. tequilana* var. azul desarrollado exclusivamente en la región de Tequila en el estado de Jalisco (Gil-Vega et al., 2001; Vargas-Ponce, 2007). La riqueza artesanal en su elaboración fue sustituida por la cocción en autoclaves, trituración con prensas hidráulicas, destilación continua y adición de glicerina, agua y tintes que maquillan una aparente variedad de productos que en realidad son solo uno: el que ofrece mayor ganancia a la industria.

Agave cupreata y *A. potatorum* son dos especies a partir de los cuales se obtienen dos reconocidas variantes de mezcal: el de maguey papalote del estado de Guerrero y el mezcal tobalá del estado de Oaxaca. Sus poblaciones naturales son pequeñas y se ubican en zonas de transición a selva baja en claros con pendiente de bosques de encino y son especies en las que no se ha reportado la formación de bulbillos o de alguna otra forma de reproducción asexual. La elaboración de mezcal requiere la cosecha de plantas (o piñas) durante la etapa de elongación del escapo floral.

Aunque la producción de mezcal aún no es comparable con la producción industrial de tequila, la

sobre explotación de este recurso ya está repercutiendo en los tamaños de las poblaciones de *A. cupreata* que presenta tasas de crecimiento menores a uno. Algunos maestros mezcaleros del estado de Guerrero, alarmados ante la disminución del tamaño de las poblaciones de *A. cupreata*, mediante la organización campesina “Sanzekan Tinemi” determinaron el establecimiento de varios viveros donde, a partir de semillas silvestres obtenidas de áreas bajo manejo intensivo de la región, propagan intensamente estas plantas para luego reintroducirlas a su ambiente natural (Illsley, 2004; Illsley, *et al.*, 2007). En este trabajo analizamos los niveles de variación y estructuración genética de las poblaciones naturales de *A. cupreata* y *A. potatorum* utilizadas para la elaboración de mezcal e interpretamos estos datos en términos de conservación y evolución de estos grupos. Paralelamente comparamos la diversidad genética de las plántulas propagadas en vivero por la organización campesina “Sanzekan Tinemi” con las de las poblaciones silvestres.

ANTECEDENTES

Mezcal, tequila, bacanora, pulque, ixtle, tienen un común denominador: El *Agave*.

Cuenta la leyenda que Ehécatl-Quetzalcóatl, el viento cósmico, visitó una noche en el cielo a la bella virgen Mayahuel, una tzitzimin¹ que dormía junto a sus hermanas y a su abuela que las cuidaba. Le habló al oído como hace el viento, susurrando, y la sedujo con sus palabras dulces. La joven Mayahuel, cansada de su paraíso celeste, aceptó entonces bajar al mundo terrenal deslizándose sobre las espaldas del Viento. Quetzalcóatl y Mayahuel se unieron transformándose en un árbol de dos ramas. La abuela, al darse cuenta de la ausencia de su nieta, mandó a las demás tzitzimines en búsqueda de Mayahuel. Hinchada de ira, encontró a la fugitiva oculta en una rama, que arrancó para dársela a comer a sus hermanas. Las astillas, sobras del festín, eran los huesos de Mayahuel, que Quetzalcóatl recogió y enterró desconsolado. De los huesos divinos nació el maguey de la tierra, cuerpo de la diosa Mayahuel, madre de los 400 señores conejo² que proveería agua sagrada en medio de la árida meseta, una fuente en el centro de la desolación terrestre. (Leyenda náhuatl de Mayahuel).

LA FAMILIA AGAVACEAE Y LOS AGAVES

La familia Agavaceae, está formada por nueve géneros que se distribuyen en el continente americano y de los cuales, el género *Agave* es el más diverso, pues constituye el 60.6% del total de especies de la familia.

Los agaves son de gran importancia económica y cultural para el pueblo de México y constituyen un grupo de plantas clave por su abundancia como por los recursos que otorgan al ecosistema. La gran variedad de formas, tamaños, colores y su majestuosa inflorescencia obligan a prestar atención a su presencia, a grado tal que, junto con el chile, el maíz y el nopal han sido considerados iconos de lo mexicano en todo el mundo. Esta apreciación no es del todo errónea, pues en México existen 150 especies de *Agave*, que representan el 75% de la diversidad total de especies, 104 son endémicas y 88 microendémicas (Tabla 1. García-Mendoza, 2002), lo que otorga a México la gran responsabilidad de ser centro de origen, mayor riqueza y diversidad del grupo.

El área de distribución del género abarca desde el sur de los Estados Unidos y Florida hasta el norte de Colombia y Venezuela incluyendo las islas del Caribe (Figura 1). En México, las poblaciones naturales de *Agave* habitan prácticamente en todo el territorio nacional, prefiriendo matorrales xerófilos de altiplanos aunque también pueden encontrarse en bosque templado de montañas y ambientes tropicales

¹ Tzitzimín: una de las estrellas del firmamento.

² Asociado a los dioses de las múltiples formas de la embriaguez (García Mendoza, 1998)

costeros de las Antillas, en altitudes que van desde el nivel del mar (*A. angustifolia*) hasta por encima de los 3400 msnm (*A. inaequidens*). El área de mayor diversidad se encuentra en el valle de Tehuacán-Cuicatlán con 15 sp seguido por la Barranca de Metztitlán con 11 especies. (García-Mendoza, 1998, 2002, 2007; Rocha-Munive et al, 2005, 2006; Alvarez de Zayas, 1995).

Tabla 1. Número total de especies de Agavaceae (*sensu Dahlgren et al., 1983*) y su endemismo en México (Modificado de García-Mendoza, 2004)

Género	Total de especies	Especies en México	Especies endémicas de México
Agave	200	150 (75%)	104 (69%)
Manfreda	29	28 (96%)	22 (78%)
Polianthes	15	15 (100%)	15 (100%)
Prochnyanthes	2	2 (100%)	2 (100%)
Furcraea	25	13 (52%)	8 (61%)
<i>Agave (Sensu lato)</i>	246	208 (85%)	151 (61%)
Beschorneria	7	7 (100%)	6 (86%)
Hesperaloë	5	5 (100%)	4 (80%)
Hesperoyucca	1	1 (100%)	0
Yucca	46	30 (65%)	16 (53%)
Total	330	251 (76%)	177 (70%)

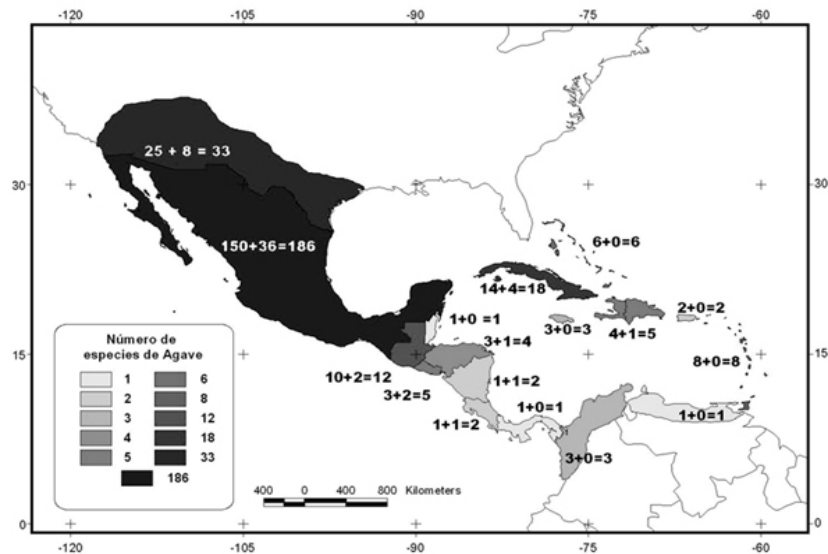


Figura 1. Distribución del género Agave. Las cantidades indican número de especies + número de categorías intraespecíficas. Figura tomada de García-Mendoza, 2002.

En función de su estructura floral, Gentry (1982), dividió al género *Agave* en dos subgéneros (*sensu stricto*): *Littaea* que incluye a todas los agaves con inflorescencia espigada³ y el subgénero *Agave* o *Euagave* con inflorescencias paniculadas (ramificadas). Sin embargo, ningún análisis molecular indican que esta subdivisión no es natural (no se ha podido rescatar ninguno de estos dos grupos) e indican que el género es parafilético incluyendo a los géneros *Manfreda*, *Polianthes* y *Prochnyanthes* (Good-Avila et al. 2006; Flores-Abreu, 2007; Irwin Smith, et al., 2008).

Análisis filogenéticos bayesianos con fragmentos de cloroplasto (matK₁, matK₂, tmL-tmF y tmD-trnT), realizados por Flores Abreu (2007), indican que el género *Agave* (*sensu lato*) se originó hace apenas 11.8 m.a años (calculados mediante filogenia putual de Máxima Verosimilitud o de 7.05 m.a. según el árbol concenso mediante inferencia Bayesiana); si consideramos que el género en sentido amplio incluye 246 especies, tenemos una espectacular radiación de especies, principalmente hace 10.7 m.a., cuando se generaban aproximadamente de 0.48 a 0.75 especies por millón de años (Flores-Abreu, 2007). A pesar de que aún se desconocen las causas y mecanismos precisos de esta impresionante radiación, éste podría ser uno de los casos más impresionantes de diversificación reportados, comparable con el de la alianza silversword de Hawii de 0.56±0.17 spp/m.a. (Baldwin y Sanderson, 1998).

Loa agaves, presentan diversos caracteres asociados a la adaptación a ambientes áridos. En los bordes de las hojas la mayoría de las plantas tienen dientes córneos que nacen sobre mamilas casi siempre con espina terminal, que les brindan una gran protección contra depredadores y que disminuyen el área de transpiración en las regiones más expuestas a la radiación solar. Tienen raíces superficiales, fotosíntesis tipo CAM (estomas con apertura nocturna y fijación de energía principalmente en la forma de ácidos como el málico) aunque algunos son C3 facultativos, cutícula gruesa con cera y la forma de las hojas disminuye el área expuesta a la radiación y dirige el agua hacia el centro de la planta (García Mendoza, 1998, 2007)

El número cromosómico básico es de 30 con 5 cromosomas largos y 25 cortos. Palomino et al. (2007), presentan un amplio listado con los números cromosómicos de diversas especies de *Agave* y obtienen que, a pesar de que la mayoría de estas plantas suelen ser diploides (*A. potatorum*, *A. celsii*, *A. karwinskii*, *A. striata*, *A. desertii*, etc.), la poliploidia no es rara, siendo comunes los tetraploides. En los estudios citogenéticos, los autores mencionan que es común observar individuos con características intermedias entre dos especies en donde sus áreas de distribución se sobreponen y los períodos de floración son simultáneos (Backman, 1944, Pinkava y Baker, 1985; Moreno Ramirez, 2003; Palomino et al., 2007; García-Mendoza, 2007).

³ Se refiere a que la inflorescencia forma una sola espiga en cuyo eje salen las flores.

Algunas especies son iteróparas⁴ aunque la gran mayoría son semélparas⁵; presentan ciclos de vida largos que van de los 4 o 5 años en las especies de talla relativamente pequeña hasta los 10 o 20 años para las especies de talla mayor; la mayoría tiene reproducción asexual por medio de estolones o bulbilos que se pueden desarrollar tanto en la base de la planta como a lo largo del escapo floral facilitando el rápido aumento en sus tamaños poblacionales. Sin embargo, el carácter más impresionante de estas plantas es el relacionado a su reproducción sexual, pues su escapo floral puede llegar a medir hasta 15 veces el tamaño de la planta, de forma que sus flores, al sobresalir por encima del nivel de las demás especies son fácilmente distinguibles por una gran diversidad de polinizadores como los murciélagos, polillas, abejas, colibríes, entre otros (Gentry 1982; García-Mendoza, 1998, 2007).

Son pocos los estudios que se han realizado sobre biología reproductiva del género *Agave*. En el Apéndice I puede encontrarse un resumen de los trabajos realizados en biología reproductiva de esta especie y puede observarse que en promedio, el 31% de las flores de *Agave* se convierten en fruto y el 42.4% de los óvulos llegan a semillas; la autopolinización suele disminuir la proporción de formación de frutos (fruit set) o semillas (seed set) a prácticamente 0. Unas pocas especies (*A. angustifolia*, *A. palmeri*, *A. salmiana*, *A. chrysantha* y *A. subsimplex*) presentan valores de tratamiento control (sin manipulación) menores a los de polinización cruzada, indicando deficiencia de polinizadores sin embargo, las demás especies (*A. cupreata*, *A. potatorum*, *A. celsii*, *A. garcia-mendozae*, *A. lechuguilla*, *A. macroacantha*, *A. xylonacantha*) presentan valores iguales o mayores en control que en cruzada, reflejo de un buen funcionamiento de los polinizadores (Arizaga et al., 2000a; Eguiarte, 2000; Slauson, 2000; Molina-Freaner y Eguiarte, 2003; García-Meneses, 2004; González-González, 2005; Estrella-Ruiz, 2008). La mayoría de las especies producen néctar con una concentración que no sobrepasa el 25% de azúcares, con picos de mayor producción en la noche y mayor formación de frutos con polinizaciones nocturnas, exceptuando *A. cupreata* que presenta las mismas proporciones en diurnas, y nocturnas, *A. potatorum*, que presenta un patrón de polinización generalista y *A. salmiana*, *chrysantha* y *subsimplex* que se benefician con la polinización diurna (Arizaga et al., 2000a; Eguiarte, 2000; Slauson, 2000; Molina-Freaner y Eguiarte, 2003; García-Meneses, 2004; Estrella-Ruiz, 2008; González-González, 2005; Rocha-Munive, 2005;).

Los visitantes más comunes suelen ser murciélagos (*Leptonycteris curasoe*, *Leptonycteris nivalis*, *Choeronycteris mexicana* y *Glosophaga spp.*), himenópteros (principalmente *Apis mellifera*), polillas, colibríes y otras aves (Arizaga et al., 2000a; Eguiarte, 2000; Slauson, 2000; Molina-Freaner y Eguiarte, 2003; García-Meneses, 2004; Espinoza-Paz, et al., 2005; Rocha-Munive, 2005; González-González, 2005; Estrella-Ruiz, 2008).

⁴ Iterópara: Que presenta un solo evento reproductivo durante su ciclo de vida.

⁵ Semélpara: Que puede presentar más de un evento reproductivo durante su ciclo de vida.

Son relativamente pocos los estudios que se han hecho sobre genética de poblaciones para las distintas especies del género *Agave* (Tabla 2), sin embargo a partir de estos se pueden ver ciertas tendencias.

Para los datos obtenidos con ISSR's (Tabla 2) se observa que las distintas especies presentan valores relativamente altos de heterocigosis (promedio de 0.22 ± 0.027 D.E.) con bajos niveles de estructuración (promedio 0.121 ± 0.068 D.E.). El número de migrantes por generación (Nm) en promedio es de 2.7 con rangos que van de uno (excepto *A. karwinskii*) a más de 4 (panmixia) en *A. xylonacantha* y *A. hidalguensis*, indicando que existe un alto flujo génico entre las poblaciones de estas especies (Aguirre Dugua, 2004; González González, 2005; Colín, 2006; Rocha Munive, 2006; Trejo, 2006; Vargas Ponce, 2007)

Tabla 2. Resumen de los estudios de genética de poblaciones para el género *Agave*.

Especie	Marc.	N	Diversidad			Estruct. Migra		Distancia Genética			Variación Genética (%)			Fuente
			He	%P	Fst	Nm	Max	Min	Prom	Gpos	Pob/Gpo	Pob		
<i>A. celsii</i>	ISSR	156	0.248	0.0110	89.40	0.130	1.8	0.089	0.023	0.051	9.20	9.53	81.30	Rocha Munive, 2006
<i>A. difformis</i>	ISSR	158	0.202	0.0180	62.70	0.113	2.36	0.062	0.013	0.033	4.81	6.02	89.17	Rocha Munive, 2006
<i>A. garcia-mendozae</i>	ISSR	133	0.240	0.0300	72.40	0.098	1.3	0.046	0.022	0.036	2.64	11.32	86.05	Gonzalez. G., 2005
<i>A. hidalguensis</i>	ISSR	276	0.205	0.0380	71.50	0.064	4.71	0.021	0.021	0.021	-	-	-	Rocha Munive, 2006
<i>A. striata striata</i>	ISSR	150	0.237	0.0280	76.70	0.103	2.7	0.051	0.012	0.036	11.90	24.30	87.50	Rocha Munive, 2006
<i>A. striata striata</i>	ISSR	231	0.191	0.0229	70.27	0.192	1.05	0.138	0.041	0.099	6.99	17.53	75.47	Trejo, 2006
<i>A. striata falcata</i>	ISSR	310	0.265	0.0243	80.85	0.279	0.64	0.076	0.021	0.039	6.99	17.53	75.47	Trejo, 2006
<i>A. xylonacantha</i>	ISSR	132	0.183	-	67.69	0.063	6.1	0.019	0.009	0.014	1.49	7.23	91.29	Colín, 2006
<i>A. xylonacantha</i>	ISSR	155	0.199	0.0120	75.40	0.059	4.67	0.027	0.006	0.016	5.65	4.05	90.30	Rocha Munive, 2006
<i>A. angustifolia Silvestre</i>	ISSR	228	0.322	0.0289	87.93	0.170	-	-	-	-	-	23.20	76.70	Vargas Ponce, 2007
<i>A. angustifolia Cultivar</i>	ISSR	960	0.270	0.0608	69.28	0.360	-	-	-	-	-	42.50	57.80	Vargas Ponce, 2007
<i>A. tequilana Var Azul</i>	ISSR	45	0.080	0.0000	20.20	-	-	-	-	-	-	-	-	Vargas Ponce, 2007
<i>A. cupreata</i>	ISSR	153	0.257	0.0300	88.80	0.145	1.49	0.093	0.035	0.067	6.00	13.00	81.00	Aguirre Dugua, 2004
<i>A. potatorum</i>	ISSR	179	0.246	0.0250	83.30	0.084	2.99	0.055	0.023	0.036	0.00	10.00	90.00	Aguirre Dugua, 2004
<i>A. cerulata</i>	RAPD	199	0.181	0.0090	77.62	0.098	4.38	0.028	0.002	0.018	-	-	-	Navarro et al., 2003
<i>A. desertii</i>	RAPD	289	0.210	0.0440	68.23	0.140	2.2	0.020	0.080	0.040	-	-	-	Glz. Chauvet, 2001
<i>A. karwinskii</i>	RAPD	41	0.210	0.0860	49.00	0.490	0.47	0.400	0.150	0.275	0.00	26.80	73.20	Lopez Urrutia, 2004
<i>A. subsimplex</i>	RAPD	102	0.143	0.0090	78.56	0.084	6.142	0.024	0.004	0.014	-	-	-	Navarro et al., 2003
<i>A. lechuguilla</i>	ISO.	36	0.394	0.0480	96.00	0.083	2.28	0.170	0.007	0.070	-	-	-	Silva Mont., 2003b
<i>A. victoria-reginae</i>	ISO.	35.5	0.334	0.0680	83.00	0.236	-	0.250	0.025	0.182	-	-	-	M.Palacios et al, 1999
Promedio ISSR, RAPDS		216.5	0.216	0.0534	71.66	0.157	2.9	0.1	0.0	0.1	5.1	16.4	81.2	
Promedio General		198.4	0.231	0.069	73.44	0.157	2.830	0.092	0.029	0.062	5.061	16.385	81.173	

Las distancias que separan a las distintas poblaciones de estas especies también son bajas, pues presentan valores que van de 0.006 a 0.13, reflejo de la poca diferenciación que hay entre las distintas poblaciones (Tabla 2). En todos los casos, al menos tres cuartas partes (75%) de la variación existente se explica al interior de las poblaciones y la cuarta parte restante se divide entre las poblaciones de las especies o entre las especies en sí es decir, existe poca diferenciación entre especies y más diferenciación entre las poblaciones. Aunque se ha reportado correlación latitudinal o longitudinal con la diversidad genética para algunas especies, de forma general para el género *Agave* no encontramos una correlación significativa que nos indique un gradiente geográfico.

Todo lo anterior indica que el género *Agave* está constituido por poblaciones con mucha variación genética que están pasando actualmente por un proceso de diferenciación, indicios acordes con la idea de una reciente radiación del grupo (Good-Avila et al., 2006; Rocha, et al., 2006).

Recientemente se ha sugerido una radiación adaptativa de *Agave sensu lato* estrechamente relacionada con sus polinizadores y con la desertificación de México, en el que algún grupo de Agavaceae polinizada principalmente por esfíngidos fue seleccionada por murciélagos generalistas. Posteriormente la desertificación de Norte América, junto con la diversificación de murciélagos nectarívoros le permitió al grupo colonizar fácilmente una gran variedad de hábitats (Eguiarte 1995; Baldwin y Sanderson 1998; Eguiarte et al. 2000; Rocha et al., 2005 y 2006; Good-Avila et al. 2006; Flores Abreu, 2007;).

GRUPOS HIEMIFLORAE Y CRENATAE (SENSU GENTRY)

Gentry (1982) clasifica a *Agave cupreata* y *Agave potatorum* dentro del subgénero *Euagave* (por sus inflorescencias paniculadas) y en los grupos Crenatae y Hiemiflorae respectivamente. Mediante la guía dicotómica de Gentry, para llegar a estos grupos tenemos que seguir las siguientes características (Gentry, 1998 pp:267-268): 1) Hojas no ensiformes, lanceoladas a ovadas, 10 veces más largas que anchas con cápsulas oblongas; 2) Plantas pequeñas con rosetas generalmente de menos de 1.6 m y hojas con largos menores a 1.5m. A partir de este punto, llega la división que nos puede llevar a alguno de los dos grupos de interés:

- 4) Plantas medianas a grandes con rosetas de 1 a 1.6 m de largo y hojas de 1 a 1.5 m de largo --> 5) Hojas con dientes --> 6) Plantas verdes sin bulbilos en la base --> 8) Plantas sencillas, no ramificadas, multianuales, tallo corto, hojas largas, 70-150cm --> 9) Flores con tubos cortos y tépalos largos 2 a 4 veces más largos que el tubo, dientes irregulares en tamaño y distancia, frecuentemente con dientes intersticiales, ubicados en la Sierra Madre Occidental. --> Grupo Crenatae --> *Agave cupreata*.
- 4) Plantas pequeñas a medianas con rosetas de 0.4 a 1 m de largo y hojas de 10 a 100 cm de largo -->

10) Plantas generalmente no surculosas con floración de invierno a inicios de primavera --> 13) Varias hojas, no marcadamente ásperas, verde a glaucosas, con espinas terminales grandes (3-6cm), flores mayormente agrupadas en grupos esféricos, a menudo conspicuamente bracteados, flores de 50 a 90 mm de largo con floración de invierno a primavera, ubicados al sur de México y Centro América --> Grupo Hiemiflorae --> *Agave potatorum*.

Las características distintivas del grupo Crenatae de Gentry (1982) son las siguientes: una profunda crenación de los márgenes de las hojas que suelen tener dientes ordenados; panículas estrechas y un tubo floral que generalmente excede el largo de los tépalos. Por su parte, el grupo Hiemiflorae se caracteriza porque sus flores se presentan apelonadas en grupos con pedúnculos muy cortos (unos pocos centímetros) dando una apariencia racemosa.

De forma general, y como se puede observar en la guía anterior, los caracteres que separan a ambos grupos son el tamaño de las plantas, (mediana a grande en Crenatae y pequeña a mediana en Hiemiflorae), la crenación de las hojas (que suele ser muy marcada en Crenatae) y en la disposición de las flores en el escapo floral, que en el caso de Hiemiflorae, suelen tener un pedúnculo reducido y apariencia apelonada. Sería conveniente realizar estudios de plasticidad fenotípica en *Agave* para estos caracteres, particularmente en *A. cupreata* y *A. potatorum*, ya que la semejanza morfológica entre estas dos especies es muy grande y al visitar sus poblaciones puede observarse un gradiente en cuanto a tamaño, forma, color y número y tamaño de dientes. Reflejo de lo anterior es el gran número de nombres comunes que presentan estas plantas o en que ambos son conocidos como papalometl en náhuatl (Colunga García, 2006). Estudios de genética de poblaciones pueden aportar a la taxonomía de este grupo.



Figura 2. *Agave cupreata* (izquierda) y *A. potatorum* (derecha) en el Jardín Botánico de la U.N.A.M.

AGAVE CUPREATA

Nombres comunes: papalometl (maguey mariposa), yaabenisi (mixteco), maguey de mezcal, ancho, maguey papalote, maguey bravo, tuchi (Colunga García, 2006; Conabio, 2006).

Esta planta semélpara, muy utilizada para la elaboración de mezcal en el estado de Guerrero, se caracteriza por una profunda crenación de color café cobrizo en sus hojas verde brillantes que en el envés conserva una fuerte marca foliar de las hojas anteriores (Figura 3). Se distribuye en las pendientes montañosas de bosques de pino-encino, pastizales, palmares o selvas bajas de la cuenca del Río Balsas en los estados de Guerrero y noreste de Michoacán en altitudes de 1200 a 1850 m.s.n.m. y precipitaciones anuales de 73 a 86 mm (Gentry, 1998; Conabio, 2006).

El tamaño de sus rosetas puede variar según el sitio en el que crezca pero generalmente miden 1 m por 80 cm y su escapo floral puede medir hasta 6 metros de alto. Florece en la época de secas de enero a marzo dos meses antes de que inicien las lluvias entre mayo y noviembre. Hasta ahora no se ha reportado ningún tipo de reproducción asexual para esta especie.

En 2004 García Meneses estudió la biología reproductiva en una población de esta especie. Describió las flores como perfectas, protándricas y dicogámicas con 380 óvulos en promedio en las que la dehiscencia de las anteras se presenta al cuarto día de la apertura de la flor y el estigma es receptivo a partir del quinto día. La floración del escapo completo dura aproximadamente seis semanas en las que las flores van madurando de abajo hacia arriba en espiral en dirección opuesta a las manecillas del reloj. En promedio cada escapo presenta de 13 a 17 umbelas con 80 a 120 flores cada uno y la formación de frutos a partir de la apertura de la flor dura aproximadamente una semana (García Meneses, 2004).

En los experimentos de polinización, García Meneses (2004) encontró, en todos los casos, niveles de fruit-set menores a 0.2 y de seed-set menores a 0.4, lo que pudiera estar indicando una limitación de polinizadores o que la especie se encuentra bajo los efectos de una depresión por endogamia mediante la expresión de alelos recesivos letales. Por otra parte, la exclusión total de polinizadores no produjo frutos ni semillas, lo que indica la existencia de mecanismos de auto incompatibilidad. El tratamiento control no mostró diferencias significativas con respecto al experimento de polinización nocturna, indicando que esta planta presenta preferencia por polinizadores nocturnos. Realizó observaciones diurnas durante dos días y registró la visitas de abejas, mariposas nocturnas (Sphingidae y Noctuidae), murciélagos (*Leptonycteris nivalis*), avispas y colibríes. Encontró que las semillas, dispersadas por viento, aunque tienen un tasa de germinación potencial del 90%, la depredación de éstas puede acabar hasta con más del 90% de éstas. (García Meneses, 2004).

En 2004, Aguirre Dugua estudió la genética de cinco poblaciones silvestres de *A. cupreata* (tres en

el centro este del estado de Guerrero: C3 “La Esperanza” C10* “Mesones” y C13* “La Laguna” y dos en el noreste de Michoacán: C14* “Etúcuaro”, y C16 “Tztitzio”), utilizando los iniciadores de ISSR 846 y 857. Encontró 36 loci polimórficos, que reflejaron niveles considerables de diversidad ($H_e = 0.25$ $P = 89\%$) y estructuración ($F_{ST} = 0.145$) y calculó distancias genéticas del orden de 0.0348 a 0.093 así como un patrón de aislamiento por distancia ($r^2 = 0.95$; $P = 0.02$), en el que a mayor distancia geográfica, mayor distancia genética. A partir de las distancias genéticas entre las poblaciones, Aguirre Dugua sugiere tres grupos de manejo: una en el estado de Guerrero (poblaciones C3, C10 y C13) y dos en el de Michoacán (población C14 y población C16) (Aguirre Dugua, 2004).

En un estudio preliminar de demografía de *A. cupreata* bajo manejo extensivo elaborado por Ilsey y colaboradores (2007) usaron poblaciones cercadas y no cercadas para evaluar mediante modelos matriciales el efecto que tienen estas estrategias. Observaron que las tasas de crecimiento son menores a uno y sugieren una decremento de las poblaciones a un ritmo del 3 a 5% anual, afirmando que el maguey papalote están en peligro de desaparecer en el mediano plazo si no se garantiza el reclutamiento y la supervivencia de nuevos individuos.

AGAVE POTATORUM

Nombres comunes: Tobalá, papalometl (náhuatl), yahuitichushi (mixteco), arruqueño, batobpaz (zapoteco), biliá, doba-la o dob-lá ó do-lá (zapoteco), maguey de cochi, maguey de mezcal, maguey de pasmo, maguey del monte, magueycillo, tobalá, yavi ticuchi (mixteco) (Colunga, 2006; Conabio, 2006).

A lo largo del tiempo, a esta especie se le ha dado los nombres de *A. scolymus* Karw. *A. saundersii* Hook; *A. verschaffeltii* Lem.; *A. potatorum* var. *verschaffletii* (Lem) Berg.; *A. grandibracteata* Ross; *A. littaeoides* Pamp.; *A. galeottei* Bak.; *A. multiflora* (Gentry, 1982; Colunga, 2006)

Esta planta (Figura 4), ampliamente utilizada para la elaboración de mezcal en Oaxaca, es morfológicamente muy parecida a *A. cupreata* (ver arriba). Por falta de caracteres considerados como únicos, ha presentados muchos problemas de clasificación; “*Because of its polymorphic nature, the species is taxonomically frustrating*” (Gentry, 1982 pp. 492). Sin embargo, se diferencia de *A. cupreata* en que sus inflorescencias tienen una apariencia apelonada de apariencia amarilla a roja purpúrea en las ramas del escape (*A. cupreata* tiene una apariencia racimosa color verde amarillento); los márgenes de sus hojas suelen ser menos crenados, en que las rosetas son ligeramente más pequeñas, y las flores de color verde-amarillento con tonalidades rojo-purpureas, son más largas y angostas (*A. cupreata* presenta flores color verde amarillento con tonalidades naranja) (Gentry, 1982).

* Población incluida en este trabajo.

Agave cupreata



Figura 3. A, B, C, D e I: morfología general de la planta. E y F: variación en la crenación de las hojas. G y H: formas de la inflorescencia. J y K: flor. L: dibujo de hoja y flor. M) Distribución potencial. Fuentes: A, F, G y J: Julia Etter & Martin Kristen. <http://www.rarepalmseeds.com>; B y H: W. Polka <http://www.rostliny.net>; I y K: Abisai G. Mendoza (<http://conabioweb.conabio.gob.mx>); L: Gentry, 1982; M) Mapa de distribución potencial (Conabio, 2006b); D y E: Enrique Scheinvar.



Figura 4. A-F: variación en la morfología de la roseta. G-H: Crenación de las hojas. I: inflorescencia. J-K: Flor. L: Dibujo de hoja, flor y fruto. M: Distribución potencial. Fuentes: C,D,I,K: Julia Etter & Martin Kristen (www.rarepalmseeds.com); E, J: Abisai G. Mendoza (<http://conabioweb.conabio.gob.mx>); F: W.Polka (<http://www.rostliny.net>); L: Gentry, 1982; M: Elaboración propia a partir de Conabio, 2006; A,B,G,H: Enrique Scheinvar

Habita las partes altas y semi-áridas de la Sierra Madre del sur, valle de Tehacán, Puebla y Sierras de Oaxaca, en claros con pendiente de bosques de Pino-Encino o selva baja en altitudes de 1240 y 2300 msnm. Comparte la porción este de la cuenca del Río Balsas con *A. cupreata* (aunque su distribución potencial se superpone totalmente a lo largo de toda esta cuenca), y se extiende hacia el Noreste en la cuenca del Río Papaloapan y hacia el sureste, en las cuencas de Río Verde y Río de Tehuantepec sobre la sierra de Oaxaca. La época de floración es de septiembre a diciembre (Gentry, 1982).

Al igual que *A. cupreata* es semélpara y hasta ahora no se ha registrado ningún tipo de reproducción asexual en esta planta, por lo que su supervivencia depende totalmente de la polinización. Estrella Ruiz (2008) realizó la biología reproductiva de esta especie y describió individuos con aproximadamente de 98 a 130 flores por inflorescencia que producen néctar durante las dos noches que se realiza la dehiscencia (día 2) con un pico de producción aproximadamente a las 8:00 de la mañana. Las flores son protándricas y la receptividad del estigma se presenta en la quinta noche (Estrella Ruiz, 2008).

Los experimentos de polinización indican que es una especie auto incompatible (la auto polinización no produce frutos ni semillas) con mayor producción de frutos con polinización nocturna (Fruit-Set = 0.74) que diurna (Fruit-Set = 0.64); no presenta diferencias significativas en la proporción de frutos formados en experimentos control (Fruit-Set = 0.45), polinización cruzada (Fruit-Set = 0.5) o polinización por insectos (Fruit-Set = 0.5), cuyos valores, de forma general son menores que los de polinización diurna o nocturna, indicando limitación de polinizadores⁶. Por otro lado, encuentran que en cuanto a la formación de semillas la polinización cruzada aumenta la proporción de semillas viables (Seed-Set = 0.8) de manera significativa con respecto a las plantas a las que no se les aplica ningún tratamiento (control, Seed-Set = 0.67), lo que se podría traducir en un efecto de depresión por endogamia mediante la expresión de recesivos letales. A pesar de que los autores reportan una gran diversidad de visitantes florales (principalmente murciélagos, aves e insectos) no detectan en la actualidad alguna diferencia significativa en la efectividad particular de alguno de éstos, por lo que identifican a esta especie como con un sistema de polinización generalista (Estrella Ruiz y Valiente, 2007).

En el trabajo ya mencionado de Aguirre Dugua (2004), también se analiza la genética de cinco poblaciones de *A. potatorum* (cuatro en el estado de Oaxaca: P2 “Camarón”, P7* “Miahuatlán”, P9* “San Catarina” y P11* “Zapotitlán” y una del estado de Puebla: P13* “Azumbilla”), encontrando niveles de diversidad y estructuración ligeramente menores que los de *A. cupreata* ($H_e = 0.245$; $P = 83\%$; $F_{ST} = 0.084$) con distancias genéticas que van de 0.022 a 0.055 que no responden a un patrón de aislamiento por distancia ($r^2 = -0.574$; $P = 0.99$) (Aguirre Dugua, 2004).

⁶ Los agaves, generalmente son polinizados por murciélagos y desgraciadamente, la gente los asocia constantemente con vampiros por lo que muy comúnmente queman las cuevas en las que anidan desapareciendo sus poblaciones.

* Población incluida en este trabajo.

En un estudio de etnobotánica realizado por Pérez Negrón y Casas (2007), en las inmediaciones de Santiago Quitepec, Oaxaca, identifican el uso de *A. potatorum* para leña, control de erosión de suelo, valla viva, alimento (las flores) y para la elaboración de mezcal. Estiman aproximadamente 65,100 (cardonal 1), 18,900 (Tetechera 1) y 69,122 (tetechera2) plantas en un área de 36,800 m², lo que nos daría un aproximado de 4 plantas por metro cuadrado; sin embargo, dado que el principal uso que se le da en estas comunidades está relacionado con su evento reproductivo, (el escapo se utiliza para la construcción o como leña y las flores para la alimentación), los autores identifican a esta especie como uno de los recursos con mayor riesgo para su conservación. (Perez Negrón y Casas, 2007).

En los años 2000 a 2002 el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) realizó una colección viva de germoplasma de agaves mezcaleros en las localidades de “El Camarón” en Yautepec y en Sto. Domingo, ambos de Oaxaca en los que se incluyeron 20 plantas adultas de cada una de las especies, incluyendo a *A. cupreata* y *A. potatorum* y reportan la dificultad de *A. potatorum* para establecerse en la comunidad de Camarón (Espinoza Paz, 2005).

EL MEZCAL

El mezcal es una bebida alcohólica típica de México que es obtenida a partir de la fermentación y destilación del producto de la cocción bajo tierra de los tallos o piñas de más de 21 especies distintas de Agave (Colunga, 2006; Conabio, 2006). El tequila, una de las bebidas más conocidas a nivel mundial, no es más que un mezcal industrializado y elaborado a partir de una especie particular en la única región permitida: *A. tequilana* en la región de Tequila Jalisco.

El término *mexcal* o mezcal es una palabra de origen náhuatl cuyas raíces, según Aguirre Rivera y colaboradores (2001) pudieran tener dos orígenes: *metxcalli* (*metl*=Agave + *ixcalli*=cocido) ó *Metzcállalli* (*metl* + *callalli*=solar), en ambos casos refiriéndose a la planta que incluso hoy en día se encuentra en los solares de los campesinos y que comúnmente es y ha sido cocinado para alimentación y actualmente para la elaboración de la bebida alcohólica.

EL PROCESO DEL MEZCAL

La elaboración de mezcal varía grandemente entre regiones y costumbres locales, sin embargo, podemos distinguir un proceso general que todos siguen (Conabio, 2006; Mtro. mezcalero Agustín Correa Granados, palenque “Puerto del Bálsamo” Gro, *Com. pers.*; Mtro. mezcalero Salatiel Molina, palenque “La Mata de Otate”, Gro, *Com. pers.*; Mtro. mezcalero Lorenzo Ángeles Mendoza palenque “Real Minero”, Oax. *Com. pers.*):

Selección de plantas: En el caso de cultivo, se seleccionan las plantas de las que se obtendrán semillas y/o esquejes para su propagación. En sitios que dependen de poblaciones silvestres, el maestro mezcalero va seleccionando aquellas plantas que se encuentren en sitios y/o que tengan características específicas de las que, según su conocimiento, puede obtener mayor y mejor cantidad de azúcares y se espera hasta que la planta inicie su etapa reproductiva. En el caso de la industria del tequila, la única especie permitida es *A. tequilana* Weber Var. azul propagada en la mayoría de las veces, mediante bulbilos o cultivo de tejidos.

Corte: Una vez que la planta inicia su etapa reproductiva, ésta comienza a producir todos los azúcares (principalmente fructanos) que va a destinar al néctar, polen y semillas de sus futuras flores. Durante su elongación, el escapo floral se corta con el objeto de acumular todos los azúcares en el tallo (cabeza o piña). Este procedimiento representa un verdadero problema para la conservación, sobre todo para las especies que carecen de reproducción asexual como *A. cupreata* y *A. potatorum*, ya que se impide la reproducción de la planta. La elaboración de un litro de mezcal totalá requiere de aproximadamente de 3 a 5 “piñas” de *A. potatorum*. Por otra parte, el uso de plantas inmaduras para la elaboración de mezcal (muy común en la elaboración de tequila) disminuye la calidad de los alcoholes y le da un sabor picoso y desagradable al producto.

Cosecha: Una vez que la planta ha madurado y concentrado todos sus azúcares en la base, la planta se arranca del suelo y se cortan las hojas a ras del tallo utilizando, según la región, barra, coa, hacha, o machete y son transportados al sitio de elaboración del mezcal o palenque.

Cocción: Los tallos de *Agave* sin hojas se cuecen para romper las cadenas de fructanos y obtener azúcares sencillos que son comestibles y fermentables. La cocción tradicional se realiza en hornos de pozo (hoyos en el suelo revestidos de piedra o mampostería). Primero se calienta la base del horno con carbón que se cubre con petates, encima se colocan las cabezas de maguey y se cubren finalmente con petates, hojas de palma, lona y tierra. Los materiales utilizados durante la cocción dan diferentes aromas y sabores al destilado final. Una mala cocción también suele dar un sabor picoso al producto. Los procesos industriales de tequila han modificado este procedimiento utilizando autoclaves de vapor a presión y eliminando la inmensa gama de sabores que este proceso brinda.

Molienda: La cabeza cocida o mexcalli (que también se aprovecha como dulce para los niños) se martaja en canoas de madera o de piedra, molinos de tipo chileno, trapiches, o incluso eléctricos con el objeto de extraer sus jugos y facilitar la fermentación. La industria del tequila utiliza prensas hidráulicas.

Fermentación: Los jugos, con o sin bagazo, se vierten en tinas donde se les agrega agua para facilitar la fermentación. En este proceso los azúcares del maguey se reducen para formar alcoholes y diversos compuestos que agregan aroma y sabor al mosto o tepache. Como tina de fermentación se puede utilizar troncos huecos, bolsas de cuero de vaca, hoyos en roca, tinas de madera o de barro, mampostería o

plástico. La industria del tequila utiliza tinajas de acero inoxidable.

Destilación: El mosto o tepache fermentado se destila dos veces en destiladores sencillos (tipo filipino), o en alambiques tipo árabe de destilación discontinua. En estos, los distintos alcoholes producidos durante la fermentación se van separando por su peso molecular: durante la primera destilación se separa y elimina el primer producto que contiene metanoles, el resto de la destilación es reintroducido para realizar la segunda destilación, en la que se recuperan y separan los alcoholes en tres fases: la primera o “punta” que contiene alcoholes de 80% a 90% Alc. Vol., la segunda o “cuerpo” con alcoholes a 50% Alc. Vol. y finalmente el último producto con los alcoholes más pesados de 25% a 30% Alc. Vol. En algunos sitios durante la destilación se agregan hierbas aromáticas (o incluso pechugas de pollo) que pueden dar un sabor diferente al mezcal. La industria tequilera ha reemplazado los alambiques de destilación discontinua por alambiques tipo árabe de destilación continua en los que se obtiene una única fase final de destilado.

Rectificación: Una vez concluida la destilación y recuperadas las tres fases de la segunda destilación “punta, cuerpo y cola”, estas son mezcladas en las proporciones adecuadas para poder ofrecer una bebida con la graduación alcohólica adecuada. La Norma Oficial Mexicana del Mezcal permite graduaciones de 36% a 55% Alc. Vol. y establece dos tipos de mezcal: el tipo I o “Mezcal 100% Agave” que debe ser rectificado exclusivamente con los mismos azúcares obtenidos de la propia destilación del *Agave* (punta, cuerpo y cola) y el tipo II o simplemente “Mezcal” al que se autoriza su adulteración hasta con 20% de carbohidratos totalmente ajenos al *Agave* en perjuicio de la calidad y sabor del producto.

Abocado: Este constituye un proceso establecido por la Norma Oficial Mexicana que lo define como “procedimiento para suavizar el sabor del mezcal, mediante la adición de uno o más productos naturales, saborizantes o colorantes permitidos en las disposiciones legales correspondientes” (extracto de roble, glicerina o jarabes a base de azúcar, entre otros).

Estabilización y Maduración: En algunas ocasiones el mezcal puede dejarse reposar o añejar por algún tiempo en barricas de madera o en botellas de vidrio. La Norma Oficial Mexicana del Mezcal determina tres tipos de mezcal a partir de este proceso: el “mezcal añejo”, que es madurado durante al menos un año en barricas de roble blanco o encino, “mezcal reposado” que se deja por lo menos dos meses en barricas de roble blanco o encino y “mezcal joven” que no se deja reposar.

Envasado y etiquetado: Esta puede realizarse o no en el palenque. Aún no está del todo regulado el procedimiento de envasado del mezcal. Este proceso representa el punto que une la cadena productiva y de explotación del recurso con el consumidor, el cual determina, en última instancia la magnitud de la producción y por ende la intensidad y calidad de la extracción, propagación y uso de los agaves.

Originalmente la producción de mezcal recaía en un solo personaje: el maestro mezcalero, que se encargaba desde la selección de las plantas hasta del envasado y venta del producto. Sin embargo, la

intensificación en la producción y consumo del mezcal hace que cada vez sean más los actores involucrados en el proceso: los campesinos propietarios del terreno y de las plantas, los jornaleros que cortan y cargan las piñas, los transportistas que llevan las piñas al palenque, los maestros mezcaleros usualmente dueños del palenque y que supervisan la cocción, fermentación y destilación, los peones que trabajan en el palenque, las embotelladoras que compran el mezcal, lo abocan y envasan y finalmente nosotros, los consumidores que determinamos el futuro de este recurso.

EL MEZCAL DE TEQUILA Y LA PÉRDIDA DE DIVERSIDAD

En los inicios del siglo XVII y debido a las diversas prohibiciones que la corona española impuso a las bebidas de origen no español (ver historia del mezcal en Apéndice II), la producción de mezcales en Colima y Jalisco pasó a la clandestinidad realizándose a nivel familiar y en tabernas establecidas en zonas remotas de barrancos y montañas hacia el noreste (Tamaulipas) y sureste del país (Michoacán, Guerrero y Oaxaca), lejos de la supervisión de la corona. La clandestinidad de la actividad y la persecución por parte de la corona seguramente imposibilitó el establecimiento de grandes plantaciones, pero la demanda del producto obligó a los productores a depender de las poblaciones silvestres de *Agave* del sitio en que se encontraran, enriqueciendo la diversidad de especies con las que se elaboraba el vino mezcal.

A partir del permiso otorgado a José Cuervo en 1795, la producción de vino mezcal en Jalisco se estableció formalmente e inició una historia de industrialización que representó (y aún representa) ingresos significativos para ese Estado (Gutiérrez-Lorenzo, 2003). En búsqueda de proteger a los grandes propietarios de la industria, surgió en 1972 la primera declaratoria de Denominación de Origen del Estado Mexicano: la del Tequila⁷ (Diario Oficial de la federación, 13 Octubre, 1977) que establece que sólo podrá llevar el nombre “Tequila” aquella bebida realizada según el protocolo establecido por la Norma Oficial que se realice en cualquier municipio del Estado de Jalisco, en ocho municipios de Nayarit⁸, siete municipios de Guanajuato⁹, treinta municipios de Michoacán¹⁰ u once de Tamaulipas¹¹ (Figura 5). Por su parte, la Norma Oficial Mexicana (Diario Oficial de la federación, 6 de enero, 2006) establece (además de la dilución o abocado hasta del 49% con colorantes, extracto de roble, glicerina o jarabes a base de azúcar y de provenientes 100% de agave o hasta 49% de otros azúcares) que debe ser realizado únicamente con *Agave tequilana* Weber variedad azul.

⁷ Para 2008, México cuenta con 11 denominaciones de origen: Tequila, Mezcal y Bacanora (todas estas producto de la destilación de Agaves), Sotol (destilación de la Agaveacea del género *Dasyliroton* sp.), Charanda, Mango ataulfo, Café de Veracruz, Café de Chiapas, Madera de Olinalá, Cerámica Talavera y Ambar de Chiapas.

⁸ Nayarit: Ahuacatlán, Amatlán de Cañas, Ixtlán del Río, Jala, Jalisco, San Pedro Lagunillas, Santa María del Oro y Tepic

⁹ Guanajuato: Abasolo, Cd. Manuel Doblado, Cuerámaro, Huanimaro, Pénjamo, Purísima del Rincón y Romita

¹⁰ Michoacán: Briseñas de Matamoros, Chavinda, Chilchota, Churintzio, Cotija, Ecuandureo, Jacona, Jiquilpan, Maravatío, Marcos Castellanos, Nuevo Parangaricutiro, Numanán, Pajacuarán, Peribán, La Piedad, Régules, Los Reyes, Sahuayo, Tancitaro, Tangamandapio, Tangancicuaro, Tanhuato, Tinguindín, Tocumbo, Venustiano Carranza, Villa Mar, Vista Hermosa, Yurécuaro, Zamora, Zináparo

¹¹ Tamaulipas: Aldama, Altamira, Antiguo Morelos, Gómez Farías, González, Llera, Mante, Nuevo Morelos, Ocampo, Tula y Xicotencatl

La presión de selección impuesta por la economía mexicana mediante la declaración de estas normas favoreció el reemplazo de los métodos tradicionales de elaboración de mezcales así como la diversidad de especies utilizadas y sembradas en la zona por un sólo método y especie: el establecido por la Norma Oficial Mexicana (Valenzuela-Zapata, 1995) y hoy en día es frecuente encontrar extensas plantaciones de esta planta fuera de su rango normal de distribución (*obs. pers.*). El aumento en la demanda de este producto ha llevado a las grandes compañías tequileras a buscar mecanismos para incrementar tanto la producción como la calidad de su producto mediante la propagación clonal *in vitro* reemplazando selvas bajas, matorrales y encinares por extensos monocultivos de *A. tequilana* Var. Azul. Tal depredación fue aplaudida y reconocida por la UNESCO en 2006 como patrimonio de la humanidad en la categoría de Paisaje cultural.



Figura 5. Denominaciones de origen para el género *Agave*: mezcal, tequila y bacanora. (Elaboración propia a partir de datos de NOM-070-SCFI-1994 (Tequila), NOM-006-SCFI-2005 (Mezcal) y NOM-168-SCFI-2004 (Bacanora).

Gil Vega y colaboradores (2001) analizaron la diversidad genética de poblaciones de *A. tequilana* Weber en Jalisco mediante RAPD's y encontraron valores de polimorfismo muy bajos (0.8%) en el total de las poblaciones que analizaron, mientras que las distancias genéticas entre las variedades Azul, Chato y Sigüín era de 0.06, 0.12 y 0.15 respectivamente, lo que pone en gran riesgo la diversidad genética de la especie y por ende, la producción de esta bebida. En 2006, la misma autora reanalizó muestras de ADN total de esta especie en el estado de Guanajuato mediante AFLP's (marcador con el que obtuvieron 333 bandas), calculando el índice "Dice" (Nei y Li, 1979: en Gil-Vega et al., 2006), el cual es utilizado para identificar polimorfismo en secuencias de sitios de restricción mitocondrial. Encontró niveles de polimorfismo de 61% entre nueve variedades de *A. tequilana* Weber y del 26% al interior de las variedades de *A. tequilana* Weber var. azul, valores que, aunque mayores a los obtenidos con RAPD's, se encuentran aún por debajo de los reportados con marcadores de menor variación como ISSR's (Gil-Vega et al., 2006).

En un análisis mediante ISSR's de diversas poblaciones silvestres y poblaciones cultivadas bajo manejo tradicional y bajo manejo comercial, Vargas Ponce (2007), encontró niveles de heterocigosis y polimorfismo mayores para las poblaciones silvestres ($He_{prom} = 0.32$, $P = 87.9\%$) que para las poblaciones bajo manejo tradicional ($He_{prom} = 0.27$, $P = 69.28$) y en estas últimas, niveles casi tres veces mayores que en las poblaciones bajo manejo comercial (variedades de azul: $He = 0.08$, $P = 20.2\%$) (Vargas-Ponce, 2007). Los niveles relativamente altos de polimorfismo encontrados en este estudio como en el de Gil-Vega (2006), contrastan con los bajos niveles de heterocigosis, indicando una variación inestable pues indica que la variación se encuentra mayoritariamente en estado homocigo, por lo que los alelos podrían fijarse rápidamente perdiendo la variación.

Vargas-Ponce (2007) también analizó la variación morfológica en plantas de la región del tequila y observó una correlación negativa entre la intensidad del manejo y la variación morfológica de plantas de esta especie, reflejo de que los productores están seleccionando plantas medianas a grandes con tallo largo y pocas hojas.

El mismo efecto de pérdida de diversidad puede observarse en el caso del henequén (*A. furcroydes*), especie que debido a la intensificación de su cultivo durante la época de las haciendas henequeneras de Yucatán con fines exclusivamente cordeleros, presenta poblaciones naturales que han perdido prácticamente su variación genética (Colunga-García, et al., 1999).

MEZCAL TRADICIONAL, DENOMINACIÓN Y NORMA

Para todo mal ... mezcal
y para todo bien.... también
(Proverbio popular)

Mezcal es, ha sido y deberá seguir siendo sinónimo de diversidad; no solo por las más de 21 especies de las que se elabora (Tabla 3), la gran variación de paisajes que abarca y el gran número de especies animales que visitan sus flores, sino también por las regiones y procedimientos de cocción, maceración, fermentación y destilación, así como una gran variedad de eventos y modos de tomarlo.

El modelo de desarrollo económico del tequila motivó a la Cámara Nacional de la industria del Mezcal A.C. a solicitar, en 1994, la Denominación de Origen Mezcal ante el Instituto Nacional de Propiedad Industrial, cuya declaratoria se expide el 11 de noviembre de 1994 (y se modifica dos veces: noviembre 2002 y febrero 2003) estableciendo que la bebida denominada Mezcal es aquella realizada según la Norma Oficial Mexicana del Mezcal en los estados de Guerrero, Oaxaca (particularmente la "Región del Mezcal": Solá de Vega, Miahuatlán, Yautepec, Santiago Mantatlán, Tlacolula, Ocotlán, Ejutla y Zimatlán), Durango, San Luis Potosí, Zacatecas, un municipio de Sinaloa: Mazatlán y once municipios

de Tamaulipas: San Carlos, San Nicolás, Burgos Miquihuana, Bustamante, Palmillas, Jaumave, Tula, Cruillas, Jiménez y Méndez (Diario Oficial de la Federación, 28 de noviembre de 1994, 13 de junio de 2002, 11 de febrero 2003, 4 de junio de 1994 y 17 de agosto de 1994). Dividiendo así la distribución de la bebida en dos regiones: Norte y Sur, quedando excluidos los estados de Michoacán, Tlaxcala, Hidalgo, Morelos, Puebla y Guanajuato (Figura 5).

El 4 de junio de 1997 la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial expidió la “Norma Oficial Mexicana (NOM-070-SCFI-1994), Bebidas Alcohólicas-Mezcal-Especificaciones”, en la que se establecen las características y especificaciones que deben cumplir los productores o comercializadores de mezcal. En esta NOM se establece que la elaboración de mezcal dependerá de: “*A. angustifolia*, *A. esperrima* (*sic*) (*¿A. asperrima = A. scabra?*), *A. weberi*, *A. potatorum*, *A. salmiana* y otras especies de *Agave*, siempre y cuando no sean utilizadas como materia prima para otras bebidas con denominación de origen”.

En cuanto al procedimiento, define dos tipos de mezcal: tipo I (con azúcares 100% de agave) o tipo II (hasta 20% de otros azúcares) y tres tipos de categoría: Añejado (madurado al menos un año), Joven (sin madurar) y Reposado (madurado al menos 2 meses), todos ellos con 36% a 55% Alcohol/Vól y permitiendo en todo caso el abocado (suavización del sabor) mediante productos naturales, saborizantes o colorantes.

El mismo caso del tequila debe servir para reconsiderar los riesgos que puede tener la aplicación de una norma que no esté sustentada en el conocimiento de la ecología, distribución, genética de la especie, y usos y costumbres de quien la utiliza.

El aumento en el consumo de mezcal, así como el cambio de uso de suelo rural con otros fines, afectó de forma significativa el tamaño de las poblaciones naturales de algunas especies de *Agave* utilizadas para la elaboración de esta bebida. Un estudio preliminar de la demografía de poblaciones de *Agave cupreata* bajo manejo intensivo elaborado por GEA y Conabio, indica que las poblaciones bajo explotación intensiva, están decreciendo ($\lambda < 1$) a un ritmo aproximado de 3 a 5% anual, sugiriendo que las poblaciones están en peligro de desaparecer a mediano plazo si no se garantiza el reclutamiento y supervivencia de nuevos individuos (Illsley et al., 2007). Cabe recordar que el tamaño poblacional es un factor fundamental en los procesos de deriva génica.

La organización campesina “S.S.S. Sansekan Tinemi” con el apoyo del “Grupo de Estudios Ambientales A.C.”, preocupados por la desaparición de los recursos para el mezcal y de la preservación de la diversidad biológica y cultural, establecieron 9 viveros comunitarios que producen alrededor de 2 millones de plántulas por año obtenidas a partir de semilla proveniente de áreas naturales bajo manejo extensivo (silvestres) de la región y cuyo objetivo es el repoblación (Illsley et al., 2007).

Tabla 3. Especies con reportes de uso para mezcal. (Conabio, 2006; Colunga, 2006; Gentry, 1982).

Espece	Nombre común	Distribución
<i>A. angustifolia</i>	chelem (maya), doba-yej (zapoteco), hamoc (seri), juyacu (mayo), yavi incoyo (mixteco), amole, bacanora, maguey de campo, espadilla, espadín, mezcal, zapupe	Toda la Sierra Madre Oriental, Eje Neovolcánico, Sierra Madre del Sur, Península de Yucatán.
<i>A. salmiana</i> <i>ssp. crassispina</i>	Mbānuada (otomí), bronco, cimarrón, manso, verde.	Altiplano Zacatecano-Potosino, Sierra madre Occidental, Eje Neovolcánico y Depresión del Balsas y Sierra Madre del Sur.
<i>A. maximiliana</i>	Lechuguila, manso tecolote.	Sierra madre occidental y sierra madre oriental.
<i>A. duranguensis</i>	cenizo	Sur de la sierra madre occidental y oeste de Eje Neovolcánico
<i>A. inaequidens</i>	hocimetl (náhatl), lechuguilla.	Sur de la sierra madre occidental y oeste de Eje Neovolcánico Depresión del Balsas y Sierra Madre del sur.
<i>A. cupreata</i>	papalometl (náhuatl), yaabendisi (mixteco), ancho, cimarrón maguey de mezcal, paplote, tuchi.	Depresión del Balsas.
<i>A. potatorum</i>	biliá, dob-bé, bob-lá (zapoteco), papalometl (náhuatl), y auiticushi (mixteco), maguey de monte.	Depresión del Balsas y Noreste de Sierra Madre del sur.
<i>A. americana</i>	t' ax' uada (otomí), teometl (náhuatl), americano mezcal, serrano.	Norte de Sierra madre Oriental, sur del altiplano Zacatecano-Potosino y Sierra madre del sur oaxaqueña.
<i>A. karwinskii</i>	al-mal-bi-cuish (chontal), bicuixe, dob-cirial, madre cuixe, tobasiche (zapoteco), cachutum (popoloca), barril, cirial	Zona central de la Sierra madre del sur en Oaxaca.
<i>A. rhodacantha</i>	quixe, mexicano, mezcal, maguey de monte.	Desierto sonorense, costa del pacífico
<i>A. lophanta</i>	estoquillo, lechugilla, mezortillo	Vertiente al Golfo de la Sierra Madre Oriental
<i>A. tequilana.</i>	tequila (nada más).	Cultivada.
<i>A. marmorata</i>	du-cual (zapoteco), pitzometl (náhuatl), maguey de caallo, curandero, tepezate.	Sierra Madre del Sur.
<i>A. americana</i> <i>var. oaxaquensis</i>	dua-bzog (zapoteco), yavi cuan (mixteco), arroqueño, blanco, castilla cenizo, maguey de coyote, de pulque, de rayo sierra negra	Valle de Tehuacán y extremo oriental e la cuenca del balsas.
<i>A. funkiana</i>	Henequén, Ixtle de Jaumavé, Lechuguilla,	Sierra Madre Oriental.
<i>A. hookeri</i>	Ixquitécatl (náhuatl), Mezcal Bravo,	Depresión del Balsas.
<i>A. kerchovei</i>	Cacalla, tunecho de cacaya, Cachrojá (popolca), Duba-gu (zapoteco), Ixtle amarillo, lechuguilla dura, maguey de conejo, maguey de pasmo, maguey escobeta, maguey jabal, maguey lechuguilla dura, pasmo, tunecho de ixcle.	Sierra madre del sur, porción oriental del eje Neovolcánico y sur de Sierra Madre Oriental.
<i>A. palmeri</i>	Agave de palmeri, chino bermejo, lechuguilla, mano larga	Desierto sonorense.
<i>A. scabra</i>	Con ċ, Con ċi ě' opak (Tzeltal), Lamparillo o Lampotillo, Lechuguilla, Maguey bruto, Maguey cenizo. Maguey de cerro, Maguey mezcal, Maguey serrano,	Desierto Chihuahuense. ¿hasta sierra madre del sur?
<i>A. seemanniana</i>	Maguey chato	Chiapas a Nicaragua.
<i>A. shrevei</i>	Mahí totosa, Totosá, Tosali u O'tosák, Mé (Raramuri), Bacanora, Ceniza, Lechugilla	Sonora y Chihuahua-Sonora.

LA GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN

Durante millones de años, las fuerzas evolutivas han generado, modificado, seleccionado y combinado toda la diversidad de formas de vida que conocemos en el planeta a partir de unos pocostipos celulares originales. La desaparición o reducción de poblaciones específicas de organismos también se ha presentado de forma natural acompañando los procesos de formación de nuevas especies; sin embargo, ningún ser viviente conocido ha tenido tanto impacto en la diversidad como el hombre, ya sea por eliminación directa, por modificación, fragmentación, eliminación del hábitat o mediante la domesticación y selección artificial (Vida, 1994; Mace et al., 1996; Eguiarte y Piñero, 1999; Conner y Hartl, 2004).

La biología moderna brinda herramientas muy poderosas¹² que permiten cuantificar conceptos complejos como diversidad y evolución, una de ellas es la genética molecular. Los genes constituyen los reservorios de información actual, pasada y futura de los diversos fenotipos que constituyen la diversidad y sobre los cuales actúan los diferentes mecanismos de la evolución como son la mutación, la selección, la migración, la deriva, y la endogamia, generando, moldeando, seleccionando o eliminando todas las variantes de vida que hoy observamos. El estudio y comprensión de sus patrones de variación permiten identificar componentes específicos o puntos de riesgo para la preservación de una especie, particularmente aquellas que se encuentran en riesgo de extinción o bajo intenso manejo humano. La Tabla 4 muestra los valores de diversidad medida en heterocigosis esperada y polimorfismo para diversas especies que se encuentran en algún estatus de conservación. (Mace et al., 1996; Loeschcke et al., 1994).

Como ejemplo de lo anterior, se pueden mencionar los trabajos de Vrijenhok (1994) quien observó una correlación directa entre la diversidad genética (estimada mediante polimorfismo de isoenzimas) y la mortandad, tasa de crecimiento, fecundidad y estabilidad de desarrollo de poblaciones de peces del género *Poecilopsis*, en la que los individuos heterocigos presentaban mayor adecuación que los homocigos. Los trabajos de Scher (1996), documentaron una fuerte estructuración local con altos niveles de homocigosis en poblaciones silvestres de *Taxus brevifolia* (especie de la que se obtiene taxol, un agente anticancerígeno y cuyos tamaños de poblaciones silvestres están en declive), ocasionado por la propagación clonal de plantaciones y fragmentación del hábitat. Los trabajos de Hoelzel et al., (1993) determinaron que la ausencia de variación genética en el elefante marino (*Mirounga angustirostrus*) es debida a un intenso cuello de botella (a 10 individuos) ocurrida en el pasado. Savolainen (1994) encontró altos niveles de depresión por endogamia en diversas especies de *Pinus*, que podrían poner en riesgo la existencia de sus poblaciones.

¹² Aunque no omnipotente.

Tabla 4. Heterocigosis (He) y porcentaje de loci polimórficos (%P) de especies en riesgo o algún estatus de conservación. Modificado de Eguiarte y Piñero (1999).

Especie	Marcador	No. loci	He	% P	Nota
<i>Mirounga angustirostris</i> ¹	Isoenzimas	21	0.0	0.0	Elefante Marino. Solo quedaban 20 en 1890 en California y en México (Bonell y Selander, 1974. Science, 184(4139):908-909.)
<i>Acinonyx jubatus</i>	Isoenzimas	47	0.0	0.0	Cheeta. Solo quedaban entre 1500 y 25000 en Sud África en 1983. (O'Brien et al., 1983. Science, 221(4609):459-462. En: Eguiarte y Piñero (1990).)
<i>Cryosplenium iowense</i>	Isoenzimas	18	0.0	0.0	Hierba endémica y relictual de Canadá. (Schwartz 1985. Can. J. Bot. 63(11):2031-2034.)
<i>Lisianthus skinneri</i>	Isoenzimas	6	0.032	13.1	Arbusto endémico de Guatemala a Panamá que se autopolinizan y pasaron por cuello de botella reciente. (Sytsma y Schaal, 1985. Evolution. 39(3):582-593.)
<i>Pinus torreyana</i>	Isoenzimas	25	0.00	0.00	Pino endémico. Cuello de botella reciente, quedaban 3400 en 1973 en California. (Ledig y Conkle. 1983 37(1):79-85.)
<i>Pedicularis furbishiae</i>	Isoenzimas	18	0.00	0.00	Hierba perenne, endémica a un valle del noreste de E.U. y en peligro de extinción. (Waller, O'Malley y Gawler, 1987. Cons. Biol. 1(4):335-340.)
<i>Lacandonia schismatica</i>	Isoenzimas	18	0.00	0.00	Especie rara, microendémica y relictual de la Selva Lacandona en México (Coello, Escalante y Soberón. 1993. Ann. of Miss. Bot. Gar. 80(4):898-901.)
<i>Ceriops decandra</i>	ISSR	11	0.25	72	Integrante de Mangles tropicales. Poblaciones bajo explotación intensa en islas filipinas cuyas poblaciones se intenta recuperar. (Tan et al., 2005)
<i>Megacodon stylophurus</i>	ISSR	13	0.08	11.2	Hierba perenne alpina de distribución restringida al Himalaya (Ge et al., 2005)
<i>Hesperozygis ringens</i>	ISSR	9	0.16	2.6	Arbusto endémico de Rio Grande do Sul Brasil en peligro de extinción por su sobreexplotación como planta medicinal (Fracaro y Echeverry garay, 2006)
<i>Hagenia abyssinica</i>	ISSR	15	0.30	73	Árbol tropical considerado como en peligro en Etiopía por su sobreexplotación para extracción de fármacos (Feyissa et al., 2007)
<i>Nouelia insignis</i>	ISSR	11	0.14	63.5	Arbusto endémico de china que se encuentra en peligro de extinción por destrucción de su hábitat (Shanshan et al., 2006)
<i>Cycas guizhouensis</i>	ISSR	11	0.06	14-21	Cícada endémica del sudeste de china en peligro de extinción por destrucción de su hábitat (Long Qian, et al., 2004)
<i>Cupressus chengiana</i>	ISSR	10	0.31	98.5	Árbol endémico de China cuyas poblaciones se encuentran en declive por su extracción como madera (Bingqing et al, 2006)
<i>Pinus squamata</i>	ISSR	17	0.03	12.3	Especie de pino en endémico de china en peligro de extinción. quedan 32 individuos. (Zhi Yong et al., 2005)

Dentro de las principales causas genéticas que pueden presentar algún riesgo para el desarrollo de una población podemos mencionar: la eliminación o disminución de la variación (la cual es condición indispensable para conservar los procesos evolutivos), la sobre expresión de genes recesivos deletéreos o letales, los cambios en las frecuencias alélicas por deriva génica aún en contra de los que se mantendrían por selección natural, el reemplazo de genotipos adaptados por el de una clona con menor adaptación al ambiente, o el cambio de pico adaptativo generado por exceso de flujo génico con una población de menor adecuación (Soulé, 1985; Vida, 1994; Allendorf y Luikart, 2007; Mace et al., 1996; Eguiarte y Piñero, 1999).

A. tequilana aparenta no presentar ningún problema de conservación ya que sus poblaciones cubren grandes extensiones de territorio en el estado de Jalisco; sin embargo, los estudios de diversidad genética realizados en la especie (ver arriba), indican niveles de polimorfismo de 0.8% o 26% (dependiendo del

marcador molecular Gil-Vega, 2001 y 2006, respectivamente) y de heterocigosis de 0.08 (Vargas-Ponce, 2007) valores equiparables (o incluso menores) a los reportados con ISSR's en especies bajo algún estatus de conservación (Tabla 4).

Si bien no existe ningún estudio que reporte depresión por endogamia o de tamaños poblacionales pequeños, en *A. tequilana* sí existe el caso de pérdida de cultivos completos por propagación clonal de genotipos susceptibles a enfermedades. Valenzuela-Zapata y Nabhan (2003) reportan que en 1988 en la región de Tequila, Jalisco, “corrió el rumor de una de las plagas más agresivas nunca antes vista en la región, conocida como el anillo rojo” (enfermedad ocasionada por el hongo ascomicete *Fusarium sp*) que para mediados de los 1990's dejó de ser un rumor y acabó con más del 20% de las plantaciones de *A. tequilana* llevando a un peligroso extremo la ya reducida existencia de esta planta¹³. Actualmente se cree que la intensidad de esta epidemia fue debida a la propagación clonal masiva de un genotipo susceptible al patógeno (Valenzuela-Zapata, 1995, 2003, 2007)

En un breve análisis forestal sobre la capacidad atrayente de plagas de distintas especies e individuos de *Agave* mezcalero realizado por el INIFAP, en Oaxaca (Espinoza Paz et al., 2005), encontraron que las diferentes especies, variedades e individuos presentan distinta capacidad atrayente de insectos, bacterias u hongos, lo que podríamos interpretar como un indicio de susceptibilidad de genotipos particulares a las enfermedades que se presentan en *Agave*. Por su parte, López Sánchez (1989), analizó las enfermedades que afectan los cultivos de *A. angustifolia* y *A. americana* en Tlacolula Oaxaca y reportó cuando menos 8 enfermedades y 10 especies de hongos ascomicetes (entre ellos *Fusarium sp*), enterobacterias, e insectos que las ocasionan (López-Sánchez, 1989; Espinoza-Paz et al., 2005) .

LOS MARCADORES MOLECULARES

Actualmente la biología usa una serie de marcadores moleculares específicos o generales, de muy diversas metodologías (basados en PCR, en secuenciación, en electroforesis, en radioactividad, en inmunoactividad, etc.), para el estudio del material genético de los individuos. La selección del marcador molecular es decisiva en un estudio genético, pues según la naturaleza de éste, podrán apreciarse aspectos particulares de los datos y de la historia que presentan. Los marcadores no codificantes del genoma son de interés en los estudios de conservación, pues al no estar implicados en la codificación de caracteres en este momento “útiles” a los organismos, son la materia prima de la evolución futura de los organismos (Eguiarte y Piñero, 1990; Futuyma, 1998; Conner y Hartl, 2004).

¹³ Esta epidemia junto con la eliminación de diversas plantaciones por razones económicas (aumenta la venta de tequila y las destiladoras comienzan a pagar menos a los productores quienes deciden abandonar sus plantaciones) generó la llamada “Crisis del Tequila”, término que después se utilizó para referirse a la crisis generada por el gobierno mexicano zedillista en 1994 al devaluar el peso a menos de la mitad de su valor.

Una de las familias de marcadores no codificantes es la de variación anónima de secuencia arbitraria, que se basan en el uso de un iniciador aleatorio a partir del cual se amplifica una región completa del ADN. Según Karl (1996), estos marcadores presentan varias ventajas para el análisis de la variación: muestrean loci distribuidos aleatoriamente por el genoma, lo que permite en teoría tener la representación de la variación genética total de una población; generan una gran cantidad de información a partir de un bajo esfuerzo de realización; su naturaleza aleatoria permite obtener datos de regiones bajo selección, neutrales pero ligadas a regiones sujetas a selección o regiones estrictamente neutrales y son aplicables a prácticamente todas las especies. Un estudio típico realizado a partir de marcadores arbitrarios resulta en la obtención de dos o más alelos de varios loci para cada individuo (Karl, 1994).

Tabla 5. Resumen de algunos marcadores moleculares utilizados en genética de poblaciones

Marcador	Polim.	Dom/ Codom	Descripción	Referencia
RAPD (Randomly Amplified Polymorphic ADN)	Alto	Dom	Se extrae ADN, y mediante PCR se amplifican primers totalmente aleatorios (ya estandarizados) de aprox. 20 pb que se visualizan mediante electroforesis en geles de agarosa.	Enrech, 2000
RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms)	Bajo	Cod.	Se extrae ADN y se corta con enzimas de restricción cuyos productos se visualizan mediante electroforesis en geles de agarosa.	Vos et al., 1995
AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)	Altísimo	Dom.	Se extrae ADN y se corta con enzimas de restricción. Los fragmentos se ligan con adaptadores (estandarizados) y se amplifica mediante PCR fragmentos específicos con primers (estandarizados) diseñados a partir de la secuencia de restricción o de adaptación. Los productos de amplificación se visualizan con geles de agarosa mediante electroforesis	Mueller y Wolfanbarger, 1999
Microsatélites ó SSR (Simple Sequence Repeated)	Alto	Cod.	Un microsatélite es una región no codificante del ADN. Se extrae ADN nuclear o de organelos. Se diseñan primers específicos de di, tri, tetra o penta nucleótidos repetidos de aprox. 6 pb conforme a la secuencia del organismo a analizar que se amplifica mediante PCR y se visualizan mediante geles de poliacrilamida o en secuenciador.	Chambers y MacAvoy, 2000
Minisatélites	Medio	Cod.	Regiones no codificantes del ADN más pequeños que los microsatélites de 10 a 100 pb de dinucleótidos repetidos. Se extrae ADN nuclear o de organelos. Se diseñan primers específicos de di, tri, tetra o penta nucleótidos repetidos de aprox. 6 pb conforme a la secuencia del organismo a analizar que se amplifica mediante PCR y se visualizan mediante geles de poliacrilamida o en secuenciador.	
ISSR (Inter Simple Sequence Repeated)	Alto	Dom.	Se extrae ADN y se amplifica mediante PCR con primers cortos de aproximadamente 14 di tri o tetra nucleótidos repetidos diseñados a partir de secuencias de microsatélite. El producto de amplificación se visualiza en geles de agarosa mediante electroforesis.	Wolfe, 2005
Secuenciación	Total	Cod. (2n) Dom. (n)	Representa uno de los mejores métodos pues brinda la secuencia exacta del locus analizado, sin embargo requiere del diseño de iniciador es específicos para el locus a secuenciar y su costo es moderado a alto.	
Isoenzimas	Medio	Cod.	Este método fue el primero en desarrollarse y ha sido ampliamente utilizado. Consiste en correr mediante electroforesis las distintas variantes de una proteína para describir las variantes.	

En la Tabla 5 mostramos un resumen de algunos de los marcadores moleculares de mayor uso en genética de poblaciones. De los marcadores más utilizados en conservación y genética de poblaciones podemos mencionar los microsatélites, que son regiones neutras (materia de evolución), con suficiente variación como para diferenciar dos individuos de la misma población, sin embargo, al ser específicos

requieren de la determinación precisa de la secuencia del iniciador, lo que puede constituir un proceso largo y costoso. Otro marcador muy utilizado son las isoenzimas, sin embargo, pueden subestimar la variación, ya que las proteínas suelen estar bajo selección purificadora, además de constituir una técnica laboriosa que requiere de mucho trabajo de laboratorio; los RAPDS (Random Amplified Polymorphic ADN) fueron utilizados durante mucho tiempo, sin embargo constituyeron una técnica de difícil reproducibilidad, lo que dificultaba la repetición de los resultados. Los RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) son marcadores utilizados principalmente cuando no es posible detectar variación con otros marcadores, pues resultan en una cantidad sorprendentemente alta de polimorfismo; sin embargo la lectura de los geles resultantes puede ser muy difícil debido a la inmensa cantidad de variación. Los ISSR (Inter Simple Sequence Repeated), son un marcador de bajo costo, fácil estandarización y elaboración y con alta reproducibilidad que proporcionan suficiente variación como para análisis de genética de poblaciones; sin embargo, al ser de naturaleza dominante¹⁴ requiere de la suposición de equilibrio Hardy Weinberg en la determinación de las frecuencias alélicas e imposibilita el cálculo de diversos parámetros evolutivos.

LOS ISSR

La técnica ISSR fue desarrollada por Zietkiewicz y colaboradores del Service de Génétique Médicale de Montreal, Canadá en 1993 (Zietkiewicz, 1994). Es un método sencillo, rápido y de bajo costo, basado en la amplificación selectiva, mediante PCR de regiones inter microsatélite, tomando como iniciadores secuencias de 16 a 25 pb de di, tri, tetra o penta nucleótidos repetidos (Figura 6). Pueden estar o no anclados en su extremo 3' o 5' mediante 1 a 4 bases degeneradas y segregan como marcadores dominantes siguiendo herencia mendeliana simple (Zietkiewicz et al. 1994; Bornet y Branchard 2001; Pradeep et al. 2002; Wolfe 2005).

Debido a que estos marcadores amplifican regiones aleatorias del genoma, la identificación de frecuencias genotípicas resultantes no puede ser directa. La existencia o no de una secuencia complementaria a nuestro iniciador de PCR en el ADN del organismo se refleja en la presencia o ausencia de una banda en gel de agarosa. De esta forma, suponiendo diploidía y dominancia¹⁵ de la presencia sobre la ausencia de una banda, la ausencia es interpretada como un fenotipo de tipo recesivo codificada por un genotipo del tipo ausencia-ausencia mientras que la presencia de la banda puede ser interpretada como un heterócigo (presencia-ausencia) o como un dominante (presencia-presencia). Debido a que en caso de presencia no se puede distinguir al heterócigo del dominante se utiliza la frecuencia del genotipo recesivo

¹⁴ En los marcadores dominantes no se puede distinguir el fenotipo heterócigo del homócigo dominante, por lo que el cálculo de frecuencias alélicas se realiza asumiendo equilibrio de Hardy Weinberg mediante la raíz cuadrada de la frecuencia del genotipo recesivo.

¹⁵ Debido a este supuesto, es que a este tipo de marcadores se les conoce genericamente como "Marcadores Dominantes".

para determinar, a partir de las proporciones en Hardy-Weinberg, las frecuencias alélicas

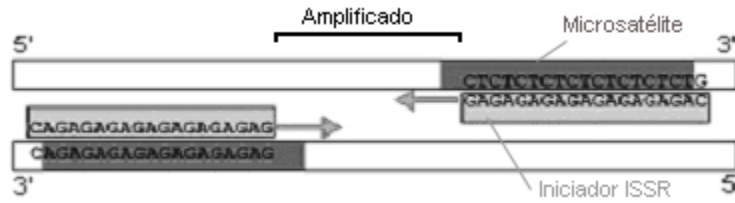


Figura 6. Esquema de amplificación de ISSR. Los iniciadores de ISSR (gris claro), presentan una secuencia complementaria a microsatélite (gris oscuro) por lo que durante el PCR se alinean al inicio (con anclaje en el extremo 3' como en el gráfico) o al final (con anclaje en 5') del microsatélite, amplificando la región ubicada entre dos microsatélites.

OBJETIVOS

Los agaves son un grupo de plantas que se distribuyen principalmente en México, de origen muy reciente que muestran una gran diversificación. La producción de mezcal depende de la extracción y procesamiento del tallo y bases foliares (cuerpo) de estas plantas antes de la formación de sus flores y generalmente a partir de poblaciones silvestres. El aumento en la demanda del producto podría poner en riesgo a las poblaciones de *A. cupreata* y *A. potatorum* dado que estas dependen exclusivamente de la reproducción sexual para reproducirse. Es por esto que en el presente trabajo se definieron los siguientes objetivos:

- Conocer y analizar los niveles de variación y estructuración genéticas dentro y entre las poblaciones de dos especies de *Agave* ampliamente utilizadas para la elaboración de mezcal en los estados de Guerrero y Oaxaca: *A. cupreata*, y *A. potatorum*
- Estimar las distancias genéticas que separan a las especies y sus poblaciones y esclarecer sus relaciones de similitud.
- Comparar el efecto que tiene el manejo humano (mediante viveros) en la variación genética de poblaciones silvestres de *A. cupreata*.
- Generar información básica necesaria sobre la genética de la conservación del germoplasma de *A. potatorum* y *A. cupreata*.
- Interpretar estos datos en función de la biología e historia del grupo así como de los impactos a futuro que pueden traer su explotación para que sean incorporados a nuevos planes de manejo en beneficio tanto de la industria local mezcalera como de la conservación de estas especies.

METODOLOGÍA

SELECCIÓN DE MUESTRAS

De las especies utilizadas para la elaboración de mezcal, se escogieron *A. cupreata* y *A. potatorum* por diversas razones: se contaba con muestras procedentes de viveros de *A. cupreata* de la organización campesina Sansekan Tinemy cuya comparación con las poblaciones silvestres de procedencia aún no había sido realizada y el laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología de la UNAM contaba con una vasta colección de tejido congelado.

Utilizando como referencia los datos de distribución potencial para la especie elaborados por Conabio (2006), y los datos de registro de herbario existentes para las especies en el Herbario Nacional (UNAM), se utilizaron siete muestras de *A. cupreata*: tres provienen de plantaciones en viveros del estado de Guerrero (C1 “Vivero Ayahualco”, C4 “Vivero La Esperanza” y C5 “Vivero Trapiche Viejo”), tres de poblaciones silvestres de el mismo estado (C2 “Ayahualco”, C10 “Mesones” y C13 “La Laguna”) y una silvestre en Michoacán (C14 “Etúcuaro”), que representa la distribución más al norte de la especie. Para *A. potatorum* se seleccionaron ocho poblaciones silvestres: una en el estado de Puebla (P13 “Azumbilla”) que representa la población más norteña, y las demás en el estado de Oaxaca (P11 “Zapotitlán”, P12 “Tequistepec”, P4 “Sn. Dionisio”, P6 “Albarradas”, P7 “Miahuatlán”, P9 “Sta. Catarina” y P10 “Yanhuitlán”) (Tabla 6 y Figura 7).

Cabe mencionar que siete de las poblaciones estudiadas (P11, P12, C1, C2, C4, C5, C10) se ubican en el área de intersección de las distribuciones potenciales de ambas especies, dos de ellas (las más lejanas) C14 y P13 fuera del área de denominación de origen Mezcal. En los alrededores de la población P10 “Yanhuitlán” se encontraron hornos para cocinar maguey que datan de 2000 a.c. (Winter, 2004) y en cuevas de Tehuacán Puebla (cercana a las poblaciones P13 y P12) Callen (1965) reporta coprolitos humanos con restos quemados de *Agave* que datan de 7000 a 1500 a.c.

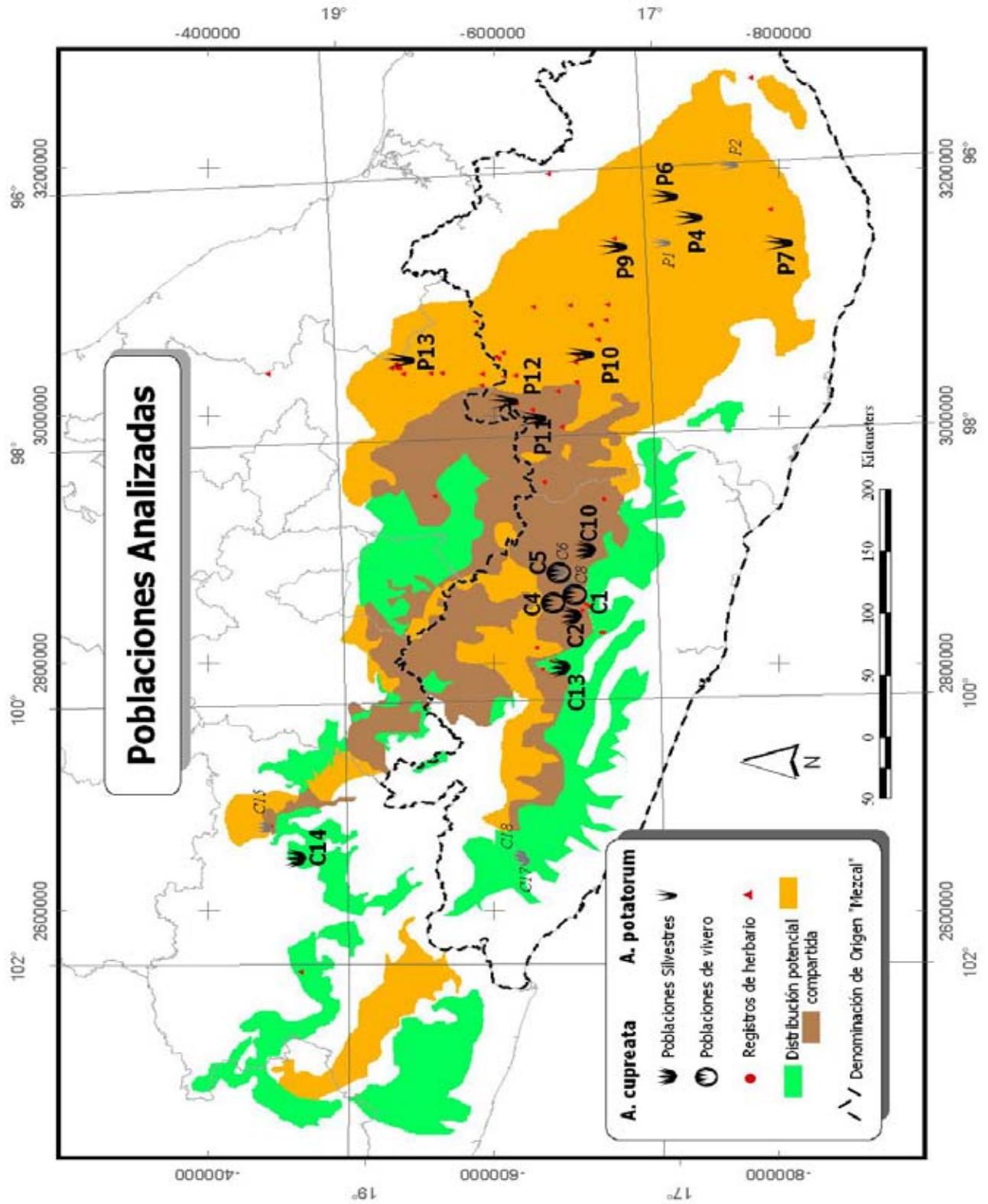


Figura 9. Ubicación de las Poblaciones analizadas y de otras reportadas. En fondo de color se muestran las distribuciones potenciales para cada especie. Los puntos grises indican poblaciones colectadas pero por la calidad del ADN obtenido se tuvieron que eliminar.

Tabla 9. Poblaciones utilizadas en el estudio

	Localidad	Ubicación	Latitud N	Longitud O	Altitud (msnm)
C1	Vivero Ayahualco	Chilapa, Guerrero	17° 37' 40.5"	99° 11' 25.0"	1443
C4	Vivero La Esperanza	Chilapa, Guerrero	17° 45' 53.2"	99° 14' 52"	1600
C5	Vivero Trapiche Viej	Chilapa, Guerrero	17° 43' 20.5"	99° 01' 07.4"	1082
C2	Ayahualco	Chilapa, Guerrero	17° 37' 00"	99° 11' 0.5"	1542
C10	Mesones	Tlapa, Guerrero	17° 32' 37"	98° 51' 48.1"	1852
C13	La Laguna	Xochipala, Guerrero	17° 43' 29.3"	99° 44' 52.7"	1997
C14	Etúcuaro	Villa Madera, Michocán	19° 25' 07.7"	101° 11' 28.3"	1792
P4	Sn. Dionisio	Sn. Dionisio Ocoteppec, Oax.	16° 48' 45.0"	96° 20' 53.5"	1893
P6	Albarradas	Sn. Lorenzo Albarradas, Oax.	16° 57' 54.3"	96° 10' 35.1"	1769
P7	Miahuatlán	Sto. Tomás Tamazulapa, Oax.	16° 15' 15.9"	96° 33' 36.9"	1900
P9	Sta. Catarina	Sta. Catarina, Oax.	17° 18' 0.5.1"	96° 32' 52.7"	2064
P10	Yanhutilán	Sto. Domingo Yanhuitlan, Oax.	17° 32' 13.4"	97° 21' 26"	2244
P11	Zapotitlán	Zapotitlán Palmas, Oax.	17° 51' 21"	97° 49' 47"	2059
P12	Tequistepec	Sn. Pedro y Pablo Tequistepec, Oax.	18° 01' 54.9"	97° 41' 34.7"	2096
P13	Azum billa	Chapulco, Puebla	18° 40' 36.3"	97° 21' 26.6"	2174

EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES

El ADN se obtuvo mediante el protocolo Miniprep de Doyle y Doyle (1987) modificado por Vázquez Lobo (1996) (Apéndice III). Debido a la gran cantidad de azúcares, proteínas y compuestos secundarios que tienen las hojas de *Agave*, así como por el estado de conservación en que se encontraban las muestras, las muestras que así lo requerían se limpiaron mediante alguno de los siguientes métodos: molido con micro-perlas de vidrio, limpieza con proteinasa K o RNAsa, y lavados con cloroformo:octanol, cloroformo:octanol:fenol o fenol:cloroformo o variación del tiempo de precipitación con cloroformo:octanol de 2 a 24 horas según la apariencia de cada una de las muestras.

Originalmente se extrajeron un total de 4 poblaciones de vivero y 8 silvestres de *A. cupreata* y 10 de *A. potatorum*; sin embargo, la calidad del ADN (observada mediante geles de agarosa) no fue la adecuada para una buena amplificación en todos los casos, por lo que estas poblaciones (C8vivero, C6, C15, C17, C18, P1 y P2) no se pudieron considerar en el presente estudio (símbolo gris en Figura 7).

Se estimó la cantidad de ADN de las muestras mediante un biofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf) y se corrieron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio para corroborar su cantidad (Figura 8).

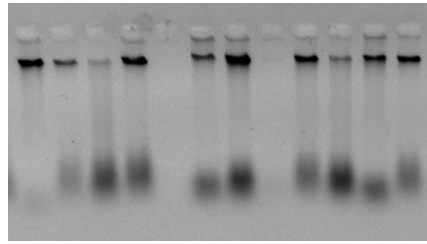


Figura 10. Fotografía de 3 μ l de ADN total en gel de agarosa con bromuro de etidio.

A partir de los programas de amplificación de PCR para ISSR's en Agaves reportados por Aguirre Dugua (2004), Rocha Munive (2006) y González González (2005), se realizaron curvas para las variables de PCR (cantidad y concentración de Mg, dNTP's, iniciador y ADN así como de tiempos y temperaturas de alineación y extensión) de 6 iniciadores aleatorios de ISSR elaborados por el instituto de biotecnología de la UNAM: 846 (CA)₈RT, 857 (AC)₈YC, 853 (TC)₈RT, 811 (GA)₈C, 841 (GA)₈YC y 842 (GA)₈YG De estos iniciadores se escogieron los cuatro que resultaron con mayor número de polimorfismo y mayor nitidez de banda (811, 857, 841, 846, Tabla 7).

Tabla 10. Iniciadores de ISSR utilizados.

811 (GA) ₈ C	GAG AGA GAG AGA GAG AC
841 (GA) ₈ YC	GAG AGA GAG AGA GAG AYC
857 (AC) ₈ YC	ACA CAC ACA CAC ACA CYC
846 (CA) ₈ RT	CAC ACA CAC ACA CAC ART

Los programas y condiciones finales de amplificación utilizados se pueden ver en la Tabla 8:

Tabla 11. Condiciones de reacción (izquierda) y programa de amplificación de PCR (derecha) para los 4 iniciadores de ISSR utilizados.

Reactivo	[final] Iniciadores		Iniciación	94° C	4 min.
		811 y 857	841 y 846	Desnaturalización	94° C
Buffer 10X	1X		Alineación	54° C - 846 53° C - 857 51° C - 811 52° C - 841	50 seg.
MgCl 30mM	1.5 mM	2 mM	Extensión	72° C	2 min.
dNTP 2.5 mM % _u	0.2 mM		Finalización	72° C	5 min.
Iniciador 10 uM	0.5 uM		Reposo	4° C	- - -
Taq pol	1 U				
ADN	20 ng /ul				

Los productos de PCR se corrieron por electroforesis en geles de 190 ml de agarosa al 2% en

buffer TAE a 180 volts con un marcador de peso molecular de 100 pb (invitrogen). Los geles se revelaron con bromuro de etidio a 1 µg/ml y se fotografiaron digitalmente mediante transiluminación ultravioleta.

ANÁLISIS DE LOS DATOS

La lectura de los geles se realizó manualmente con ayuda del programa Gel Compare (V. 5.10, Applied Maths), el cual facilita la lectura de los geles al permitir “enderezar” y alinear todos los carriles con muestra de diversos geles en una sola imagen, permite asignar loci manualmente, y genera una matriz de presencia/ausencia de los loci ingresados.

La alineación de los geles se realizó utilizando como referencia los ladder y las bandas más gruesas y menos polimórficas. Ante la dificultad de diferenciar entre un locus muy grueso y dos o más loci muy pegados, se siguió el criterio precautorio de obtener el menor número de loci, de forma que dos o más loci muy cercanos en peso molecular no fueron asignados a loci distintos a menos que hubieran aparecido simultáneamente en una sola muestra. La naturaleza del individuo analizado, el proceso de extracción y de amplificación, así como la tinción con bromuro de etidio, son todos factores metodológicos que pueden afectar la intensidad de banda, por lo que las fotografías se leyeron una segunda vez con contraste digital. Las regiones extremas de los geles no se consideraron en el análisis debido a que las de menor peso pueden presentar variación generada por calentamiento durante el proceso de electroforesis¹⁸, o debido a la dificultad para diferenciar los loci por encima de los 2500 pb¹⁹.

De la matriz de presencias/ausencias de bandas se eliminaron los individuos para los cuales no se obtuvo la amplificación de dos o más iniciadores. A partir de la matriz depurada se calcularon para todos los individuos las frecuencia genotípica recesiva (ausencia de banda, Ecuación 1 en Apéndice IV) y de alelos recesivos (Ecuación 2 en Apéndice IV) siguiendo la corrección para marcadores dominantes de Lynch y Milligan (1994)

Se calcularon los parámetros básicos descriptivos de variación genética: frecuencias genotípicas (Ecuación 1 en Apéndice IV), frecuencias alélicas (Ecuación 2 en Apéndice IV), número de loci polimórficos (P) con el criterio del 95% (Ecuación 5 en Apéndice IV), y heterocigosis esperada (He) mediante la corrección de Lynch y Milligan (1994) (Ecuaciones 3 y 4 en Apéndice IV).

Se aplicó la prueba exacta de diferenciación (Raymond y Rousset 1995) para determinar si

¹⁸ Luego de 2hrs de correr, las cámaras de electroforesis pueden comenzar a calentarse y expandir el gel y ocasionando que algunas bandas (principalmente por debajo de los 100 pb) corran a mayor velocidad que otras.

¹⁹ Debido al tamaño de las cámaras electroforéticas y al tiempo de corrida, la región por encima de los 2500 pb puede no llegar a separarse totalmente.

existían diferencias significativas entre las frecuencias genotípicas observadas, utilizando el programa TFGA ver. 1.3. (Miller, 1997) indicando 1000 corridas previas de cadena larga (dememorization), 10 corridas de cadena corta (batches) y 2000 permutaciones por lote.

Se calculó el parámetro de coancestría theta θ equivalente a F_{ST} de Weir y Cockerham (1984) y sus intervalos de confianza mediante bootstrap utilizando el programa TFGA versión 1.3 (Miller, 1997) al que se le indicaron 5000 replicas con intervalo de confianza del 95%. Se calcularon los valores de estructuración para todos los pares posibles de poblaciones y se calculó el número efectivo de migrantes por generación (Nm) para cada uno de los pares (Ecuaciones 7, 8, 9 y 10 en Apéndice IV).

Se calculó el porcentaje de variación inter e intrapoblacional mediante la prueba de análisis de varianza molecular (AMOVA) (Excoffier, 1992) utilizando el programa Arlequin V. 2.0 (Schneider et al., 2000). Para este análisis fue necesario depurar la base de datos eliminando aquellos individuos a los que les faltaba la amplificación de algún marcador y se le indicó al programa las opciones de cómputo propio de las distancias genéticas a partir de diferencias pareadas.

Se calcularon las distancias genéticas entre las poblaciones mediante el algoritmo de Nei (1972) (Ecuación 11 en Apéndice IV) y se graficaron mediante el método UPGMA validando las ramas con 5000 permutaciones de bootstrap.

Se calculó el número de poblaciones más probables mediante el programa Structure V. 2.2 (Pritchard et al., 2000, Falush et al., 2003, 2007), para lo cual se realizó una corrida exploratoria de los datos sin probabilidades previas con 100,000 y 60,000 iteraciones “burning” y 100,000 iteraciones “post-burning” de cadena fría utilizando el modelo de mezcla de poblaciones con frecuencias alélicas correlacionadas entre poblaciones probando la probabilidad posterior de 1 a 15 agrupamientos con una repetición cada una con el objeto de determinar el tamaño de las iteraciones a utilizar (mediante la observación de los valores de likelihood, $\ln P_{(D)}$) (este análisis tardó 1.5 días*). Una vez determinado el número de las iteraciones se procedió a calcular el número de poblaciones más probables con el método de Evano et al. (2005), para lo cual se calcularon las probabilidades posteriores de $k=1$ a $k=18$ con 30 repeticiones cada una, 20,000 iteraciones “calientes” y 30,000 iteraciones “frías” bajo el mismo modelo que el paso anterior (este análisis tardó 5 días*). Finalmente, se procedió a calcular la probabilidad posterior de pertenencia a cada uno de los agrupamientos más probables indicando la probabilidad previa de pertenencia a población observada, modelo de ancestría de entrecruza (cada individuo puede portar una fracción de su genoma de alguna de las poblaciones k) con frecuencias alélicas correlacionadas (asume que las poblaciones k sufrieron deriva independiente a partir de frecuencias ancestrales) (este análisis tardó 1 día*).

* Se utilizó una computadora Intel Pentium (R) M a 1.8 GHz y 1GB de RAM bajo sistema operativo Linux.

Se calcularon los parámetros básicos de diversidad, estructura y distancia mencionados arriba para las agrupaciones de mayor verosimilitud obtenidas mediante el programa Structure (Pritchard, et al., 2000).

Las comparaciones entre medias (ANOVA, F, y T) así como las correlaciones simples se realizaron mediante el software Statgraphics plus 5.1 y el cálculo de las distancias geográficas entre las poblaciones así como los mapas incluidos en este trabajo se realizaron mediante el paquete Arc View V. 3.1.

RESULTADOS

LOCI POLIMÓRFICOS

A partir de las amplificaciones realizadas con los cuatro iniciadores de ISSR analizados se obtuvo un total de 90 loci polimórficos en ambas especies: 22 con el primer 811 (numerados del 1 al 22), 19 con el primer 846 (numerados del 23 al 41), 30 con el 857 (numerados del 42 al 71) y 19 con el 841 (numerados del 72 al 90) (Figuras 9 y 10).

FRECUENCIAS ALÉLICAS

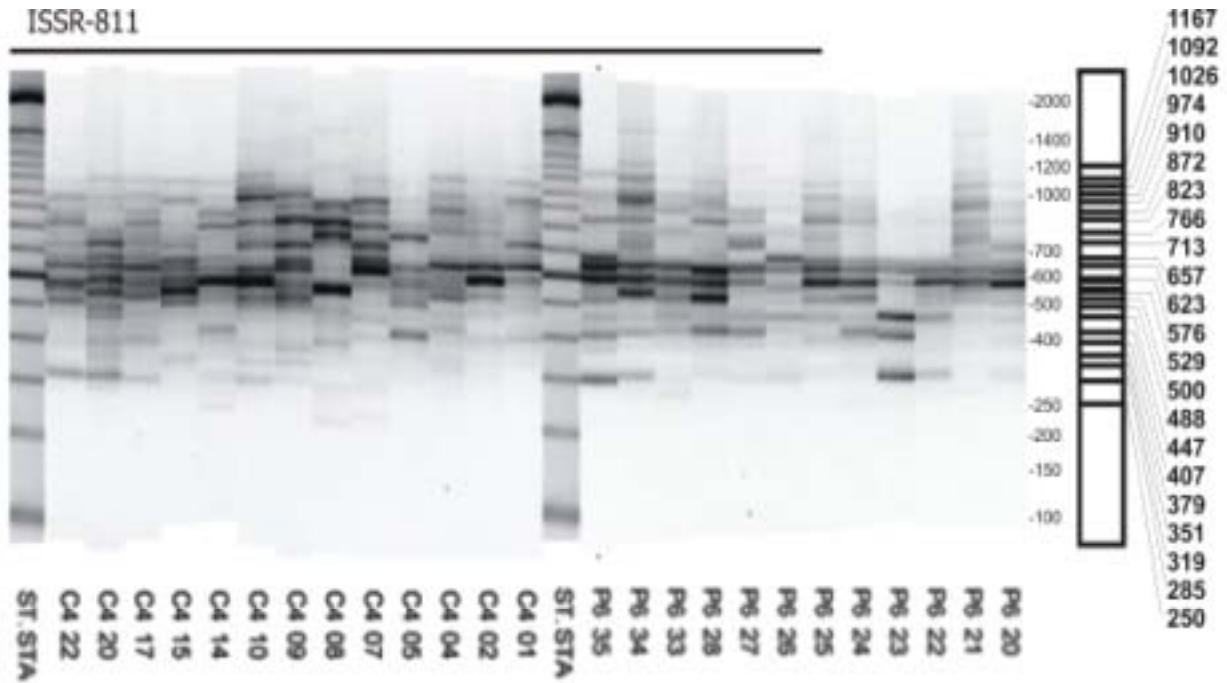
Las frecuencias alélicas, genotípicas y heterocigosis esperadas para cada uno de los loci para *A. cupreata* y *A. potatorum*, así como para cada una de las poblaciones puede consultarse en el Apéndice V.

La prueba exacta de diferenciación (Raymond y Rousset, 1995) mostró diferencias significativas en las frecuencias genotípicas de más de 30 loci en todas las comparaciones realizadas (en todos los casos $P_{(g.l.=180; a=0.05)} \ll 0.05$). Y de igual manera, todos los loci resultaron significativos en alguna de las comparaciones y 22 de ellos resultaron con significancia para todas las comparaciones (Apéndice VI).

Tabla 12. Prueba exacta de diferenciación de los 90 loci para los principales grupos a analizar. Todos los casos con $P_{(g.l.=180; a=0.05)} = 0.0000$

Comparación	No. de loci con $p < 0.05$
Entre poblaciones de <i>A. cupreata</i>	80
Entre poblaciones de <i>A. potatorum</i>	80
<i>A. potatorum</i> vs <i>A. cupreata</i> (sp.)	53
Vivero vs. Silvestre (<i>A. cupreata</i>)	39

a)



b)

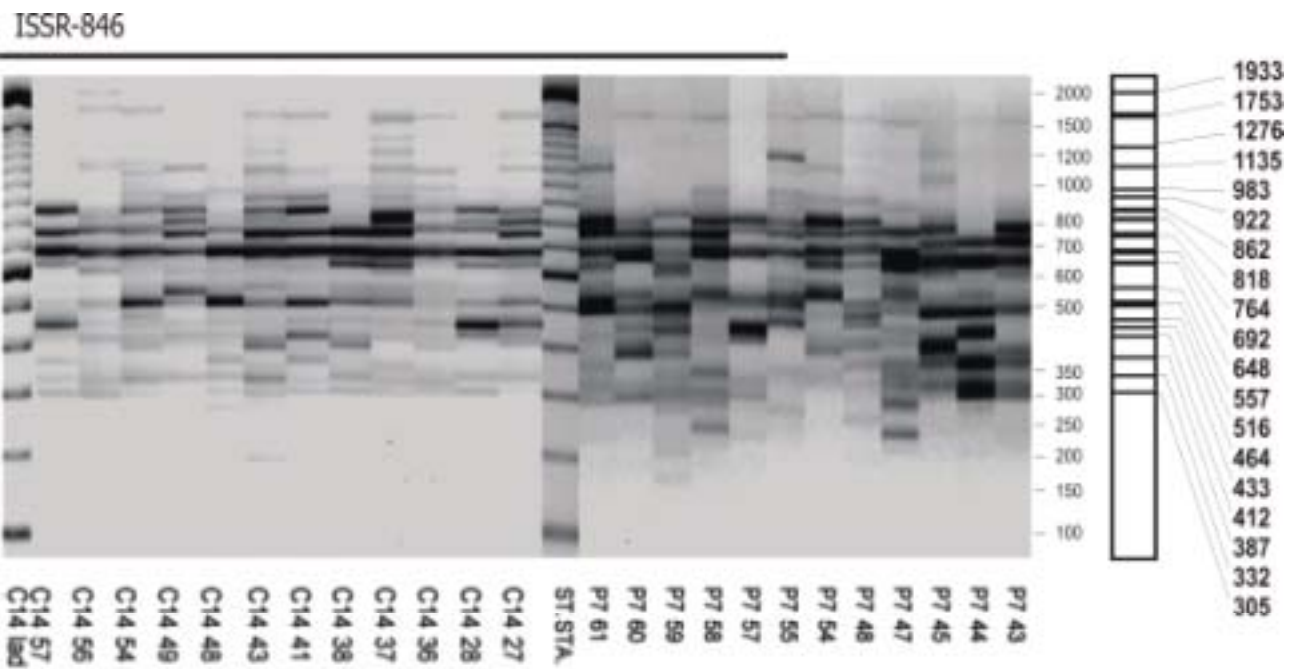
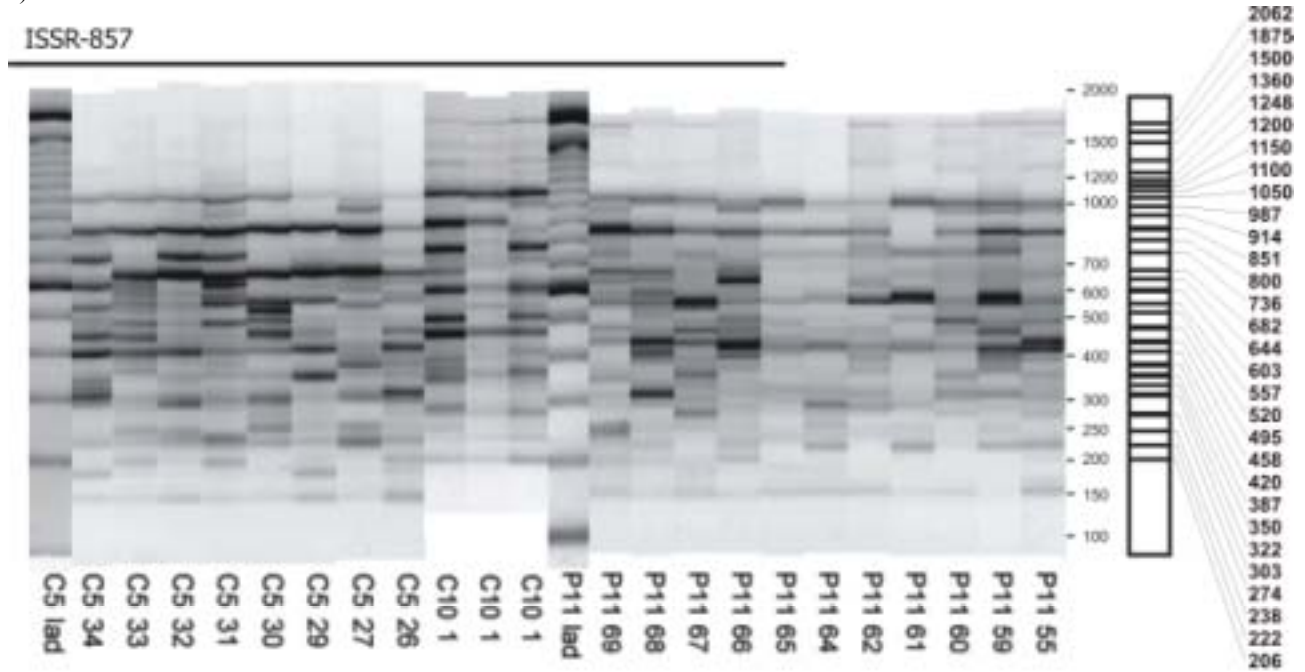


Figura 11. Loci amplificados con los iniciadores 811 (a) y 846 (b) en individuos de *A. cupreata* (C) y *A. potatorum*(P).Al inicio y enmedio se muestra el ladder de 100pb.

a)



b)

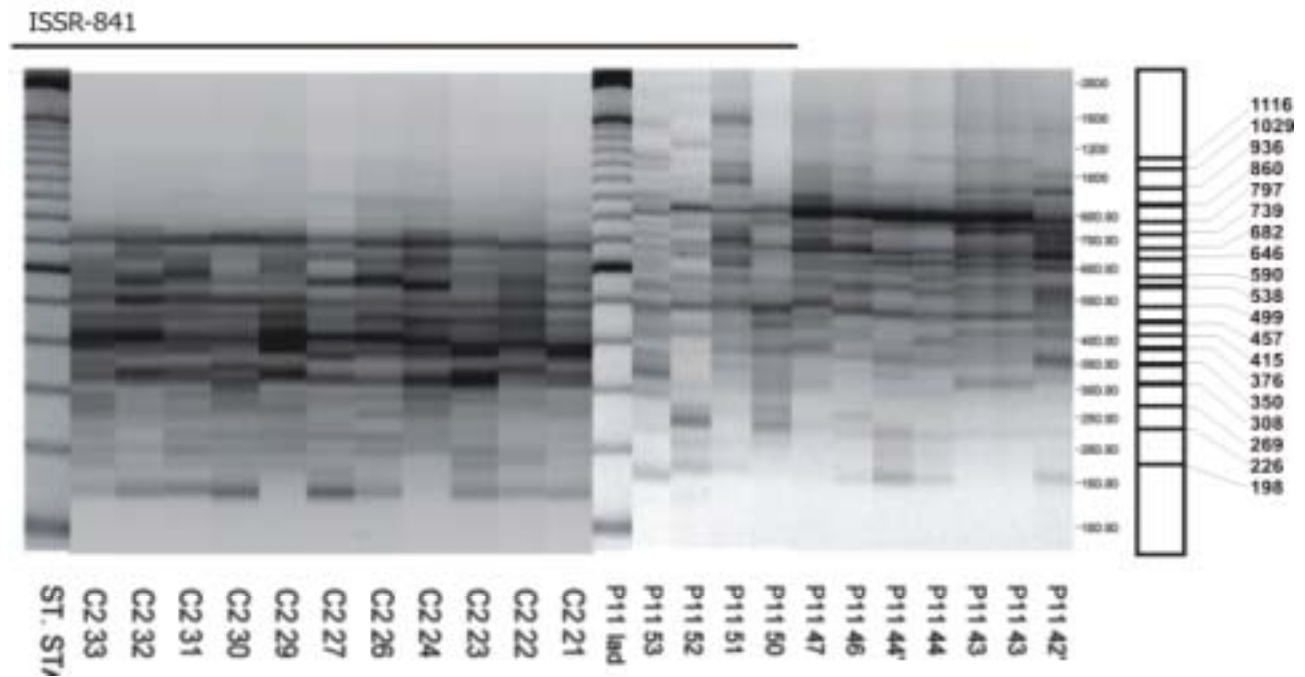


Figura 12. Loci amplificados con los iniciadores 857 (a) y 841 (b) en individuos de *A. cupreata* (C) y *A. potatorum*(P).Al inicio y en medio se muestra el ladder de 100pb.

La prueba exacta de diferenciación para todos los pares de poblaciones posibles a comparar también mostró diferencias significativas en todas las combinaciones ($P_{(g.l.:180;a=0.05)}=0.0000$). Las poblaciones presentan promedios mayores de 32 loci con diferencias significativas. La comparación de las poblaciones de *A. cupreata* y las de *A. potatorum* mostraron diferencias significativas en 53 loci (10 de 811, 9 de 856, 18 de 857 y 16 de 811); la comparación de viveros (C1v, C4v, C5v) contra silvestres (C2, C10, C13 y C14) de *A. cupreata* indicó diferencias significativas en 39 loci (8 de 811, 6 de 846, 14 de 857 y 11 de 811), mientras que la comparación de poblaciones procedentes de Chilapa, Guerrero (C1v, C2, C4v, C5v) con las demás de *A. cupreata* (C10, C13 y C14) mostró diferencias significativas en 29 loci

Tabla 13. Prueba exacta de diferenciación entre pares de poblaciones. La mitad superior indica el número de loci con $p < 0.05$ (Raymond y Rousset 1995) y la mitad inferior indica el valor de Xi-cuadrada. Todos los casos con $P_{(g.l.:180; a=0.05)}=0.0000$

	C1v	C2	C4v	C5v	C10	C13	C14	P4	P6	P7	P9	P10	P11	P12	P13	Loci significativos Promedio
C1v		31	25	32	37	37	33	30	42	41	38	37	33	41	28	C1v 34.64
C2	481.7		29	22	39	38	43	30	48	42	37	38	36	41	36	C2 36.43
C4v	445.5	481.9		28	31	38	31	32	49	40	48	39	34	36	33	C4v 35.21
C5v	585.9	405.5	439.7		32	32	39	39	41	54	49	45	42	41	45	C5v 38.64
C10	660.4	623.7	514.2	556.5		25	37	37	40	40	50	36	33	39	41	C10 36.93
C13	604.6	608.8	572.4	509.8	401.1		29	40	32	39	48	35	39	38	37	C13 36.21
C14	542.1	681.8	529.4	610.5	520.2	461.9		40	41	32	48	42	35	41	38	C14 37.79
P4	476.5	490.6	551.5	591.7	659.4	586.0	624.6		35	33	31	29	27	27	28	P4 32.71
P6	630.4	690.0	721.9	682.4	597.8	550.2	612.2	546.8		36	40	35	35	36	36	P6 39.00
P7	625.2	726.4	681.9	833.2	662.3	660.5	594.6	594.5	615.8		35	28	28	34	32	P7 36.71
P9	563.4	651.2	711.3	798.2	790.0	760.1	828.2	488.8	675.6	574.5		37	38	40	30	P9 40.64
P10	587.9	712.7	566.8	724.5	689.3	631.3	628.7	461.5	603.7	528.8	564.1		24	32	27	P10 34.57
P11	524.2	602.5	556.7	666.3	610.5	625.8	572.9	442.6	548.7	487.9	597.4	415.0		22	26	P11 32.29
P12	553.3	660.3	605.6	709.2	698.0	639.0	639.1	470.2	611.6	608.9	609.9	447.8	410.7		22	P12 35.00
P13	452.5	603.3	520.6	746.8	652.7	636.2	583.5	475.1	621.6	475.4	479.9	464.2	426.1	397.1		P13 32.79

DIVERSIDAD GENÉTICA

Se calcularon la heterocigosis esperada (Lynch y Milligan, 1994) y el polimorfismo con criterio del 95% para todas las poblaciones y para sus agrupamientos (Tabla 11). El número de muestras utilizado para la mayoría de los casos es mayor a 30 individuos exceptuando las poblaciones C1, C13 y P4, de las que únicamente se pudieron obtener 25, 28 y 22 muestras respectivamente, con amplificación de 3 o más iniciadores (de los 4 utilizados). Sin embargo, el número promedio de muestras es mayor a 30 en todos los casos (*A. cupreata*: 33.4, *A. potatorum* 38.9, todas: 36.33, vivero: 33.3 y silvestres: 33.5).

Tabla 14. Heterocigosis esperada y porcentaje de loci polimórficos con el criterio del 95%. Entre paréntesis se muestra la varianza.

Población	Ubicación	N	He ($V_{(He)}$)	P _(95%) ($V_{(P)}$)
C1 Vivero “Ayahualco”	Chilapa, Guerrero	25	0.2689 (0.0008)	74.44 (0.192)
C4 Vivero “La Esperanza”	Chilapa, Guerrero	34	0.3043 (0.0010)	84.44 (0.133)
C5 Vivero “Trapiche Viejo”	Chilapa, Guerrero	41	0.3225 (0.0012)	76.67 (0.181)
C2 “Ayahualco”	Chilapa, Guerrero	32	0.2969 (0.0010)	74.44 (0.192)
C10 “Mesones”	Tlapa, Guerrero	41	0.3723 (0.0015)	91.11 (0.082)
C13 “La Laguna”	Xochipala, Guerrero	28	0.3445 (0.0013)	87.78 (0.108)
C14 “Etucuario”	Villa Madera, Michocán	33	0.3096 (0.0011)	81.11 (0.155)
Viveros	Chilapa Guerrero	100	0.3219 (0.0012)	84.44 (0.133)
Silvestres	Chilapa, Tlapa, Villa Madera	134	0.3566 (0.0014)	94.44 (0.053)
<i>A. cupreata</i>	Gro-Mich.	234	0.3452 (0.0013)	93.33 (0.063)
P4 “San Dionisio”	Sn. Dionisio Ocotepc, Oaxaca	22	0.2605 (0.0007)	73.33 (0.198)
P6 “Albarradas”	Sn. Lorenzo Albarradas, Oaxaca	31	0.3374 (0.0013)	85.56 (0.125)
P7 “Miahatlán”	Sto. Tomás Tamazulapa, Oaxaca	49	0.2909 (0.0009)	83.33 (0.140)
P9 “Sta. Catarina”	Sta. Catarina, Oaxaca	48	0.2813 (0.0009)	76.67 (0.180)
P10 “Yanhutitlan”	Sto. Domingo Yanhuítlan, Oaxaca	31	0.2794 (0.0009)	82.44 (0.133)
P11 “Zapotitlán”	Zapotitlán Palmas, Oaxaca	46	0.3183 (0.0011)	87.78 (0.108)
P12 “Tequistepec”	Sn. Pedro y Sn. Pablo Tequistepec, Oaxaca	46	0.2837 (0.0009)	78.98 (0.168)
P13 “Azumbilla”	Chapulco, Puebla	38	0.306 (0.0010)	88.89 (0.100)
<i>A. potatorum</i>	Oax.-Pue	311	0.3122 (0.0011)	93.33 (0.063)
Total todas	Gro-Oax-Mich-Pue	545	0.331 (0.0012)	96.67 (0.032)

La consideración de dos grupos según la especie resultó en una heterocigosis promedio de 0.3287 para el conjunto *A. cupreata* y *A. potatorum*, indicando una deficiencia de 0.003 heterocigotos con respecto al valor obtenido de heterocigosis total (0.331). La subdivisión de poblaciones de *A. cupreata* según su origen en vivero y silvestre y la consideración de un grupo de *A. potatorum* aumenta la heterocigosis promedio a 0.3302 y disminuye la deficiencia de heterocigotos por efecto Wahlund a tan solo 0.0007 con respecto a la heterocigosis total obtenida.

Los valores máximos de diversidad los presentó la población C10 “Mesones” ($He = 0.3723$, $P = 21.33\%$) y los mínimos la P4 “Sn Dionisio” (0.2605, 73.33%). De forma general, *A. cupreata* presentó valores mayores de diversidad ($He = 0.3219$ en viveros y 0.3566 en silvestres), que *A. potatorum*, con un máximo en C10 “Mesones” y mínimos en la región de Chilapa, Guerrero, particularmente en la población C1 vivero “Ayahualco” (0.2689, 74.44). De forma general, *A. potatorum* presentó valores menores de heterocigosis esperada pero mayores de polimorfismo que *A. cupreata*. Los máximos de esta especie se encontraron en las poblaciones P6 “Albarradas” para la heterocigosis esperada (0.3374) y P13 “Azumbilla, P.” para el polimorfismo (88.89%), mientras que los mínimos se encontraron en P4 “Sn.Dio”.

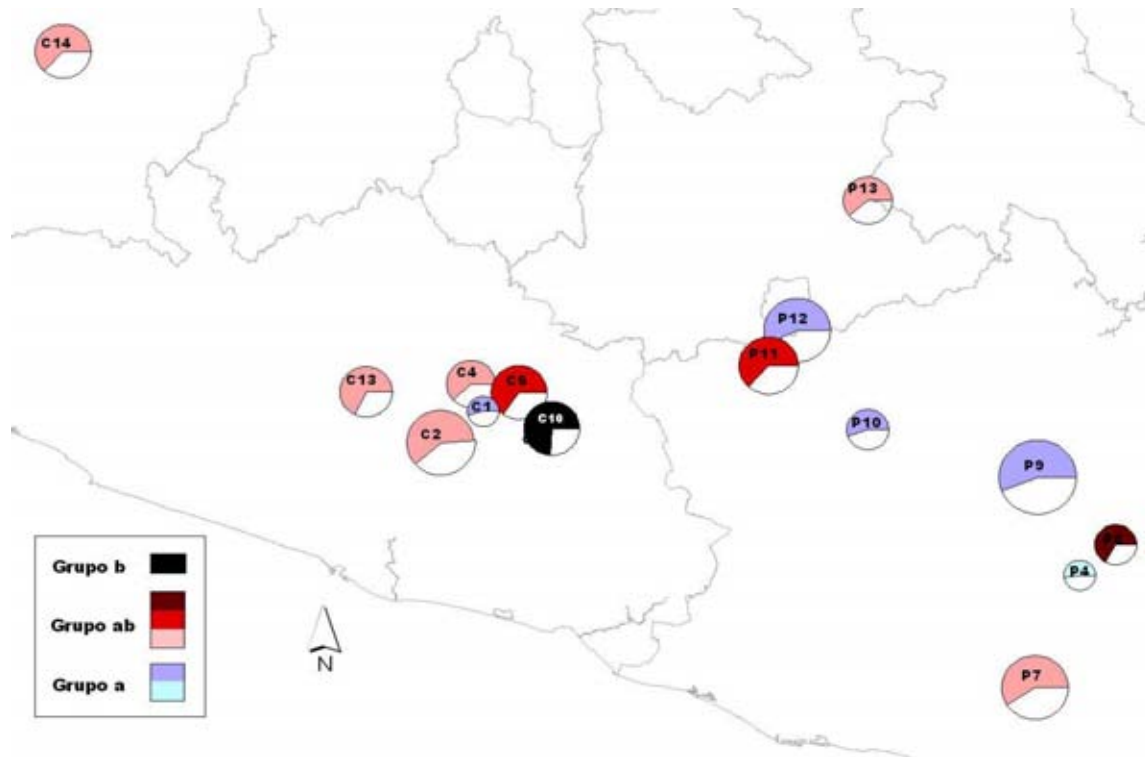


Figura 13. Ubicación geográfica de las poblaciones analizadas de *A. cupreata* (indicados con la letra C) y de *A. potatorum* (indicados con la letra P). Los gráficos indican la He como porcentaje respecto a un máximo de 0.5; el tamaño del gráfico indica el tamaño de muestra y los colores los agrupamientos del análisis de varianza.

DIVERSIDAD ENTRE ESPECIES

Todos los valores de diversidad genética son altos. No se observan diferencias significativas en los valores de heterocigosidad esperadas ($F=2.54$; $P_{(g=179;a=0.5)}=0.1127$) o polimorfismo ($F=0.05$; $P_{(g=14;a=0.05)}=0.9462$) de las agrupaciones de especie (Fig. 12 a y b), ni en la consideración del origen de las poblaciones de *A. cupreata* (heterocigosidad: $F=1.68$, $P_{(g=269;a=0.5)}=0.1882$; polimorfismo: $F=1.09$, $P=0.36$) (Fig. 12 c y d), a pesar de que esta especie presenta valores ligeramente mayores de heterocigosidad y ligeramente menores de polimorfismo con respecto a *A. potatorum*.

Se realizó un análisis de correlación lineal entre los valores de heterocigosidad esperada o polimorfismo y latitud, longitud o altitud y para ninguno de los casos se encontró relación significativa (todos los casos: $p \gg 0.1$). La mayor correlación (aunque no significativa) se encontró entre la heterocigosidad esperada y la latitud ($r^2 = 0.3658$). La tendencia general que mostraron los datos fue la de un aumento de la heterocigosidad en latitudes y longitudes mayores (hacia el oeste y norte); la altitud mostró una tendencia negativa a disminuir la heterocigosidad en altitudes mayores a los 2000 msnm.

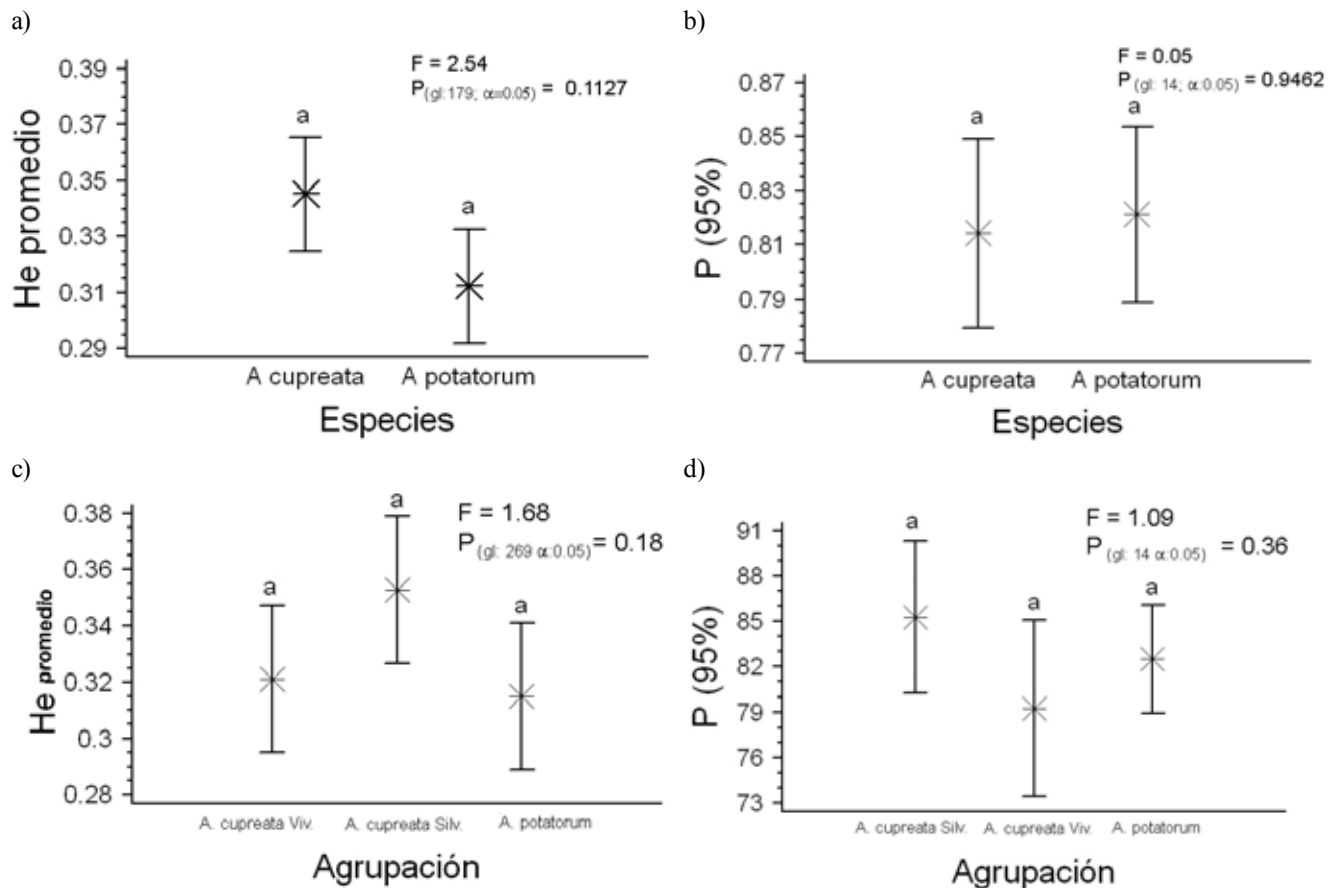


Figura 14. Heterocigosis esperada (He) y porcentaje de loci polimórficos ($P\%$) promedio para las dos especies estudiadas (ayb) y para los tres grupos principales (c y d). Las barras representan los intervalos de confianza del 95% con la prueba de rango múltiple de Tukey.

DIVERSIDAD ENTRE POBLACIONES DE *A. CUPREATA*

Al comparar las poblaciones de *A. cupreata* provenientes de vivero con las silvestres, no se encontraron diferencias significativas entre los valores de heterocigosis esperada promedio ni polimorfismos, aunque existe una ligera tendencia a presentar mayores niveles de diversidad para ambos parámetros en las poblaciones silvestres (Fig. 12 c y d).

Al comparar las poblaciones de *A. cupreata*, encontramos que mostraron diferencias significativas en cuanto a heterocigosis ($F=2.93$; $P_{(gl=629; \alpha=0.05)}=0.008$), indicando diferencias entre las poblaciones C1 “Vivero Ayahualco” con la menor heterocigosis y C10 “Mesones” con la mayor heterocigosis y ubicado al este de la distribución de *cupreata* en la región limítrofe con las colectas de *A. potatorum*. Las demás poblaciones tienen niveles intermedios de diversidad con una ligera tendencia a mostrar valores menores de diversidad en las poblaciones ubicadas en Chilapa Guerrero (C1 Vivero “Ayahualco”, C4 Vivero “La Esperanza”, C5 Vivero “Trapiche Viejo” y C2 “Ayahualco” Figura 13).

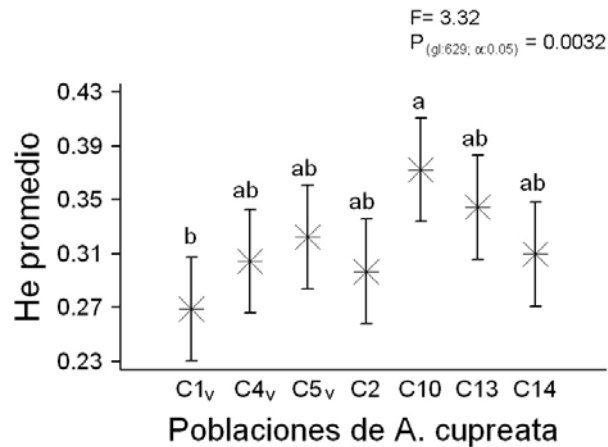


Figura 15. Heterocigis esperada promedio en las poblaciones de *A. cupreata*. Las barras representan los intervalos confianza del 95% con la prueba de rango múltiple de Tukey.

Los análisis de correlación de He con la ubicación geográfica (latitud, longitud o altitud) tampoco mostraron algún patrón significativo ($P > 0.2$), aunque se observa una tendencia ($r^2 = 0.64$) a aumentar la heterocigis en altitudes por arriba de los 1700m.

DIVERSIDAD ENTRE POBLACIONES DE *A. POTATORUM*

La comparación de las poblaciones de *A. potatorum* permitió observar diferencias significativas ($F=2.17$; $P_{(gl:719; \alpha:0.05)}=0.0348$) con respecto a la heterocigis esperada de la población P4 “San Dionisio”, que mostró la menor diversidad y la población adyacente P6 “Albarradas” con la mayor diversidad. Las demás poblaciones mostraron valores de heterocigis intermedios y similares entre sí con una tendencia de la población P11 “Zapotitlán” y P13 “Azumbilla” a presentar valores ligeramente mayores que las demás (Figura 14).

Tampoco se encontró alguna correlación significativa para los valores de He esperada de *A. potatorum* y su ubicación geográfica (altitud, latitud o longitud) ($P > 0.4$). Sin embargo se observa una tendencia inversa a la que presenta *A. cupreata* de disminuir la He ($r^2 = -0.32$) en altitudes mayores a los 2000 msnm.

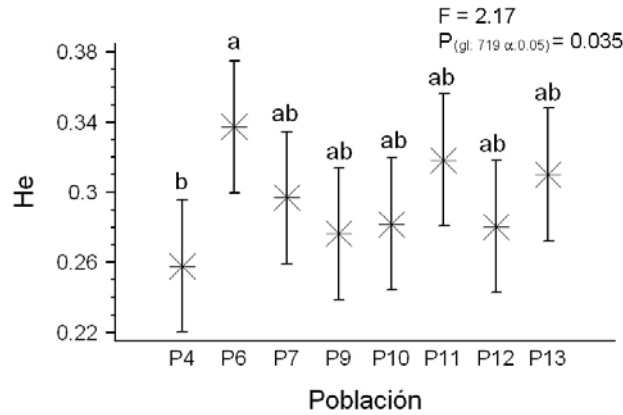


Figura 16. Heterocigosis esperada promedio en las poblaciones de *A. potatorum*. Las barras representan los intervalos de confianza del 95% con la prueba de rango múltiple de Tukey.

ESTRUCTURACIÓN/ DIFERENCIACIÓN

Se calculó el parámetro de coancestría theta (θ) equivalente al parámetro F_{ST} de Weir y Cockerham (1984), para las poblaciones y sus posibles agrupaciones (Tabla 12). Los valores de theta muestran niveles de diferenciación moderados según la clasificación de Wright (entre 0.05 y 0.15). El máximo valor se obtuvo al comparar *A. cupreata* y *A. potatorum* (0.1224), indicando que la máxima diferenciación se encuentra entre especies. Las cuatro poblaciones silvestres de *A. cupreata* mostraron mayor diferenciación entre sí (0.1049) que las de viveros de la misma especie (0.0952), las cuales son prácticamente iguales. Las ocho poblaciones de *A. potatorum* también mostraron muy poca diferenciación entre ellas (0.0791).

Tabla 15. Valores de Theta y Nm para los principales grupos estudiados.

Grupo	Theta θ (\pm E.S)	N_{pobs}	Nm
<i>A. cupreata</i>	0.1044 (\pm 0.0090)	7	10.97
<i>A. potatorum</i>	0.0791 (\pm 0.0063)	8	14.05
<i>A. cupreata</i> vs <i>A. potatorum</i>	0.1224 (\pm 0.0095)	15	0.89
Viveros de <i>A. cupreata</i>	0.0952 (\pm 0.0124)	3	17.82
Silvestres de <i>A. cupreata</i>	0.1049 (\pm 0.0108)	4	11.02

El análisis de varianza no mostró diferencias significativas ($F=2.12$; $P_{(gl:357;a:0.05)}=0.097$) entre los valores de diferenciación para los loci de *A. cupreata*, *A. potatorum*, provenientes tanto de viveros como de poblaciones silvestres (Figura 15).

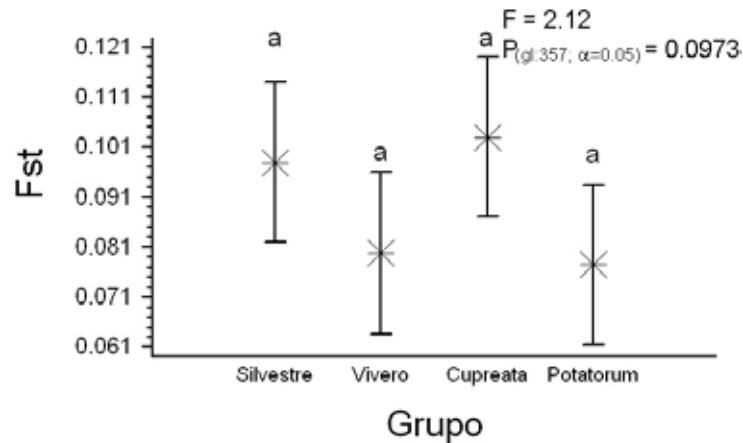


Figura 17. Análisis de varianza de los valores de estructuración de los loci de *A. cupreata* y las poblaciones de *A. potatorum*. Las barras representan el intervalo de confianza del 95% con la prueba de rango múltiple de Tukey.

Los números de migrantes obtenidos a partir de los valores de diferenciación de los principales agrupamientos (Tabla 12), indican valores muy altos (por arriba de 10) exceptuando la comparación de *A. cupreata* y *A. potatorum* que presenta un valor menor a uno, lo que inicialmente indicaría que al interior de las poblaciones de cada especie existe suficiente flujo génico como para evitar efectos de endogamia.

Calculamos los valores de diferenciación entre todos los pares de poblaciones posibles (Tabla 13, diagonal superior) y se calcularon los valores promedio de diferenciación de cada población hacia los principales grupos formados (Tabla 14).

Al calcular los valores de diferenciación pareada se puede observar que de forma general los grupos analizados presentan mayor similitud al compararse contra ellos mismos que contra otro grupo. Las poblaciones silvestres de *A. cupreata*, presentan mayor similitud entre ellas mismas ($F_{ST}=0.109$; $Nm = 2.286$) que con las de vivero ($F_{ST} = 0.112$; $Nm = 2.222$) o *potatorum* ($F_{ST} = 0.133$; $Nm = 1.83$), con excepción de la población silvestre C2 “Ayahualco” ubicada en Chilapa, Guerrero, que muestra mayor similitud con las poblaciones de vivero ($F_{ST} = 0.093$; $Nm = 2.542$).

Las poblaciones de *A. potatorum* muestran mayor similitud con respecto a las demás poblaciones de la misma especie ($F_{ST} = 0.082$; $Nm = 3.15$); las poblaciones P6 “Albarradas” y P10 “Yanhuitlan” aunque presentan menor estructuración con respecto a las demás poblaciones de *A. potatorum*, muestran números altos de migración con silvestres ($F_{ST} = 0.122$; $Nm = 1.83$) y viveros de *A. cupreata* ($F_{ST} = 0.0079$; $Nm = 2.029$), respectivamente.

Tabla 16. Comparación pareada de las poblaciones de *A. cupreata* y *A. potatorum* estudiadas. La mitad superior muestra los valores de diferenciación (θ) y la mitad inferior los correspondientes de número de migrantes (Nm) obtenidos a partir de F_{ST} .

<i>A. cupreata</i> vivero			<i>A. cupreata</i> silvestre				<i>A. potatorum</i>								
C1v	C4v	C5v	C2	C10	C13	C14	P4	P6	P7	P9	P10	P11	P12	P13	
C1v	-	0.107	0.128	0.113	0.137	0.175	0.142	0.104	0.133	0.132	0.103	0.115	0.089	0.106	0.078
C4v	1.83	-	0.070	0.098	0.085	0.141	0.099	0.135	0.149	0.114	0.116	0.086	0.082	0.096	0.083
C5v	1.49	2.84	-	0.069	0.083	0.105	0.093	0.127	0.127	0.126	0.123	0.142	0.107	0.126	0.111
C2	1.71	1.98	2.90	-	0.115	0.147	0.136	0.125	0.148	0.124	0.108	0.134	0.100	0.125	0.106
C10	1.37	2.28	2.31	1.65	-	0.063	0.083	0.135	0.100	0.118	0.153	0.123	0.103	0.123	0.111
C13	1.03	1.29	1.80	1.25	3.09	-	0.100	0.160	0.123	0.160	0.190	0.150	0.146	0.159	0.143
C14	1.32	1.95	2.06	1.37	2.29	1.83	-	0.156	0.119	0.133	0.173	0.132	0.118	0.131	0.123
P4	1.87	1.37	1.45	1.50	1.32	1.06	1.07	-	0.117	0.122	0.094	0.100	0.077	0.077	0.085
P6	1.42	1.22	1.44	1.24	1.86	1.45	1.47	1.45	-	0.111	0.136	0.133	0.087	0.112	0.107
P7	1.44	1.66	1.45	1.53	1.54	1.06	1.28	1.38	1.47	-	0.087	0.072	0.055	0.069	0.062
P9	1.89	1.63	1.50	1.78	1.15	0.86	0.94	1.85	1.17	1.83	-	0.088	0.073	0.078	0.062
P10	1.67	2.26	1.27	1.40	1.47	1.15	1.30	1.72	1.20	2.23	1.67	-	0.049	0.054	0.059
P11	2.24	2.39	1.76	1.93	1.80	1.19	1.48	2.28	1.94	2.98	2.05	2.75	-	0.042	0.046
P12	1.84	2.00	1.46	1.51	1.47	1.07	1.31	2.28	1.46	2.35	1.90	2.48	2.53	-	0.046
P13	2.57	2.34	1.69	1.83	1.65	1.21	1.41	2.06	1.54	2.65	2.44	2.24	2.31	1.29	-

Los viveros de *A. cupreata* mostraron mayor similitud entre sí ($F_{ST} = 0.101$; $Nm = 2.38$) que con las poblaciones silvestres ($F_{ST} = 0.112$; $Nm = 2.143$) o con las poblaciones de *A. potatorum* ($F_{ST} = 0.113$; $Nm = 2.038$). Cada población de vivero mostró similitudes distintas: el vivero C1 “Ayahualco” presenta mayor similitud con las poblaciones de *A. potatorum* ($F_{ST} = 0.108$; $Nm = 2.14$), el vivero C4 “La Esperanza” con los otros dos viveros ($F_{ST} = 0.088$; $Nm = 2.717$) y el vivero C5 “Trapiche viejo” con las silvestres de la misma especie ($F_{ST} = 0.087$; $Nm = 2.677$).

El análisis de varianza resultante de la comparación de las poblaciones de *A. cupreata* y las de *A. potatorum* indica que el 81.26% de la variación se encuentra dentro de las poblaciones (independientemente de la especie a la que pertenecen), el 13.54% se encuentra entre las poblaciones de cada especie y únicamente el 5.2% se encuentra entre las especies (Figura 16).

La comparación de las poblaciones originarias de viveros contra las silvestres mostró datos similares pues vemos que el 83.5% de la variación se encuentra dentro de las poblaciones (independientemente de si son originarias de vivero o silvestre), el 15.97% corresponde a las poblaciones de vivero o silvestre y tan solo el 0.53% se encuentra entre el grupo vivero o silvestre. El valor de estructuración obtenido para esta comparación fue de F_{ST} : 0.16497 (Figura 17).

Tabla 17. Valores promedio de diferenciación y número de migrantes obtenidos a partir de las comparaciones pareadas. Los valores en negritas indican la mínima de diferenciación y la(s) máxima(s) de migración (se indican dos valores cuando la diferencia entre ellas es menor a 0.5).

		Nm promedio de comparaciones pareada					F_{ST} promedio de comparaciones pareadas				
		Potatorum	Viveros	Silvestres	Cupreata	Total	Potatorum	Viveros	Silvestres	Cupreata	Total
Viveros	C1v	2.144	1.902	1.558	1.672	1.942	0.108	0.117	0.142	0.134	0.119
	C4v	2.182	2.717	2.194	2.368	2.262	0.108	0.088	0.106	0.100	0.104
	C5v	1.790	2.521	2.677	2.625	2.148	0.123	0.099	0.087	0.091	0.110
Silvestres	C2	1.844	2.542	1.652	2.097	1.952	0.121	0.093	0.113	0.113	0.118
	C10	1.854	2.334	2.806	2.570	2.161	0.121	0.102	0.094	0.094	0.110
	C13	1.398	1.613	2.481	2.047	1.676	0.154	0.140	0.122	0.122	0.140
	C14	1.623	2.083	2.203	2.143	1.846	0.136	0.111	0.109	0.109	0.124
Potatorum	P4	2.429	1.826	1.502	1.641	2.035	0.096	0.122	0.144	0.135	0.115
	P6	1.975	1.594	1.834	1.731	1.853	0.115	0.136	0.122	0.128	0.121
	P7	3.020	1.774	1.642	1.698	2.359	0.082	0.124	0.134	0.130	0.106
	P9	2.747	1.958	1.427	1.655	2.201	0.088	0.114	0.156	0.138	0.113
	P10	3.281	2.029	1.616	1.793	2.537	0.079	0.114	0.135	0.126	0.103
	P11	4.128	2.489	1.939	2.175	3.151	0.061	0.092	0.117	0.106	0.084
	P12	3.797	2.067	1.627	1.816	2.807	0.068	0.109	0.135	0.124	0.096
P13	3.820	2.572	1.850	2.159	2.990	0.067	0.091	0.121	0.108	0.087	
Promedio Potatorum		3.150	2.038	1.680	1.833	2.492	0.082	0.113	0.133	0.124	0.103
Promedio Vivero			2.380	2.143	2.222	2.117		0.101	0.112	0.108	0.111
Promedio Silvestre				2.286	2.214	1.909			0.109	0.109	0.123
Promedio Cupreata					2.217	1.998			0.109	0.118	

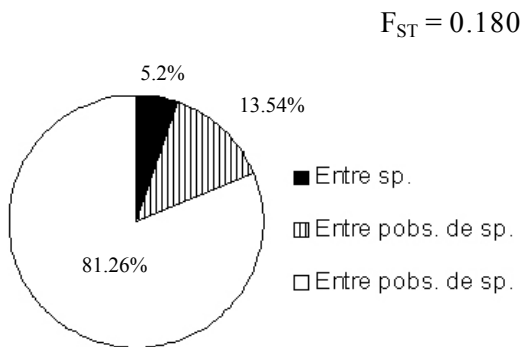


Figura 18. Porcentaje de fuente de variación entre *A. cupreata* y *A. potatorum*.

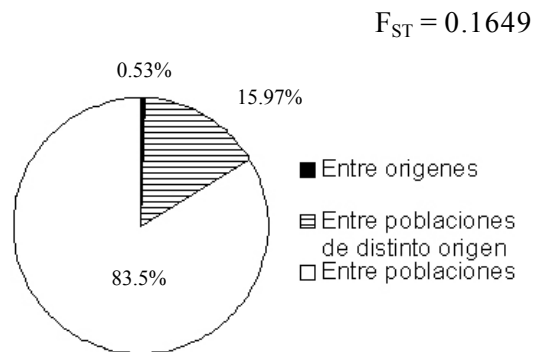


Figura 19. Porcentaje de variación entre las poblaciones de *A. cupreata* según su origen (vivero o silvestre).

AISLAMIENTO POR DISTANCIA

La Tabla 15 muestra los valores de distancia genética de Nei (diagonal superior) y distancia geográfica (diagonal inferior) entre todos los pares de poblaciones analizados. De forma general, las distancias genéticas obtenidas para cualquier par de poblaciones resultaron con valores muy pequeños, indicando que la mayoría de las poblaciones comparten una gran parte de sus alelos. La distancia promedio obtenida entre cualquier par de poblaciones de *A. cupreata* o *A. potatorum* fue de 0.0557, con un máximo de 0.1083 entre la población C13 y P9 y un mínimo de 0.0191 entre P11 y P12.

AISLAMIENTO POR DISTANCIA EN *A. CUPREATA*

A. cupreata presenta distancias promedio de 0.0576 entre pares de poblaciones de esta especie con un máximo de 0.0957 entre las poblaciones C1 “Vivero Ayahualco” y C13 “La Laguna” y un mínimo de 0.0336 entre las poblaciones C2 “Ayahualco” y C5 “Vivero Trapiche Viejo”.

El dendrograma UPGMA (Figura 18) muestra claramente la formación de dos grupos en *A. cupreata*. El primer grupo está constituido por las poblaciones C10 “Mesones” (Tlapa, Gro), C13 “La Laguna” (Xochipala, Gro) y C14 “Etúcuaro” (V. Madera, Mich.), en el cual la población de Michoacán presenta mayor distancia con respecto a las de Guerrero. El segundo grupo está constituido por las poblaciones originarias de la región de Chilapa, Guerrero: C2 “Ayahualco” y los viveros C5 “Trapiche Viejo”, C4 “La Esperanza” y C1 “Ayahualco”; la mayor distancia de este grupo se encuentra entre la población silvestre de Ayahualco C2 y el vivero C1 ubicado en la misma localidad. La población silvestre C2 “Ayahualco” de Chilapa, Guerrero muestra menor distancia con la población C14 “Etucuaru” de Michoacán (Nei: 0.07 y 290 km de distancia) que con la C13 “La Laguna” de Guerrero (Nei: 0.0819 y 61 km de distancia).

Las pruebas de Mantel entre las distancias geográficas y las distancias genéticas de las poblaciones ($r^2 = -.0162$; $p = 0.4410$) o entre la distancia geográfica y el número de migrantes Nm ($r^2 = -0.0481$; $p = 0.6510$) de *A. cupreata* no mostró ninguna correlación significativa (Figuras 19 y 20), indicando que las poblaciones de *A. cupreata* analizadas en este trabajo, no se diferencian conforme a un patrón de aislamiento por distancia.

Tabla 18. Distancias entre poblaciones. Diagonal superior: distancias genéticas de Nei (1972); Diagonal inferior: distancias geográficas lineales (km)

		Viveros <i>A. cupreata</i>			Silvestres <i>A. cupreata</i>				<i>A. potatorum</i>							
		C1	C4	C5	C2	C10	C13	C14	P4	P6	P7	P9	P10	P11	P12	P13
Viveros <i>A. cupreata</i>	C1		0.05	0.06	0.05	0.08	0.1	0.07	0.04	0.07	0.06	0.04	0.05	0.04	0.05	0.03
	C4	16.3		0.03	0.05	0.05	0.08	0.05	0.06	0.08	0.06	0.05	0.04	0.04	0.04	0.04
	C5	21	24.7		0.03	0.05	0.06	0.05	0.06	0.07	0.07	0.06	0.07	0.06	0.06	0.06
Silvestres <i>A. cupreata</i>	C2	1.44	17.7	21		0.07	0.08	0.07	0.06	0.08	0.06	0.05	0.06	0.05	0.06	0.05
	C10	35.9	47.5	25.7	34.9		0.04	0.05	0.08	0.06	0.07	0.09	0.07	0.06	0.07	0.06
	C13	60.1	53.2	77.3	61	95.9		0.05	0.08	0.07	0.09	0.11	0.08	0.09	0.09	0.08
	C14	289	274	296	290	321	241		0.08	0.07	0.07	0.09	0.06	0.06	0.06	0.06
<i>A. potatorum</i>	P4	315	326	301	314	279	375	587		0.06	0.05	0.04	0.04	0.04	0.03	0.04
	P6	329	338	313	328	293	389	595	24.9		0.06	0.07	0.07	0.05	0.06	0.06
	P7	319	331	308	318	284	376	602	65.8	88.7		0.04	0.03	0.03	0.03	0.03
	P9	283	291	266	282	247	343	543	58.1	54.3	116		0.04	0.03	0.03	0.03
	P10	195	202	177	194	160	254	454	134	141	165	89.8		0.02	0.02	0.03
	P11	146	150	127	146	115	204	394	195	201	223	149	61.2		0.02	0.02
	P12	165	167	144	164	135	220	399	196	200	231	146	65.2	24.2		0.02
	P13	226	224	205	226	202	273	411	232	227	281	174	126	103	79.5	

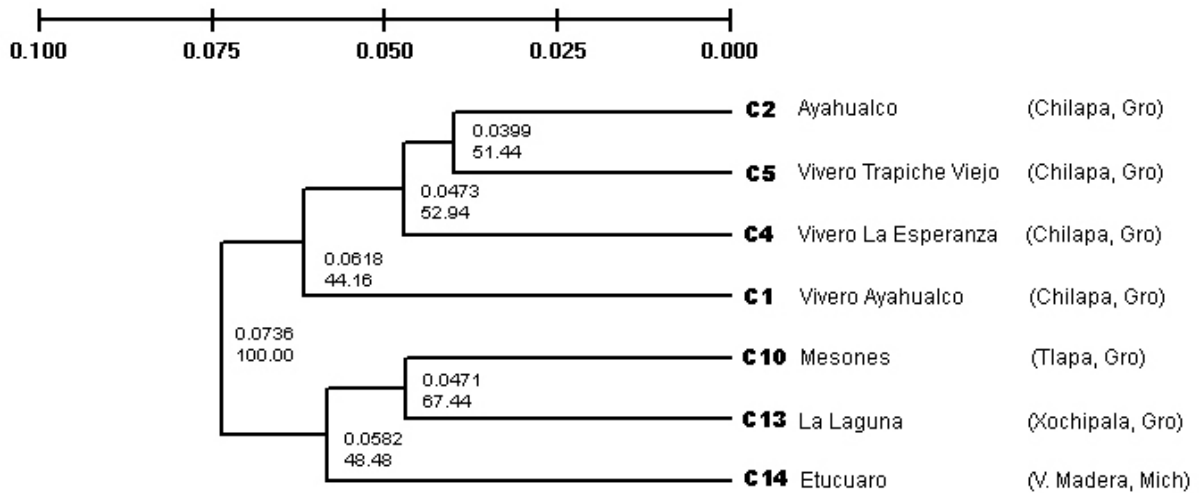


Figura 20. Dendrograma utilizando el algoritmo UPGMA basado en las distancias genéticas de Nei(1972) para las poblaciones de *A. cupreata*. Los números indican la distancia (arriba) y el bootstrap (abajo)

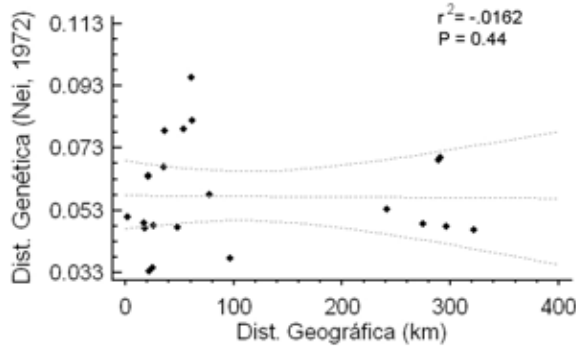


Figura 21. Correlación vía Mantel de Distancias Geográficas (km) y Genéticas (Nei, 1972) para las poblaciones de *A. cupreata*

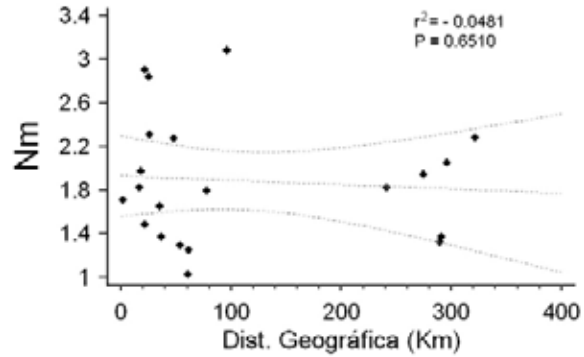


Figura 22. Correlación vía Mantel de Distancias Geográficas (km) y número de migrantes efectivos por generación (*Nm*) para las poblaciones de *A. cupreata*.

Las pruebas de Mantel entre las distancias genéticas o números de migrantes y las distancias geográficas de los diferentes grupos de *A. cupreata* no mostró ninguna correlación significativa ($P \gg 0.1$). Sin embargo, dado que Aguirre Dugua (2004) reporta un patrón de aislamiento por distancia, realizamos el análisis excluyendo las poblaciones de Chilapa y observamos que la correlación aumenta sustancialmente ($r^2 = 0.7037$), aunque los grados de libertad obtenidos en esta comparación no permiten establecer que esta relación sea significativa ($gl = 2$; $P = 0.5$).

Tabla 19. Correlaciones entre Distancias genéticas o Número de migrantes y distancias geográficas de los principales grupos de *A. cupreata*. A pesar de que ninguna de estas fue significativa, presentamos esta tabla para fines comparativos con otros estudios.

Grupos	Distancia genética (Nei) Vs Distancia Geográfica (Km)			Número de migrantes (Nm) Vs. Distancia Geográfica (Km)		
	r^2	P	g.l.	r^2	P	g.l.
Silvestres (C2, C10, C13 y C14)	- 0.2844	0.5848	5	0.03	0.94	5
Viveros (C1, C4 y C5)	- 0.4355	0.7131	2	0.6744	0.5287	2
Chilapa (C1, C2, C4 y C5)	- 0.3175	0.5398	5	0.5132	0.2977	5
No Chilapa (C10, C13 y C14)	0.7037	0.5030	2	- 0.7480	0.4620	2

AISLAMIENTO POR DISTANCIA EN A. POTATORUM

En las poblaciones de *A. potatorum*, la distancia promedio entre pares de poblaciones fue de 0.038, valor significativamente inferior a los presentados por *A. cupreata* ($F=18.43$; $p_{(gl:48; a:0.05)}=0.001$). La población P6 “Albarradas” (ubicada en el límite nororiental de la distribución de *A. potatorum*) presentó las mayores distancias genéticas (aunque no las geográficas) con respecto a las demás poblaciones de esta especie, particularmente con la con la P9 “Sta. Catarina” con la cual presenta el mayor valor (0.0695). Las menores distancias se encontraron entre las poblaciones P10 “Yanhutilán”, P11 “Zapotitlán”, P12 “Tequistepec” y P13 “Azumbilla”, particularmente entre la P11 y P12 (Nei: 0.0191), todas ellas ubicadas en la región noroeste de la distribución de la especie (Tabla 17)

Tabla 20. Distancias genéticas de Nei (diagonal superior) y distancias geográficas en km (diagonal inferior) entre las poblaciones de *A. potatorum*.

	P4	P6	P7	P9	P10	P11	P12	P13
P4		0.0575	0.0548	0.0395	0.0416	0.0351	0.0325	0.0376
P6	24.91		0.0567	0.0695	0.0693	0.0465	0.0565	0.0572
P7	65.83	88.73		0.0383	0.0313	0.0254	0.0303	0.0278
P9	58.13	54.29	115.92		0.0378	0.0335	0.0334	0.0271
P10	133.95	140.56	165.43	89.78		0.0219	0.0228	0.0262
P11	195.16	201.29	222.85	149.11	61.22		0.0191	0.0219
P12	196.39	199.53	230.64	145.76	65.24	24.24		0.0202
P13	232.15	226.76	280.92	174.41	125.91	103.47	79.52	

El dendrograma construido mediante el algoritmo UPGMA con las distancias genéticas de la Tabla 17 indica que las poblaciones de *A. potatorum* se agrupan en una sola rama de similitud indicando a la población P6 como la mas distante, mientras que las poblaciones P11, P12 y P13 (las de ubicación mas norte en la distribución de *A. potatorum*) muestran la mayor similitud entre sí (Figura 21).

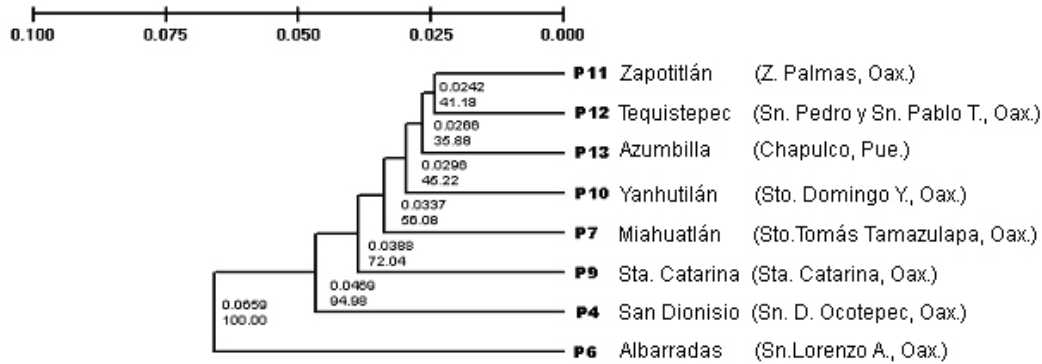


Figura 23. Dendrograma usando el algoritmo UPGMA basado en las distancias genéticas de Nei (1972) para las poblaciones de *A. potatorum*. Los números indican la distancia (arriba) y el bootstrap (abajo)

Al igual que en *A. cupreata*, cuando se realizaron los análisis de Mantel entre las distancias geográficas (km) y las distancias genéticas ($r^2 = -0.0652$; $p = 0.6070$) o los números de migrantes por generación ($r^2 = -0.1085$; $p = 0.3000$), no se encontró ninguna correlación significativa, de modo que al interior de las poblaciones de *A. potatorum* no existe ningún indicio de aislamiento por distancia (Figuras 22 y 23).

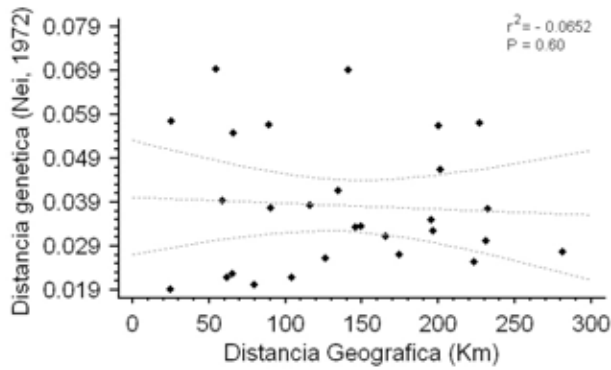


Figura 24. Correlación vía Mantel de Distancias Geográficas (km) y Genéticas (Nei, 1972) para las poblaciones de *A. potatorum*

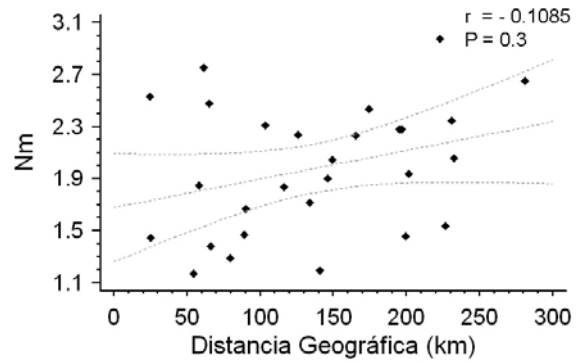


Figura 25. Correlación vía Mantel de Distancias Geográficas (km) y número de migrantes efectivos por generación (Nm) para las poblaciones de *A. potatorum*.

AISLAMIENTO POR DISTANCIA ENTRE GRUPOS

Se calcularon las distancias de Nei que separan a los grupos de origen silvestre y vivero de *A. cupreata* y las de *A. potatorum*. La menor distancia se obtuvo entre los viveros y las silvestres de *A. cupreata* (0.0164) y la mayor entre las poblaciones silvestres de *A. cupreata* con las de *A. potatorum* (0.0301).

La prueba de correlación entre las distancias geográficas y genéticas indica que sí existe un patrón de aislamiento por distancia entre las poblaciones de *A. cupreata* y *A. potatorum* en cuanto a distancia genética de Nei, ó número de migrantes en la que en cuanto más cercanas sean las poblaciones, mayor flujo y menor distancia genética, habrá entre las mismas (Figuras 24 y 25).

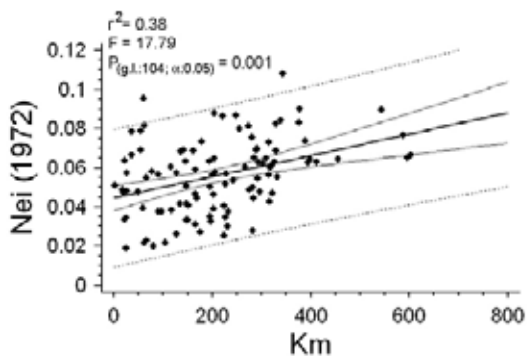


Figura 26. Correlación entre la distancia genética y distancia geográfica de las poblaciones de *A. cupreata* y *A. potatorum* mediante la prueba de Mantel.

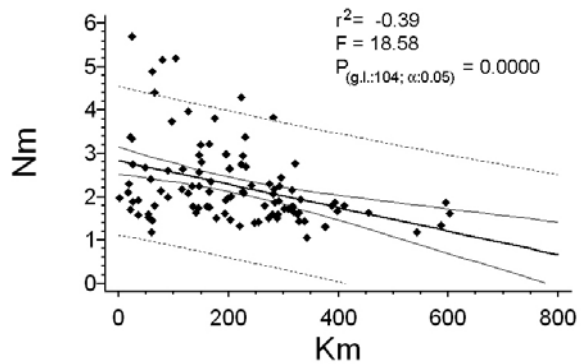


Figura 27. Correlación entre el flujo génico por generación y la distancia geográfica de *A. cupreata* y *A. potatorum* mediante la prueba de Mantel

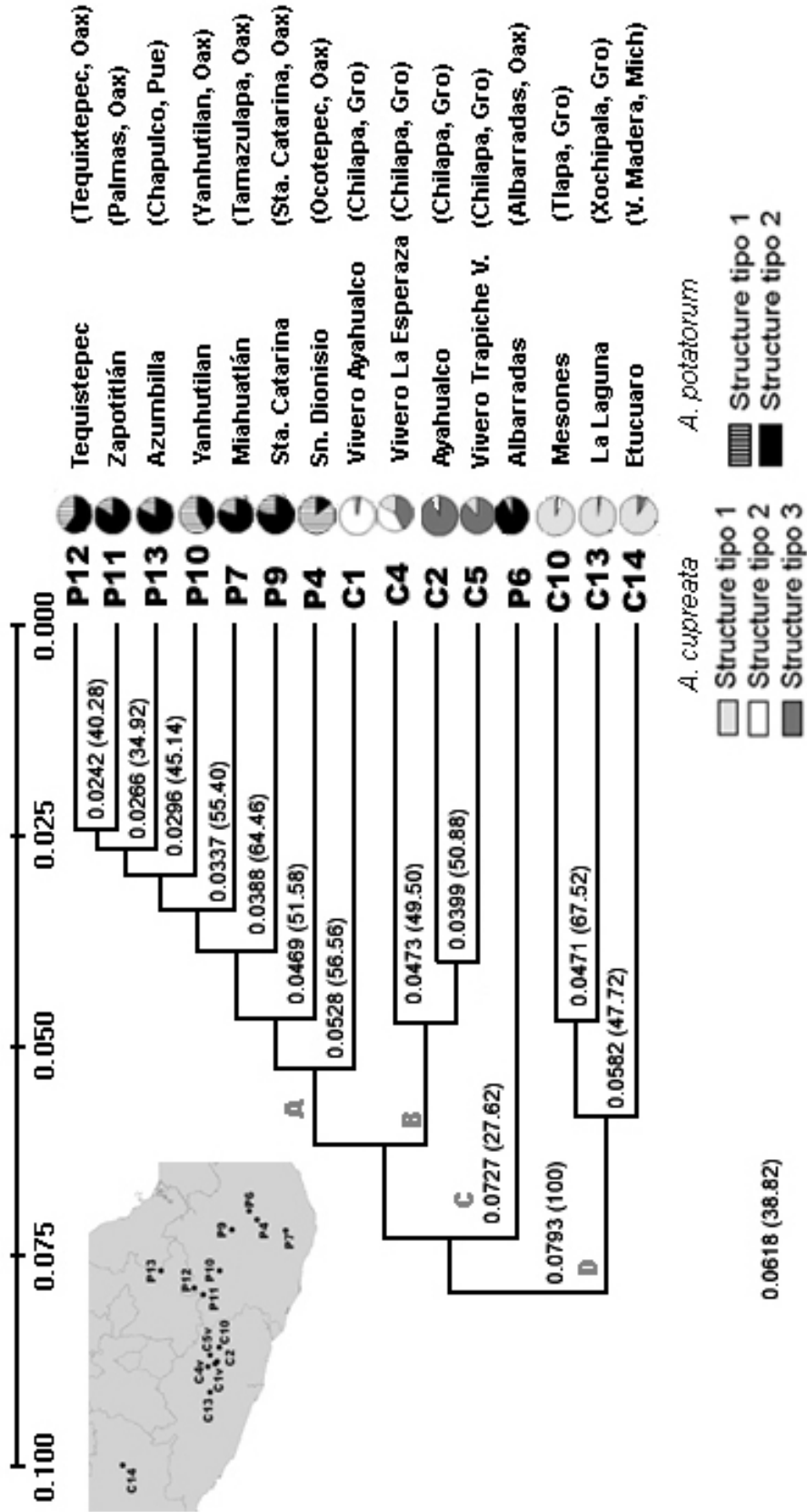


Figura 28. Dendrograma utilizando el algoritmo UPGMA basado en las distancias de Nei (1972) de todas las poblaciones de *A. cupreata* y *A. potatorum*. Los números indican la distancia genética de Nei (1972) y el valor de bootstrap (en paréntesis) con 5000 repeticiones. Los gráficos de pie indican el porcentaje de composición ancestral según el programa structure (ver adelante)

El dendrograma UPGMA obtenido mediante las distancias genéticas de Nei (1972), indica la formación de cuatro grupos principales (Figura 26): uno conformado por las especies de *A. cupreata* que se encuentran fuera de Chilapa, Guerrero (C10 “Mesones” en Tlapa Gro., C13 “La Laguna” Xochipala Gro. y C14 “Etúcuaro” V. Madera Mich.) indicado en el dendrograma como “D”; el segundo grupo está conformado por las especies de *A. potatorum* y la población de vivero C1 “Vivero Ayahualco” (que mostró mayor afinidad con esa especie) indicado en el dendrograma como “A”; el tercero por las poblaciones de *A. cupreata* procedentes de Chilapa, Guerrero (indicado como “B”) y con mayor afinidad a *A. potatorum* que con *A. cupreata*; la población P6 “Albarradas” de Oaxaca que, además de haber presentado la máxima heterocigosis de *A. potatorum*, se muestra totalmente separada de las demás poblaciones de esta especie y constituye una sola rama del dendrograma.

AGRUPAMIENTO BAYESIANO DE POBLACIONES

Se corrieron varias pruebas con distintos valores de iteración (hasta 100,000 iteraciones) hasta determinar el número de corridas necesarias para obtener un buen estimado de la verosimilitud. En la Figura 27 se puede observar la variación de los estimados de distribución posterior durante una corrida de 60,000 iteraciones. La Figura 27a muestra el parámetro alfa (parámetro de Dirichlet) que indica la probabilidad posterior de mezcla de las muestras. El gráfico de la Figura 27b muestra la variación de la probabilidad de estructuración posterior estimada en cada iteración; la Figura 27c indica la variación del ln de la verosimilitud de cada iteración y 27d muestra la variación del valor de probabilidad posterior de la verosimilitud. En todos los casos se puede observar que estos parámetros se estabilizan a partir de las 20,000 iteraciones.

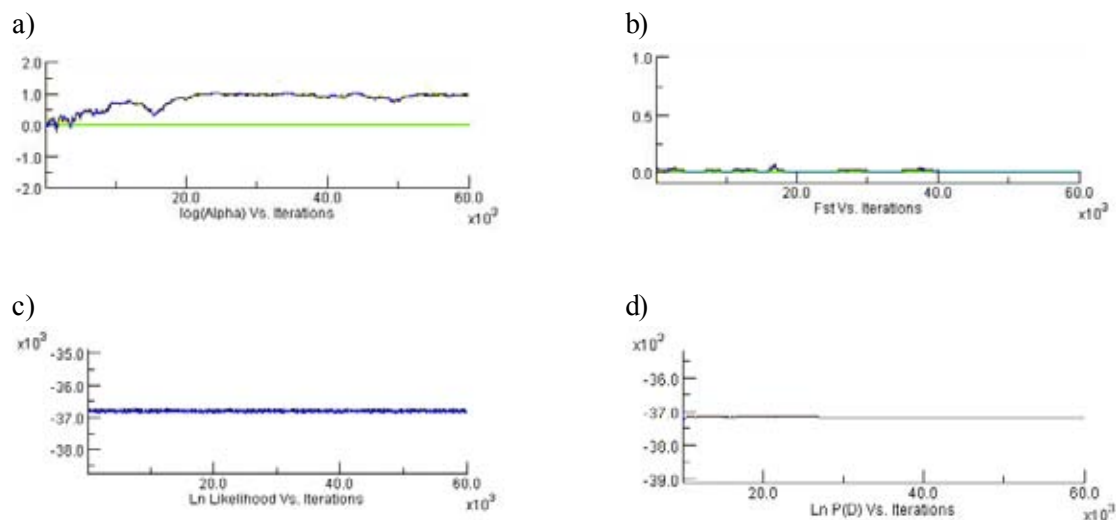


Figura 29. Parámetros clave para una de las corridas con 60,000 iteraciones. a) valor de alfa b) valor de Fst c) verosimilitud d) probabilidad posterior.

AGRUPAMIENTO BAYESIANO ENTRE ESPECIES

En la Tabla 18 se pueden observar el valor máximo de verosimilitud (LnP(D)), de las 30 corridas para cada una de las posibles agrupaciones (K) del conjunto de poblaciones de *A. cupreata* y *A. potatorum*. También se muestra la varianza de la verosimilitud (Var), el error debido a la estructuración (alfa) y valores de F_{ST} resultantes calculados mediante el programa Structure.

Tabla 21. Valores de verosimilitud, varianza, alfa y estructuración de la corrida de mayor valor de verosimilitud de las 30 realizadas en cada población posible K de 1 a 15 para todas las poblaciones.

K	Ln P(D)	Var	alfa	Fst1	Fst2	Fst3	Fst4	Fst5	Fst6	Fst7	Fst8	Fst9	Fst10	Fst11	Fst12	Fst13	Fst14	Fst15
1	-32315.2	746.3	-	0.0001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-31805.7	1447	0.071	0.074	0.019	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-31411.2	1705.7	0.052	0.095	0.055	0.042	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-31145.6	2149	0.055	0.039	0.117	0.087	0.078	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-30726.4	2474.3	0.063	0.139	0.060	0.121	0.138	0.074	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-30605.6	2842.3	0.053	0.147	0.066	0.176	0.135	0.135	0.078	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-32320.3	6644.2	0.048	0.030	0.159	0.153	0.077	0.101	0.131	0.186	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-30379.2	3548.7	0.048	0.173	0.156	0.097	0.162	0.101	0.093	0.131	0.222	-	-	-	-	-	-	-
9	-30478.1	4190.4	0.044	0.214	0.175	0.112	0.159	0.117	0.106	0.193	0.105	0.177	-	-	-	-	-	-
10	-32418.7	8361.7	0.044	0.131	0.223	0.179	0.176	0.192	0.037	0.121	0.135	0.234	0.118	-	-	-	-	-
11	-31496.9	7121.1	0.043	0.130	0.192	0.136	0.171	0.193	0.112	0.227	0.220	0.156	0.313	0.186	-	-	-	-
12	-30465.5	5250.4	0.041	0.209	0.167	0.190	0.144	0.130	0.21	0.173	0.182	0.152	0.022	0.247	0.238	-	-	-
13	-32703.1	10302	0.045	0.199	0.235	0.197	0.131	0.132	0.152	0.178	0.209	0.180	0.613	0.182	0.600	0.266	-	-
14	-35469.1	16046.4	0.043	0.215	0.197	0.159	0.166	0.164	0.146	0.193	0.636	0.246	0.3	0.212	0.161	0.244	0.167	-
15	-32174	9571.7	0.044	0.180	0.325	0.231	0.138	0.244	0.210	0.148	0.233	0.166	0.629	0.001	0.253	0.192	0.172	0.259

El método de determinación de número de agrupamientos más probable de Evanno y Goudet considera la variación generada por el error de muestreo, calculando el valor absoluto de diferencia de verosimilitud entre la posibilidad de una población con la posibilidad siguiente y estandarizándolo con la desviación estándar de los datos. De esta forma, se puede obtener el máximo valor de verosimilitud que presenta el menor valor de error debido al muestreo. Mediante esta prueba, se obtuvo que el total de las poblaciones estudiadas en este trabajo presentan mayor probabilidad de agrupamiento en dos poblaciones (Figura 28).

Los valores de H_e y de estructuración promedio para los dos grupos más probables obtenidos mediante métodos bayesianos, son muy similares a los obtenidos mediante la estimación tradicional con la corrección de Lynch y Milligan (1994): el grupo uno obtuvo H_e de 0.3025 y F_{ST} de 0.0748, valores similares a los obtenidos para *A. potatorum* ($H_e = 0.31$; $F_{ST} = 0.079$), mientras que el grupo dos aunque presenta menor estructuración ($F_{ST} = 0.0748$) (probablemente debido al reacomodo de la población P6), muestra valores de heterocigosis muy similares a los de *A. cupreata* ($H_e = 0.3452$; $F_{ST} = 0.1044$).

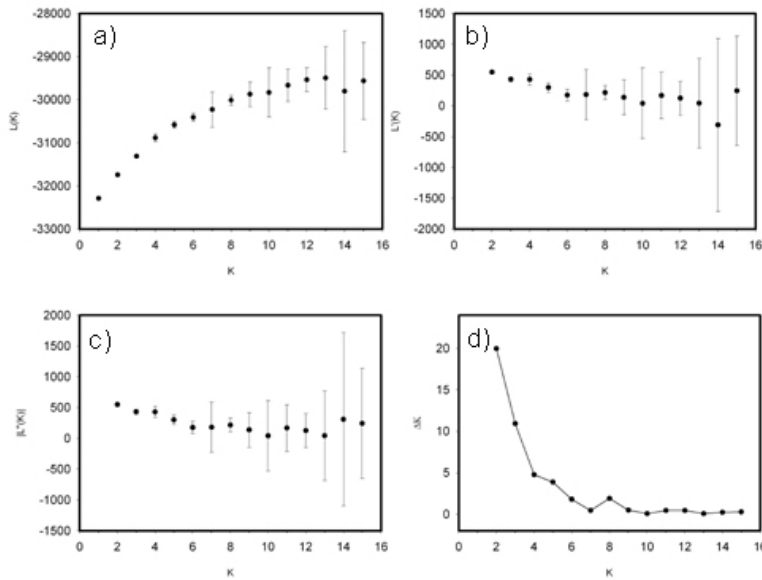


Figura 30. Número de agrupamientos con mayor verosimilitud para todas las poblaciones (*A. cupreata* y *A. potatorum*) obtenido mediante el método de Evanno y Goudet (2005). Arriba a la izquierda se muestra la verosimilitud promedio de 30 corridas para cada una de las posibles poblaciones k. La gráfica de arriba a la derecha muestra la diferencia media entre valores sucesivos de verosimilitud. Abajo a la izquierda muestra el valor absoluto de la diferencia de valores sucesivos de verosimilitud y la última gráfica muestra el valor modal de las diferencias de verosimilitud estandarizado con la desviación estándar de los datos. A partir de esta última se puede observar que la mayor probabilidad se encuentra en dos agrupaciones.

En la Tabla 19 y Figura 29 se puede observar los estimados de probabilidad posterior de pertenencia de cada población observada a cada uno de los dos grupos de mayor probabilidad calculada.

Tabla 22. Proporción de alelos pertenecientes a cada uno de los dos grupos más probables. (Evanno y Goudet)

	Grupo 1	Grupo 2		Grupo 1	Grupo 2
C1	0.129	0.871	P4	0.604	0.396
C2	0.028	0.972	P6	0.193	0.807
C4	0.199	0.801	P7	0.794	0.206
C5	0.023	0.977	P9	0.931	0.069
C10	0.053	0.947	P10	0.924	0.076
C13	0.018	0.982	P11	0.692	0.308
C14	0.057	0.943	P12	0.886	0.114
			P14	0.690	0.310
			He	0.3025	0.3484
			F _{ST}	0.0748	0.0190

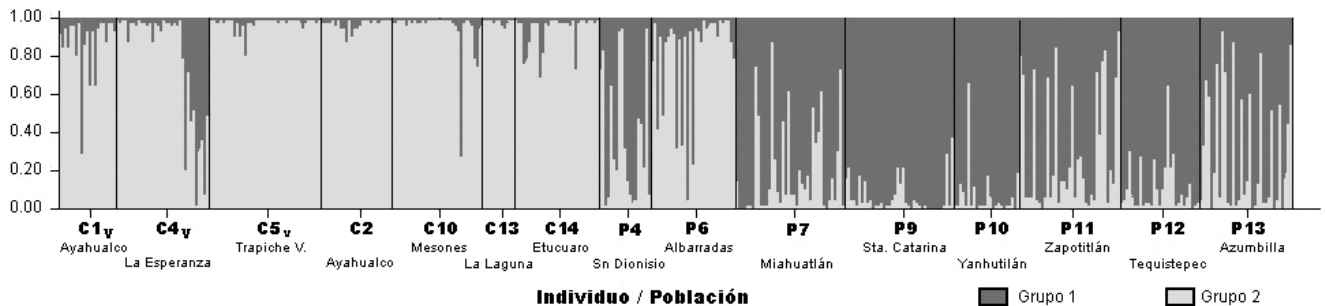


Figura 31. Porcentaje de pertenencia de cada individuo a cada una de las dos agrupaciones más probables (Evanno y Goudet) según el análisis mediante el programa structure. En gris oscuro grupo uno y en gris claro grupo dos.

AGRUPAMIENTO BAYESIANO EN *A. CUPREATA*

Se probó la probabilidad de agrupamiento de una a siete poblaciones de *A. cupreata*. Los valores máximos de verosimilitud obtenidos para cada una de las corridas de esta especie se puede observar en la tabla 20. El cálculo mediante el método de Evanno y Goudet (2005) muestra la máxima probabilidad en tres agrupamientos (Figura 30).

Tabla 23. Valores de verosimilitud, varianza, alfa y estructuración de la corrida de mayor valor de verosimilitud de las 30 realizadas en cada población posible K de 1 a 15 para todas las poblaciones de *A. cupreata*

K	Ln P(D)	Var[Ln P(D)]	alfa	Fst1	Fst2	Fst3	Fst4	Fst5	Fst6	Fst7
1	-13875.3	463.4	-	0.0039	-	-	-	-	-	-
2	-13425	727.6	0.0462	0.1441	0.0009	-	-	-	-	-
3	-13125.6	812.3	0.0401	0.0544	0.1427	0.1192	-	-	-	-
4	-13178.6	1524.3	0.0404	0.1145	0.1473	0.127	0.087	-	-	-
5	-13216.5	2064.7	0.0422	0.2235	0.111	0.0929	0.1623	0.2032	-	-
6	-14450.8	4751.9	0.0425	0.1424	0.143	0.0949	0.2294	0.231	0.0873	-
7	-13021.1	2413.1	0.041	0.1154	0.1906	0.1878	0.2409	0.1283	0.1993	0.2151

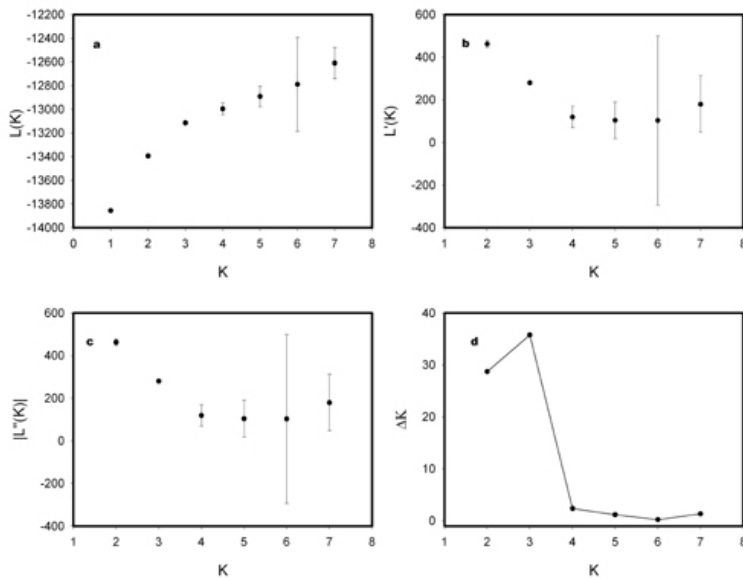


Figura 32. Número de agrupamientos con mayor verosimilitud para las poblaciones de *A. cupreata* obtenido mediante el método de Evanno y Goudet (2005). La gráfica a muestra la verosimilitud promedio de 30 corridas para cada una de las posibles poblaciones k. La gráfica b muestra la diferencia media entre valores sucesivos de verosimilitud. La gráfica c muestra el valor absoluto de la diferencia de valores sucesivos de verosimilitud y la gráfica d finalmente muestra el valor modal de las diferencias de verosimilitud estandarizado con la desviación estándar de los datos. A partir de la gráfica d se puede observar que la mayor probabilidad se encuentra en tres poblaciones.

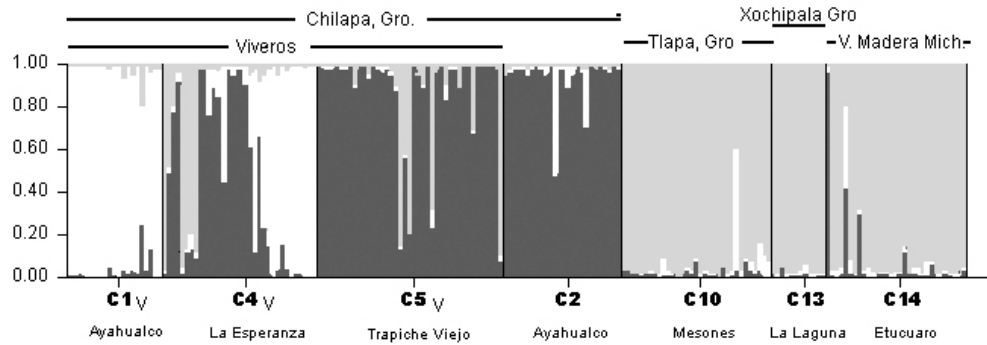


Figura 33. Porcentaje de pertenencia de cada individuo de *A. cupreata* a cada una de las tres poblaciones más probables (método Evanno y Goudet) según el programa Structure. En gris claro elementos tipo uno; en blanco elementos tipo dos y en gris oscuro elementos tipo tres.

Tabla 24. Proporción de alelos pertenecientes a cada uno de los dos grupos más probables de *A. cupreata* (Evanno y Goudet)

	Agrupamiento		
	1 (g.claro)	2 (blanco)	3 (g. obsc.)
C1v	0.025	0.944	0.031
C4v	0.167	0.409	0.423
C5v	0.117	0.013	0.870
C2	0.012	0.046	0.942
C10	0.947	0.035	0.018
C13	0.980	0.009	0.011
C14	0.901	0.029	0.070
He	0.3617	0.2923	0.3192
F_{ST}	0.0544	0.1427	0.1192

Las poblaciones de *A. cupreata* que se encuentran fuera de la región de Chilapa, Guerrero (C10, C13 y C14) muestran una alta proporción de elementos del agrupamiento uno, el cual presenta el valor de *He* más alto (0.3617) y el menor de *F_{ST}* (0.0544), mientras que las poblaciones ubicadas en Chilapa (C4v, C5v y C2) muestran una alta proporción de elementos del grupo tres exceptuando la población C1v que muestra un alto contenido de elementos del grupo 2.

AGRUPAMIENTO BAYESIANO EN *A. POTATORUM*

Se probó la probabilidad de agrupamiento de uno a ocho grupos para todas las poblaciones de *A. potatorum* mediante el programa Structure (Tabla 22). El análisis de Evanno y Goudet indica que la mayor probabilidad se encuentra en dos agrupaciones (Figura 32).

Tabla 25. Valores de verosimilitud, varianza, alfa y estructuración de la corrida de mayor valor de verosimilitud de las 30 realizadas en cada población posible K de 1 a 15 para todas las poblaciones de *A. potatorum*

k	ln P(D)	Var Ln P(D)	alfa	Fst1	Fst2	Fst3	Fst4	Fst5	Fst6	Fst7	Fst8
1	-17610.8	385.5	-	0.0011	-	-	-	-	-	-	-
2	-17313.7	615.8	0.0696	0.0888	0.0016	-	-	-	-	-	-
3	-17706.3	1853.2	2.2598	0.1593	0.0626	0.0813	-	-	-	-	-
4	-17624.1	2386.4	2.5322	0.1363	0.0978	0.0738	0.1234	-	-	-	-
5	-17032.7	1642.8	1.7863	0.1379	0.1128	0.0761	0.1199	0.0889	-	-	-
6	-17077.7	2280.3	0.3099	0.1406	0.1187	0.0752	0.1216	0.0992	0.0524	-	-
7	-16901.7	2285.9	0.2448	0.1404	0.1225	0.0762	0.1204	0.1021	0.0580	0.0885	-
8	-16843.6	2313.9	-	0.1467	0.1279	0.0797	0.1160	0.1069	0.0525	0.0876	0.0442

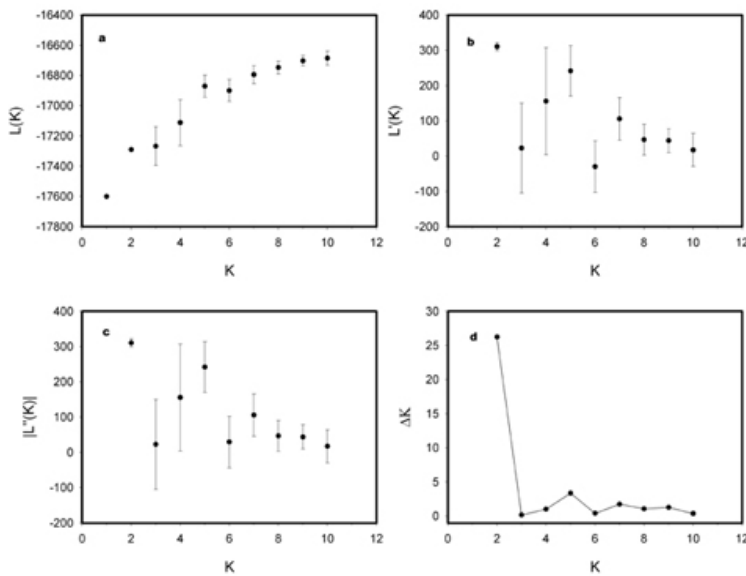


Figura 34. Número de agrupamientos con mayor verosimilitud para las poblaciones de *A. potatorum* obtenido mediante el método de Evanno y Goudet (2005). La gráfica a muestra la verosimilitud promedio de 30 corridas para cada una de las posibles poblaciones k. La gráfica b muestra la diferencia media entre valores sucesivos de verosimilitud. La gráfica c muestra el valor absoluto de la diferencia de valores sucesivos de verosimilitud y la gráfica d finalmente muestra el valor modal de las diferencias de verosimilitud estandarizado con la desviación estándar de los datos. A partir de la gráfica d se puede observar que la mayor probabilidad se encuentra en dos poblaciones.

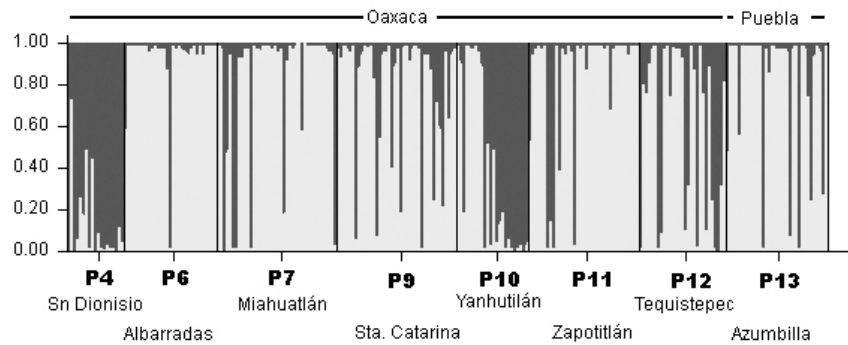


Figura 35. Porcentaje de pertenencia de cada individuo de *A. potatorum* a cada una de las dos poblaciones más probables (método Evanno y Goudet) según el structure. En gris obscuro: elementos tipo 1 y en gris claro: elementos tipo 2.

Tabla 26. Porcentaje de pertenencia de cada población de *A. potatorum* a cada uno de los dos agrupamientos más probables (Evanno y Goudet)

	Agrupación	
	Tipo 1	Tipo 2
P4	0.862	0.138
P6	0.066	0.934
P7	0.186	0.814
P9	0.216	0.784
P10	0.604	0.396
P11	0.155	0.845
P12	0.395	0.605
P13	0.182	0.818
<i>He</i>	0.2669	0.3302
<i>F_{ST}</i>	0.0875	0.0047

DISCUSIÓN

LOS ISSR Y SU POLIMORFISMO

Los marcadores utilizados en este estudio resultaron en 90 loci polimórficos, número superior al obtenido en otros estudios en el mismo género (Tabla 24; Aguirre Dugua, 2004; González, 2005; Colín, 2006; Trejo, 2006; Rocha, 2006).

La Tabla 24 resume el número de loci polimórficos obtenidos con ISSR's en diversos trabajos de *Agave*. Se puede observar que para el iniciador 811 se han obtenido valores de 12 (*A. hidalguensis*) a 25 (*A. xylonacantha*) bandas polimórficas, para el 841 solo se han reportado 25 (*A. g.-mendozae*), para el 846 se han reportado de 14 (*A. celsii*) a 24 (*A. g.-mendozae*) y para el 857 solo se tiene el reporte de Aguirre Dugua (2004) de 20 loci para *A. cupreata* y *A. potatorum*. Los valores obtenidos en este estudio para los iniciadores 811 (22), 841 (19) y 846 (19), se encuentran dentro de los rangos observados de variación en este género (Aguirre Dugua, 2004; González, 2005; Colín, 2006; Rocha, 2006; Trejo, 2006).

Tabla 27. Número de loci polimórficos por iniciador. Abajo y como porcentaje se muestra el polimorfismo total reportado por especie con el criterio de 95%. En paréntesis para cada iniciador en cada especie se calculó el porcentaje de polimorfismo esperado²⁰ respecto al total obtenido por especie por estudio. El número de loci polimórficos esperados por iniciador se obtuvo mediante la suma de los productos del número de loci observados por su polimorfismo dividido entre el número de especies amplificadas.

Iniciador	<i>A. difformis</i> ¹	<i>A. hidalguensis</i> ¹	<i>A. xylonacantha</i> ¹	<i>A. xylonacantha</i> ²	<i>A. celsii</i> ¹	<i>A. striatta</i> ¹	<i>A. striatta</i> ³	<i>A. cupreata</i> ⁴	<i>A. potatorum</i> ⁴	<i>A. g.-mendozae</i> ⁵	<i>A. potatorum</i> ⁶	<i>A. cupreata</i> ⁶	No. Loci esp./iniciador
811 (GA)₈C	19 (0.23)	12 (0.21)	21 (0.27)	25 (0.26)	17 (0.32)	17 (0.24)	17 (0.29)				22 (0.20)	22 (0.19)	4.76
841 (GA)₈YC										25 (0.32)	19 (0.18)	19 (0.16)	4.92
842 (GA) ₈ YG										16 (0.20)			3.33
846 (CA)₈RT	17 (0.20)	16 (0.28)	20 (0.26)	21 (0.21)	14 (0.26)	22 (0.31)	18 (0.30)	16 (0.39)	16 (0.37)	24 (0.31)	19 (0.18)	19 (0.16)	5.05
857 (AC)₈YC								20 (0.49)	20 (0.46)		30 (0.28)	30 (0.26)	8.91
853 (TC) ₈ RT	15 (0.18)	15 (0.26)	16 (0.21)	19 (0.19)	16 (0.30)	14 (0.20)	12 (0.20)						3.4
TOTAL	51 62%	43 76%	57 75%	65 67%	47 89%	53 76%	47 80%	36 88%	36 83%	65 84%	90 85%	90 80%	

¹(Rocha, 2006), ²(Colín, 2006), ³(Trejo, 2006), ⁴(Aguirre Dugua, 2004), ⁵(González, 2005), ⁶(Este trabajo).

²⁰ Calculado por regla de tres: porcentaje de polimorfismo obtenido por especie y marcador respecto al total de polimorfismo obtenido en la especie

Los iniciadores 846 y 857 fueron utilizados en *A. cupreata* y *A. potatorum* por Aguirre Dugua (2004) quien reporta, 16 alelos con el iniciador 846 y 20 con el 857. Al analizar los geles obtenidos por Aguirre Dugua pudimos detectar prácticamente todos los loci (aunque con diferente nombre) (Tabla 25): para el iniciador 846 logramos resolver 3 bandas de 300 a 400 pb no reportadas por Aguirre Dugua y para el iniciador 857, aunque no pudimos resolver el locus 950, logramos diferenciar los loci 1200, 682 y 458 así como 7 loci por debajo de 400 pb. Estas diferencias las adjudicamos a la metodología utilizada por Aguirre Dugua²¹ al fotografiar los geles, pues el tamaño de las fotografías utilizada no le permitía la diferenciación de regiones de bajo o alto peso molecular.

Tabla 28. Equivalencias entre los loci obtenidos por Aguirre Dugua (2004) y este estudio para los iniciadores 846 y 857

846				857					
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1900	1933	650	648	2000	2062	950	-	470	495
1800	1753	580	557	1800	1875	900	914	-	458
1200	1276	530	516	1600	1500	840	851	410	420
1020	1135	460	464	1400	1360	780	800	-	387
980	983	420	433	1300	1248	700	736	-	350
900	922	400	412	-	1200	-	682	-	322
850	862	-	387	1150	1150	650	644	-	274
800	818	-	332	1100	1100	600	603	-	238
740	764	-	305	1080	1050	570	557	-	222
700	692			1000	987	500	520	-	206

A: Aguirre Dugua, 2004; B: Este estudio

Al comparar los diversos estudios realizados con ISSR en *Agave*, también podemos observar que los iniciadores con alto contenido de A y C o que presentan anclaje de C son los que presentan el mayor número de polimorfismos, por lo que podríamos suponer que la secuencia de microsatélite afín de *Agave* presenta altos contenidos de estas bases nitrogenadas. El iniciador 857 utilizado en este estudio presentó el mayor número de polimorfismos y cumple con ambas características.

La fase experimental de este trabajo enfrentó principalmente dos dificultades: la primera se presentó durante el proceso de extracción, donde al alto contenido de azúcares, proteínas y compuestos secundarios inherentes a la composición química de las hojas de *Agave* dificultaba la obtención de ADN puro de alta calidad. Finalmente esto se pudo obtener mediante la implementación de diversos protocolos de limpieza (lavados en alcohol, fenol:cloroformo, cloroformo:octanol, o fenol) o mediante la adición de diversas sustancias al buffer de extracción (PVP40, Ac. ascórbico, DIECA, Polietilen Glicol, etc...) ver Apéndice III. La segunda dificultad se presentó durante la amplificación, pues debido a que los ISSR son secuencias aleatorias, pueden amplificar prácticamente cualquier organismo eucarionte, por lo que los problemas de contaminación no son raros durante el proceso de PCR.

²¹ Aguirre utilizó una cámara fotográfica mecánica Polaroid que producía fotografías de aproximadamente 12 x 10 cm

De forma general podemos decir que los marcadores ISSR resultaron ser una técnica de bajo costo y de fácil montaje y elaboración que resultaron en la detección de una gran cantidad de loci polimórficos para el análisis de la diversidad genética en *Agave cupreata* y *A. potatorum* y que dada la naturaleza neutra y semi-aleatoria de sus secuencias, permite estimar la variación sin el sesgo que podría desarrollar un marcador bajo selección. Sin embargo presentan diversos inconvenientes: son extremadamente sensibles a cualquier tipo de contaminación, la detección del polimorfismo mediante geles de electroforesis está determinada por el criterio del investigador, lo que agrega un posible factor de error en la determinación de la variación (se sugiere probar la detección de loci mediante procesos de secuenciación) y finalmente la naturaleza dominante de este tipo de marcadores limita el número de análisis potenciales que se podría obtener al analizar más de 30 muestras de diversas poblaciones de una especie permitiendo únicamente la estimación genética descriptiva de la población.

DIVERSIDAD GENÉTICA

Los estudios previos de genética de poblaciones realizados en el género *Agave* con ISSR (Tabla 2) indican valores de diversidad altos, con valores de He y P promedios de 0.22 y 72.6% para todo el grupo.

Los valores de He y de P obtenidos en este trabajo para las poblaciones analizadas (0.31-93.33%, 0.32-94.4% y 0.35-84.4% respectivamente) representan los máximos valores de variación obtenidos con ISSR para cualquier especie de *Agave*, únicamente equiparables con los de *A. angustifolia* silvestre (0.32) obtenidos con el mismo marcador (Vargas Ponce, 2007) o con los obtenidos con isoenzimas: *A. lechuguilla* (0.39) (Silva, 2003b) y *A. victoria-reginae* (0.33) (Martínez-Palacios, 1999) (Figura 34).

Los valores extremos de He de todo el género los presentan las especies autoincompatibles, presentan mayor efectividad en la formación de semillas con polinización nocturna y son utilizadas para la elaboración de tequila o mezcal. El valor mínimo de diversidad lo presenta el cultivar comercial de *A. angustifolia* var. *Azul*, de uso intensivo para elaboración de tequila y que prácticamente no presenta variación genética (0.08) y los valores máximos los presentan *A. cupreata* silvestre (0.35), *A. angustifolia* silvestre (0.32), *A. cupreata* de vivero (0.32), *A. potatorum* (0.31), y Cultivares tradicionales de *A. angustifolia* (0.27), todos ellos con algún uso en elaboración de mezcal, seguidos por *A. striata* var. *falcata* (0.26), cuyo sistema de reproducción no se conoce y *A. celsii* (0.24) cuya autopolinización no forma frutos.

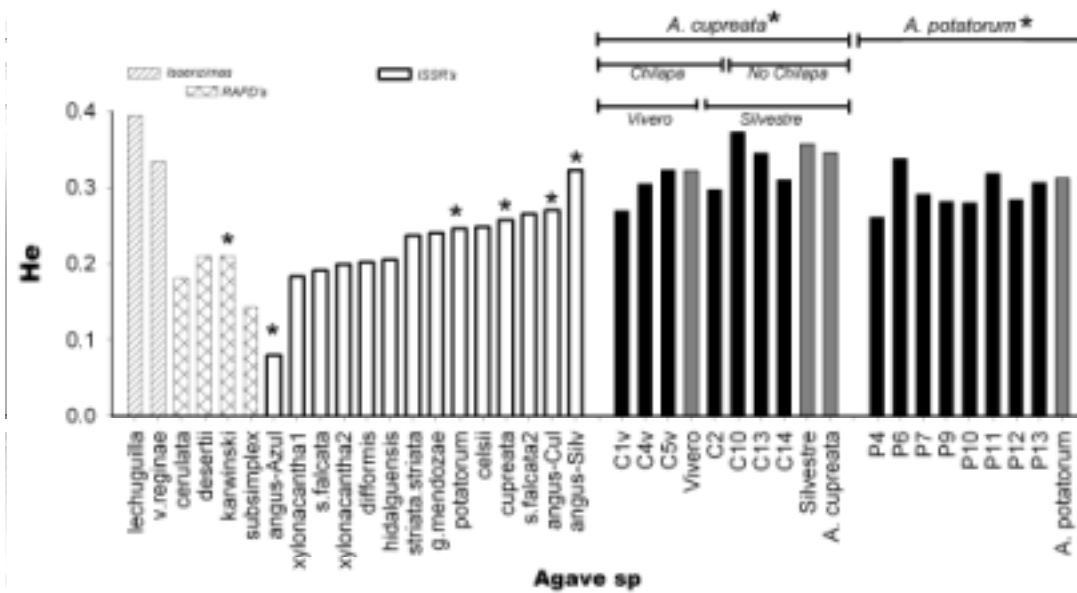


Figura 36. He para todos los estudios realizados con ISSR en el género *Agave*. El asterisco indica las especies utilizadas para la elaboración de mezcal o tequila. Datos de Isoenzimas, Rapd's e ISSR's obtenidos de Martínez-Palacios, 1999; Silva-Montellano, 2003b; Navarro et. al., 2003; López-Umutia, 2004; González Chauvet, 2001; Rocha-Munive, 2006; González-González, 2005 Trejo, 2006; Colín, 2006; Vargas-Ponce, 2007 y Aguirre Dugua, 2004.

En cuanto a los valores de polimorfismo, el cultivar comercial de *A. angustifolia* var. *Azul* también presenta el menor valor de polimorfismo de toda la especie (0.8% con RAPD, 20.2% con ISSR ó 61% con AFLP), mientras que los valores máximos los presentan las poblaciones silvestres *A. cupreata* silvestre (94.4%), *A. potatorum* (93.3%), *A. celsii* (89.4%), *A. angustifolia* silvestre (87.93%), y *A. cupreata* de vivero (84.4%), seguido de *A. striata* var. *falcata* (80.85%). Los cultivares tradicionales de *A. angustifolia*, que presentaron valores altos de heterocigosis, disminuyen su polimorfismo (69.28%) ubicándose dentro de los más bajos de *Agave*.

La Figura 35 muestra la correlación entre la He y P en la que se puede observar que las poblaciones bajo manejo (cultivar tradicional (e) y var. azul de *A. angustifolia* (f) y Vivero de *A. cupreata* (c)), aunque se encuentran dentro de los límites predichos de la correlación, se ubican fuera de los límites de confianza (95%) con una tendencia a disminuir el polimorfismo.

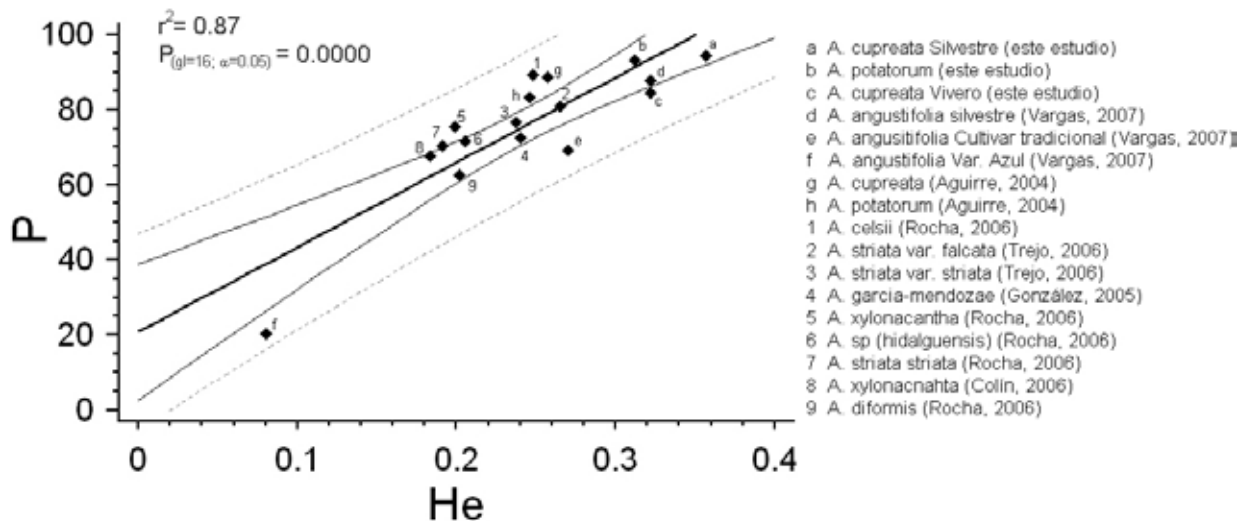


Figura 37. Correlación entre la heterocigosis esperada y el porcentaje de loci polimórficos de especies de *Agave* estudiadas mediante ISSR. La línea gruesa indica la correlación; la delgada el límite de confianza del 95% y la línea punteada los límites predichos. Para las referencias ver Tabla 2.

La variación puede ser introducida a una población mediante el lento proceso de mutación, o mediante la migración de genes de otra población con alelos diferentes y puede ser mantenida por selección balanceadora. La recombinación de esos nuevos genes puede dar origen a grandes cantidades de arreglos genotípicos aumentando considerablemente las combinaciones observadas de alelos en diferentes genes (Lewontin, 1974).

A. cupreata y *A. potatorum* presentan características que podrían explicar los altos niveles de diversidad: ambas son alógamas²² autoincompatibles (lo que aumenta considerablemente la posibilidad de generar nuevas combinaciones de alelos) con una amplia gama de polinizadores, principalmente nocturnos, dentro de los que se encuentran los murciélagos, que al volar largas distancias en una noche pueden conectar genéticamente poblaciones lejanas (García Meneses, 2004; Estrella Ruiz, 2008).

No se encontraron diferencias significativas entre la *He* o *P* que expliquen alguna diferenciación entre las dos especies, probablemente debido a su reciente divergencia y a que ambas especies presentan patrones reproductivos similares. Sin embargo, *A. cupreata* presenta una tendencia a mostrar niveles mayores de diversidad ($He = 0.3452$) que *A. potatorum* (0.3122).

Aunque los valores de diversidad son altos, la existencia de altos niveles de diversidad genética no constituyen en sí el único factor que puede asegurar la preservación de una especie (como referencia, ver Tabla 4). La generación de diversidad es un proceso largo, particularmente en especies de vida larga como los *Agaves*, mientras que la pérdida de diversidad genética es un proceso mucho más rápido que se puede

²² Con exclusiva reproducción sexual.

presentar por diversas causas, entre los que podemos mencionar cualquier tipo de selección no balanceadora y los factores aleatorios dependientes del tamaño poblacional como la deriva génica y la endogamia, poblacional (Lewontin, 1974; Futuyma, 1998; Hedrick, 2005).

El que *A. potatorum* presente menores valores de diversidad que *A. cupreata*, podría representar un riesgo a largo plazo para la conservación de esta especie, particularmente si consideramos que, según los estudios demográficos realizados por Ilsley y colaboradores (2007), las poblaciones de *A. cupreata* ya presentan tasas intrínsecas de crecimiento menores a uno, es decir, están disminuyendo. Los valores menores de diversidad de *A. potatorum* pudieran ser reflejo del tamaño y estado en que se encuentran sus poblaciones en el estado de Oaxaca.

DIVERSIDAD EN A. POTATORUM

Las poblaciones de *A. potatorum* mostraron diferencias significativas en la heterocigosis de las poblaciones P6 y P4 (Fig. 14), de forma que la población P6 “Alabarradas” presenta el máximo valor (0.3374) y la P4 “San Dionisio” el mínimo (0.2605), a pesar de que ambas se encuentran separadas por tan solo 24.9 km entre sí en el extremo este de la distribución de *A. potatorum*. Las demás poblaciones presentan valores intermedios, con una tendencia de las poblaciones P11 “Zapotitlán” ($He = 0.3183$), y P13 “Azumbilla” en Puebla, ($He = 0.306$), ubicadas en los extremos norte y oeste de su distribución, a mostrar valores ligeramente mayores de heterocigosis.

La Figura 36 muestra los valores de composición de los dos tipos más probables de *A. potatorum* obtenidos mediante el programa Structure, así como los valores de He y P obtenidos en este trabajo. Se puede observar que las poblaciones P6, P11 y P13, de alta heterocigosis y polimorfismo presentan la mayor proporción de elementos de tipo 2, mientras que la población P4 es está constituida predominantemente por elementos de tipo 1.

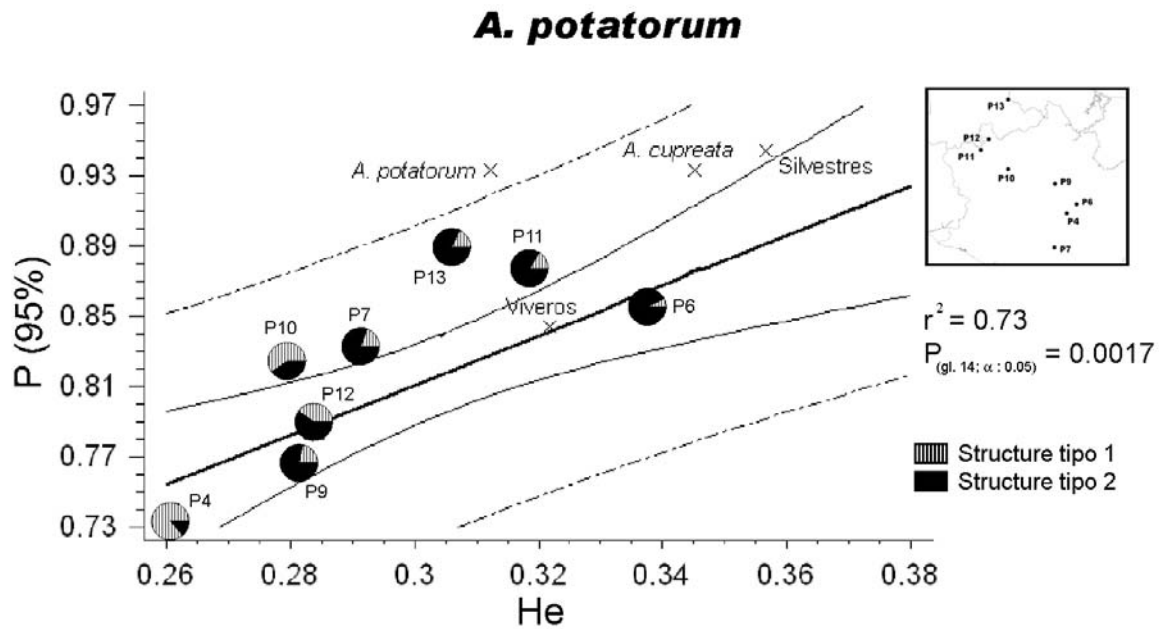


Figura 38. Valores de composición de elementos más probables (tipo 1 y tipo 2) según el programa Structure y sus valores de Heterocigosis esperada (He) y porcentaje de loci polimórficos (P) en poblaciones de *A. potatorum*. La línea gruesa indica correlación; la delgada el límite de confianza del 95%, la línea punteada los límites predichos y los taches los valores para el grupo.

DIVERSIDAD EN A. CUPREATA

Las poblaciones de *A. cupreata* también mostraron diferencias significativas en cuanto a diversidad al interior de sus poblaciones. La población C10 “Mesones”, ubicada en la región este de su distribución y limítrofe con *A. potatorum* mostró mayor diversidad genética ($He = 0.3723$) que las demás poblaciones, mientras que la población C1 “Vivero Ayahualco” presentó la menor ($He = 0.2689$), a pesar de que, al igual que con las poblaciones de *A. potatorum*, la distancia que separa a estas dos poblaciones es de tan solo 36 km. Las poblaciones con alto contenido de elementos de tipo 3 y bajo contenido de elementos de tipo 1 (C2 y C5v) o con alto contenido de tipo 2 (C1v), mostraron los valores más bajos de diversidad (Fig. 36)

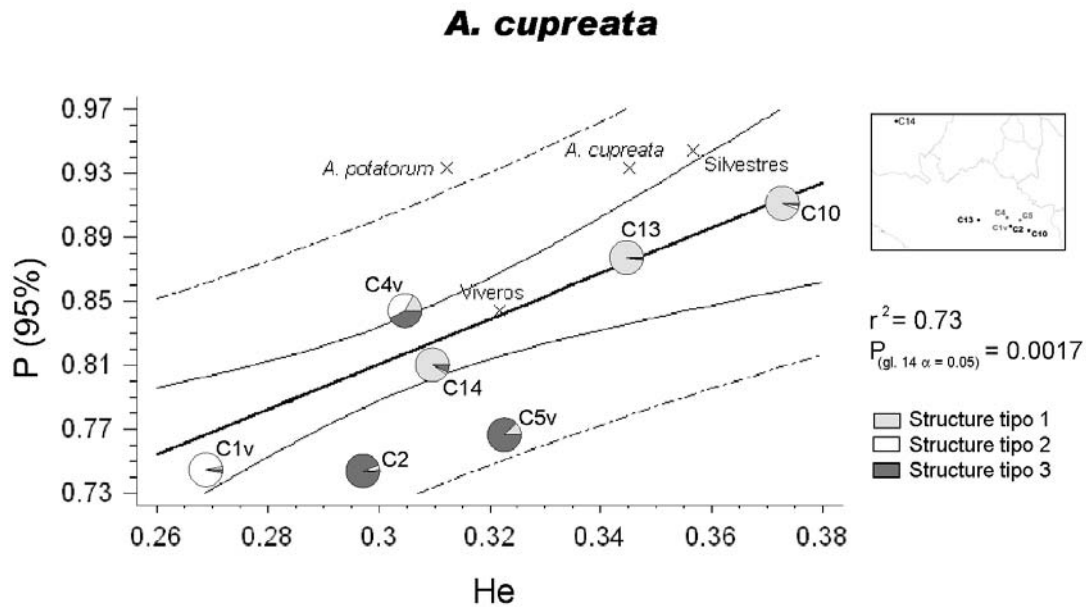


Figura 39. Valores de composición de elementos más probables (tipo 1, tipo 2 y tipo 3) según el programa Structure y sus valores de Heterocigosis y Polimorfismo en poblaciones de *A. cupreata*. La línea gruesa indica la correlación; la delgada el límite de confianza del 95%, la línea punteada los límites predichos y los tachos los valores para el grupo

ESTRUCTURACIÓN / DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

Todos los valores obtenidos en este trabajo indican poca a moderada diferenciación entre las poblaciones de las especies o entre los agrupamientos de las poblaciones (menores a 0.15), lo cual parece ser común en el género *Agave*, exceptuando a los cultivares tradicionales de *A. angustifolia* y a *A. striata striata* (Figura 38) que presentan valores mayores de estructuración. La comparación de *A. cupreata* contra *A. potatorum* obtuvo mayor estructuración ($\theta = 0.1224$) que entre las poblaciones de *A. cupreata* ($\theta = 0.1044$) o entre las de *A. potatorum* ($\theta = 0.0791$), indicando que existen más similitudes entre las poblaciones de cada especie que entre las dos especies y confirmando su separación en dos especies diferentes.

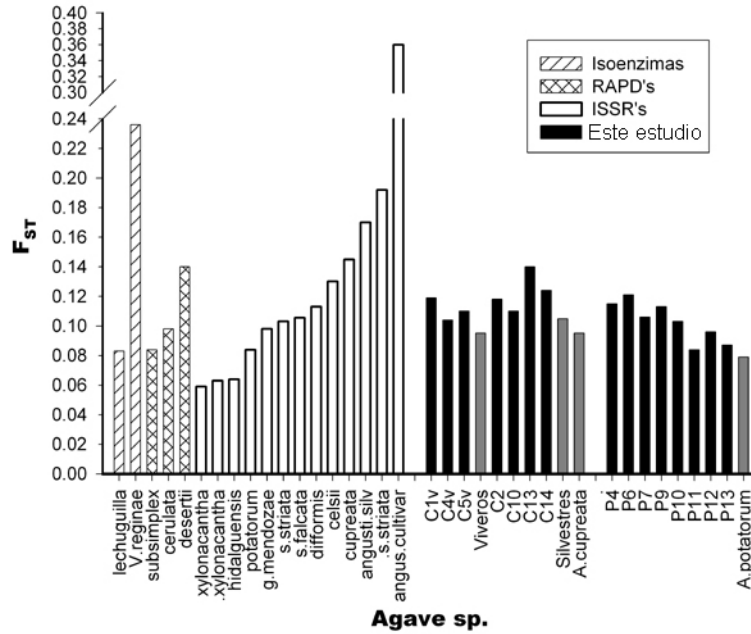


Figura 40. Valores de F_{ST} obtenidos para el género *Agave*

El análisis bayesiano de agrupaciones (Structure) también confirma la separación de *A. cupreata* y *A. potatorum* en dos grupos. Las poblaciones de *A. cupreata* presentan una marcada composición de elementos identificados como del grupo 2 mientras que *A. potatorum* del grupo 1 (Tabla 19 y Figura 29).

Las distancias genéticas obtenidas muestran valores muy pequeños, sin embargo, al comparar los valores de distancia con respecto a los obtenidos con el mismo marcador en otras especies de *Agave* (Figura 39), podemos observar que las distancias que hay al interior de *A. cupreata* o de *A. potatorum* son mayores a la que se puede encontrar al interior de las poblaciones de la mayoría de las otras especies de *Agave*. La distancia que separa a estas dos especies ($D = 0.0301$) no es tan grande como la que se puede observar en la mayoría de las comparaciones de especies pero muestra valores similares a las reportadas para *A. difformis* - *A. hidalguensis* - *A. xylonacantha*,

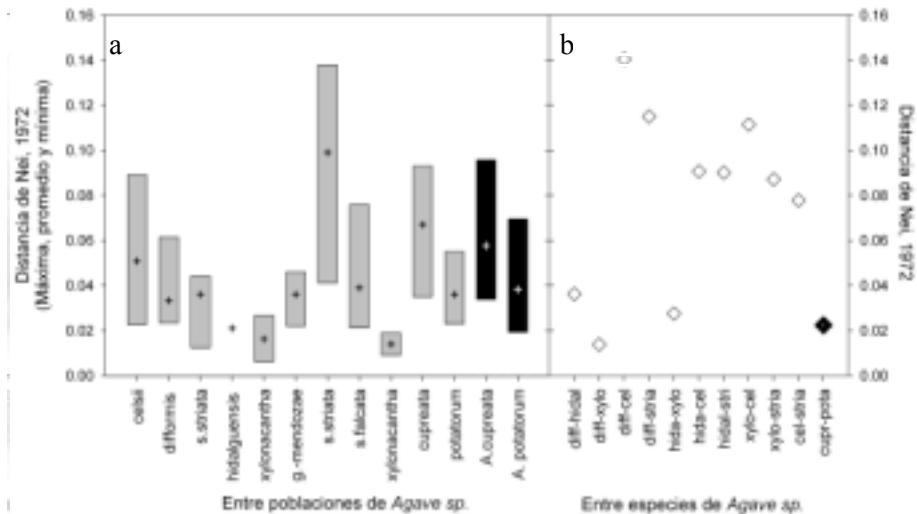


Figura 41. Distancias genéticas de Nei obtenidas con ISSR entre poblaciones de *Agave* (izquierda) y entre especies de *Agave* (derecha).

Todo lo anterior permite afirmar que existen evidencias genéticas como para considerar a *A. cupreata* y a *A. potatorum* como dos grupos genéticamente distintos, de muy alta diversidad, que se encuentran actualmente en un proceso de divergencia, por lo que presentan distancias genéticas y valores de estructuración pequeños.

A. CUPREATA

A. cupreata mostró mayores valores de diferenciación que *A. potatorum*. Los valores de estructuración pareada entre sus poblaciones indican que en promedio, las poblaciones silvestres que se encuentran fuera de la región de Chilapa (C10, C13 y C14), muestran mayor parecido con otra silvestre que con las de *A. potatorum*, mientras que las poblaciones de la región de Chilapa (C1v, C4v, C5v y C2) muestran mayor parecido con otras poblaciones de vivero ($F_{ST} = 0.101$) que con las silvestres de la misma especie ($F_{ST} = 0.112$) o que con *A. potatorum* ($F_{ST} = 0.113$).

Al analizar cada población por separado (Tabla 26), la población de vivero C1 “Ayahualco” muestra mayor parecido (a pesar de que se puedan encontrar a más 220 km de distancia) con las poblaciones de *A. potatorum* ($F_{ST} = 0.108$, particularmente con P13 $F_{ST} = 0.078$ y P11 $F_{ST} = 0.089$), que con los demás viveros ($F_{ST} = 0.117$) que pueden estar a menos de 2 km de distancia, o incluso que con las silvestres ($F_{ST} = 0.145$) de su misma especie. El vivero C4 “La Esperanza” también muestra gran similitud con las poblaciones de *A. potatorum* aunque presenta elementos de parecido con el vivero C5 y con la silvestre C10. El vivero C5 y las poblaciones silvestres de *A. cupreata* (C10, C13 y C14) muestran mayor similitud con otras poblaciones de *A. cupreata* y menor similitud con las de *A. potatorum*.

Tabla 29. Valores de estructuración pareada (F_{ST}) de cada población de *A. cupreata* en orden ascendente. En fondo gris las poblaciones de *A. potatorum*.

	C1v	C4v	C5v	C2	C10	C13	C14
P13	0.078	C5v 0.070	C2 0.069	C5v 0.069	C13 0.063	C10 0.063	C10 0.083
P11	0.089	P11 0.082	C4v 0.070	C4v 0.098	C14 0.083	C14 0.100	C5v 0.093
P9	0.103	P13 0.083	C10 0.083	P11 0.100	C5v 0.083	C5v 0.105	C4v 0.099
P4	0.104	C10 0.085	C14 0.093	P13 0.106	C4v 0.085	P6 0.123	C13 0.100
P12	0.106	P10 0.086	C13 0.105	P9 0.108	P6 0.100	C4v 0.141	P11 0.118
C4v	0.107	P12 0.096	P11 0.107	C1v 0.113	P11 0.103	P13 0.143	P6 0.119
C2	0.113	C2 0.098	P13 0.111	C10 0.115	P13 0.111	P11 0.146	P13 0.123
P10	0.115	C14 0.099	P9 0.123	P7 0.124	C2 0.115	C2 0.147	P12 0.131
C5v	0.128	C1v 0.107	P12 0.126	P12 0.125	P7 0.118	P10 0.150	P10 0.132
P7	0.132	P7 0.114	P7 0.126	P4 0.125	P10 0.123	P12 0.159	P7 0.133
P6	0.133	P9 0.116	P4 0.127	P10 0.134	P12 0.123	P4 0.160	C2 0.136
C10	0.137	P4 0.135	P6 0.127	C14 0.136	P4 0.135	P7 0.160	C1v 0.142
C14	0.142	C13 0.141	C1v 0.128	C13 0.147	C1v 0.137	C1v 0.175	P4 0.156
C13	0.175	P6 0.149	P10 0.142	P6 0.148	P9 0.153	P9 0.190	P9 0.173

El análisis de asignación de poblaciones por probabilidad bayesiana (Tabla 21 y Figura 31) confirma la predominancia de elementos de tipo 2 (Blanco) en las poblaciones C1v y C4v, que ahora podemos identificar como elementos de tipo *potatorum*, y la dominancia de elementos de tipo 1 (Gris claro) en las poblaciones C10, C13 y C14, ahora identificadas como elementos de tipo *cupreata* y que muestran valores altos de diversidad (Figura. 36). La población C1v (que mostró bajos índices de diversidad; Figura 37), a diferencia de la población C4 (que mostró valores altos de diversidad según Figura 37), prácticamente no presenta elementos de tipo 1 (Gris claro – *cupreata*).

La pérdida de relación entre el vivero C1 “Ayahualco” y las demás poblaciones silvestres está repercutiendo grandemente en la población silvestre más cercana (C2 “Ayahualco” a casi 2km de distancia), de forma que esta última está mostrando mayor similitud con los viveros o con las poblaciones de *A. potatorum* (que, en general, presentan menores valores de diversidad) que con las demás de *A. cupreata*.

La discordancia en los niveles de diferenciación encontrados entre las poblaciones de Chilapa (viveros C1, C4 y C5 y silvestre C2) y las que se encuentran fuera de Chilapa (silvestres C10, C13 y C14) explican la separación observada en el UPGMA (Figura 26) en dos grupos (Chilapa y No Chilapa) y la ubicación de la población de vivero C1 “Ayahualco” como más cercana a *A. potatorum*.

El patrón de aislamiento por distancia encontrado por Aguirre Dugua (2004) en poblaciones silvestres de *A. cupreata* hace difícil considerar que la diferenciación encontrada en las poblaciones de Chilapa (ubicadas en una zona intermedia entre las silvestres C10 y C13-C14) de este trabajo sean debidas

únicamente a un efecto de ancestría en esta región, y evidencian un patrón de flujo génico muy reciente en la región de los Chilapas entre las poblaciones de *A. cupreata* y las de *A. potatorum*, esto sin dejar de considerar la posibilidad de estar percibiendo la señal de efecto de ancestría común entre *A. cupreata* (incluyendo las poblaciones de Chilapa) y *A. potatorum* en la similitud con las poblaciones P11, P13 y P6.

El análisis de correlación entre el porcentaje de composición de cada uno de los grupos obtenidos con probabilidad bayesiana de *A. cupreata* y sus heterocigosis mostró una tendencia significativa entre la composición de grupo 1-cupreata y el aumento de heterocigosis (Figs.30 y 36 gris claro; $r^2 = 0.74$ $P_{(gl;6 \alpha:90\%)} = 0.055$) y entre la composición de grupo 2-potatorum y la disminución de diversidad (Fig 30 y 36 blanco-potatorum; $r^2 = -0.69$ $P_{(gl;6 \alpha:90\%)} = 0.083$); la composición de grupo 3 no presentó ningún valor significativo ante la heterocigosis. En la gráfica 36 también puede apreciarse que el efecto de grupo 1-cupreata es lo suficientemente fuerte como para aumentar la diversidad de la población C4v.

Por todo lo anterior, podemos concluir que, aunque las poblaciones de *A. cupreata* y *A. potatorum* muestran una clara señal de elementos de ambas especies debido a su reciente ancestría y actual proceso de divergencia, las poblaciones ubicadas en la región de los Chilapas muestran un patrón discordante a las demás poblaciones, con fuerte parecido a las poblaciones de *A. potatorum* debido a eventos de introgresión de genes procedentes principalmente de la zona nor-oeste de Oaxaca, posiblemente debidos a manejo humano que han disminuido la diversidad genética de las poblaciones silvestres de *A. cupreata* y modificado el patrón de aislamiento por distancia que presentaría de forma natural esta especie.

A. POTATORUM

Las comparaciones entre poblaciones indican que en promedio, y a diferencia de las poblaciones de *A. cupreata*, las de *A. potatorum* muestran mayor parecido con otras poblaciones de su misma especie que con cualquiera de *A. cupreata* (Tablas 13 y 14). *A. potatorum* muestra valores de estructuración más bajos que los de *A. cupreata*, indicando que el proceso de diferenciación de sus poblaciones pudiera ser más reciente o bien que los polinizadores de esta especie están actuando con mayor intensidad.

El estudio realizado por Estrella Ruiz (2008), indica una gran diversidad de visitantes florales (principalmente murciélagos, aves e insectos) así como una tendencia de esta especie a presentar un sistema de polinización generalista, lo que apoyaría la idea de un sistema de polinización eficiente y podría explicar la inexistencia de aislamiento por distancia en esta especie detectado en este y en el trabajo de Aguirre Dugua (2004). Las poblaciones P6 “Albarradas” P4 “Sn. Dionisio” y en menor grado las poblaciones P9 “Sta. Catarina” y P7 “Miahuatlán” (todas ubicadas en la parte central de Oaxaca), muestran menor parecido con las demás poblaciones de *A. potatorum*, por lo que, siguiendo la idea de efectividad de polinizadores, podríamos esperar que exista mayor flujo genético en la zona norte de

Oaxaca (límitrofe con el estado de Puebla) que en la región centro de Oaxaca (alrededores de la “Región del Mezcal”).

La constancia de parecido en todas las poblaciones de *A. potatorum* con las poblaciones P11 “Zapotitlán”, P12 “Tequistepec” y P13 “Azumbilla” observadas tanto en los valores de F_{ST} (Tabla 27) como en las distancias de Nei (Tabla 17), podría indicar la presencia de elementos comunes o ancestrales en estas poblaciones ubicadas en la zona norte de Oaxaca, en los alrededores de Tehuacán, Puebla.

Cabría mencionar que los evidencias más antiguas de uso del maguey se remiten a estas zonas de estudio: en las cuevas de Tehuacán (cerca de las poblaciones P10 “Yahnuitlán” y P13 “Azumbilla”) se encontraron coprolitos humanos con restos quemados de *Agave* que datan de 7000 a 1500 A.C. (Callen, 1965); en la cueva de Guilá Naquitz (Cerca de Mitla y de la población P9 “Sta. Catarina”) se reportan restos de *Agave* masticado y chupado que datan de 12 mil a 4 mil años A.C. (Buckler IV et al., 1998) y a orillas del río Yahnuitlán (en las inmediaciones de la población P10 “Yahnuitlán”), se encontraron hornos para cocinar maguey que datan de 2000 A.C. (Winter, 2004).

Tabla 30. Valores de estructuración pareada (F_{ST}) por población en orden ascendente. En fondo gris las poblaciones de *A. cupreata*

P4	P6	P7	P9	P10	P11	P12	P13
P11 0.077	P11 0.087	P11 0.055	P13 0.062	P11 0.049	P12 0.042	P11 0.042	P11 0.046
P12 0.077	C10 0.100	P13 0.062	P11 0.073	P12 0.054	P13 0.046	P13 0.046	P12 0.046
P13 0.085	P13 0.107	P12 0.069	P12 0.078	P13 0.059	P10 0.049	P10 0.054	P10 0.059
P9 0.094	P7 0.111	P10 0.072	P7 0.087	P7 0.072	P7 0.055	P7 0.069	P7 0.062
P10 0.100	P12 0.112	P9 0.087	P10 0.088	C4v 0.086	P9 0.073	P4 0.077	P9 0.062
C1v 0.104	P4 0.117	P6 0.111	P4 0.094	P9 0.088	P4 0.077	P9 0.078	C1v 0.078
P6 0.117	C14 0.119	C4v 0.114	C1v 0.103	P4 0.100	C4v 0.082	C4v 0.096	C4v 0.083
P7 0.122	C13 0.123	C10 0.118	C2 0.108	C1v 0.115	P6 0.087	C1v 0.106	P4 0.085
C2 0.125	C5v 0.127	P4 0.122	C4v 0.116	C10 0.123	C1v 0.089	P6 0.112	C2 0.106
C5v 0.127	C1v 0.133	C2 0.124	C5v 0.123	C14 0.132	C2 0.100	C10 0.123	P6 0.107
C4v 0.135	P10 0.133	C5v 0.126	P6 0.136	P6 0.133	C10 0.103	C2 0.125	C5v 0.111
C10 0.135	P9 0.136	C1v 0.132	C10 0.153	C2 0.134	C5v 0.107	C5v 0.126	C10 0.111
C14 0.156	C2 0.148	C14 0.133	C14 0.173	C5v 0.142	C14 0.118	C14 0.131	C14 0.123
C13 0.160	C4v 0.149	C13 0.160	C13 0.190	C13 0.150	C13 0.146	C13 0.159	C13 0.143

El análisis bayesiano de *A. potatorum* indica una alta probabilidad de composición en dos grupos: uno con mayor presencia en casi todas las poblaciones de esta especie (Fig. 32 elementos tipo 2 gris claro), elementos que podríamos identificar como de *A. potatorum* y que mostraron una correlación significativa ($r^2 = 0.81 P_{(gl:6 \alpha:95\%)} = 0.0139$) con el aumento de heterocigosis, y otro con predominancia en las poblaciones P4 y P10 (Figura 33) cuya pertenencia no pudimos identificar en este trabajo y que disminuyen significativamente la diversidad ($r^2 = -0.81 P_{(gl:6 \alpha:95\%)} = 0.013$).

CARACTERES DE HISTORIA DE VIDA

La Figura 40 muestra la correlación entre heterocigosis y estructuración de diversos caracteres de historia de vida así como para los diversos trabajos en el género *Agave* con RAPD's e ISSR's. Según Hamrick y Godt (1997), Loveless y Hamrick (1984) y Nybom y Bartish (2000), el sistema de polinización cruzado, la polinización por aves o murciélagos, la dispersión de semillas por viento, así como los sistemas de reproducción sexual son caracteres que presentan una tendencia a mostrar niveles altos de diversidad y bajos de estructuración. Las plantas perennes de vida larga suelen presentar alta heterocigosis y baja estructuración mientras que las de vida corta bajan la heterocigosis y aumentan la diferenciación. Las plantas monocárpicas no muestran relación con la heterocigosis pero tienden a aumentar la estructuración mientras que las policárpicas a disminuirla y las plantas de distribución regional presentan mayor variación que las endémicas, de amplia distribución o restringidas.

Como se puede observar en la Figura 40, la mayoría de las especies de *Agave* presentan valores de diversidad que van de bajos a altos y presentan valores de estructuración bajos. *A. cupreata* y *A. potatorum*, presentan patrones genéticos concordantes con plantas perennes de vida larga con sistema de reproducción sexual y cruzada, polinizados por murciélagos o aves dispersadas por viento, ya que todas estas características promueven altos niveles de diversidad y bajos de estructuración.

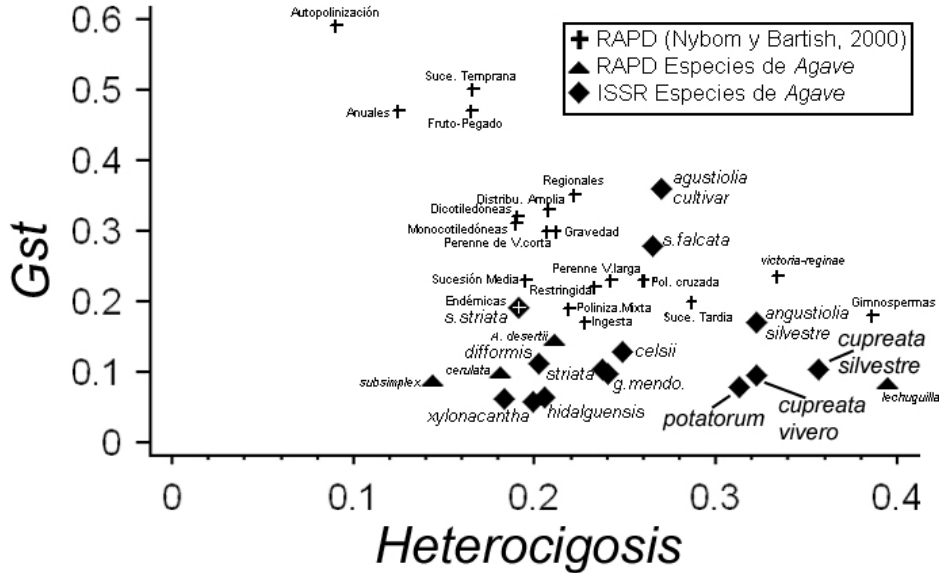


Figura 42. Correlación entre la diversidad genética y la estructuración. Datos de caracteres de vida obtenidos de Nybomy Bartish (2000)

CONCLUSIONES

- *Agave cupreata* y *A. potatorum* muestran ser dos especies cercanas genéticamente de muy reciente divergencia y altos niveles de diversidad genética cuya diferenciación responde a un patrón de aislamiento por distancia muy reciente que está siendo enmascarado por su propagación como especie mezcalera.
- Los altos valores de heterocigosis de *A. cupreata* y *A. potatorum* se pueden explicar porque ambas son plantas perennes de vida larga, alógamas e autoincompatibles, de distribución regional polinizadas por murciélagos, dispersadas por viento y de muy reciente origen. Sin embargo, estos altos niveles de diversidad pueden verse afectados en un futuro no muy lejano por efectos aleatorios dependientes del tamaño poblacional, por lo que consideramos como urgente conocer la demografía de ambas especies, particularmente debido a que su uso (en cualquiera de sus formas: mezcal, construcción, o alimento) involucra eliminar la fase reproductiva de estas plantas de exclusiva reproducción sexual.
- Las zonas de mayor uso para la elaboración de mezcal a partir de estas especies presentan una tendencia a disminuir el polimorfismo (región de Chilapa en Guerrero y Zona del Mezcal en Oaxaca). Los niveles más altos de variación genética en *A. cupreata* se encuentran en sus poblaciones silvestres.
- Las poblaciones ubicadas en la región de Chilapa muestran un patrón discordante a las demás poblaciones silvestres de *A. cupreata*, con un fuerte parecido a las poblaciones de *A. potatorum* debido probablemente a eventos de introgresión de genes procedentes principalmente de la zona nor-oeste de Oaxaca, que está repercutiendo en la disminución de la diversidad de las poblaciones de *A. cupreata* por lo que se recomienda replantear los mecanismos de intercambio y obtención de semillas en los viveros de la S.S.S. Sanzekan Tinemi, particularmente en el vivero C1 “Ayahualco” que muestra fuertes elementos de *A. potatorum*.
- Las poblaciones de *A. potatorum* que muestran mayor parecido con *A. cupreata*, muestran alta heterocigosis, por lo que sugerimos realizar estudios de una posible depresión por endogamia en las poblaciones de *A. potatorum*.
- Sugerimos realizar análisis filogeográficos que puedan determinar el posible origen del grupo en la región nor-oeste de Oaxaca.
- Cualquier plan de conservación de estas especies (particularmente de *A. potatorum*) debe considerar

su uso y beneficio por parte de las comunidades que poseen el recurso. El aumento en la demanda de mezcal requiere estrategias de mercado que permitan a los productores obtener beneficios sin afectar la dinámica natural de estas dos especies y sin impedir que los productores puedan acceder a esta fuente de recursos.

- Sugerimos ampliar la Denominación de Origen a “todas las especies de *Agave* que no estén contempladas en otra D.O.” para evitar el reemplazo de flora nativa por aquellas favorecidas por la N.O. vigente (como pudiera ser el caso de *A. cupreata*).
- Los ISSR resultaron ser una técnica de bajo costo y de relativo fácil montaje y elaboración que resultaron en la detección de una gran cantidad de loci polimórficos (90) y repetibles que permite estimar la variación sin el sesgo que podría desarrollar un marcador bajo selección. Sin embargo, son fácilmente susceptibles a contaminación, la detección de bandas puede resultar a criterio del investigador y su naturaleza dominante impide el análisis a mayor detalle de diversos parámetros evolutivos de interés, sobre todo cuando se analiza una considerable cantidad de poblaciones.

APENDICE I. BIOLOGÍA REPRODUCTIVA EN AGAVE

Especie	Mezcal	Tamaño						Mes de floración	Experimentos polinización										Nectar			Visitantes	Referencia								
		ancho (m)	largo (m)	Escapo (m,max)	Edad planta (años)	Bulbos/Planta	Horade dehiscencia		Autopol.		Cruzada		Sin Polini		Control		Nocturna		Diurna		Pico			ul	%						
									F	S	F	S	F	S	F	S	F	S	F	S						F	S	F	S		
<i>A. americana</i>	si	3	2	9	-	2.3	-	May-Sep	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*a * b		
<i>A. amer. var Oaxaquesisi</i>	si	3	2	10	-	0.5	-	Jun-Ago	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*a * b		
<i>A. angustifolia</i>	si	1.5	1	5	20	12	noct	en-ma (N) Jul-Oct (S)	0	0	0.6	0.5	0	0	0.1	0.5	0.2	0.5	0	0	noche	180	18-26	Lc, Ab, Ap, Av	Molina-Freaner y Eguiarte, 2003;			*a * b			
<i>A. convallis</i>	si	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
<i>A. cupreata</i>	si	1	0.8	6	5?	0	-	Ene-Mar	0	0	0.2	0.4	0	0	0.2	0.4	0.1	0.4	0.1	0.1	-	-	-	Lp, Ln, Es, Co (Trochilidae), Vc	García-Meneses 2024;			*a * b			
<i>A. duranguensis</i>	si	2	1.5	4.5	-	-	-	Jul-Nov	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	* b		
<i>A. inaequidens</i>	si	2.5	1.5	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	* b		
<i>A. karwinskii</i>	si	1.5	4	3.5	-	2.3	-	Jun-Sep	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*a * b		
<i>A. marmorata</i>	si	2	1.5	6	-	0.2	-	Abr-Jun	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*a * b		
<i>A. maximiliana</i>	si	1.5	0.8	8	-	-	-	Ene-May	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*a * b		
<i>A. palmeri</i>	si	-	-	-	-	-	noct	Jul-oct	0	0	0.5	0.4	-	-	0.2	0.3	0.7	0.2	0.1	0.2	21:00	702	13-17	No, Hy, Ap, Co (selasphorus), y pocos Bo, Xy, Lc	Slauson, 2000						
<i>A. potatorum</i>	si	1	0.7	4	-	0	noct	Sep-Dic	0	0	0.5	0.8	-	-	0.5	0.7	0.7	0.7	0.6	0.8	-	-	-	-	-	-	-	-	Estrella-Ruiz 2008; Espinoza-Paz, et al., 2005; *b		
<i>A. rhodacantha</i>	si	4	2	9	-	1	-	May-Ago	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*a * b		
<i>A. salmiana</i>	si	2	1.5	8	8	0	noct	May-Sep	0.1	0.2	0.37	0.36	-	-	0.19	0.23	0.34	0.21	0.44	0.23	16:00	102	12.1	Lc, Av (Amazilia), Ecterus, Eugens, Hylocharis, Taxostoma, Diglossa, Colaptes), Te	Eguiarte, 2000; Martínez del Río y Eguiarte, 1987; Estrella-Ruiz, 2008;			*a *b			
<i>A. tequilana</i>	si	3	2	5	-	1	-	May-Jul	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*b		
<i>A. celsii</i>	no	50	11	2.5	-	-	-	Mar-May	0	0	0.2	0.2	-	-	0.5	0.3	0.2	0.1	0	0	22:00	133	14.8	Lc, Ch, Gl, Bo, Ab, Co, Es.				*c			
<i>A. chrysantha</i>	no	75	13	7	-	-	noct	May-Ago	-	0.5	0.1	-	-	0.2	0.2	0	0.2	0.2	0.1	0	24:00	288	15-17	Ap, Co, No, Hy, Av (Selasphorus)	Slauson, 2000						
<i>A. difformis</i>	no	9.5	13	5	-	-	-	May-Ago	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2:00	82.9	13.1	Lc, Ch, Gl, Ab, Bo, Es				*c			
<i>A. garcia-mendozae</i>	no	58	10	-	-	0	-	Jun-Ago	0.2	0.3	0.5	0.7	0.1	0.3	0.6	0.6	0.2	0.2	0.1	0.1	1:00	77.5	20.2	Lc, Ch, Ap, Bo, Es	González-González, 2005						
<i>A. lechuguilla</i>	no	40	50	3.5	15-24	-	-	-	-	0.8	-	0.5	-	-	0.5	0.5	0.4	-	0.3	-	-	-	12-52	-	Es, Co, Ab	Silva-Montellano, 2001; Silva-Montellano y Eguiarte, 2003a					
<i>A. macroacantha</i>	no	27	27	2	34	7.3	noct	May-Jun	0	-	0.2	0.7	0.0	1	-	0.2	0.6	0.3	-	0	-	-	-	18-24	110	-	Bo, Dr, Ve, Hy (Ichneumonidae), Ch, Le, No, Es, Ab, Co. *1	Arizaga et al. 2000a, Arizaga, 1998.			
<i>A. schottii</i>	no	-	-	-	36	-	-	-	0.2	-	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Hy, Bo, Co	Trame 1995					
<i>A. sp.</i>	??	-	-	-	-	4.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2:00	91.5	13.7	LCG Ab, Bo	Espinoza-Paz, et al. 2005 *c						

Especie	Tamaño							Experimentos polinización										Nectar			Visitantes	Referencia			
	Mezcal ancho (m)	largo (m)	Escapo (m max)	Edad planta (años)	Bulbilos/Planta	Horade dehiscencia	Mes de floración	Autopol.		Cruzada		Sin Polini		Control		Nocturna		Diurna		Pico			ul	%	
								F	S	F	S	F	S	F	S	F	S	F	S						F
<i>A. striata</i>	no	75	85	2.5	-	-	Jun-Oct	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20:00	219	19.3	Lc, Ch, Gl, Ab, *c Bo, Es	
<i>A. subsimplex</i>	no	27	60	3.5	11	noct	Abr-Jun	0	0	0.4	0.5	0	0	0.2	0.5	0.1	0.3	0.2	0.3	noct	43	22-24	Ap, Ab, Vè	Molina-Freaner y Eguiarte, 2003	
<i>A. xylonacantha</i>	no	-	-	6	-	-	Feb-Abr	0.3	0.2	0.5	0.5	-	-	0.5	0.4	0	0	0	0	24:00	118	24.7	Lc, Ch, Gl, Ab, *c Bo, Co, Es		
PROMEDIO		18.5	13.8	5.5	2.1	noct		0.069	0.15	0.35	0.46	0.0	0.11	0.31	0.42	0.26	0.27	0.16	0.18		166	16.97			
1* Salticidae(Aracnidae), Mariposa s, microleptidopteros			Lc- Leptonycteris curasoae Ch-Cheronycteris mexicana, Gl- Glosophaga Ln- Leptonycteris nivalis				Av- Aves (S.L.) Co- Colibries (S.L.)				Ab- Abejas (S.L.) Ap- Apis mellifera Vè- Avispas Hy- Hymenopteros				Bo- Bombus sp. Xy- Xylocopa sp. Dr- Drosophila				Es- Esfingido (S.L.) No- Noctuidae Te-Tegeticula sp.			*a Espinoza-Paz, et al.,2005; *b Conabio, 2006 *c Rocha-Munive, 2005			

APÉNDICE II. LOS ORÍGENES DEL MEZCAL

El inicio del uso del *Agave* se remota a tiempos prehistóricos. En 1965, Callen analiza el contenido de más de 500 coprolitos humanos de diversas cuevas de Tamaulipas y de Tehuacán que datan de 7000 a.c. a 1500 d.c. encontrando restos quemados de *Agave* que, junto con los cactus, calabazas, chiles y restos de hueso, son una constante en las distintas cuevas a lo largo del tiempo (Calen, 1965). En las cuevas Guilá Naquitz en Oaxaca también se reportan restos de *Agave* masticado y chupado que datan de 12 mil a 4 mil años a.c. y donde los cambios climáticos de aquel entonces favorecieron el crecimiento de estas plantas (Buckler IV, et al., 1998). Excavaciones a orillas del Arroyo Yanhuítlan en el municipio del mismo nombre en Oaxaca, se encontraron hornos para cocinar maguey que datan de 2000 a.c. (Winter, 2004). En el sur de Arizona se han encontrado extensos rodales de cultivo de *A. murpheyi*, *A. delamateri* y *A. phillipsiana* acompañados de varios hornos con residuos carbonizados de inflorescencias, espinas y dientes de maguey así como herramientas de piedra utilizadas para su despulpe que datan del período clásico de la cultura Hohokam en Arizona E.U. (Fish et al., 1992; Buren et al., 1992; Parker et al., 2007); en Metztitlán Hidalgo se han encontrado herramientas de obsidiana utilizadas para raspar maguey que datan del postclásico (900-1500 d.c.) (Mandujano et al. 2002)

La evidencia del uso del maguey durante el período prehispánico así como de la colonia también es basto. Los indígenas mexicanos se referían a esta planta como *metl* (nahuatl), *tacamba* (purépecha), *huadá* ó *bomi'ni* (otomí), *dua* ó *doba* (zapoteco), *yabi* (mixteco) (García-Mendoza, 1998). La palabra maguey fue traída por Hernán Cortés a partir del nombre que le daban a esta planta los taínos, habitantes de la ahora República Dominicana. En 1520, en su segunda carta de relación escrita al rey Carlos V, Hernán Cortes da el primer aviso al viejo mundo de la existencia de esta planta: “*venden miel de unas plantas que llaman en las otras islas maguey que es muy mejor que arrope, y destas plantas facen azúcar y vino que asimismo venden*” (Cortés, 1520).

En 1546, Juan de Tolosa reporta una banda de zacatecos acampando en la falda del cerro de la Buña quienes se alimentaban de vino de maguey (pulque) (en: Aguirre-Rivera et al, 2001). Francisco Hernández (1582), maravillado por las propiedades y capacidades adaptativas de estas plantas describe al maguey como una planta que “*sola podría fácilmente proporcionar todo lo necesario para una vida frugal y sencilla ... no la dañan los temporales ni los rigores del clima, ni la marchita la sequía*” (F. Hernández, Historia Natural de Nueva España, 1574-1577). En 1580 Gonzalo de las Casas en su relataría de la “Guerra de los chichimecas” decía que para los guachichiles (o “cabezas rojas”, grupo indígena que habitaban en Jalisco, Zacatecas y S.L.P.) “*el maguey les es de gran ayuda y mantenimiento que nunca les falta, y del que se aprovechan e todo lo que los demás de la Nueva España... comen las hojas y raíz cocidas e hornillos que acá llaman mixcali y es buena comida y hacen vino del que beben*” (en Aguirre-Rivera et al. 2001). Una relatoría de las misiones en territorio yaqui en 1645 de Andrés Pérez de Ribas se describen grandes magueyeras plantadas junto a las casas y su uso como alimento (en Aguirre-Rivera et al., 2001). Ya para 1792, el misionero jesuita Joseph Acosta diría que “*El árbol de las maravillas es el maguey.. de que da agua, vino, aceyte, vinagre, miel, arrope, hilo, aguja y otras cien cosas. El es un árbol, que en la Nueva-España estiman mucho los Indios... y en los campos se da y le cultivan. ... El tronco, que es grueso, quando está tierno, le cortan, y queda una concavidad grande, donde sube la substancia de la raíz, y es un licor que se bebe como agua, y es fresco y dulce: este mismo cocido se hace como vino, y dexandolo acedar, se vuelve vinagre: y apurandolo mas al fuego es como miel; y á medio cocer sirve de arrope, y es de buen sabor y sano, y á mi parecer es mejor que arrope de uvas*”. (Joseph Acosta, Historia Natural y Moral de las Indias, 1792).

No fue sino hasta 1753 que Linneo describiera a los magueyes bajo un mismo género (incluido en las plantas de 6 estambres y 1 ovario: hexandria y monoginia) al que diera el nombre de *Agave* (que en griego quiere decir ilustre, admirable), incluyendo cuatro especies: *A. americana*, *A. vivipara* (*A. cantalata*), *A. virginica* (*Manfreda virginica*) y *A. fetida* (*Furcraea sp.*) (Linneo, 1753).

En la tragedia “Las Bacantes” de Eurípides (409 A.C.), Ágave, es la madre de Penteo, Rey de Tebas e hija de Cadmo, fundador de Tebas, que dirige, junto con sus hermanas a las ménades, adoradoras de Baco. Luego de que el rey desconociera a Baco como dios, éste (hijo de la hermana de Ágave, Semele con Zeus) se presenta en forma humana y engañando a Penteo, lo viste de mujer y lo guía al Citerón, sitio en el que se realizaba un culto secreto a Baco. Ágave, al ser avisada por el mismo Baco de la presencia del espía, en total frenesí arranca el brazo de su hijo y con ayuda de las demás ménades descuartizan su cuerpo y clava su cabeza en su tirso²¹. Entra triunfante a Tebas pensando que es un león al que ha matado. Enterada por su padre Cadmo, de que es su propio hijo al que ha matado, se destierra lejos del Citerón. (Las ménades, Eurípides, 409 A.C.). Es probable que Linneo al describir a la ilustre planta de la que se obtiene la bebida de los dioses (pulque), encuentre el destino final de Ágave, la adoradora de Baco auto-desterrada de Tebas por la pena de asesinar

21 Vara enramada cubierta de hojas de hiedra y parra, que solía llevar la figura de Baco, y que usaban los seguidores en las fiestas dedicadas a este dios

a su hijo.

El origen de la fermentación del agave (pulque), así como de su cocción bajo tierra como alimento (mexcal) es sin lugar a dudas de origen prehispánico, pero el origen de la destilación del maguey para generar la bebida mezcal muchas personas se lo adjudicaban a los españoles, quienes buscaron una bebida equiparable al ron que pudiesen realizar con materiales disponibles en el nuevo continente (B. de Barrios, 1971; Valenzuela-Zapata y Nabham, 2003), sin embargo en 1898 el etnólogo noruego Carl Lumholtz encuentra que los huicholes de Nayarit realizaban mezcal mediante un destilador muy sencillo de barro²², que en 1944 Henry Bruman (1944) describe como un destilador de origen filipino. A partir de entonces surge una nueva teoría de su origen documentada histórica, genética y etnográficamente por Colunga y colaboradores (Zizumbo Villareal y Colunga, 2007 y 2007b).

En 1566, luego de establecer las nuevas colonias españolas en las Islas Filipinas y fundar la ciudad de Manila, regresa al puerto de Navidad Jalisco, el galeón “San Gerónimo” inaugurando una nueva ruta comercial conocida como la del “Galeón de Manila” o la “Nao de la China”, transportando a los primeros esclavos filipinos (o chinos, como se les decía) a las primeras 25 encomiendas de Colima, principalmente en Caxitlán para el trabajo ganadero, de cacao y coco (Amparo-Tello, 2000). Con estos recién llegados, se introduce a México la palapa, un método sencillo de destilación basado en ollas de barro (Bruman, 1944, 1945) y su subsecuente vino elaborado con sabia de cocotero o vino de coco hasta hoy conocido como tuba en colima “... en este valle de Caxitlán los indios y los chinos hacen alcohol de coco (vino de cocos)...” (Toscano, 1612 en: Zizumbo-Villareal y Colunga-García, 2007)

En 1608 en Colima se establecen 14 haciendas y 60 tabernas (sitios de destilación) dedicadas a la producción de vino de coco. Entre 1630 y 1670 y gracias a la demanda generada por las zonas mineras de Guanajuato, Pachuca y Zacatecas, la producción de esta bebida se vuelve la principal actividad económica del Estado y principal competencia para las bebidas traídas desde España, competencia que genera el decreto de prohibición, en 1603, por Francisco Escudero de Figueroa, Alcalde Mayor de Colima, para “... los chinos o no españoles, cualquiera que sea su estatus ... de hacer alcohol de coco o tuba”. Cuando los españoles se creían beneficiados con esta nueva ley, en 1610, Luis de Velasco, “el mozo, Marqués de Salinas, Virrey de la Nueva España”, modifica la prohibición a “cualquier habitante, cualquiera que sea su status o condición” (Zizumbo-Villareal, Colunga-García, 2007). Al quedar totalmente ilegal la producción de alcohol, los productores comienzan a moverse hacia las zonas de barrancos y lugares apartados evadiendo la supervisión de la corona.

Una vez establecida esta prohibición del vino de coco es que aparece el primer registro, en 1619, de la existencia del alcohol de maguey en Nayarit: “*Mexcales son muy similares al maguey y sus raíces y base de la hoja son quemados y comidos... extraen un mosto del que obtienen vino por destilación, más claro que el agua y más fuerte que el aguardiente al gusto. Y a pesar de que existan muchas virtudes del mexcale del que es hecho, ellos (los indios) lo utilizan con tal exceso que desacreditan el líquido como a la planta*” (Arregui, 1621). En 1670, las autoridades coloniales se convencieron que no podían seguir protegiendo las importaciones de uva de la península mediante prohibiciones pues la producción clandestina y consumo de aguardiente seguía creciendo y se establecen las tabernas legales que abastecían los centros mineros las ciudades importantes y la demanda regional, pero la destilación clandestina continuó para evadir el pago de impuestos (Aguirre-Rivera, etal, 2001).

Zizumbo-Villareal, Colunga-García, mediante evidencia botánica, datos toponímicos, arqueológicos y etnohistóricos encuentran que la producción de mezcal efectivamente inicia en Colima a partir de poblaciones silvestres de *Agave angustifolia* en los alrededores de Ixtlahuacán, Comala y Nahuatlapan y que luego de la prohibición se extiende hacia las zona de barrancos utilizando poblaciones silvestres de *A. angustifolia* y *A. rodacantha* en Jalisco y *A. hookeri* en Michoacán.

La historiografía clásica jalisciense, otorga la paternidad de la bebida a Pedro Sánchez de Tagle, Marqués de Altamira, que, a principios de 1600 en el Estado de Jalisco introduce plantaciones de agave al rededor del volcán de Tequila en la hacienda de Cuisillos, en la región centro-poniente de Jalisco con una taberna para la elaboración de vino mezcal, sin embargo, no hay evidencia documental de este hecho (Gutiérrez-Lorenzo, 2003), pero sí de que en 1638 el Gobernador de la Nueva Galicia, (Nayarit, Jalisco, Colima, Aguascalientes, Sinaloa, Zacatecas y San Luis Potosí), don Juan Canseco y Quiñonez, decide regular la elaboración y comercialización de bebidas de *Agave* para establecer el correspondiente estanco (impuesto), y que gracias a esta recaudación fiscal la ciudad de Guadalajara contó con baños de agua caliente, solucionó los problemas de agua de la ciudad y construyó el palacio de gobierno (Zizumbo-Villareal y Colunga-García, 2007; Gutiérrez-Lorenzo, 2003).

22 Este descubrimiento llevó a mucha gente a hablar sobre el origen prehispánico de la destilación, sin embargo no existe evidencia, ni por los relatos de la Nueva España, ni por tradición oral ó por códices, sobre la existencia de alguna bebida destilada durante la época precolombina (que de haber existido seguramente se habría incorporado rápidamente a los ritos y tradiciones locales).

Entre 1764 y 1772, el rey Carlos III envía a José de Gálvez como visitador General de todos los Tribunales y Cajas Reales, con el objeto de vigilar los ingresos de la corona, y el 3 de mayo de 1785 expide una real orden para que se procediera a la erradicación de las bebidas clandestinas; fueron tan grande la lista de localidades y de variantes de mezcal a perseguir que el rey Carlos III establece una nueva prohibición a la fabricación y venta de bebidas embriagantes nacionales (Aguirre-Rivera, et al, 2001).

En 1795 el rey Carlos IV termina con la prohibición establecida por su antecesor y concede licencia de venta de vino mezcal a José Prudencio Cuervo en la hacienda “La Cofradía” en la región de Tequila, Jalisco utilizando un alambique de cobre (de origen árabe), a pesar de que exista registro del consumo y venta de 12 bebidas diferentes en la región de Tequila; de hecho, en Real de Minas Zacatecas ya se consumía mezcal bajo el nombre de “vino mezcal de Guadalajara” (Gutiérrez-Lorenzo, 2003). En 1873 existe el registro de envío de 3 barriles de Vino Mezcal a Nuevo México; para 1873 la población de Tequila (2,500 habitantes) contaba con 16 destilerías registradas; para 1893 en la Exposición Universal de Chicago, en E.U.A. se habla del mezcal brandy hecho en Tequila y para 1910 en San Antonio se hace referencia al “Vino Tequila” (B. de Barrios, 1971), iniciando una expansión y origen de un nombre que terminaría desacreditando a las demás bebidas y llevaría a las grandes compañías destiladoras a un desarrollo económico espectacular pero que pondría en gran peligro la economía de los pequeños productores y la diversidad de recursos que estos utilizaban.

APÉNDICE III. PROTOCOLOS DE LABORATORIO

MÉTODO “MINI-PREP” DE EXTRACCIÓN DE ADN (VAZQUEZ LOBO, 1996)

- 1.Moler aproximadamente un gramo de tejido con nitrógeno líquido *(agregando un poco de microperlas de vidrio)
- 2.Agregar al mortero 1000 µl de CTAB2X y homogeneizar
- 3.Recuperar todo en un tubo eppendorf de 1.5ml
- 4.Centrifugar a 10,000 g por 8 minutos a 4°C
- 5.Eliminar el sobrenadante
- 6.Resuspender con 600 ul CTAB2X *(Agregar 60ul de proteinasa K)*
- 7.Incubar a 65° por 15 minutos
- 8.Agregar 600 ul de cloroformo:octanol 24:1 y agitar hasta homogenizar *(cloroformo:fenol:octanol 24:2:1)*
- 9.Centrifugar a 7000g por 12 mins. a 4°C o hasta que el sobrenadante quede transparente
- 10Recuperar 200ul de sobrenadante en un tubo nuevo
- 11 Agregar 2/3 de volumen (600ul) de Isopropanol frío a -20°C
- 12Reposar por 2 a 12 horas a -20°C
- 13.Centrifugar a 9000 g por 5 mins. a 4°C
- 14.Eliminar el sobrenadante
- 15.Agregar 1000 ul de etanol al 70% frío a -20°C
- 16Reposar por 5 mins. a temperatura ambiente.
- 17.Centrifugar a 7000 g por 5 mins.
- 18.Eliminar el sobrenadante
- 19.Dejar secar
- 20.Resuspender en agua destilada.

MÉTODO “MINI-PREP” DE EXTRACCIÓN DE ADN (VÁZQUEZ-LOBO, 1996, MODIFICADO POR VALERA, 2007)

- 1.Moler aproximadamente 2 gramos de tejido en nitrógeno líquido.
- 2.Agregar al mortero 300ul de CTAB y 800 ul de STE y seguir moliendo hasta homogeneizar
- 3.Recuperar todo en un microtubo de 1.5 ml
- 4.Centrifugar a 9000 g por 8 min.
- 5.Eliminar el sobrenadante
- 6.Agregar 500 ul de CTAB2X y 700 ul de STE y homogeneizar
- 7.Centrifugar a 9000 g por 8 mins.

8. Eliminar el sobrenadante
9. Agregar 800 ul de CTAB2X y 6ul de RNAsa (7000 u/ml)
10. Incubar a 37°C por 20 mins.
11. Poner en hielo 5 mins.
12. Agregar 80 ul de proteinasa K
13. Incubar a 65°C por 20 mins. (durante el proceso invertir los tubos 2 o 3 veces)
14. Poner en hielo 5 mins.
15. Agregar 600 ul de cloroformo:octanol 24:1
16. Centrifugar a 13000 g por 12 mins.
17. Recuperar 200 ul del sobrenadante.
18. (Si la muestra no se encuentra totalmente transparente, repetir desde la adición de 600 ul de cloroformo:octanol 24:1)
19. Agregar 2/3 (600ul) de Isopropanol frío a -20°C
20. Reposar por 2 horas a -20°C
21. Centrifugar a 9000g por 5mins.
22. Eliminar el sobrenadante
23. Agregar 1000ul de etanol 70% frío a -20°C
24. Dejar reposar 5mins a temperatura ambiente.
25. Centrifugar a 12000 g por 5 mins.
26. Eliminar el sobrenadante
27. Agregar 1000ul de etanol 80% frío a -20°C
28. Dejar reposar 5 mins a temperatura ambiente
29. Centrifugar a 12000 g por 5 minutos
30. Eliminar el sobrenadante
31. Secar
32. Rehidratar con 15ul a 75ul de agua destilada

ELIMINACIÓN DE RNA (VAZQUEZ LOBO, 1996)

1. Agregar 2ul de RNAsa
2. Incubar a 37°C por 30mins
3. Agregar 100ul de Acetato de amonio 7.5M frío
4. Incubar a 4°C por 15mins
5. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 mins.
6. Recuperar el sobrenadante
7. Agregar 600 ul de etanol 95%
8. Centrifugar a 8500 rpm por 5mins

9. Eliminar el sobrenadante
10. Agregar 1000 ul de Etanol 70%
11. Centrifugar a 6000 rpm por 4 mins
12. Eliminar el sobrenadante
13. Secar
14. Resuspender.

BUFFER DE EXTRACCIÓN CTAB2X

- Tris-HCl 100mM pH8
- NaCl 1.4 M
- EDTA 20mM pH8
- CTAB 2%
- Opcional: PVP40 4% p/v (remueve compuestos. fenólicos, alcaloides y estabiliza enzimas)
- Opcional: Ac. Ascórbico 0.1% p/v
- Opcional: DIECA 0.1% p/v
- Opcional: Polietilen Glicol 4% p/v (captura azúcares de alto p.m. Si se utiliza es necesario un lavado posterior con CTAB2X sin PEG)
- b-mercaptoetanol 0.3% (agregar hasta el momento de usar el buffer)

1. Preparar solución 0.5 M de Tris (la cantidad a preparar se calcula en el paso 4) y ajustar pH a 8 con HCL
2. Preparar solución 3.0 M de NaCl (la cantidad a preparar se calcula en el paso 4)
3. Preparar solución 0.5M de EDTA (la cantidad a preparar se calcula en el paso 4) y ajustar pH a 8 con NaOH
4. Preparar solución²³ de Tris-HCl 100mM, NaCl 1.4M y EDTA 20mM
5. Agregar (en gramos) 2% del volumen total de CTAB y de compuestos opcionales (Si se utiliza el protocolo modificado por Valera no agregar ningún compuesto adicional)
6. Aforar con agua destilada al volumen final
7. Al momento de utilizar, agregar 0.3% de b-mercaptoetanol
8. Guardar en frasco ambar.

BUFFER DE EXTRACCIÓN CTAB

- Tris-HCL 100mM pH8
- NaCl 1.5M
- EDTA 20mM pH8
- CTAB 4%
- PVP40 4%
- Acido Ascórbico 0.1%
- DIECA 0.1%
- b-mercaptoetanol 0.3 % (agregar hasta el momento de usar el buffer)

- 1.- Preparar solución 0.5 M de Tris (la cantidad a preparar se calcula en el paso 4) y ajustar pH a 8 con HCL
- 2.- Preparar solución 3.0 M de NaCl (la cantidad a preparar se calcula en el paso 4)
- 3.- Preparar solución 0.5M de EDTA (la cantidad a preparar se calcula en el paso 4) y ajustar pH a 8 con NaOH
- 4.- Preparar solución de Tris-HCl 100mM, NaCl 1.5M y EDTA 20mM
- 5.- Agregar (en gramos) 4% del volumen total de CTAB, 4% de PVP40, .01% de Ac. Ascórbico y 0.1% de DIECA
- 6.- Aforar con agua destilada al volumen final
- 7.- Al momento de utilizar, agregar 0.3% de b-mercaptoetanol

23 Utilizar la formula $C_i V_i = C_f V_f$

8.- Guardar en frasco ambar.

BUFFER DE EXTRACCION STE

- Tris-HCl 100mM pH8
 - EDTA 50 mM pH8
 - NaCl 100mM
 - b-mercaptoetanol 0.3% (agregar hasta el momento de usar el buffer)
- 1.- Preparar solución 0.5 M de Tris (la cantidad a preparar se calcula en el paso 4) y ajustar pH a 8 con HCL
 - 2.- Preparar solución 3.0 M de NaCl (la cantidad a preparar se calcula en el paso 4)
 - 3.- Preparar solución 0.5M de EDTA (la cantidad a preparar se calcula en el paso 4) y ajustar pH a 8 con NaOH
 - 4.- Preparar solución de Tris-HCl 100mM, NaCl 100mM y EDTA 50mM
 - 6.- Añorar con agua destilada al volumen final
 - 7.- Al momento de utilizar, agregar 0.3% de b-mercaptoetanol

LIMPIEZA DE PROTEINAS EN DNA CON FENOL-CLOROFORMO

- 1.- Agregar 50% del volumen de DNA de fenol y 50% del volumen de cloroformo
- 2.- Agitar en vortex para mezclar bien todo
- 3.- Centrifugar 30 segundos a 14000 rpm
- 4.- En un tubo nuevo recuperar la fase de arriba cuidando no tocar la fase blanca que contiene las proteínas
- 5.- Repetir desde el paso 1 hasta que la fase de arriba no se vea turbia
- 6.- Agregar 100% del volumen de cloroformo
- 7.- Mezclar bien en el vortex y centrifugar
- 8.- Recuperar la fase de arriba a un tubo limpio
- 9.- Precipitar el DNA agregando 10% del volumen de NaCl 4M y 2.5% del volumen de isopropanol o etanol absoluto
- 10.- Dejar a -20°C toda la noche
- 11.- Centrifugar por 1 hora a 14000 rpm
- 12.- Tirar el sobrenadante
- 13.- Agregar 1000 ul de etanol al 80%
- 14.- Centrifugar
- 15.- Secar
- 16.- Rehidratar con agua.

BUFFER DE ELECTROFORESIS TAE

Para preparar 1 litro a 10X:

- 48.4 gramos de Tris ultra puro
- 11.42 ml de Acido Acetico Glacial
- 20 ml de EDTA 0.5M pH=8
- Añorar a 1000 ml
- Ajustar pH final a 8.2-8.3 (con Ac. acetico glacial o EDTA)

APÉNDICE IV. FÓRMULAS UTILIZADAS

FRECUENCIAS ALÉLICAS:

(Ecuación 1) Frecuencia de genotipo recesivo para marcadores dominantes (Lynch y Milligan, 1994):

$$\hat{x} = \frac{\text{No. de ausencias}}{N}$$

$$\text{Var}(\hat{x}) = \frac{\hat{x}(1-\hat{x})}{N}$$

(Ecuación 2) Frecuencia de alelo recesivo para marcadores dominantes (Lynch y Milligan, 1994)

$$\hat{q} = \frac{\sqrt{\hat{x}}}{1 - \frac{\text{Var}(\hat{x})}{8x^2}}$$

$$\text{Var}(\hat{q}) = \frac{(1-\hat{x})}{4N}$$

$$\hat{p} = 1 - \hat{q}$$

Ecuación 2

Heterocigosis y Polimorfismo:

(Ecuación 3) Heterocigosis esperada por locus según Lynch y Milligan (1994)

$$\hat{H}_j(i) = 2\hat{q}_j(i)[1-\hat{q}_j(i)] + 2\text{Var}[\hat{q}_j(i)]$$

$$\text{Var}[\hat{H}_j(i)] = 4[1-2\hat{q}_j(i)]^2 \text{Var}[\hat{q}_j(i)]$$

donde:

$H_j(i)$ = Heterocigosis esperada para el locus i en la población j

$q(i)$ = frecuencia alélica q del locus i en población j

Ecuación 3

(Ecuación 4) Heterocigosis esperada en la población según Lynch y Milligan (1994)

$$\hat{H}_j = \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L \hat{H}_j(i)$$

$$\text{Var}(\hat{H}_j(i)) = \frac{1}{L(L-1)} \sum_{i=1}^L [\hat{H}_j(i) - \hat{H}_j]^2$$

donde:

$H_j(i)$ = Heterocigosis del locus i en la población j

L = Número de loci observados.

(Ecuación 5) Proporción de loci polimórficos

$$p = \frac{\text{Número de loci polimórficos}(x)}{\text{Número total de loci}(m)}$$

ESTRUCTURACIÓN / DIFERENCIACIÓN:

(Ecuación 6) Coeficientes de estructuración de Wright:

$$F_{ST} = \frac{\overline{q^2} - \bar{q}^2}{\bar{q}(1-\bar{q})} \quad F_{IS} = \frac{\bar{R} - \bar{q}^2}{\bar{q} - \bar{q}^2} \quad F_{IT} = \frac{\bar{R} - \bar{q}^2}{\bar{q}(1-\bar{q})}$$

(Ecuación 7) G_{ST} de Nei (1973)

$$G_{ST} = \frac{D_{ST}}{H_T} ; \quad D_{ST} = H_{ST} - \frac{H_S + H_T}{H_T} ; \quad H_T = H_{ST} + D_{ST}$$

(Ecuación 8) Parámetros de estructuración de Weir y Cockerham (1984)

$$\hat{\theta} = \frac{2\bar{\pi} - 1}{2(\bar{\pi} - 1)} \frac{s^2}{\bar{p}(1-\bar{p})} - \frac{1}{2(\bar{\pi} - 1)} ; \quad \bar{F}_t = 1 - \frac{\bar{\pi}_i}{2\bar{p}_i(1-\bar{p}_i)} ; \quad f = 0$$

(Ecuación 9) Estimado de F_{ST} de Lynch y Milligan (1994) para marcadores dominantes

$$\hat{F}_{ST} = \frac{\hat{H}_B}{\hat{H}_T} \left(1 + \frac{\hat{H}_B \text{Var}(\hat{H}_w) - \hat{H}_w \text{Var}(\hat{H}_B) + (\hat{H}_B - \hat{H}_w) \text{Cov}(\hat{H}_B, \hat{H}_w)}{\hat{H}_B \hat{H}_B^2} \right)^{-1}$$

(Ecuación 10) Estadístico G_{ST} y estadístico Nm de Crow y Aoki (1984)

$$G_{ST} = \frac{1}{4Nm\alpha + 1} \quad \left| \quad Nm = \frac{1}{4\alpha} \left(\frac{1}{G_{ST}} - 1 \right) \right.$$

$$\alpha = \left[\frac{n}{(n-1)} \right]^2$$

DISTANCIAS

(Ecuación 11) Cálculo de identidad genética (I) y distancia genética (D) de Nei (1972) a partir de las frecuencias del alelo i en poblaciones x e y .

$$I = \frac{J_{xy}}{\sqrt{J_x J_y}} ; \quad J_{xy} = \sum_{i=1}^n p_{i,x} p_{i,y} ; \quad J_x = \sum_{i=1}^n p_{i,x}^2 ; \quad J_y = \sum_{i=1}^n p_{i,y}^2 ; \quad D = -\ln(I)$$

Genética de poblaciones silvestres y cultivadas de dos especies Mezcaleras: *Agave cupreata* y *Agave Potatorum*

Locus	Silvestre			C1			C2			C4		
	R	q	He	R	q	He	R	q	He	R	q	He
59	0.300 0.002	0.549 0.001	0.498 0.000	0.044 0.002	0.237 0.010	0.382 0.012	0.281 0.006	0.536 0.006	0.509 0.000	0.235 0.005	0.491 0.006	0.511 0.000
60	0.808 0.001	0.899 0.000	0.182 0.001	0.957 0.002	0.978 0.001	0.043 0.002	0.844 0.004	0.919 0.001	0.151 0.003	0.824 0.004	0.908 0.001	0.169 0.004
61	0.431 0.002	0.657 0.001	0.453 0.000	0.565 0.011	0.755 0.005	0.379 0.005	0.281 0.006	0.536 0.006	0.509 0.000	0.353 0.007	0.598 0.005	0.490 0.001
62	0.315 0.002	0.563 0.001	0.495 0.000	0.435 0.011	0.664 0.006	0.458 0.003	0.719 0.006	0.849 0.002	0.261 0.004	0.441 0.007	0.667 0.004	0.452 0.002
63	0.146 0.001	0.385 0.002	0.477 0.000	0.044 0.002	0.237 0.010	0.382 0.012	0.188 0.005	0.441 0.006	0.506 0.000	0.353 0.007	0.598 0.005	0.490 0.001
64	0.523 0.002	0.724 0.001	0.402 0.001	0.609 0.010	0.783 0.004	0.348 0.005	0.688 0.007	0.831 0.002	0.286 0.004	0.765 0.005	0.876 0.002	0.222 0.004
65	0.546 0.002	0.740 0.001	0.387 0.001	0.870 0.005	0.933 0.001	0.127 0.004	0.531 0.008	0.731 0.004	0.400 0.003	0.735 0.006	0.859 0.002	0.247 0.004
66	0.700 0.002	0.837 0.001	0.274 0.001	0.826 0.006	0.910 0.002	0.168 0.005	0.625 0.007	0.792 0.003	0.335 0.004	0.618 0.007	0.788 0.003	0.340 0.004
67	0.354 0.002	0.596 0.001	0.484 0.000	0.522 0.011	0.726 0.005	0.408 0.004	0.594 0.008	0.773 0.003	0.358 0.004	0.588 0.007	0.769 0.003	0.361 0.004
68	0.723 0.002	0.851 0.001	0.255 0.001	0.957 0.002	0.978 0.001	0.043 0.002	0.875 0.003	0.936 0.001	0.122 0.003	0.824 0.004	0.908 0.001	0.169 0.004
69	0.308 0.002	0.556 0.001	0.496 0.000	0.565 0.011	0.755 0.005	0.379 0.005	0.813 0.005	0.902 0.002	0.179 0.004	1.000 0.000	1.000 0.000	0.000 0.000
70	0.708 0.002	0.842 0.001	0.268 0.001	0.957 0.002	0.978 0.001	0.043 0.002	0.906 0.003	0.952 0.001	0.092 0.002	1.000 0.000	1.000 0.000	0.000 0.000
71	0.539 0.002	0.734 0.001	0.392 0.001	0.957 0.002	0.978 0.001	0.043 0.002	1.000 0.000	1.000 0.000	0.000 0.000	1.000 0.000	1.000 0.000	0.000 0.000
72	0.475 0.002	0.690 0.001	0.430 0.001	0.840 0.005	0.917 0.002	0.155 0.005	0.963 0.001	0.982 0.000	0.037 0.001	0.971 0.001	0.985 0.000	0.029 0.001
73	0.558 0.002	0.748 0.001	0.379 0.001	0.640 0.009	0.802 0.004	0.324 0.005	0.963 0.001	0.982 0.000	0.037 0.001	0.824 0.004	0.908 0.001	0.169 0.004
74	0.383 0.002	0.620 0.001	0.474 0.000	0.840 0.005	0.917 0.002	0.155 0.005	0.778 0.006	0.883 0.002	0.211 0.005	0.765 0.005	0.876 0.002	0.222 0.004
75	0.300 0.002	0.549 0.002	0.498 0.000	0.600 0.010	0.777 0.004	0.354 0.005	0.704 0.008	0.841 0.003	0.274 0.005	0.206 0.005	0.460 0.006	0.509 0.000
76	0.200 0.001	0.449 0.002	0.498 0.000	0.040 0.002	0.227 0.010	0.370 0.011	0.630 0.009	0.796 0.003	0.332 0.005	0.000 0.000	0.000 0.007	0.015 0.029
77	0.217 0.001	0.467 0.002	0.501 0.000	0.960 0.002	0.980 0.000	0.040 0.002	0.259 0.007	0.516 0.007	0.513 0.000	0.677 0.006	0.824 0.002	0.295 0.004
78	0.425 0.002	0.653 0.001	0.456 0.000	0.520 0.010	0.725 0.005	0.409 0.004	0.296 0.008	0.550 0.007	0.508 0.000	0.412 0.007	0.645 0.004	0.467 0.002
79	0.208 0.001	0.458 0.002	0.500 0.000	0.120 0.004	0.360 0.009	0.478 0.003	0.296 0.008	0.550 0.007	0.508 0.000	0.265 0.006	0.520 0.005	0.510 0.000
80	0.175 0.001	0.420 0.002	0.491 0.000	0.400 0.010	0.637 0.006	0.474 0.002	0.407 0.009	0.643 0.006	0.470 0.002	0.029 0.001	0.195 0.007	0.328 0.011
81	0.192 0.001	0.440 0.002	0.496 0.000	0.720 0.008	0.850 0.003	0.260 0.006	0.370 0.009	0.613 0.006	0.486 0.001	0.029 0.001	0.195 0.007	0.328 0.011
82	0.292 0.002	0.541 0.002	0.500 0.000	0.520 0.010	0.725 0.005	0.409 0.004	0.185 0.006	0.439 0.008	0.508 0.000	0.706 0.006	0.842 0.002	0.271 0.004
83	0.033 0.000	0.188 0.002	0.310 0.003	0.080 0.003	0.300 0.009	0.438 0.006	0.111 0.004	0.346 0.008	0.469 0.003	0.000 0.000	0.000 0.007	0.015 0.029
84	0.108 0.001	0.332 0.002	0.447 0.001	0.520 0.010	0.725 0.005	0.409 0.004	0.185 0.006	0.439 0.008	0.508 0.000	0.177 0.004	0.427 0.006	0.502 0.001
85	0.192 0.001	0.440 0.002	0.496 0.000	0.680 0.009	0.827 0.003	0.293 0.006	0.370 0.009	0.613 0.006	0.486 0.001	0.147 0.004	0.392 0.006	0.489 0.001
86	0.167 0.001	0.410 0.002	0.487 0.000	0.120 0.004	0.360 0.009	0.478 0.003	0.222 0.006	0.479 0.007	0.514 0.000	0.059 0.002	0.258 0.007	0.396 0.007
87	0.108 0.001	0.332 0.002	0.447 0.001	0.280 0.008	0.536 0.007	0.512 0.000	0.222 0.006	0.479 0.007	0.514 0.000	0.324 0.006	0.573 0.005	0.499 0.000
88	0.375 0.002	0.613 0.001	0.477 0.000	0.600 0.010	0.777 0.004	0.354 0.005	0.370 0.009	0.613 0.006	0.486 0.001	0.647 0.007	0.806 0.003	0.318 0.004
89	0.233 0.002	0.485 0.002	0.503 0.000	0.600 0.010	0.777 0.004	0.354 0.005	0.296 0.008	0.550 0.007	0.508 0.000	0.529 0.007	0.730 0.004	0.401 0.003
90	0.425 0.002	0.653 0.001	0.456 0.000	0.880 0.004	0.939 0.001	0.117 0.004	0.296 0.008	0.550 0.007	0.508 0.000	0.706 0.006	0.842 0.002	0.271 0.004

Genética de poblaciones silvestres y cultivadas de dos especies Mezcaleras: *Agave cupreata* y *Agave Potatorum*

Locus	C5			C10			C13			C14														
	R	q	He	R	q	He	R	q	He	R	q	He												
59	0.220	0.004	0.474	0.005	0.508	0.000	0.366	0.006	0.608	0.004	0.484	0.001	0.440	0.010	0.668	0.006	0.455	0.003	0.125	0.003	0.364	0.007	0.476	0.002
60	0.976	0.001	0.988	0.000	0.024	0.001	0.756	0.005	0.870	0.002	0.229	0.003	0.920	0.003	0.960	0.001	0.079	0.003	0.750	0.006	0.867	0.002	0.234	0.004
61	0.439	0.006	0.665	0.003	0.452	0.002	0.366	0.006	0.608	0.004	0.484	0.001	0.400	0.010	0.637	0.006	0.474	0.002	0.688	0.007	0.831	0.002	0.286	0.004
62	0.195	0.004	0.447	0.005	0.504	0.000	0.317	0.005	0.567	0.004	0.499	0.000	0.040	0.002	0.227	0.010	0.370	0.011	0.125	0.003	0.364	0.007	0.476	0.002
63	0.220	0.004	0.474	0.005	0.508	0.000	0.146	0.003	0.390	0.005	0.486	0.001	0.080	0.003	0.300	0.009	0.438	0.006	0.156	0.004	0.404	0.007	0.495	0.001
64	0.561	0.006	0.751	0.003	0.380	0.003	0.293	0.005	0.545	0.004	0.505	0.000	0.440	0.010	0.668	0.006	0.455	0.003	0.719	0.006	0.849	0.002	0.261	0.004
65	0.415	0.006	0.647	0.004	0.464	0.001	0.415	0.006	0.647	0.004	0.464	0.001	0.400	0.010	0.637	0.006	0.474	0.002	0.844	0.004	0.919	0.001	0.151	0.003
66	0.537	0.006	0.735	0.003	0.396	0.003	0.634	0.006	0.798	0.002	0.327	0.003	0.760	0.007	0.873	0.002	0.226	0.005	0.813	0.005	0.902	0.002	0.179	0.004
67	0.732	0.005	0.856	0.002	0.249	0.003	0.220	0.004	0.474	0.005	0.508	0.000	0.280	0.008	0.536	0.007	0.512	0.000	0.344	0.007	0.591	0.005	0.494	0.001
68	0.561	0.006	0.751	0.003	0.380	0.003	0.756	0.005	0.870	0.002	0.229	0.003	0.360	0.009	0.605	0.006	0.491	0.001	0.813	0.005	0.902	0.002	0.179	0.004
69	0.488	0.006	0.701	0.003	0.426	0.002	0.098	0.002	0.321	0.006	0.447	0.003	0.040	0.002	0.227	0.010	0.370	0.011	0.281	0.006	0.536	0.006	0.509	0.000
70	0.951	0.001	0.976	0.000	0.048	0.001	0.659	0.006	0.813	0.002	0.308	0.003	0.200	0.006	0.456	0.008	0.512	0.000	0.969	0.001	0.984	0.000	0.031	0.001
71	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.439	0.006	0.665	0.003	0.452	0.002	0.040	0.002	0.227	0.010	0.370	0.011	0.594	0.008	0.773	0.003	0.358	0.004
72	0.927	0.002	0.963	0.000	0.072	0.002	0.317	0.005	0.567	0.004	0.499	0.000	0.526	0.013	0.730	0.006	0.407	0.005	0.242	0.006	0.498	0.006	0.511	0.000
73	0.902	0.002	0.950	0.001	0.096	0.002	0.463	0.006	0.683	0.003	0.439	0.002	0.211	0.009	0.470	0.010	0.519	0.000	0.546	0.008	0.741	0.003	0.391	0.003
74	0.683	0.005	0.828	0.002	0.289	0.003	0.171	0.004	0.419	0.005	0.497	0.001	0.368	0.012	0.614	0.008	0.491	0.002	0.333	0.007	0.582	0.005	0.497	0.001
75	0.098	0.002	0.321	0.006	0.447	0.003	0.268	0.005	0.522	0.005	0.508	0.000	0.053	0.003	0.260	0.013	0.410	0.012	0.152	0.004	0.398	0.006	0.492	0.001
76	0.171	0.004	0.419	0.005	0.497	0.001	0.000	0.000	0.000	0.006	0.012	0.024	0.105	0.005	0.344	0.012	0.475	0.005	0.152	0.004	0.398	0.006	0.492	0.001
77	0.146	0.003	0.390	0.005	0.486	0.001	0.220	0.004	0.474	0.005	0.508	0.000	0.421	0.013	0.655	0.008	0.467	0.003	0.061	0.002	0.262	0.007	0.401	0.007
78	0.122	0.003	0.357	0.005	0.470	0.002	0.342	0.006	0.588	0.004	0.493	0.001	0.421	0.013	0.655	0.008	0.467	0.003	0.636	0.007	0.800	0.003	0.326	0.004
79	0.122	0.003	0.357	0.005	0.470	0.002	0.098	0.002	0.321	0.006	0.447	0.003	0.368	0.012	0.614	0.008	0.491	0.002	0.182	0.005	0.434	0.006	0.504	0.000
80	0.122	0.003	0.357	0.005	0.470	0.002	0.146	0.003	0.390	0.005	0.486	0.001	0.158	0.007	0.412	0.011	0.507	0.001	0.030	0.001	0.198	0.007	0.332	0.011
81	0.073	0.002	0.281	0.006	0.416	0.004	0.073	0.002	0.281	0.006	0.416	0.004	0.263	0.010	0.523	0.010	0.518	0.000	0.152	0.004	0.398	0.006	0.492	0.001
82	0.220	0.004	0.474	0.005	0.508	0.000	0.268	0.005	0.522	0.005	0.508	0.000	0.368	0.012	0.614	0.008	0.491	0.002	0.364	0.007	0.607	0.005	0.487	0.001
83	0.146	0.003	0.390	0.005	0.486	0.001	0.000	0.000	0.000	0.006	0.012	0.024	0.053	0.003	0.260	0.013	0.410	0.012	0.000	0.000	0.000	0.008	0.015	0.030
84	0.195	0.004	0.447	0.005	0.504	0.000	0.122	0.003	0.357	0.005	0.470	0.002	0.158	0.007	0.412	0.011	0.507	0.001	0.000	0.000	0.000	0.008	0.015	0.030
85	0.146	0.003	0.390	0.005	0.486	0.001	0.122	0.003	0.357	0.005	0.470	0.002	0.211	0.009	0.470	0.010	0.519	0.000	0.121	0.003	0.358	0.007	0.473	0.002
86	0.293	0.005	0.545	0.004	0.505	0.000	0.195	0.004	0.447	0.005	0.504	0.000	0.105	0.005	0.344	0.012	0.475	0.005	0.121	0.003	0.358	0.007	0.473	0.002
87	0.195	0.004	0.447	0.005	0.504	0.000	0.098	0.002	0.321	0.006	0.447	0.003	0.053	0.003	0.260	0.013	0.410	0.012	0.061	0.002	0.262	0.007	0.401	0.007
88	0.366	0.006	0.608	0.004	0.484	0.001	0.390	0.006	0.628	0.004	0.475	0.001	0.158	0.007	0.412	0.011	0.507	0.001	0.485	0.008	0.699	0.004	0.429	0.003
89	0.317	0.005	0.567	0.004	0.499	0.000	0.098	0.002	0.321	0.006	0.447	0.003	0.105	0.005	0.344	0.012	0.475	0.005	0.424	0.007	0.655	0.004	0.461	0.002
90	0.268	0.005	0.522	0.005	0.508	0.000	0.439	0.006	0.665	0.003	0.452	0.002	0.105	0.005	0.344	0.012	0.475	0.005	0.697	0.006	0.836	0.002	0.278	0.004

Genética de poblaciones silvestres y cultivadas de dos especies Mezcaleras: *Agave cupreata* y *Agave Potatorum*

	P4			P6			P7			P9														
	R	q	He	R	q	He	R	q	He	R	q	He												
59	0.238	0.009	0.497	0.009	0.518	0.000	0.065	0.002	0.270	0.008	0.409	0.006	0.458	0.005	0.679	0.003	0.441	0.001	0.104	0.002	0.330	0.005	0.452	0.002
60	0.619	0.011	0.790	0.005	0.341	0.006	0.581	0.008	0.764	0.003	0.367	0.004	0.646	0.005	0.805	0.002	0.318	0.003	0.979	0.000	0.990	0.000	0.021	0.000
61	0.619	0.011	0.790	0.005	0.341	0.006	0.677	0.007	0.825	0.003	0.294	0.004	0.854	0.003	0.925	0.001	0.141	0.002	0.813	0.003	0.902	0.001	0.179	0.003
62	0.714	0.010	0.847	0.003	0.266	0.007	0.226	0.006	0.482	0.006	0.512	0.000	0.542	0.005	0.738	0.002	0.392	0.002	0.583	0.005	0.765	0.002	0.364	0.002
63	0.000	0.000	0.000	0.012	0.024	0.048	0.032	0.001	0.204	0.008	0.341	0.011	0.500	0.005	0.709	0.003	0.418	0.002	0.063	0.001	0.260	0.005	0.395	0.005
64	0.857	0.006	0.927	0.002	0.139	0.005	0.387	0.008	0.626	0.005	0.478	0.001	0.292	0.004	0.544	0.004	0.504	0.000	0.917	0.002	0.958	0.000	0.082	0.002
65	0.667	0.011	0.819	0.004	0.304	0.007	0.613	0.008	0.785	0.003	0.344	0.004	0.708	0.004	0.843	0.002	0.268	0.003	0.667	0.005	0.818	0.002	0.302	0.003
66	0.667	0.011	0.819	0.004	0.304	0.007	0.516	0.008	0.721	0.004	0.410	0.003	0.938	0.001	0.968	0.000	0.062	0.001	0.667	0.005	0.818	0.002	0.302	0.003
67	0.238	0.009	0.497	0.009	0.518	0.000	0.065	0.002	0.270	0.008	0.409	0.006	0.500	0.005	0.709	0.003	0.418	0.002	0.771	0.004	0.879	0.001	0.216	0.003
68	0.429	0.012	0.660	0.007	0.462	0.003	0.452	0.008	0.675	0.004	0.447	0.002	0.667	0.005	0.818	0.002	0.302	0.003	0.354	0.005	0.598	0.003	0.488	0.001
69	0.238	0.009	0.497	0.009	0.518	0.000	0.032	0.001	0.204	0.008	0.341	0.011	0.875	0.002	0.936	0.001	0.122	0.002	0.958	0.001	0.979	0.000	0.041	0.001
70	0.524	0.012	0.728	0.006	0.408	0.005	0.807	0.005	0.899	0.002	0.185	0.004	0.917	0.002	0.958	0.000	0.082	0.002	0.854	0.003	0.925	0.001	0.141	0.002
71	0.714	0.010	0.847	0.003	0.266	0.007	0.258	0.006	0.514	0.006	0.512	0.000	0.771	0.004	0.879	0.001	0.216	0.003	0.958	0.001	0.979	0.000	0.041	0.001
72	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.387	0.008	0.626	0.005	0.478	0.001	0.652	0.005	0.809	0.002	0.313	0.003	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
73	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.936	0.002	0.968	0.001	0.064	0.002	0.457	0.005	0.678	0.003	0.443	0.002	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
74	0.714	0.010	0.847	0.003	0.266	0.007	0.419	0.008	0.651	0.005	0.464	0.002	0.109	0.002	0.337	0.005	0.457	0.002	0.917	0.002	0.958	0.000	0.082	0.002
75	0.714	0.010	0.847	0.003	0.266	0.007	0.419	0.008	0.651	0.005	0.464	0.002	0.283	0.004	0.535	0.004	0.505	0.000	0.208	0.003	0.461	0.004	0.505	0.000
76	0.095	0.004	0.327	0.011	0.462	0.005	0.194	0.005	0.448	0.007	0.507	0.000	0.022	0.001	0.168	0.005	0.290	0.009	0.104	0.002	0.330	0.005	0.452	0.002
77	0.619	0.011	0.790	0.005	0.341	0.006	0.226	0.006	0.482	0.006	0.512	0.000	0.087	0.002	0.304	0.005	0.433	0.003	0.500	0.005	0.709	0.003	0.418	0.002
78	0.952	0.002	0.976	0.001	0.048	0.002	0.323	0.007	0.573	0.006	0.500	0.001	0.522	0.005	0.724	0.003	0.405	0.002	0.771	0.004	0.879	0.001	0.216	0.003
79	0.048	0.002	0.248	0.011	0.395	0.012	0.194	0.005	0.448	0.007	0.507	0.000	0.044	0.001	0.222	0.005	0.356	0.006	0.375	0.005	0.615	0.003	0.480	0.001
80	0.381	0.011	0.623	0.007	0.484	0.002	0.226	0.006	0.482	0.006	0.512	0.000	0.174	0.003	0.423	0.005	0.497	0.000	0.333	0.005	0.580	0.004	0.494	0.000
81	0.524	0.012	0.728	0.006	0.408	0.005	0.226	0.006	0.482	0.006	0.512	0.000	0.500	0.005	0.709	0.003	0.418	0.002	0.333	0.005	0.580	0.004	0.494	0.000
82	0.810	0.007	0.901	0.002	0.183	0.006	0.871	0.004	0.934	0.001	0.126	0.003	0.500	0.005	0.709	0.003	0.418	0.002	0.563	0.005	0.752	0.002	0.378	0.002
83	0.048	0.002	0.248	0.011	0.395	0.012	0.129	0.004	0.369	0.007	0.480	0.002	0.152	0.003	0.396	0.005	0.488	0.001	0.354	0.005	0.598	0.003	0.488	0.001
84	0.619	0.011	0.790	0.005	0.341	0.006	0.452	0.008	0.675	0.004	0.447	0.002	0.696	0.005	0.835	0.002	0.279	0.003	0.750	0.004	0.867	0.001	0.234	0.003
85	0.191	0.007	0.448	0.010	0.514	0.000	0.323	0.007	0.573	0.006	0.500	0.001	0.870	0.003	0.933	0.001	0.127	0.002	0.583	0.005	0.765	0.002	0.364	0.002
86	0.714	0.010	0.847	0.003	0.266	0.007	0.516	0.008	0.721	0.004	0.410	0.003	0.565	0.005	0.753	0.002	0.376	0.002	0.688	0.005	0.830	0.002	0.285	0.003
87	0.429	0.012	0.660	0.007	0.462	0.003	0.613	0.008	0.785	0.003	0.344	0.004	0.870	0.003	0.933	0.001	0.127	0.002	0.688	0.005	0.830	0.002	0.285	0.003
88	0.476	0.012	0.695	0.006	0.437	0.004	0.774	0.006	0.881	0.002	0.213	0.004	0.870	0.003	0.933	0.001	0.127	0.002	0.833	0.003	0.913	0.001	0.160	0.002
89	0.857	0.006	0.927	0.002	0.139	0.005	0.807	0.005	0.899	0.002	0.185	0.004	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
90	0.667	0.011	0.819	0.004	0.304	0.007	0.936	0.002	0.968	0.001	0.064	0.002	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000

Genética de poblaciones silvestres y cultivadas de dos especies Mezcaleras: *Agave cupreata* y *Agave Potatorum*

Locus	PI0			PI1			PI2			PI3														
	R	q	He	R	q	He	R	q	He	R	q	He												
59	0.167	0.005	0.417	0.007	0.500	0.001	0.217	0.004	0.471	0.004	0.507	0.000	0.194	0.005	0.448	0.007	0.507	0.000	0.432	0.007	0.661	0.004	0.456	0.002
60	0.967	0.001	0.983	0.000	0.033	0.001	0.761	0.004	0.873	0.001	0.224	0.003	0.839	0.004	0.917	0.001	0.156	0.004	0.784	0.005	0.886	0.002	0.205	0.004
61	0.633	0.008	0.798	0.003	0.329	0.004	0.413	0.005	0.645	0.003	0.464	0.001	0.936	0.002	0.968	0.001	0.064	0.002	0.703	0.006	0.840	0.002	0.274	0.004
62	0.567	0.008	0.755	0.004	0.377	0.004	0.544	0.005	0.739	0.003	0.391	0.002	0.871	0.004	0.934	0.001	0.126	0.003	0.432	0.007	0.661	0.004	0.456	0.002
63	0.133	0.004	0.375	0.007	0.483	0.002	0.065	0.001	0.266	0.005	0.400	0.005	0.129	0.004	0.369	0.007	0.480	0.002	0.135	0.003	0.376	0.006	0.481	0.001
64	0.900	0.003	0.949	0.001	0.098	0.003	0.783	0.004	0.885	0.001	0.205	0.003	0.903	0.003	0.951	0.001	0.095	0.003	0.838	0.004	0.916	0.001	0.156	0.003
65	0.667	0.007	0.818	0.003	0.303	0.005	0.587	0.005	0.768	0.002	0.361	0.003	0.548	0.008	0.743	0.004	0.389	0.003	0.487	0.007	0.700	0.004	0.427	0.002
66	0.833	0.005	0.914	0.001	0.161	0.004	0.544	0.005	0.739	0.003	0.391	0.002	0.742	0.006	0.863	0.002	0.241	0.004	0.919	0.002	0.959	0.001	0.080	0.002
67	0.533	0.008	0.733	0.004	0.399	0.003	0.283	0.004	0.535	0.004	0.505	0.000	0.645	0.007	0.805	0.003	0.320	0.004	0.487	0.007	0.700	0.004	0.427	0.002
68	0.700	0.007	0.838	0.003	0.276	0.005	0.804	0.003	0.897	0.001	0.186	0.003	0.613	0.008	0.785	0.003	0.344	0.004	0.892	0.003	0.945	0.001	0.106	0.002
69	0.767	0.006	0.877	0.002	0.220	0.004	0.609	0.005	0.782	0.002	0.346	0.003	0.484	0.008	0.699	0.004	0.429	0.003	0.514	0.007	0.719	0.003	0.411	0.003
70	0.800	0.005	0.895	0.002	0.191	0.004	0.587	0.005	0.768	0.002	0.361	0.003	0.936	0.002	0.968	0.001	0.064	0.002	0.892	0.003	0.945	0.001	0.106	0.002
71	0.633	0.008	0.798	0.003	0.329	0.004	0.935	0.001	0.967	0.000	0.064	0.001	0.581	0.008	0.764	0.003	0.367	0.004	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
72	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.978	0.001	0.989	0.000	0.022	0.001	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000
73	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.911	0.002	0.955	0.001	0.087	0.002	0.816	0.004	0.904	0.001	0.176	0.003
74	0.742	0.006	0.863	0.002	0.241	0.004	0.556	0.006	0.747	0.003	0.383	0.002	0.444	0.006	0.669	0.003	0.449	0.001	0.579	0.006	0.763	0.003	0.368	0.003
75	0.484	0.008	0.699	0.004	0.429	0.003	0.711	0.005	0.844	0.002	0.266	0.003	0.556	0.006	0.747	0.003	0.383	0.002	0.474	0.007	0.691	0.004	0.434	0.002
76	0.065	0.002	0.270	0.008	0.409	0.006	0.044	0.001	0.224	0.005	0.358	0.007	0.133	0.003	0.372	0.005	0.477	0.001	0.053	0.001	0.244	0.006	0.381	0.007
77	0.452	0.008	0.675	0.004	0.447	0.002	0.422	0.005	0.652	0.003	0.460	0.001	0.333	0.005	0.581	0.004	0.494	0.000	0.474	0.007	0.691	0.004	0.434	0.002
78	0.871	0.004	0.934	0.001	0.126	0.003	0.600	0.005	0.776	0.002	0.352	0.003	0.711	0.005	0.844	0.002	0.266	0.003	0.737	0.005	0.859	0.002	0.245	0.004
79	0.129	0.004	0.369	0.007	0.480	0.002	0.022	0.001	0.170	0.005	0.293	0.010	0.178	0.003	0.427	0.005	0.499	0.000	0.158	0.004	0.405	0.006	0.493	0.001
80	0.323	0.007	0.573	0.006	0.500	0.001	0.244	0.004	0.499	0.004	0.508	0.000	0.356	0.005	0.599	0.004	0.487	0.001	0.316	0.006	0.566	0.005	0.500	0.000
81	0.323	0.007	0.573	0.006	0.500	0.001	0.400	0.005	0.635	0.003	0.470	0.001	0.111	0.002	0.341	0.005	0.459	0.002	0.395	0.006	0.632	0.004	0.473	0.001
82	0.807	0.005	0.899	0.002	0.185	0.004	0.600	0.005	0.776	0.002	0.352	0.003	0.622	0.005	0.790	0.002	0.336	0.003	0.684	0.006	0.828	0.002	0.288	0.004
83	0.032	0.001	0.204	0.008	0.341	0.011	0.111	0.002	0.341	0.005	0.459	0.002	0.111	0.002	0.341	0.005	0.459	0.002	0.105	0.003	0.334	0.006	0.457	0.003
84	0.355	0.007	0.600	0.005	0.490	0.001	0.556	0.006	0.747	0.003	0.383	0.002	0.644	0.005	0.804	0.002	0.319	0.003	0.684	0.006	0.828	0.002	0.288	0.004
85	0.742	0.006	0.863	0.002	0.241	0.004	0.733	0.004	0.857	0.002	0.248	0.003	0.533	0.006	0.732	0.003	0.397	0.002	0.790	0.004	0.889	0.001	0.200	0.003
86	0.258	0.006	0.514	0.006	0.512	0.000	0.444	0.006	0.669	0.003	0.449	0.001	0.267	0.004	0.520	0.004	0.507	0.000	0.237	0.005	0.492	0.005	0.510	0.000
87	0.645	0.007	0.805	0.003	0.320	0.004	0.711	0.005	0.844	0.002	0.266	0.003	0.533	0.006	0.732	0.003	0.397	0.002	0.263	0.005	0.518	0.005	0.509	0.000
88	0.774	0.006	0.881	0.002	0.213	0.004	0.933	0.001	0.966	0.000	0.066	0.001	0.844	0.003	0.919	0.001	0.150	0.002	0.842	0.004	0.918	0.001	0.152	0.003
89	0.807	0.005	0.899	0.002	0.185	0.004	0.844	0.003	0.919	0.001	0.150	0.002	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.895	0.003	0.946	0.001	0.103	0.002
90	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.956	0.001	0.978	0.000	0.044	0.001	0.911	0.002	0.955	0.001	0.087	0.002	0.868	0.003	0.932	0.001	0.128	0.003

APÉNDICE VI. VALORES DE SIGNIFICANCIA R&R

Loci	Comparación									
	Cup Vs Pot		Viv Vs Sil		Todas Juntas		Cupreata		Potatorum	
	p	S.E.	p	S.E.	p	S.E.	p	S.E.	p	S.E.
811 1167	0.409	0.021	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
811 1092	0.069	0.020	0.004	* 0.002	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
811 1026	0.922	0.005	0.023	* 0.004	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
811 974	0.278	0.015	0.487	0.014	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.001	* 0.001
811 910	0.013	* 0.005	0.572	0.013	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.169	0.028
811 872	0.000	* 0.000	0.002	* 0.001	0.000	* 0.000	0.002	* 0.001	0.000	* 0.000
811 823	0.666	0.019	0.063	0.009	0.002	* 0.002	0.153	0.011	0.000	* 0.000
811 766	0.094	0.019	0.013	* 0.003	0.000	* 0.000	0.022	* 0.005	0.000	* 0.000
811 713	0.301	0.019	0.616	0.014	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
811 657	0.450	0.021	0.512	0.012	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.029	* 0.005
811 623	0.600	0.020	0.051	0.005	0.098	0.016	0.031	* 0.008	0.308	0.020
811 576	0.000	* 0.000	1.000	0.000	0.000	* 0.000	0.028	* 0.006	0.000	* 0.000
811 529	0.000	* 0.000	0.013	* 0.003	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.002	* 0.001
811 500	0.305	0.018	1.000	0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
811 488	0.000	* 0.000	0.487	0.014	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.494	0.028
811 447	0.643	0.014	0.651	0.008	0.000	* 0.000	0.020	* 0.006	0.000	* 0.000
811 407	0.001	* 0.001	0.017	* 0.005	0.000	* 0.000	0.008	* 0.002	0.000	* 0.000
811 379	0.796	0.010	0.199	0.008	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
811 351	0.034	* 0.006	0.567	0.010	0.000	* 0.000	0.044	* 0.005	0.000	* 0.000
811 319	0.001	* 0.001	0.610	0.013	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
811 285	0.005	* 0.003	0.005	* 0.002	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
811 250	0.008	* 0.002	0.064	0.007	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
846 1933	0.456	0.010	0.146	0.006	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
846 1753	0.027	* 0.006	0.006	* 0.003	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
846 1276	0.108	0.013	0.003	* 0.001	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
846 1135	0.088	0.014	0.399	0.014	0.000	* 0.000	0.085	0.010	0.000	* 0.000
846 983	1.000	0.000	0.408	0.009	0.000	* 0.000	0.006	* 0.002	0.000	* 0.000
846 922	0.151	0.011	0.583	0.009	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
846 862	0.020	* 0.004	0.048	* 0.008	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
846 818	0.000	* 0.000	1.000	0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
846 764	0.438	0.024	0.003	* 0.001	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.012	* 0.004
846 692	0.758	0.009	0.022	* 0.003	0.019	* 0.005	0.007	* 0.002	0.182	0.019
846 648	0.000	* 0.000	0.009	* 0.004	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
846 557	0.641	0.019	0.136	0.010	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
846 516	0.126	0.014	0.316	0.010	0.000	* 0.000	0.002	* 0.001	0.000	* 0.000
846 464	0.012	* 0.004	0.711	0.007	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.027	* 0.007
846 433	0.000	* 0.000	0.577	0.011	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
846 412	0.000	* 0.000	0.236	0.011	0.000	* 0.000	0.082	0.016	0.000	* 0.000
846 387	0.035	* 0.008	0.054	0.005	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
846 332	0.287	0.019	0.383	0.010	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
846 305	0.003	* 0.003	0.427	0.012	0.000	* 0.000	0.001	* 0.000	0.000	* 0.000
857 2062	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
857 1872	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
857 1500	0.000	* 0.000	0.040	* 0.003	0.000	* 0.000	0.017	* 0.004	0.000	* 0.000
857 1360	0.000	* 0.000	0.699	0.003	0.000	* 0.000	0.159	0.008	0.000	* 0.000
857 1248	0.789	0.005	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
857 1200	0.012	* 0.002	1.000	0.000	0.024	* 0.007	0.050	* 0.005	0.398	0.013

Loci	Comparación									
	Cup Vs Pot		Viv Vs Sil		Todas Juntas		Cupreata		Potatorum	
	p	S.E.	p	S.E.	p	S.E.	p	S.E.	p	S.E.
857 1150	0.001	* 0.001	0.405	0.008	0.000	* 0.000	0.383	0.013	0.000	* 0.000
857 1100	0.004	* 0.003	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.004	* 0.002
857 1050	0.002	* 0.001	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.008	* 0.005
857 987	0.370	0.018	0.303	0.013	0.000	* 0.000	0.001	* 0.001	0.003	* 0.001
857 914	0.033	* 0.010	0.341	0.018	0.000	* 0.000	0.008	* 0.003	0.000	* 0.000
857 851	0.929	0.005	0.466	0.017	0.000	* 0.000	0.001	* 0.000	0.009	* 0.003
857 800	0.026	* 0.007	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
857 736	0.000	* 0.000	0.292	0.015	0.000	* 0.000	0.239	0.021	0.000	* 0.000
857 682	0.684	0.012	0.014	* 0.003	0.005	* 0.005	0.000	* 0.000	0.511	0.018
857 644	0.000	* 0.000	0.057	0.012	0.000	* 0.000	0.011	* 0.005	0.016	* 0.005
857 603	0.000	* 0.000	0.002	* 0.001	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.187	0.015
857 557	0.851	0.010	0.059	0.006	0.000	* 0.000	0.019	* 0.006	0.000	* 0.000
857 520	0.051	0.012	0.021	* 0.003	0.000	* 0.000	0.023	* 0.006	0.000	* 0.000
857 495	0.000	* 0.000	1.000	0.000	0.000	* 0.000	0.020	* 0.006	0.000	* 0.000
857 458	0.000	* 0.000	0.878	0.003	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
857 420	0.406	0.026	0.166	0.013	0.000	* 0.000	0.066	0.010	0.000	* 0.000
857 387	0.000	* 0.000	0.114	0.013	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
857 350	0.451	0.019	0.210	0.012	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.531	0.040
857 322	0.122	0.018	0.312	0.013	0.000	* 0.000	0.129	0.018	0.000	* 0.000
857 303	0.850	0.010	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
857 274	0.010	* 0.004	0.769	0.008	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
857 238	0.001	* 0.001	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
857 222	0.671	0.014	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
857 206	0.446	0.025	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
841 1116	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
841 1029	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
841 936	1.000	0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
841 860	0.000	* 0.000	0.439	0.011	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
841 797	0.028	* 0.004	0.013	* 0.002	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.167	0.009
841 739	0.708	0.013	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
841 682	0.000	* 0.000	0.138	0.010	0.000	* 0.000	0.002	* 0.002	0.000	* 0.000
841 646	0.239	0.021	0.601	0.009	0.000	* 0.000	0.110	0.014	0.000	* 0.000
841 590	0.001	* 0.000	0.852	0.005	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.495	0.034
841 538	0.002	* 0.001	0.750	0.011	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
841 499	0.000	* 0.000	0.011	* 0.003	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.002	* 0.001
841 457	0.000	* 0.000	0.142	0.006	0.000	* 0.000	0.006	* 0.001	0.005	* 0.002
841 415	0.000	* 0.000	0.003	* 0.001	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.016	* 0.006
841 376	0.000	* 0.000	0.214	0.013	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
841 350	0.000	* 0.000	1.000	0.000	0.000	* 0.000	0.173	0.017	0.000	* 0.000
841 308	0.000	* 0.000	0.004	* 0.001	0.000	* 0.000	0.028	* 0.007	0.000	* 0.000
841 269	0.000	* 0.000	0.045	* 0.006	0.000	* 0.000	0.013	* 0.005	0.004	* 0.002
841 226	0.000	* 0.000	0.002	* 0.001	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000
841 198	0.000	* 0.000	0.037	* 0.005	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000	0.000	* 0.000

APENDICE VII. VALORES DE FST POR LOCUS

Locus	Viveros vs Silvestres	<i>A. cupreata</i> vs <i>A. potatorum</i>	Polaciones de <i>A. cupreata</i>	Poblaciones de <i>A. potatorum</i>	Todas juntas	
1	811-1167	0.253	0.139	0.247	0.061	0.147
2	811-1092	0.075	0.096	0.063	0.126	0.099
3	811-1026	0.148	0.090	0.155	0.063	0.097
4	811-974	0.062	0.051	0.074	0.045	0.054
5	811-910	0.051	0.043	0.062	0.007	0.039
6	811-872	0.070	0.081	0.056	0.038	0.066
7	811-823	0.019	0.031	0.014	0.053	0.033
8	811-766	0.055	0.063	0.039	0.093	0.066
9	811-713	0.108	0.104	0.126	0.109	0.110
10	811-657	0.078	0.055	0.093	0.038	0.058
11	811-623	0.045	0.021	0.042	0.011	0.023
12	811-576	0.089	0.158	0.102	0.148	0.145
13	811-529	0.154	0.139	0.156	0.045	0.121
14	811-500	0.069	0.058	0.082	0.051	0.062
15	811-488	0.069	0.088	0.082	0.000	0.069
16	811-447	0.036	0.045	0.042	0.062	0.049
17	811-407	0.051	0.081	0.044	0.068	0.070
18	811-379	0.037	0.042	0.041	0.057	0.046
19	811-351	0.010	0.031	0.013	0.047	0.030
20	811-319	0.201	0.168	0.225	0.082	0.164
21	811-285	0.167	0.127	0.166	0.055	0.125
22	811-250	0.207	0.166	0.228	0.050	0.170
23	846-1933	0.059	0.084	0.065	0.115	0.090
24	846-1753	0.136	0.136	0.138	0.146	0.140
25	846-1276	0.091	0.118	0.085	0.151	0.123
26	846-1135	0.019	0.038	0.021	0.053	0.038
27	846-983	0.026	0.054	0.030	0.088	0.059
28	846-922	0.046	0.049	0.056	0.052	0.051
29	846-862	0.072	0.133	0.075	0.209	0.138
30	846-818	0.036	0.130	0.045	0.117	0.111
31	846-764	0.214	0.103	0.203	0.040	0.105
32	846-692	0.130	0.066	0.110	0.052	0.071
33	846-648	0.135	0.094	0.134	0.040	0.083
34	846-557	0.116	0.100	0.126	0.108	0.107
35	846-516	0.051	0.075	0.058	0.094	0.077
36	846-464	0.043	0.050	0.052	0.026	0.044
37	846-433	0.078	0.197	0.092	0.230	0.177
38	846-412	0.015	0.105	0.016	0.117	0.095
39	846-387	0.072	0.075	0.073	0.079	0.076
40	846-332	0.038	0.076	0.044	0.109	0.080
41	846-305	0.070	0.128	0.082	0.154	0.126
42	857-2062	0.178	0.073	0.140	0.026	0.068
43	857-1872	0.183	0.171	0.179	0.073	0.139

Locus	Viveros <i>A. cupreata</i> vs Silvestres <i>A. potatorum</i>		Polaciones de <i>A. cupreata</i>	Polaciones de <i>A. potatorum</i>	Todas juntas	
44	857-1500	0.033	0.088	0.029	0.047	0.069
45	857-1360	0.007	0.125	0.009	0.037	0.085
46	857-1248	0.260	0.126	0.262	0.033	0.135
47	857-1200	0.006	0.017	0.010	0.002	0.012
48	857-1150	0.004	0.077	0.004	0.077	0.069
49	857-1100	0.118	0.060	0.083	0.032	0.055
50	857-1050	0.141	0.097	0.127	0.034	0.089
51	857-987	0.038	0.033	0.045	0.034	0.035
52	857-914	0.021	0.045	0.025	0.049	0.043
53	857-851	0.048	0.039	0.058	0.038	0.042
54	857-800	0.119	0.077	0.103	0.051	0.077
55	857-736	0.009	0.074	0.010	0.088	0.062
56	857-682	0.081	0.030	0.077	0.000	0.032
57	857-644	0.034	0.159	0.030	0.031	0.103
58	857-603	0.083	0.080	0.071	0.006	0.062
59	857-557	0.056	0.056	0.053	0.077	0.061
60	857-520	0.028	0.045	0.021	0.054	0.044
61	857-495	0.020	0.122	0.026	0.070	0.087
62	857-458	0.124	0.160	0.143	0.062	0.134
63	857-420	0.032	0.100	0.034	0.162	0.102
64	857-387	0.064	0.132	0.066	0.197	0.132
65	857-350	0.065	0.031	0.075	0.000	0.033
66	857-322	0.012	0.036	0.013	0.061	0.037
67	857-303	0.116	0.106	0.087	0.148	0.113
68	857-274	0.079	0.086	0.094	0.080	0.085
69	857-338	0.364	0.303	0.328	0.302	0.309
70	857-222	0.318	0.148	0.305	0.061	0.159
71	857-206	0.486	0.287	0.445	0.186	0.301
72	841-1116	0.327	0.293	0.270	0.253	0.279
73	841-1029	0.168	0.206	0.153	0.199	0.189
74	841-936	0.224	0.160	0.180	0.185	0.171
75	841-860	0.127	0.146	0.147	0.077	0.128
76	841-797	0.317	0.141	0.345	0.026	0.151
77	841-739	0.235	0.129	0.224	0.088	0.137
78	841-682	0.078	0.166	0.083	0.076	0.127
79	841-646	0.025	0.063	0.030	0.090	0.064
80	841-590	0.099	0.085	0.117	0.006	0.069
81	841-538	0.153	0.141	0.177	0.054	0.124
82	841-499	0.076	0.143	0.075	0.026	0.102
83	841-457	0.215	0.172	0.226	0.049	0.141
84	841-415	0.188	0.338	0.168	0.031	0.242
85	841-376	0.078	0.273	0.089	0.115	0.201
86	841-350	0.021	0.164	0.027	0.076	0.116
87	841-308	0.074	0.286	0.051	0.083	0.196
88	841-269	0.045	0.202	0.042	0.039	0.133
89	841-226	0.132	0.428	0.110	0.036	0.307
90	841-198	0.139	0.357	0.152	0.062	0.268

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre Dugua Xitlali, 2004. "Genética de Poblaciones de *A. cupreata* y *A. potatorum*: Aportaciones para el manejo y conservación de dos especies mezcaleras", Tesis Licenciatura, Fac. Ciencias, UNAM, 73 pp.
- Aguirre Rivera J.R. , Charcas Salazar H. Flores Flores J.L., 2001. El maguey mezcalero potosino, Universidad Autónoma de SLP, México, 87
- Alvarez de Zayas A., 1995. Los Agaves de las Antillas, Bol. Soc. Bot. México (57):37-48
- Allendorf F.W. y Luikart G., 2007. Conservation and the genetics of populations, Blackwell Publishing, 642 pp.
- Arizaga P. J.S., 1998. Biología Reproductiva de *Agave macroacantha* Zucc. en Tehuacán Puebla., Tesis Doctoral, Fac. Ciencias UNAM, México, 154
- Arizaga S. Ezcurra E., Peters E. Ramírez de A. F., Vega E., 2000a. Pollination ecology of *Agave macroacantha* (Agavaceae) in a Mexican Tropical desert. I. Floral Biology and pollination mechanisms, Am. Jour. Bot. 87(7):1004-1010
- Arizaga S. Ezcurra E., Ramírez de A. F., y Vega E., 2000b. Pollination ecology of *Agave macroacantha* (Agavaceae) in a Mexican Tropical desert. II. The Role of pollinators, Am. Jour. Bot. 87(7):1011-1017
- B. de Barrios V., 1971. A guide to Tequila, Mezcal and Pulque. Edit. Minutiae, México. 64 pp
- Backman G. E., 1944. A karyosystematic study of the genus *Agave*, Am. Jour. Bot. 31:283-298
- Baldwin B.G. y Sanderson J. M., 1998. Age and rate of diversification of the Hawaiian silversword alliance (Compositae), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:9402-9406
- Bingqing H., Wang L. Mu L, Yao L. Zhang R. Tang M. y Bao W. 2005. A study of conservation genetics in *Cupressus chengiana*, an endangered endemic of china, usin ISSR markers. Biochemical Genetics 44(1/2): 31-45
- Bogler D., y Simpson B. B., 1996. Phylogeny of Agavaceae based on ITS RDNA sequence Variation, American Journal of Botany 83(9):1225-1235
- Bogler D.J., Pires J.C. y Francisco-Ortega J., 2006. Phylogeny of Agavaceae based on *ndhF*, *rbcL*, and its sequences: implications of molecular data for classification, Aliso 22:313-328
- Bornet y Brnchard. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Molecular Biology Reporter 19:209-215
- Bruman H.J. 1944. The asiatic origin of the huichol still. Geographical Review 34(3):418-427
- Bruman H.J. 1945. Early coconut culture in western Mexico. Hisp. Am Hist Rev. 25:301-314
- Buckler IV E.S., Pcarsall D.M., Holtsford T.P., 1998. Climate, Plant Ecology and Central Mexican Archaic Subsistence, Current Anthropology 39(1):152-164
- Buren Van Mary, James M. Skibo, and Alan P. Sullivan III, 1992. The Archaeology of an *Agave* Roasting Location, The Marana Community in the Hohokam World, The University of Arizona Press, EUA,
- Callen E.O., 1965. Food Habits of Some Pre-Columbian Mexican Indians, Economic Botany 19(4):335-343
- Chambers G. K. y E. S. MacAvoy, 2000. Microsatellites: consensus and controversy, Comparative biochemistry and Physiology Part B (126):455-470
- Colin Núñez R., 2006. Análisis de la diversidad genética y estructura poblacional de *A. xylonacantha* (Agavaceae) utilizando ISSR como marcador molecular, Tesis de Licenciatura, Fac. Ciencias, UNAM, México, 62
- Colunga García M., 2006. Base de datos de nombres técnicos o de uso común en el aprovechamiento de los agaves en México, Informe Final proyecto SNIB-CONABIO CS007, CONABIO, México,
- Colunga-GarcíaMarín P., Coello-Coello J., Eguiarte L.E., y Piñero D., 1999. Isozymatic variation and phylogenetic relationship between henequén (*A. fourcroydes*) and its wild ancestor *A. angustifolia*, Am. Journal of Botany 86(1):115-12
- Conabio-Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2006. Mezcales y Diversidad, 2a ed., México,

- Conabio-Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2006b Distribución potencial de Maguey y mezcal papalote. Mapa escala 1:250,000.
- Conabio-Comisión Nacional para el estudio de la Biodiversidad, 1998. La diversidad biológica de México: Estudio de país, 1998, Ed. digital, ,
- Conner K. Jeffrey, Daniel L. Hartl, 2004. A primer of ecological genetics, Sinauer, Massachusetts EUA, 304
- Crow J.F. y Aoki K., 1984. Group selection for a polygenic behavioral trait: Estimating the degree of population subdivision, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6073-6077
- Dahlgren R., 1984. The families of the monocotyledons : Structure, evolution and taxonomy, , Springer, Berlin, 520
- Diario Oficial de la Federación, 11 de febrero, 2003. Modificación a la declaración de protección a la denominación de origen Mezcal. México
- Diario Oficial de la Federación, 13 de Junio, 2002. Extracto de la solicitud para modificar la declaración de protección de la denominación de origen Mezcal. México
- Diario Oficial de la Federación, 13 de Octubre 1977. Declaración General de Protección a la Denominación de origen "Tequila". México.
- Diario Oficial de la Federación, 17 de agosto, 1994. Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994, Bebidas Alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. México
- Diario Oficial de la Federación, 28 de Noviembre, 1994. Resolución mediante la cual se otorga la protección prevista a la denominación de origen Mezcal, para ser aplicada a la bebida alcohólica del mismo nombre. México
- Diario Oficial de la Federación, 4 de junio, 1997. Norma oficial Mexicana NOM-070-SCFI-1994, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. México
- Diario Oficial de la Federación, 6 de enero de 2006. Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2005, Bebidas alcohólicas-Tequila-Especificaciones. México
- Doyle J.J. y Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19:11-15.
- Dubs H.H. y Smith R.S. 1942. Chinese in Mexico City in 1635. The far eastern quarterly 1(4):387-389
- Eguiarte L.E., 1995. Hutchison (Agavales) vs Huber y Dahlgren (Asparagales): Análisis moleculares sobre la filogenia y evolución de la familia Agavaceae sensu Hutchinson dentro de las monocotiledoneas, Bol. Soc. Bot. Mexico (56):45-56
- Eguiarte L. E. y D. Piñero, 1999. Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos, En: Núñez-Farfán y Eguiarte (comps), 1999, La evolución biológica, ciencias, unam, México, 457
- Eguiarte L.E., Souza V., Silva-Montellano A., 2000. Evolución de la Familia Agavaceae: Filogenia, Biología Reproductiva y Genética de poblaciones, Bol. Soc. Bot. Mexico (66):131-150
- Eguiarte L.E., González-González A. y Scheinvar G. E., 2006. Genética de poblaciones en viveros de *Agave cupreata* e impacto de los planes de manejo en la diversidad y estructuración de esta especie., Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. CS016. México, ,
- Eguiarte L.E. y Gonzalez González A., 2007. De genes y magueyes, el estudio y conservación de los recursos genéticos del tequila y el mezcal, Ciencias (87):28-35
- Endlicher S., 1841. Enchiridion Botanicum Exhibens Classes et ordines plantarum, , Afid Fr. Bece, Braumueller & Seidel, Carol Gerold, Moerschner, Robrmann, Schaumburg & Comp.,
- Enrech N X. de, 2000. Una década de aplicación del método RAPD: Alcances y límites en el estudio de relaciones genéticas en plantas, Acta Científica Venezolana (51):197-202
- Espinoza-Paz, H., Bravo-Mosqueda E., López-López P., Arredondo V. C., 2005. El agave mezclero de Oaxaca: Avances de investigación, , Inst.Nal. de invest. Forest. Agric y Pecuaria. Pacífico Sur, México, 180
- Estrella-Ruiz J.P. y Valiente Banuet A., 2007. Pollination Biology of *Agave potatorum* in the Tehuacan-Cuicatlan Valley, Mexico, Memory of The annual meeting of the ATBC, Cartel. Morelia, México,
- Estrella-Ruiz J.P., 2005. Biología de la polinización de *Agave salmiana* Otto & Salm-Dick en el valle de Tehuacán-

Cuicatlán, México, Tesis de Licenciatura, Fac. Ciencias, UNAM, México, 33

- Estrella-Ruiz J.P. 2008. Efecto de la explotación humana en la biología de la polinización de *Agave salmiana* y *Agave potatorum* en el valle de Tehuacán-Cuicatlán. Tesis de Maestría. Inst. de Ecología, UNAM. 53pp.
- Evanno S.G. Regnaut y Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611-2620
- Excoffier L., Smouse P. E. y Quattro J.M., 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data, *Genetics* (131):479-491
- Falush D., Stephens M. y Pritchard J.K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587.
- Falush D., Stephens M. y Pritchard J.K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: Dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*.
- Feyissa T., Nybom H., Bartish I.V. Welander. 2007. Analysis of genetic diversity in the endangered tropical tree species *Hagenia abyssinica* using ISSR markers. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 54:947-958.
- Flores Abreu N. I., 2007. Coevolución entre *Agave* Senu Lato y sus murciélagos polinizadores (Phyllostomidae), Tesis Maestría, Instituto de Ecología, UNAM,, 79
- Fracaro F. y Echeverrigaray S. 2006. Genetic Variability in *Hesperozygis ringens* Benth (Lamiaceae) an Endangered Aromatic and Medicinal Plant of Southern Brazil. *Biochemical Genetics* 44(11/12): 479-490.
- Francisco Hernández, 1577. *Historia Natural de Nueva España 1574-1577*,
- Frankel, O.H. y M.E. Soulé, 1981. *Conservation and evolution*, Cambridge University Press, Cambridge USA,
- Frankham, J.D. Ballou y D.A. Briscoe, 2003. *Introduction to Conservation Genetics*, Cambridge University Press, United Kingdom, 617
- Futuyma Douglas J, 1998. *Evolution*, Sinauer, USA, 603 pp.
- García Mendoza A. y Galván V. R., 1995. Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México, *Bol. Soc. Bot. México* (56):45474
- García Mendoza A., 1998. Con sabor a Maguey. Guía de la colec. nal. de Aga. y Noli. del JarBot del Inst. Biol unam, -, unam, México, 114
- García Mendoza A., 2002. Distribution of *Agave* (Agavaceae) in Mexico, *Cact. Suc. J.* (74):177-188
- García Mendoza A., 2004. Agaváceas, En: García-Mendoza, A. J., Ordóñez M de J. y Biomes-Salas M., 2004, *Biodiversidad de Oaxaca*, UNAM, WWF, México, 605
- García Mendoza A., 2007. Los Agaves de México, *Ciencias* (87):14.23
- García Meneses P. M., 2004. Reproducción y germinación de *Agave cupreata* Trel. & Berger (Agavaceae) en la localidad de Ayahualco, Guerrero, Tesis Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 78
- Ge X.J., Zhang L.B., Yuan Y.M., Hao G. y Chiang T.Y. 2005. Strong genetic differentiation of the East-Himalayan *Megacodon stylophorus* (Gentianaceae) detected by Inter-simple sequence Repeats (ISSR). *Biodiversity and Conservation* 14: 849-861.
- Gentry S., 1982. *Agaves of continental North America*. The University of Arizona Press E.U.A. 670 pp.
- Gil Vega K, González Chavera M., Martínez de la V. O., Simpson J. y Vandemark G. 2001. Análisis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. *Azul* using RAPD markers. *Euphytica* 119:335-341.
- Gil Vega K. Díaz C., Nava Cedillo A., Simpson J. 2006. AFLP análisis of *Agave tequilana* varieties. *Plant Science* 170:904-909
- González Chauvet R., 2001. Análisis de variación genética de *Agave desertii* en el desierto sonorense por medio de marcadores moleculares (RAPDs), Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 69
- Gonzalez Gonzalez A., 2005. *Biología Reproductiva y Genética de Poblaciones de Agave garcia-mendozae*, Tesis Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM,, 89
- Good-Avila S., Souza V., Gaut B.S. y Eguiarte L.E., 2006. Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae), *PNAS*

103(24):9124-9129

- Gutierrez Lorenzo Ma. del P. 2003. Ponencia “Fuentes para el estudio del vino mezcal en la población de Tequila (Jalisco), Siglos XVIII y XIX.” Segundo Congreso Nacional de Historia Económica, México del 27 al 29 de octubre.
- Hamrick J.L. y Godt M.J. 1997. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. En: Silvestown J. Franco M. y Harper J.L. 1997. *Plant Life Histories: ecology, phylogeny and evolution*. Cambridge university press. pp: 102-118.
- Hartl D. L. y Clark A.G. 1997. *Principles of Population Genetics*, , Sinauer Associates, Inc.,Massachusetts, Canada, 542
- Hedrick, Philip W., 2005. *Genetics of Populations*, , Jones and Bartlett publishers,USA, 737
- Hernández Sandoval L., 1995. Análisis cladístico de la familia Agavaceae, *Bol. Soc. Bot. Mexico* (56):57-68
- Hoelzel A. R. Halley J., O'Brien S.J., Campagna C. Ambom T, Le Bouef B. Ralls, K y Dover G.A., 1993. Elephant Seal Genetic Variation and the use of simulation models to investigate Historical Population Bottlenecks, *Journal of Heredity* (84):443-449
- Husband B. C. y Barrett S. C. H., 1992. Effective population size and genetic drift in tristylous *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae), *Evolution* 46(6):1875-1890
- INIFAP-Instituto Nacional de Investigaciones forestales y Agropecuarias, 1996. México: Informe Nacional para la conferencia técnica internacional de la FAO sobre los recursos fitogenéticos, , Versión en línea.
- Illsley, C.G., 2004. Proyecto TS002. Manejo sustentable del maguey papalote de Chilapa. CONABIO-GEA.
- Illsley C., Vega, E. Pisanty I, Tlacotempa A., García P., Morales P., Rivera G, García J., Jiménez V., Castro F., y Calzada M. 2007. Maguey papalote: hacia el manejo campesino sustentable de un recurso colectivo en el trópico seco de Guerrero México. En: Colunga-García M., Saavedra A.L., Eguiarte L.E. y Zizumbo-Villareal D. (eds.). 2007. *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves*. CICY, CONACYT, CONABIO, SEMARNAT e INE, México. pp: 319-340.
- Irwin-Smith C., Pellmyr O., Althoff D.M., Balcázar-Lara M., Leebens-Mack J. y Segraves K.A., 2008. Pattern and timing of diversification in *Yucca* (Agavaceae): Specialized pollination does not escalate rates of diversification, *Proceedings of the Royal Society B* 275:249-258
- Karl Stephen A., 1996. Application of Anonymous Nuclear Loci to Conservation Biology, En: Thomas B. Smith y Robert K. Wayne, 1996, *Molecular Genetic Approaches in Conservation*, Oxford University Press, N.Y. USA, 483
- Kimura M., 1968. Evolutionary Rate at the Molecular Level, *Nature* 217(17):624-626
- Lewontin, R.C., 1974. The paradox of variation, En: Ridley M. (Ed), 1977, *Evolution The Genetic Basis of Evolutionary Change*, Oxford University Press, Oxford, GB,
- Lewontin R.C., 1991. Twenty-Five Years ago in genetics: Electrophoresis in the development of evolutionary Genetics: Milestone or Millstone?, *Genetics* (128):657-662
- Loeschcke V., J. Tomiuk y S.K. Jain, 1994. Introductory remarks: Genetics and conservation biology, En: V. Loeschcke, J. Tomiuk y S.K. Jain (Eds), 1994, *Conservation Genetics*, Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, 440
- Long Quian X., Xue-Jun G, Xun G. Gang H y Si-Xiang Z., 2004. ISSR variation in the endemic and endangered plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae). *Annals of Botany* 94:133-138
- López Sánchez C., 1989. Principales enfermedades que afectan a *A. angustifolia* y *A. americana* en el Distrito de Tlacolula, Oaxaca, Tesis Licenciatura Biología. ENEP Iztacala :124
- Lopez Urrutia E. R., 2004. Diversidad genética de la población de *Agave karwinskii* Zucc. en el Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla, Tesis de Licenciatura, FES, Iztacala, UNAM, México, 51
- Loveless M.D. y Hamrick J.L. 1984. Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, (15): 65-95.
- Lynch M. y Milligan B.G., 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers, *Molecular Ecology* (3):91-99
- Mace G.M., T. B. Smith, M. W. Bruford y R. K Wayne, 1996. An Overview of the Issues, En: Smith T. B. y R. K. Wayne, 1996, *Molecular Genetics Approaches in Conservation*

- Mandujano C., S. Elizalde, G. Cassiano, D. Soto, D. Tenorio, M. Jiménez-Reyes, 2002. Provenance and use wears of Pre-Hispanic obsidian scrapers from Metztlán, Hidalgo, Mexico, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 252(1):81-88
- Mantel N., 1967. The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach, *Cancer Research* 27(2):209-220
- Marcus Winter, 2004. Los orígenes del Maíz, *Diario de Campo*, INA (28):
- Martínez del Río y Eguiarte L.E., 1987. Bird visitation to *Agave salmiana*: comparison among humminbirds and perching birds., *Condor* (89):357-363
- Martínez Palacios, Eguiarte L.E., y Gurnier G. R., 1999. Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoria-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert, *Am. Jour. Bot.* 86(8):1093-1098
- Martínez-Montiel L.M. 1994. La raíz africana de la const norte del pacífico en la Nueva España. *Revista del Caribe* 24: 1-9
- Miller, M. P., 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. computer software distributed by author.,
- Mills L.S. y Allendorf F.W., 1996. The One Migrant per Generation Rule in Conservation and Management, *Conservation Biology* 10(6):1509-1518
- Molina Freaner y Eguiarte L.E., 2003. The pollination Biology of two pauculate Agaves (Agavaceae) from northwestern Mexico: Contrasting roles of bats as pollinators, *Am. Jour. Bot.* 90(7):1016-1024
- Moreno Ramírez J.C., 2003. Estudio citogeográfico de *A. karwinskii* y *A. macroacantha* en las terrazas aluviales del valle de Zapotitlán, Puebla, Tesis Licenciatura, FES Iztacal, México, 54
- Mueller U.G. y L. L. Wolfenbarger, 1999. AFLP genotyping and fingerprinting, *Tree* 14(10):389-394
- Navarro Quezada A.R., 1999. Estructura genética y procesos de especiación de *Agave cerulata* (Trel.) y *Agave subsimplex* (Trel.) en el desierto Sonorense a partir de RAPD's, Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México, 96
- Navarro Quezada, González Cahuvet R., Molina Freaner F. y Eguiarte L.E., 2003. Genetic differentiation in the *Agave deserti* (Agavaceae) complex of the Sonoran desert, *Heredity* (90):220-227
- Nei Masatoshi, 1973. Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70(12):3321-3323
- Nei Masatoshi. 1972. Genetic distance between populations. *The american naturalist* 106(949):283-292.
- Nybom H. y Bartish I. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, evolution and systematics* (3):93-114.
- Palomino G., Martínez J. y Méndez I. 2007. Variación inter e intraespecífica en especies de *Agave* por citometría de flujo y análisis de sus cromosomas. En: Colunga-García M., Saavedra A.L., Eguiarte L.E. y Zizumbo-Villareal D. (eds.) 2007. En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. CICY, CONACYT, CONABIO, SEMARNAT e INE, México. pp: 41-65.
- Parker C. K., J. L. Hamrick, W.C. Hodgson, D. W., Trapell, A.J. Parker y R. K. Kuzoff 2007. Genetic Consequence of pre-columbian cultivation for *Agave murphei* and *A. delamateri* (Agavaceae), *American Journal of Botany* 94(9):1479-1490
- Pérez Negrón E. y Casas A., 2007. Use, extraction rates and spatial availability of plant resources in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico: The case of Santiago Quiotepec, Oaxaca, *Journal of Arid Environments* (70):356-379
- Pinkava D.J. y Baker M.A., 1985. Chromosomes and hybridization studies of agaves, *Desert Plants* 7(2):93-100
- Pinven N.M, Barredo-Pool F. A. Borges-Argáez, I.C., Herrera-Alamillo M.A. et al, 2001. Reproductive biology of henequén (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *Agave angustifolia* (Agavaceae) I. Gametophyte development, *Am. Jour. Bot.* 88(11):1966-1976
- Pradeep R., Sarla N y Siddiq E.A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128:2-17.
- Pritchard J.K., Stephens M y Donnelly P. 2000. Inference of population structure from multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959

- Raymond M. y Rousset F., 1995. An exact Test for population Differentiation, *Evolution* 49(6):1280-1286
- Rocha Munive M, Good AS, Molina F, Arita HT, Castillo A, GarcíaM A., SilvaM A., etal, 2006. Pollination Biology and adaptive radiation of Agavaceae, with special emphasis on the genus *Agave*, *Aliso* (22):329-344
- Rocha Munive M. G., 2006. Ecología Evolutiva Comparada de 5 especies de *Agave*, Tesis Doctorado, Instituto de Ecología, UNAM,, 164
- Rocha Munive., Valera A. y Eguiarte L.E., 2005. Reproductive Ecology of five sympatric *Agave Littaea* (Agavaceae) Species in central Mexico., *Am. Jour. Bot.* 92(8):130-1341
- Savolainen O., 1994. Genetic variation and fitness: Conservation lessons from pines, En: V. Loeschcke, J. Tomiuk y S.K. Jain (Eds), 1994, *Conservation Genetics*, Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, 440
- Scher Staley, 1996. Genetic Structure of Natural *Taxus* Populations in Western North America, En: Smith T. B. y R. K. Wayne, 1996, *Molecular Genetics Aroaches i Conservation*
- Schneider S., Roessli D. y Excoffier L., 2000. Arlequin: A software for population genetics analysis,
- Shanshan L. Tzen-Yuh C. y Xun G. 2006. High Genetic Diversity vs. Low genetic differentiation in *Nouelia insignis* (Asteraceae), a Narrowly distributed and endemic species in china, revealed by ISSR Fingerprinting. *Annals of botany* 98:583-589.
- Silva Montellano J.A., 2001. Ecología reproductiva y genética de poblaciones de *Agave lechuguilla* (Torr) en un gradiente Latitudinal, Tesis Doctoral, Instituto de Ecología, UNAM,, 148
- Silva Montellano A. y Eguiarte L.E., 2003a. Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the chihuahuan desert. I. Floral Characteristics visitors and fecundity, *Am. Jour. Bot.* 90(3):377-387
- Silva Montellano A. y Eguiarte L.E., 2003b. Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the chihuahuan desert. II. Genetic Variation, differentiation and inbreeding estimates, *Am. Jour. Bot.* 90(5):700-706
- Slauson L.A., 2000. Pollination Biology of two chiropterophilous *Agaves* in Arizona, *Am. Jour. of Bot.* 87(6):825-836
- Sokal, R., 1979. Testing Statistical Significance of Geographic Variation Patterns, *Systematic Zoology* 28(2):227-232
- Soulé M.E. 1985. What is Conservation Biology?. *BioScience* 35(11):727-734
- Suzanne K. Fish, Paul R. Fish, and John H. Madsen, 1992. Evidence for Large-scale *Agave* Cultivation in the Marana Community, , The University of Arizona Press, EUA,
- Tan F., Huang Y., Ge X., Su G. Ni X y Shi S. 2005. Population genetic structure and conservation implications of *Ceriops decandra* in Malay Peninsula and North Australia. *Aqueatic Botany* 81: 175-188.
- Trame A.M. Coddington A.J. y Paige K.N., 1995. Field and genetic studies testing optimal outcrossing in *Agave schottii*, a long-lived clonal plant, *Oecologia* 104(1):1432-1939
- Trejo Hernández L., 2006. Genética de Poblaciones de *Agave striata* Zucc, Tesis de Maestría, Inst. Ecología, UNAM,, 73
- Valenzuela Zapata A.G., 2007. Ponencia As Denominacoes de Origem do Tequila e Mezcal e a biodiversidade no genero *Agave* sp, Seminário Biodiversidade e Denominações de Origem: Uma problemáticaglobal, Escola Superior Agrária de Coimbra, Coimbra, Portugal,
- Valenzuela Zapata A.G., y Nabham G.P., 2003. Tequila: a natural and cultural history. Edit. Tucson university press. EUA, 113 pp.
- Valenzuela Zapata, A. G., 1995. La agroindustria del agave tequilero *Agave tequilana* Weber, *Boletín de la Sociedad Botánica de México* (55):15-25
- Valera A., y Falcón L., 2007. Extracción de ácidos nucleicos. En: Eguiarte L.E., Souza V. y Aguirre X. (comps). *Ecología Molecular*. SEMARNAT-INE-UNAM-CONABIO, pp: 499-516.
- Vargas Ponce O., 2007. Diversidad y relaciones genéticas del complejo *Agave angustifolia* Haw. y los agaves mezcaleros del occidente de México, Tesis Doctoral, Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C., México, 119
- Vázquez Lobo A., 1996. Filogenia de Hongos Endófitos del género *Pinus* L.: Implementacion de Técnicas moleculares y Resultados Preliminares, Tesis de Licenciatura, Fac. Ciencias, UNAM, México, 66

- Vida G. , 1994. Global issues of genetic diversity, En: V. Loeschcke, J. Tomiuk y S.K. Jain (Eds), 1994, Conservation Genetics, Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, 440
- Vos P. Hogers R. Bleeker M. Reijans M. Theo Van de Lee, Homes M. Friters A. Pot J. Paleman J. Kuiper M y Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research 23(21):4407-4414
- Vrijenhoek R.C. 1994 Conservation genetics of north american desert fishes. pp 367-397. En: Conservation Genetics.
- Wang Jingliang, 2004. Application of the One migrant per generation rule to conservation and management, Conservation Biology 18(2):332-343
- Weir B.S. y Cockerham C. Clark, 1984. Estimating F-Statistics for the analysis of population structure, Evolution 38(6):1358-1380
- Wolf A.D., 2005. ISSR Techniques for Evolutionary Biology, Methods in Enzymology (395):134-144
- Zhi Yong Z. Yong Yan C. y De Zhu L. 2005. Detection of low genetic variation in a critically endangered chinese pine, *Pinus squamata*, using RAPD and ISSR markers.
- Zietkiewicz E., A. Rafalski y D. Labuda, 1994. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification, Genomics 20:176-183
- Zizumbo Villareal D. y Colunga García Marin, 2007. Early coconut distillation and the origins of mezcal and tequila spirits in west-central México. Genet. Resour. Crop. Evol . Versión en línea.
- Zizumbo Villareal D. y Colunga García Marín, 2007b. La introducción de la destilación y el origen de los mezcales en el occidente de México. . En: Colunga-García M., Saavedra A.L., Eguiarte L.E. y Zizumbo-Villareal D. (eds.). 2007. En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. CICY, CONACYT, CONABIO, SEMARNAT e INE, México. pp: 85-112