



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

SISTEMÁTICA

Variación morfológica y genética del complejo *Agave angustifolia* Haw., en el estado de Oaxaca

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Miguel Rivera Lugo

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

Dr. Abisai Josué García Mendoza
Instituto de Biología

COMITÉ TUTOR:

Dr. Eloy Solano Camacho
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Dr. Salvador Arias Montes
Instituto de Biología

TUTORA INVITADA:

Dra. June Kilpatrick Simpson Williamson
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

MÉXICO, D.F. MAYO DE 2014



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.



MÉXICO, D.F. mayo 2014

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 9 de diciembre de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **RIVERA LUGO MIGUEL** con número de cuenta **300164277** con la tesis titulada "**Variación morfológica y genética del complejo *Agave angustifolia* Haw., en el estado de Oaxaca**", realizada bajo la dirección del **DR. ABISAÍ JOSUÉ GARCÍA MENDOZA**:

Presidente: DR. DR. RAFAEL LIRA SAADE
Vocal: DR. DAVID SEBASTIAN GERNANDT
Secretario: DR. ANGEL SALVADOR ARIAS MONTES
Suplente: DRA. HEIKE DORA MARIE VIBRANS LINDEMANN
Suplente: DRA. RAQUEL GALVÁN VILLANUEVA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 23 de abril de 2014.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y la formación académica recibida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con número de becario/CVU: 384834.

A mi tutor, el Dr. Abisaí Josué García Mendoza, por su asesoría, apoyo académico y conocimientos brindados en el desarrollo de este proyecto de investigación.

A los miembros de mi comité tutorial, el Dr. Eloy Solano Camacho, Dr. Ángel Salvador Arias Montes y la Dra. June Kilpatrick Simpson Williamson, por todos sus comentarios, recomendaciones y conocimientos aportados para la realización de este proyecto.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Al Dr. Abisáí Josué García Mendoza, por haberme aceptado como su alumno, por su disposición, conocimientos, enseñanzas y trabajo compartido.

A la Dra. June Simpson por darme la valiosa oportunidad de trabajar en el Laboratorio de Genética Molecular del Desarrollo Sexual y Asexual que se encuentra a su cargo en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Campus Irapuato. Esta ayuda fue de suma importancia para la realización de este trabajo.

A la M. en C. Katia del Carmen Gil Vega, por toda la ayuda prestada en toda la parte experimental de este trabajo, su enseñanza y guía fueron de suma importancia en este trabajo. Además de brindarme su invaluable amistad. Gracias por toda Katia.

A los integrantes de mi jurado de examen, el Dr. Rafael Lira Saade, Dr. David Sebastian Gernandt, Dr. Ángel Salvador Arias Montes, Dra. Heike Dora Marie Vibrans Lindemann Dra. Raquel Galván Villanueva, por los comentarios y aportaciones realizadas al trabajo, enriqueciendo de gran forma el manuscrito final.

Al Dr. Eloy Solano Camacho, por su apoyo otorgado en la etapa final de la tesis, además de todas las enseñanzas compartidas.

A todos mis amigos y compañeros con los que compartí alegrías y buenos ratos estos años, en especial a Karla y Gabriela por su apoyo y motivación para seguir adelante.

DEDICATORIA

A mis Padres

*“Con un poco de amor fue tejida mi piel
Y el cincel de huesos fue un poco de amor”*

Al pueblo de Oaxaca

Legítimos dueños de su gran biodiversidad, que durante muchos años han sufrido el despojo de sus recursos naturales. Esperando que este trabajo de alguna manera pueda significar un pequeño cambio en sus condiciones de vida.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	6
ANTECEDENTES	7
ZONA DE ESTUDIO	11
MÉTODOS	14
RESULTADOS	28
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	51
LITERATURA CITADA	52

FIGURAS

		Pagina
1	Localización de la zona de estudio	10
2	Ejemplares examinados en el herbario MEXU.	14
3	Taxones y localidades muestreadas	15
4	Ubicación geográfica de las localidades muestreadas	16
5	Material colectado	17
6	Caracteres morfológicos analizados en el trabajo	19
7	Dispersión y tendencias fenotípicas de los taxones analizados por PCA	30
8	Dispersión y tendencias fenotípicas de los taxones analizados por CDA	33
9	Contenido relativo de ADN de los taxones analizados	36
10	Árbol de distancias morfológicas de los taxones analizados	37
11	DNA extraído de tejido foliar, en gel de electroforesis	39
12	Gel de poliacrilamida mostrando las bandas de fragmentos de DNA de los individuos analizados	40
13	Árbol de distancias genéticas de los individuos analizados	42
14	Correspondencia entre los grupos obtenidos en los análisis morfológicos y moleculares	44

CUADROS

	Pagina
1 Localidades visitadas y taxones colectados para este trabajo	16
2 Caracteres morfológicos registrados en las plantas colectadas	20
3 Componentes principales que explican el 79% de la variación de los datos observados	28
4 Proporción de cada una de las variables en cada uno de los primeros tres componentes	29
5 Funciones discriminantes y el porcentaje de la varianza que explican parte de los datos analizados	31
6 Proporción de cada una de las variables en las primeras tres funciones discriminantes	32
7 Probabilidad que los taxones hayan sido designados <i>a priori</i> en los grupos establecidos	34
8 Parámetros de diversidad genética obtenidos mediante AFLP	41

RESUMEN

El complejo *Agave angustifolia* Haw. (*sensu* Gentry, 1982) comprende cuatro especies y cinco variedades, incluyendo tres especies de importancia comercial. En Oaxaca se distribuyen tres taxones silvestres, *A. angustifolia* var. *angustifolia*, *A. angustifolia* var. *rubescens* y *A. rhodacantha*, además de una forma cultivada denominada “Espadín”. El objetivo de este trabajo fue determinar la variación morfológica y genética del complejo *Agave angustifolia* en el estado de Oaxaca así como identificar los caracteres que pueden ayudar a su delimitación taxonómica. Se muestrearon cinco poblaciones silvestres y tres cultivadas en el estado de Oaxaca, así como una población de *A. tequilana* en Guanajuato y otra de *A. angustifolia* en Sonora como grupo comparativo. Se colectó material para análisis morfológicos y moleculares. Para el análisis morfológico de roseta, hoja, flor, fruto y semilla se midieron 45 caracteres, codificándose en caracteres biestado. Se construyó una matriz de similitud empleando el coeficiente de Ne & Li/Dice, y mediante el algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) se elaboró un árbol de similitud. Para el análisis genético se utilizó la técnica AFLP (Amplified fragment length polymorphism); se utilizaron cuatro combinaciones diferentes de *primers* marcados con fluorescencia, cuantificando 289 bandas. Se construyó una matriz de presencia-ausencia y de similitud utilizando el coeficiente de Ne & LI/Dice, se utilizó el mismo análisis para la morfología. Ambos análisis coinciden en la separación de los taxones cultivados (*A. tequilana* y *A. angustifolia* “Espadín”) de los silvestres. Las poblaciones silvestres de *A. angustifolia* del estado de Sonora difieren de las ubicadas en la localidad tipo del estado de Oaxaca. Se hicieron las primeras colectas completas de *Agave rhodacantha*. Se plantea un estudio de este grupo de taxones en toda su área de distribución para comprender mejor su taxonomía.

ABSTRACT

The *Agave angustifolia* Haw., complex (*sensu* Gentry, 1982) consists of four species and five varieties, including three species of commercial importance. Wild populations of *A. angustifolia* var. *angustifolia*, *A. angustifolia* var. *rubescens* and *A. rhodacantha* are found in Oaxaca and a cultivated form called "Espadín". The aim of this study was to determine the morphological and genetic variation of the *Agave angustifolia* complex in the state of Oaxaca and to identify characters that can help the taxonomic delimitation of its components. Five wild populations and three cultivated populations were sampled in the state of Oaxaca, and two more populations for comparison, one of *A. tequilana* from the state of Guanajuato and another of *A. angustifolia* from the state of Sonora. We collected material for morphological and molecular analysis. For the morphological analysis rosettes, leaves, flowers, fruits and seeds were measured for 45 different characters. These measurements were standardized using the Thiele method. We constructed a similarity matrix using the coefficient of Ne & Li / Dice, and used the UPGMA algorithm to obtain a similarity tree. For the genetic analysis we used four different combinations of fluorescently labeled AFLP primers to quantify a total of 289 bands. A matrix was constructed of presence-absence of the bands and a similarity matrix was calculated using the Ne & LI / Dice index, and we used the same grouping analysis as for morphology. Both analyses agree in the separation of the cultivated taxa (*A. tequilana* and *A. angustifolia* "Espadín") from the wild populations. Important differences also were found between populations of *A. angustifolia* from Sonora and from Oaxaca. The first complete specimen of *Agave rhodacantha* was collected. A study of this species throughout its entire distribution area is recommended to propose a new taxonomic arrangement.

INTRODUCCIÓN

La familia Agavaceae fue propuesta por Dumortier (1829). Él incluyó dentro de ésta a los géneros *Agave*, *Furcraea* y *Littaea*. A partir de esta fecha, los géneros que han conformado la familia han variado de acuerdo a diferentes criterios morfológicos utilizados por varios autores. Hutchinson (1934) reconoció 19 géneros anteriormente ubicados en las familias Amaryllidaceae y Liliaceae. Dahlgren *et al.* (1985) dentro del orden Asparagales delimitan la familia Agavaceae con ocho géneros, incluidos en dos subfamilias: Agavoideae y Yuccoideae. Las clasificaciones moleculares del Angiosperm Phylogeny Group, versión APG I (1998) y APG II (2003) siguen manteniendo esta circunscripción; sin embargo, en la actualización más reciente de esta clasificación (APG III, 2009) se incluye Agavaceae como subfamilia Agavoideae, dentro de la familia Asparagaceae. Los últimos estudios hechos dentro del orden Asparagales demuestran que la familia Asparagaceae *sensu* APG III es parafilética (Kim *et al.*, 2010). Con base en estas evidencias, se ha decidido seguir tratando a Agavaceae como una familia, utilizando la circunscripción propuesta por Dahlgren *et al.* (1985).

El centro de diversidad de la familia se encuentra en México. Se distribuye en todos los ecosistemas, y es particularmente diversa en las zonas semiáridas y templadas (Dahlgren *et al.*, 1985. García-Mendoza, 2004). Agavaceae es una familia endémica del continente americano y se encuentra desde el sur de Canadá hasta Bolivia. Según Dahlgren *et al.* (1985), esta familia está integrada por nueve géneros y aproximadamente 330 especies. El género más diverso es *Agave*, con aproximadamente 200 especies. De éstas, 159 (75%) se encuentran en México, con un 74% de endemismo (García-Mendoza, 2011). En el estado de Oaxaca se conocen 39 especies de este género, que representan el 25% del total registrado para México, por lo tanto, es la entidad con mayor riqueza de taxones (García-Mendoza *et al.*, 2011).

En México los agaves han tenido y tienen una gran importancia económica y cultural para numerosos pueblos indígenas y mestizos, que los han aprovechado durante siglos como fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, ornato, fibras duras extraídas de las hojas (ixtle), abono,

entre otros usos. Los magueyes fueron una de las primeras plantas aprovechadas por los pobladores de Mesoamérica (García-Mendoza, 2007). Entre las especies más utilizadas están *Agave americana* L., *A. angustifolia* Haw., *A. cupreata* Trel. & A. Berger, *A. durangensis* Gentry, *A. funkiana* K. Koch & C. D. Bouché, *A. fourcroydes* Lem., *A. inaequidens* K. Koch, *A. karwinskii* Zucc., *A. lechuguilla* Torr., *A. marmorata* Roetzl., *A. mapisaga* Trel, *A. maximiliana* Baker, *A. potatorum* Zucc., *A. rhodacantha* Trel., *A. salmiana* Otto ex Salm-Dyck, *A. sisalana* Perrine y *A. tequilana* Weber.

Agave angustifolia presenta la distribución geográfica más amplia dentro del género, ya que se encuentra desde Sonora y Tamaulipas en México hasta Costa Rica (Gentry, 1982). Por consiguiente se desarrolla en tipos de vegetación y climas muy diversos, como bosques de *Quercus-Pinus*, matorrales xerófilos y selvas bajas caducifolias, desde el nivel del mar hasta 2500 m de altitud (García-Mendoza y Chiang, 2003). Dentro de su amplia área de distribución, diversas poblaciones han estado sujetas a procesos de domesticación para obtener fibras duras y materia prima para la elaboración de bebidas destiladas.

Agave angustifolia se encuentra ubicado junto con otras 12 especies en la sección Rigidae (Gentry, 1982). Las especies de esta sección se caracterizan por presentar hojas angostas y rígidas, además de tener una panícula pequeña, laxa y con pocas ramas, flores verdosas o amarillentas, con tépalos que se marchitan rápidamente. Gentry (1982), utilizando un concepto de especie morfológico, reúne en una sola especie una serie de poblaciones que otros autores (Salm-Dyck, 1834; Hooker, 1871; Trelease, 1907; Trelease, 1920; Berger, 1915) habían propuesto como especies distintas.

Con base en los caracteres vegetativos y reproductivos que presentan las poblaciones, a Gentry (1982), le resultó difícil separar de manera consistente las especies y sus taxones infraespecíficos, por lo que reunió más de 20 sinónimos bajo *A. angustifolia* y propone separar a éstas poblaciones en tres variedades silvestres: *Agave angustifolia* var. *angustifolia*, *A. angustifolia* var. *rubescens* y *A. angustifolia* var. *sargentii*, así como cuatro variedades cultivadas: *A. angustifolia* var. *deweyana*, *A. angustifolia* var. *letonae*, *A. angustifolia* var.

marginata y *A. angustifolia* var. *nivea*. Gentry identifica a *A. rhodacantha* y *A. tequilana* como especies diferentes de *A. angustifolia*. Sin embargo, Gentry (1982) comenta que en la práctica en muchas ocasiones estos taxones son difíciles de separar de *A. angustifolia*, por lo que, en este trabajo se consideró que las tres forman parte de un complejo taxonómico denominado *Agave angustifolia*.

Con el objetivo de clarificar la taxonomía de este complejo, se han realizado algunos trabajos que intentan reconocer las relaciones entre plantas domesticadas y algunas poblaciones silvestres. En la península de Yucatán, Colunga-GarcíaMarín *et al.* (1996; 1997) y Keb Llanes *et al.* (2002) analizaron las relaciones morfológicas y genéticas del henequén con las poblaciones silvestres de *Agave angustifolia*. Por otro lado en los estados de Jalisco y Guanajuato -otros centros de domesticación del complejo-, Gil-Vega *et al.* (2006, 2007), Vargas (2007) y Vargas *et al.* (2007) han analizado la variedad genética y la relación entre los taxones silvestres y cultivados del complejo centrado en *Agave tequilana*.

El presente estudio pretende aclarar la taxonomía de este complejo en el estado de Oaxaca, entidad donde se desarrollan poblaciones silvestres y domesticadas de *Agave angustifolia*. Dado que las evidencias morfológicas previamente utilizadas por Trelease (1908) y Gentry (1982) no han sido suficientes para delimitar de forma clara estos taxones, es necesario el uso de las herramientas propuestas por los estudios más recientes realizados en el complejo para poder interpretar toda la variabilidad que existe dentro de los taxones y poblaciones y así proponer una delimitación clara y práctica.

OBJETIVOS

General

- Analizar la diversidad morfológica y genética de algunas poblaciones silvestres y cultivadas del complejo *Agave angustifolia* Haw. en el estado de Oaxaca y compararlas con poblaciones del complejo fuera del área de estudio.

Particulares

- Describir la diversidad morfológica de algunas poblaciones del complejo *Agave angustifolia* distribuidas en el estado de Oaxaca, así como de algunas otras poblaciones elegidas con fines comparativos.
- Distinguir caracteres morfológicos útiles en la delimitación de los taxones que integran el complejo.
- Establecer la variabilidad genética que presentan las poblaciones tanto silvestres como cultivadas del complejo *Agave angustifolia*.
- Analizar la posible correspondencia entre la variación morfológica y la variación genética.

ANTECEDENTES

El género *Agave* fue descrito por Linnaeus (1753) en su obra *Species Plantarum*. En este género reconoció cuatro especies, dos de las cuales fueron transferidas posteriormente a *Furcraea* (Ventenat, 1793) y una a *Manfreda* (Salisbury, 1866). Desde finales del siglo XVIII y durante el siglo XIX, se describieron las especies del género *Agave* a partir de ejemplares cultivados en jardines europeos. La mayoría de estas descripciones se basaban únicamente en plantas en estado vegetativo, no incluían ilustraciones, ni citaban ejemplares tipo. La primera descripción que considera las flores, fue hecha por Zuccarini en 1833. Durante la segunda mitad del siglo XIX destacan en el estudio de los agaves Joseph Salm-Reifferscheidt-Dyck (1834) y Georg Albano von Jacobi (1864-1867), quienes describieron un gran número de especies nuevas dentro del género, utilizando caracteres vegetativos.

Alwin Berger (1915) fue el primero que organizó todas las descripciones de los naturalistas europeos en una monografía del género, donde enlistó 274 especies, agrupándolas en tres subgéneros: *Manfreda*, *Littaea* y *Euagave*. Al mismo tiempo, William Trelease (1908, 1910, 1913, 1915, 1920) describe y elabora tratamientos taxonómicos de especies en América continental y el Caribe. Trelease fue el primer taxónomo en visitar poblaciones de *Agave in situ* y en sus trabajos cita localidades, ejemplares de herbario y designa algunos tipos. Sin embargo, sus ejemplares herborizados son incompletos puesto que conservó por lo general ápices de hoja y rara vez flores y frutos.

Dentro de los trabajos contemporáneos del género *Agave*, la monografía de Gentry (1982) es la más exhaustiva por incluir descripciones taxonómicas, localidades precisas, mapas de distribución, ideogramas florales, gráficas de factores ambientales como precipitación, nombres comunes y en ocasiones datos de cultivo y uso para 136 especies, 25 subespecies, 29 variedades y siete formas de la parte continental de Norteamérica. A pesar de tener más 30 años de su publicación, es la referencia más importante dentro del género en cuestiones taxonómicas. Su propuesta de agrupamiento de las especies de *Agave* en secciones es la utilizada en este estudio.

Una de las herramientas que se ha utilizado en la familia Agavaceae para delimitar poblaciones y taxones son los análisis morfométricos. Colunga-GarcíaMarín *et al.* (1996) estudiaron las diferencias morfológicas de los diferentes cultivares de *Agave fourcroydes* (henequén) y la relación que mantienen con las poblaciones silvestres de *A. angustifolia*. Por medio de estos análisis morfométricos pudieron identificar y separar diferentes cultivares de henequén. Por medio de este mismo tipo de análisis Castro-Castro *et al.* (2010), analizaron la variación morfológica en el género *Prochnyanthes*, y concluyeron que el género está conformado por una especie, *Prochnyanthes mexicana*, y no de tres, reconocidas anteriormente por varios autores.

Además de los análisis morfométricos existen otro tipo de evidencias que también son útiles para poder delimitar taxones, entre ellos los marcadores moleculares. Éstos son un conjunto de herramientas proporcionadas por la biología molecular, que permiten examinar diferencias en el material genético de los organismos. Los marcadores moleculares detectan diferencias en las secuencias del ácido desoxirribonucleico, y son aplicables a todos los organismos. Son entidades heredables que siguen las leyes mendelianas (Simpson, 1997).

Para que un marcador molecular sea útil, debe presentar las siguientes propiedades: polimorfismo, codominancia, ser frecuente en el genoma, estar distribuido en todo el genoma y ser selectivamente neutro. Además, ser reproducible, de ensayo rápido y sencillo y de fácil acceso (Simpson 1997; Keb-LLanes *et al.*, 2002; Rentería, 2007). Existen distintos tipos de marcadores, entre éstos los microsatélites o SSRs (Repeticiones de secuencias simples), RFLP (Polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción), RAPD (Polimorfismos de DNA amplificados al azar) y AFLP (Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados) y finalmente la secuenciación de ADN, tanto de las mitocondrias como del núcleo (Vos *et al.*, 1995).

Dentro del complejo *Agave angustifolia* se han hecho pocos análisis moleculares para delimitar sus poblaciones y los taxones cercanamente relacionados. Uno de los primeros estudios en incorporar estas nuevas herramientas dentro del complejo, fue el de Colunga-GarcíaMarín *et al.* (1997). Ellos analizaron la variabilidad isoenzimática de los cultivares de henequén (*Agave*

fourcroydes) y poblaciones silvestres de *A. angustifolia* en Yucatán. Con la técnica empleada se detectaron diferencias significativas entre *A. fourcroydes* y *A. angustifolia*, y los distintos cultivares de henequén analizados; además demostraron que los cultivares identificados por los agricultores locales presentan diferencias genéticas significativas, que demuestra el proceso de selección artificial al que han sido sometidos.

Los AFLP combinan el corte de ADN genómico con enzimas de restricción y la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Permite detectar los polimorfismos por cambios en los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción. Esta técnica detecta múltiples *loci* polimórficos dentro del genoma. Es útil para generar huellas genéticas o para mapear genes. Las ventajas que ofrece el método AFLP son su confiabilidad y consistencia, en comparación con otras técnicas de detección de polimorfismos, debido a las condiciones de alta astringencia bajo las cuales se llevan a cabo las reacciones de PCR y la habilidad de detectar rápidamente muchos *loci* polimórficos. Además, los AFLP no requieren del conocimiento previo del genoma en términos de análisis de secuenciación, síntesis de oligonucleótidos iniciadores (primers) o caracterización de sondas de ADN (Vos *et al.* 1995; Simpson, 1997). Esta técnica molecular propuesta por Vos *et al.* (1995), modificada para su utilización en agaves por Simpson (1997), ha demostrado ser efectiva para identificar la variación genética en las poblaciones y variedades analizadas.

Esta técnica se ha usado exitosamente para determinar la diversidad genética en especies ubicadas en el complejo *Agave angustifolia*. Keb-Llanes *et al.* (2002) utilizaron este método para cuantificar la variación genética entre cultivares de *A. fourcroydes*. Barraza-Morales *et al.* (2006) identificaron diferencias entre distintas poblaciones de *A. angustifolia* en el estado de Sonora y Gil-Vega *et al.* (2006, 2007) analizaron las diferentes variedades de *A. tequilana* en los estados de Jalisco y Guanajuato.

Con base en lo anterior, el presente trabajo aborda la problemática taxonómica en torno al complejo *Agave angustifolia* en el estado de Oaxaca, incorporando análisis morfométricos de caracteres vegetativos y reproductivos, además de técnicas de AFLP. El estudio no sólo aportará

conocimiento biológico de los taxones analizados, sino que será útil para los productores de mezcal del estado de Oaxaca ya que con esta información será posible actualizar de manera adecuada la legislación actual para la producción de esta bebida.

ZONA DE ESTUDIO

Ubicación geográfica

El trabajo se llevó a cabo en el estado de Oaxaca. Esta entidad se localiza entre las siguientes coordenadas: $90^{\circ} 29' 15''$ a $93^{\circ} 54' 10''$ O y $15^{\circ} 37' 56''$ a $18^{\circ} 38' 57''$ N (fig. 1).

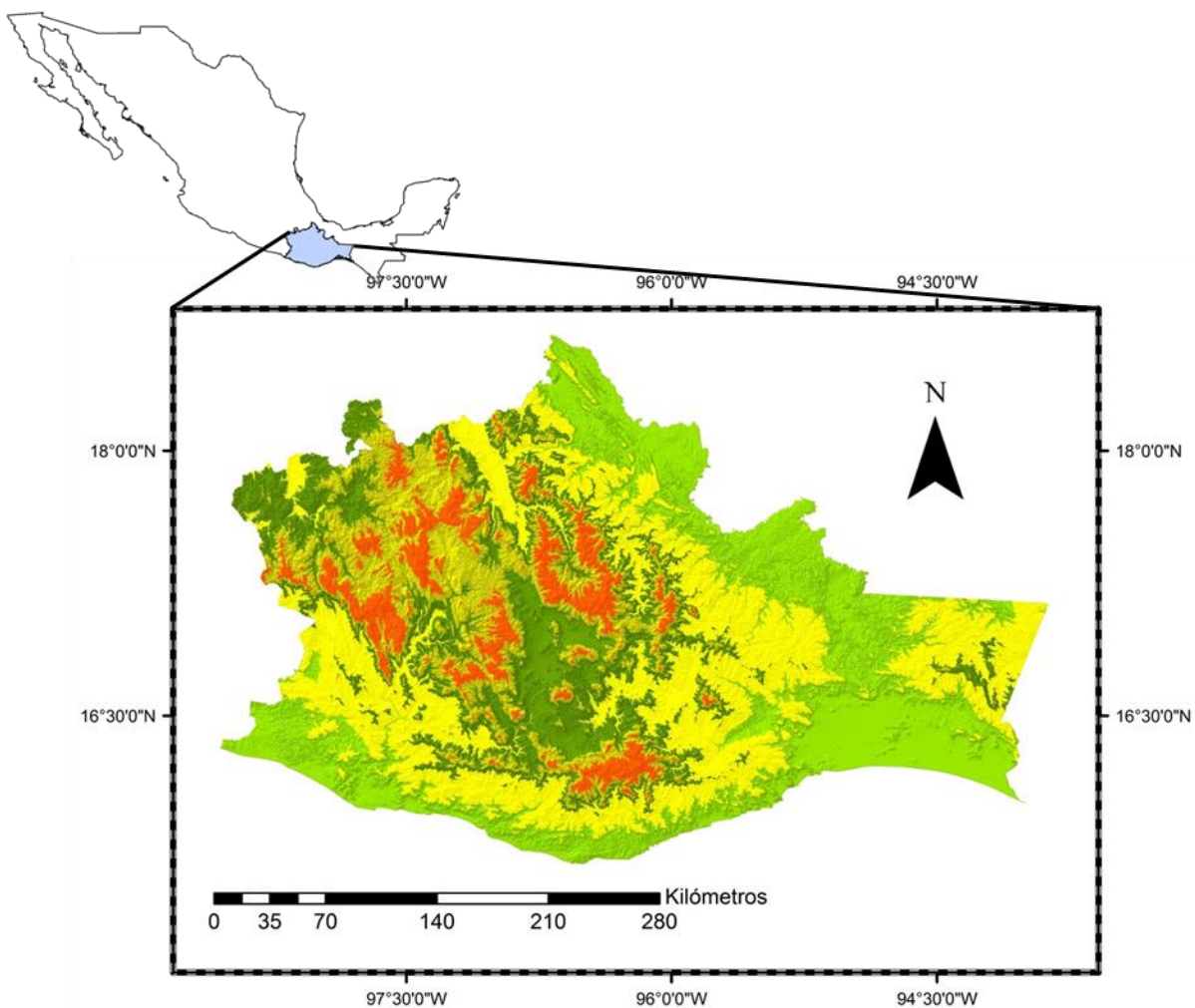


Figura 1. Localización de la zona de estudio.

Geología

La gran biodiversidad del estado de Oaxaca está directamente relacionada con su fisiografía y la composición de su sustrato, ambas derivadas de una evolución geológica compleja, que se remonta a más de mil millones de años de historia. Las rocas más antiguas son metamórficas precámbricas, que cubren una gran porción de la región norte y centro del estado. En el Paleozoico Medio se forman las rocas metamórficas de la región occidental, a partir del Paleozoico Tardío y durante la mayor parte del Mesozoico se dieron eventos alternados de invasión del mar y emersión de tierras, con erosión y formación de rocas continentales. Durante el Jurásico la región oriental y el istmo se desplazaron a su posición actual y a finales del Mesozoico y principios del Cenozoico un evento de deformación cambió el paisaje, ya que los mares se retiraron permanentemente. La mayoría de los elementos actuales fueron originados por la actividad volcánica y la formación de montañas asociadas al movimiento de grandes fallas ocurridos en los últimos 65 millones de años (Centeno-García, 2004).

Fisiografía

A partir del análisis y delimitación de los rasgos de la topografía, la geología, la geomorfología y el arreglo fisiográfico de los elementos orográficos e hidrográficos, en el estado se identifican 12 subprovincias: 1. Depresión del Balsas, 2. Montañas y Valles del Occidente de Oaxaca, 3. Fosa de Tehuacán, 4. Sierra Madre de Oaxaca, 5. Planicie Costera del Golfo, 6. Valles Centrales de Oaxaca, 7. Montañas y Valles del Centro, 8. Depresión Ístmica de Tehuantepec, 9. Sierra Madre del Sur de Oaxaca y Chiapas, 10. Sierra Madre del Sur, 11. Planicie Costera del Pacífico y 12. Planicie Costera de Tehuantepec. Cada una de estas subprovincias tienen características hidrológicas y orográficas propias, y están estrechamente asociadas a las unidades florísticas que en estas se encuentran (Ortiz *et al.*, 2004).

Suelos

Las unidades de suelo representativas en el estado son: Acrisoles, Regosoles, Luvisoles, Cambisoles, Litosoles, Fluvisoles y Arenosoles, distribuidos principalmente en las partes elevadas. Su consistencia es friable y cuando están húmedos son más vulnerables a la degradación. Los Regosoles, Arenosoles y Cambisoles son muy jóvenes y poco desarrollados. Los Fluvisoles y Arenosoles son más susceptibles a la erosión. Las unidades con moderada vulnerabilidad ocupan menores superficies en las partes bajas y planas, pero presentan en algunos casos problemas como salinidad o encharcamiento al menos durante una parte del año, estas características relacionadas con la accidentada topografía dan a lugar a una mayor vulnerabilidad a la erosión (Alfaro-Sánchez, 2004).

Clima

Oaxaca se distingue por una gran diversidad climática, esto se atribuye al efecto de distintos factores como son la posición geográfica, el intrincado relieve, la exposición a los sistemas meteorológicos que se desarrollan tanto en la vertiente del Pacífico como en la del Golfo, las corrientes marinas y la temperatura del océano, entre otros. Esto permite la presencia de condiciones térmicas y de humedad contrastantes en el territorio del estado.

Los principales tipos de climas en el estado de acuerdo con el sistema de clasificación de Köppen (1948), modificado por García (1988), son: cálido húmedo (Am), que cubre el 16.43% de la superficie estatal, semicálido subhúmedo (ACw) que abarca 18.42%, cálido subhúmedo (Aw) con el 25%, el templado subhúmedo (Cw) con un área del 18.49% y el semiárido cálido (BS) con el 8.95% (Trejo, 2004).

MÉTODOS

Revisión bibliográfica

Se llevó a cabo una extensa revisión bibliográfica sobre el complejo *Agave angustifolia*, analizando las publicaciones originales de cada taxón y las revisiones taxonómicas y monográficas que hay para el estado. Se tomó como delimitación inicial la propuesta de Gentry (1982), quien reconoce los taxones silvestres *Agave angustifolia* var. *angustifolia* y *A. angustifolia* var. *rubescens*; así como las plantas cultivadas reconocidas con el nombre genérico de “espadín”. También se consideró dentro del complejo a *Agave rhodacantha* y *A. tequilana*, taxones que el propio Gentry separó tentativamente de *A. angustifolia*; no obstante, menciona su cercanía morfológica con este complejo.

Revisión de herbario

Se revisaron todos los ejemplares de los taxones del complejo distribuidos en el estado de Oaxaca depositados en el Herbario Nacional de México (MEXU; fig. 2). Este herbario cuenta con la colección más completa del género en México, además de contar con duplicados de la gran mayoría de los herbarios que han colectado agaves en el estado de Oaxaca. Se encontraron un total de 120 ejemplares; además de 220 registros del complejo en las bases de datos digitales GBIF y UNIBIO. Para la entidad se identificaron *Agave angustifolia* var. *angustifolia*, *A. angustifolia* var. *rubescens* y *A. rhodacantha*, así como una de las formas cultivadas mencionadas por Gentry (1982), conocidas como “espadín”. De igual forma se revisaron algunas poblaciones de *A. tequilana* del estado de Guanajuato y *A. angustifolia* de Sonora. Con estos registros se generó una base de datos en Excel con todas las localidades y sus coordenadas geográficas. De esta base de datos se seleccionaron las poblaciones y localidades a muestrear, dando preferencias a ejemplares con las fechas más recientes de colecta y las localidades tipo de los taxones.



Figura 2. Ejemplares examinados en el herbario MEXU.

Trabajo de campo

Se hicieron cinco salidas de campo al estado de Oaxaca, en el periodo comprendido de junio del 2011 a agosto de 2012. Para Guanajuato se añadieron dos salidas más, en los meses de junio y julio de 2011. El material botánico de Sonora, fue colectado por El Dr. Abisaf García-Mendoza durante los años 2008 y 2009. Los ejemplares colectados en estas salidas están depositados en MEXU y en el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Del total de 45 localidades registradas se eligieron nueve para el muestreo en campo (fig. 3 y 4; cuadro 1), la selección se hizo con base en localidades tipo, etapa fenológica del material colectado y fecha de colecta de los ejemplares.

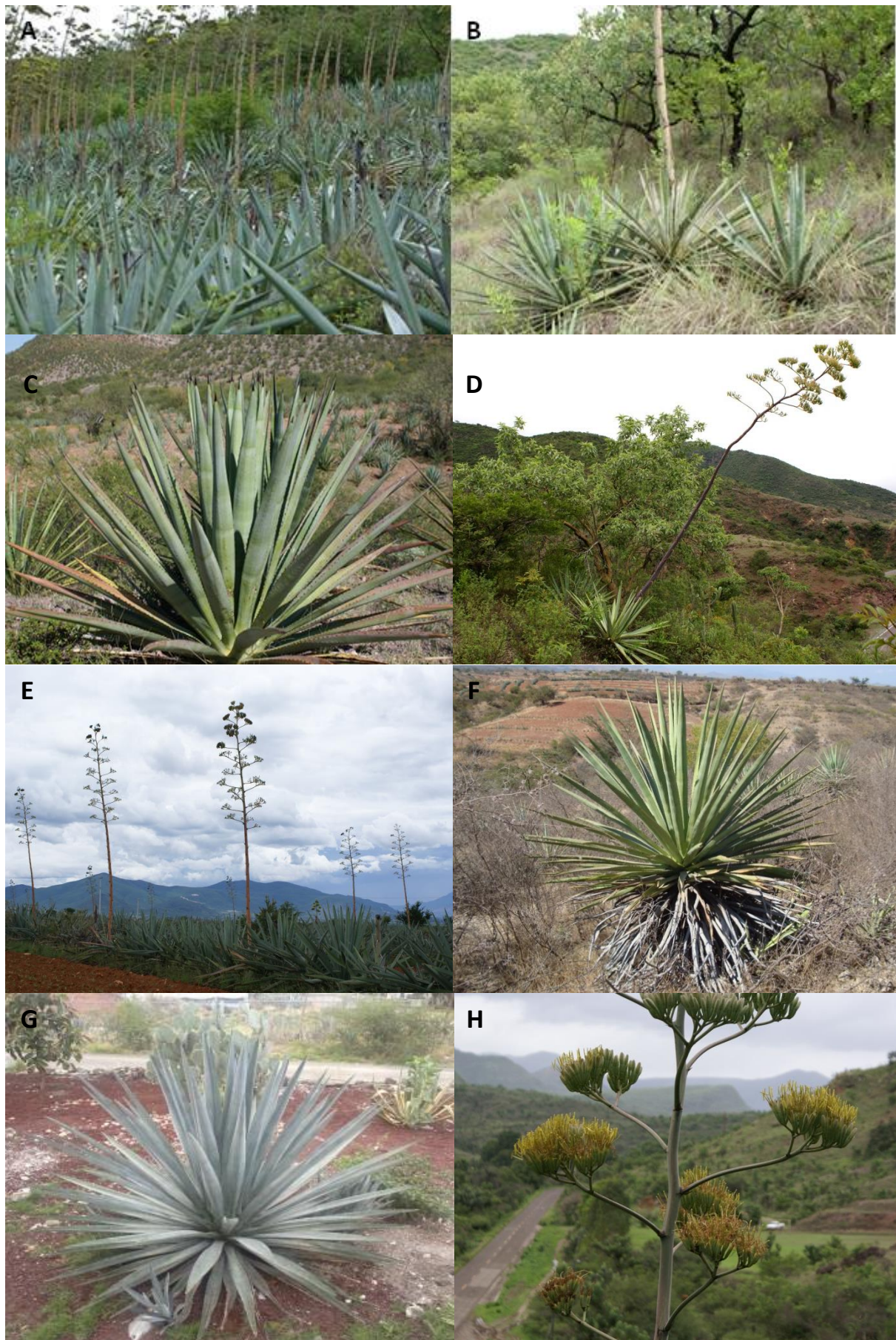


Figura 3. Taxones y localidades muestreadas A) *A. angustifolia* Espadín, Localidad Los Coaches. B) *A. angustifolia* var. *rubescens*, localidad El Camarón. C) *Agave angustifolia* de Sonora, localidad Nácori Chico D) *A. angustifolia* var. *rubescens*, localidad Las Sedas. E) *A. angustifolia* Espadín, localidad Magdalena Teitipac. F) *A. rhodacantha*, localidad El Coyote G). *A. tequilana*, localidad Puerto Interior H) *A. angustifolia* var. *angustifolia*, localidad La Luz Nagore .

Cuadro 1. Localidades visitadas y taxones colectados para este trabajo.

Estado	Municipio	Localidad	Taxones reportados	Colectas para análisis morfológico	Colectas para análisis molecular	Ejemplares herborizados	Localidad tipo
Oaxaca	San Carlos Yautepec	El Camarón	<i>Agave angustifolia</i> var. <i>rubescens</i>	3	10	6	No
Oaxaca	San Francisco Telixtlahuaca	Las Sedas	<i>A. angustifolia</i> var. <i>rubescens</i>	5	10	10	Si
Oaxaca	San Andrés Dinicuiti	La Reforma	<i>A. angustifolia</i> var. <i>angustifolia</i>	2	10	4	Si
Oaxaca	Huajolotitlán	La Luz Nagore	<i>A. angustifolia</i> var. <i>angustifolia</i>	4	10	4	No
Oaxaca	Magdalena Teitipac	Magdalena Teitipac	<i>A. angustifolia</i> “espadín”	5	10	10	No
Oaxaca	San Pedro Totolapan	Los Coaches	<i>A. angustifolia</i> “espadín”	5	10	10	No
Oaxaca	Yogana	El Coyote	<i>A. rhodacantha</i>	5	10	10	No
Guanajuato	Silao de la Victoria	Puerto interior	<i>A. tequilana</i>	10	10	16	No
Sonora	Nácori Chico	Nácori Chico	<i>A. angustifolia</i>	9	7	0	No

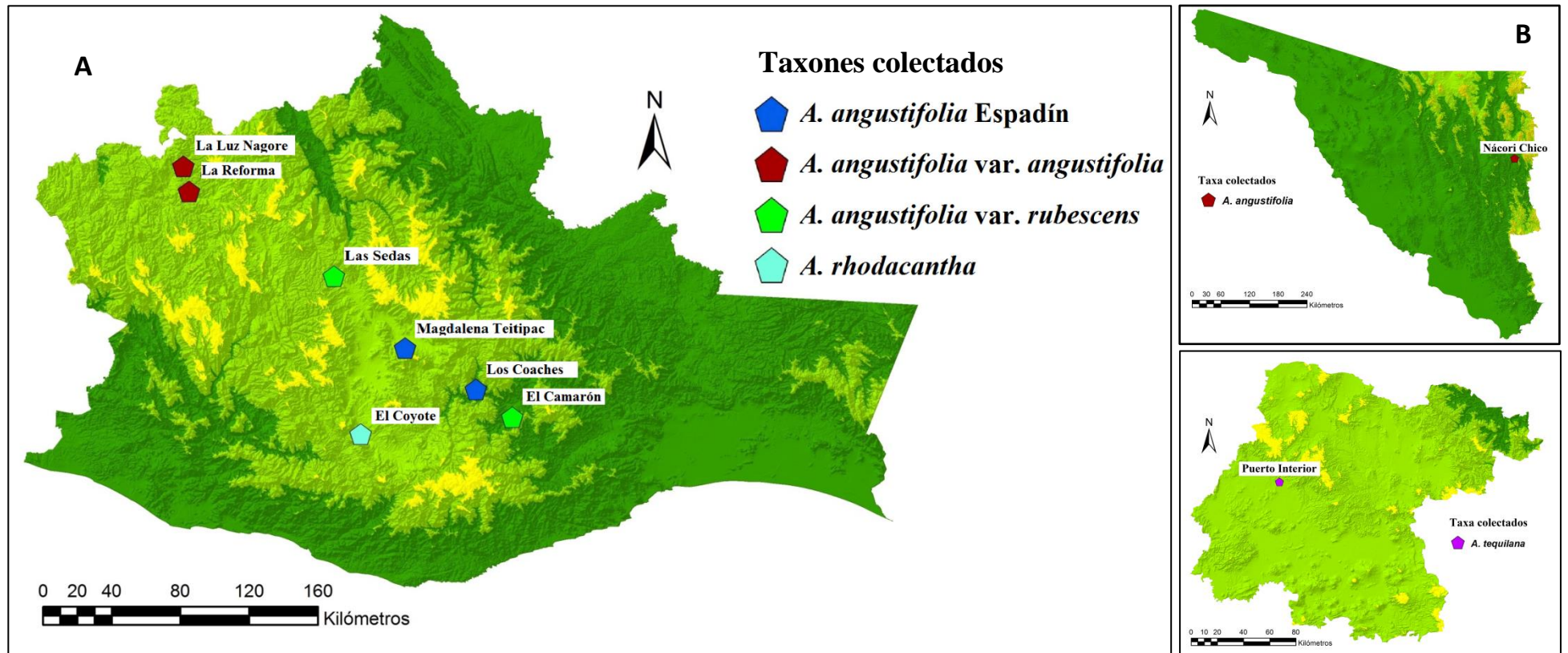


Figura 4. Ubicación geográfica de las localidades muestreadas. A) Oaxaca. B) Sonora. C) Guanajuato.

En estas salidas se obtuvieron: tejido fresco vegetativo y reproductivo para los análisis morfométricos, plantas vivas para el análisis molecular y material para la herborización de ejemplares de respaldo. Para los análisis morfológicos se registraron los caracteres de 46 individuos, pertenecientes a las distintas poblaciones seleccionadas. Estos fueron individuos maduros en etapa reproductiva y se tomaron mediciones tanto en campo como en el laboratorio. En campo se registraron los siguientes datos: altura y diámetro de la roseta, número de hojas, longitud de la inflorescencia, largo del pedúnculo, número de ramas de la inflorescencia y rama más larga de esta última. Se colectó para las mediciones en el laboratorio una hoja madura por planta, la tercera bráctea de la inflorescencia, flores conservadas en solución GAA (15% glicerina, 45% alcohol y 40% agua) y frutos.

Se colectaron 46 individuos para el análisis morfológico, 70 ejemplares de herbario para respaldo, que fueron depositados en los herbario MEXU y FEZA, y 87 ejemplares vivos para el análisis molecular (fig. 5). Estos últimos fueron transportados al Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, donde se mantuvieron en condiciones de invernadero para la subsecuente toma de muestras de tejido vivo. Estos ejemplares se incorporarán a la Colección Nacional de Agaváceas del Jardín Botánico.



Figura 5. Material colectado A) Ejemplares en proceso de herborización. B) Ejemplares de *Agave tequilana* vivos en el área de cuarentena del Jardín Botánico del IBUNAM. C. Flor conservada en solución GAA para sus mediciones morfológicas.

Para los análisis morfológicos se registraron y evaluaron el mayor número de caracteres vegetativos y reproductivos con la finalidad de tener una adecuada representación de la variación morfológica de los taxones. Se consideraron los tratamientos taxonómicos y otros trabajos dentro del género y de la sección. Se identificaron los caracteres que fueron utilizados por otros autores, los cuales se citaban como diagnósticos o relevantes para la delimitación de los taxones, ya sea cuantitativos o cualitativos, reproductivos y vegetativos. Se tuvo especial atención en los caracteres que han sido reportados como susceptibles a los procesos de domesticación (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1996) y se siguieron las pautas para el ingreso de los datos de trabajos similares realizados dentro del género o de la familia (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1996; Castro-Castro *et al.*, 2010). Se evaluaron en total 46 caracteres, cuatro cualitativos y 42 cuantitativos (fig. 6). La lista completa de caracteres y estados de carácter se indican en la cuadro 2.



Figura 6. Algunos de los caracteres morfológicos analizados en el trabajo. A= Alto de la roseta. B=Diámetro de la roseta. C=Largo de la inflorescencia. D=Largo del pedúnculo. E= Largo de la rama de la inflorescencia. F= Largo de los dientes. G= Ancho de los dientes en la base. H= Distancia entre dientes- I= Grosor de la hoja en la base. J= Distancia entre la parte más ancha y la base. K=Ancho de la hoja L=Largo de la hoja. M= Largo de la bráctea basal. N= Ancho de la bráctea basal Ñ= Decurrencia de la espina. O=Diámetro de la espina en la base. P=Largo de la espina. Q=Largo del tubo del perianto. R=Diámetro del tubo del perianto. S=Diámetro del ovario. T=Largo del pedicelo. U=Largo del ovario. V=Ancho de la antera. W=Largo de la antera X=Largo del filamento. Y=Largo de la cápsula Z=Ancho de la cápsula. AA=Largo de la semilla. AB=Ancho de la semilla.

Cuadro 2. Caracteres morfológicos registrados en las plantas colectadas

#	Carácter	Descripción	Observaciones	
1	Alto de la roseta (cm)	De la base del tallo hasta el ápice de las hojas centrales		
2	Diámetro de la roseta (cm)	En la parte media de la roseta		
3	Número de hojas			
4	Largo de la hoja (cm)	Desde la base hasta el ápice de la espina	Una hoja por planta, hoja madura, 35 a 45 hojas a partir del ápice de la planta	
5	Ancho de la hoja (cm)	Parte media de la hoja		
6	Color de la hoja	Verde, glauca, verde amarillenta		
7	Grosor de la hoja en su base (cm)			
8	Distancia entre la parte más ancha y la base (cm)			
9	Forma de la hoja	Lanceolada, espatulada, linear u ovada		
10	Tipo de superficie	Plana, cóncava		
11	Numero de dientes	Un lado de la hoja		
12	Largo de los dientes (mm)	Cinco dientes centrales de la hoja		
13	Ancho de los dientes en la base (mm)			
14	Distancia entre dientes (mm)			
15	Largo de la espina (mm)			
16	Diámetro de la espina en la base (mm)			
17	Decurrencia de la espina (mm)			
18	Largo de la inflorescencia (cm)			
19	Relación pedúnculo/panícula	1/2, 1/3, 1/4 del total de la inflorescencia		
20	Número de ramas de la inflorescencia			
21	Largo de la rama de la inflorescencia	Rama más larga de la inflorescencia		
22	Número de la rama más larga			
23	Orden de ramificación	Primaria, secundaria, terciaria, cuaternaria		
24	Largo de la bráctea basal (cm)	Tercera bráctea de la inflorescencia a partir de la base		
25	Ancho de la bráctea basal (cm)			
26	Largo del pedicelo (mm)			
27	Largo del ovario (mm)			
28	Diámetro del ovario (mm)			
29	Largo del tubo del perianto (mm)	De la base del tubo a la base de los tépalos	Cinco flores por planta	
30	Diámetro del tubo del perianto	En la porción distal		
31	Largo del tépalo externo (mm)	De la base al ápice del tépalo		
32	Ancho del tépalo externo (mm)	En la parte media		
33	Largo del tépalo interno (mm)	De la base al ápice del tépalo		
34	Ancho del tépalo interno (mm)	En la parte media		
35	Inserción de los filamentos	En la base, en la parte media, distal del tubo		
36	Largo del filamento (mm)	De la inserción en el tépalo hasta la base de la antera		
37	Largo de la antera (mm)			
38	Ancho de la antera (mm)	En la inserción del filamento turgente		
39	Largo del estilo (mm)	Desde su unión con el ovario hasta la base del estigma		
40	Ancho del estigma (mm)			
41	Largo de la cápsula (mm)		Cinco frutos por planta	
42	Ancho de la cápsula (mm)			
43	Largo de la semilla (mm)	Diez semillas por fruto de la porción media de la cápsula		
44	Ancho de la semilla (mm)			
45	Semillas totales por fruto	Numero de semillas totales de la cápsula		
46	Proporción de semillas maduras			

Análisis estadístico

Los datos morfológicos obtenidos de las mediciones de los ejemplares fueron ingresados manualmente en formatos hechos exprofeso para esta tarea, después se ingresaron en formato digital en software Microsoft Excel®, generando así una matriz de datos continuos formada por 46 individuos y 47 caracteres, Con esta matriz de datos continuos se hizo una serie de análisis estadísticos en el Laboratorio de Cómputo del Posgrado en Ciencias Biológicas de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. En primer lugar se llevó a cabo un análisis de correlación con el programa Stata® 9.0. Este análisis permitió reconocer cuáles caracteres presentaban un alto coeficiente de correlación y por lo tanto no aportaban prácticamente nada a la varianza de los datos obtenidos. Se hizo análisis multivariado para determinar que caracteres tienen mayor peso en la caracterización morfológica de los taxones (Cristofolini *et al.*, 2005; Cron *et al.*, 2007; Strandby *et al.*, 2009; Chiapella *et al.*, 2011).

De los distintos análisis multivariados que se utilizan para interpretar los datos biológicos, se decidió aplicar dos, el análisis de coordenadas principales (PCA) y el análisis de discriminantes canónicos (CDA). Se calcularon ambos de forma independiente para identificar cuál de los dos resultaba más adecuado para el comportamiento de las cifras obtenidas. Se seleccionaron estos dos tipos de análisis ya que han demostrado su utilidad en trabajos de la familia o en otros complejos taxonómicos (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1996, Castro-Castro *et al.*, 2010, Urbaniak, 2010).

Análisis de agrupamiento

Se aplicó un análisis fenético de distancias morfológicas entre los taxones analizados para así identificar las diferencias morfológicas entre las poblaciones y taxones del complejo *Agave angustifolia*. En el análisis fenético, primero se transformaron los datos continuos en discretos, utilizando el método de ponderación de brecha de Thiele (Thiele, 1993). Este método consiste en encontrar para cada carácter el intervalo de medias entre los taxones analizados, y se divide en segmentos pequeños; el número de estos segmentos depende del tipo de análisis. Para el caso de un análisis morfométrico son dos segmentos. Este tipo de codificación fue seleccionada ya que permite identificar tanto caracteres que presentan diferencias grandes en unos caracteres y pequeñas entre otros (Thiele, 1993). En el método de Thiele se aplica la formula siguiente:

$$xN = n * [(x - \text{min}) / (\text{max} - \text{min})]$$

Donde x=media del carácter del taxón en cuestión; max y min son los valores máximos y mínimos del carácter en todos los taxones y n es igual al número de estados de carácter que se estandaricen, para el caso de datos morfométricos n=2.

Estos datos estandarizados se redondearon a los números enteros más cercanos, y con ellos se construyó una matriz binaria mediante el software NTSYSPc 2.1 (Rohlf, 2008), enseguida se generó una matriz de similitud, utilizando el algoritmo de Dice, y con el método de Agrupamiento por pares no ponderados por media aritmética (UPGMA, por sus siglas en inglés) se obtuvo un árbol de similitud. Para conocer el apoyo de cada uno de los grupos mostrados en el árbol de distancias, al mismo tiempo se analizaron con el software FreeTree (Pavlíček *et al.* 1999), utilizando el método de remuestreo jackknife.

Obtención de los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP)

Se tomaron muestras de tejido de plantas vivas que se colectaron en campo y han sido cultivadas en condiciones de invernadero en el Jardín Botánico del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. En total se colectaron 88 muestras correspondientes a los seis taxones estudiados, que se trasladaron al Laboratorio de Genética Molecular del Desarrollo Sexual y Asexual del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Campus Irapuato. Ahí se procesaron y almacenaron a -80°C para su posterior utilización.

El primer paso fue la extracción de ADN genómico de las muestras de tejido, para esto se utilizaron Kits de extracción DNeasy Plant Mini Kit® ADN de la marca Qiagen, ya que esta técnica de extracción es más fácil y se obtiene ADN con una buena calidad y concentración.

Protocolo para la obtención de los AFLP según el protocolo de Vos *et al.* (1995)

1) Digestión: se llevó a cabo usando una enzima de corte frecuente, Eco R I y otra de corte raro Mse I para digerir 100 ng de ADN genómico y así generar fragmentos pequeños. Las muestras fueron incubadas durante dos horas a 37°C y después se inactivaron las enzimas a 70°C por 15 min. Se usó la mezcla de enzimas Eco R I/Mse I (1.25 U/ μL de cada enzima) incluida en el Kit de preparación de templado marca LI-COR

2) Ligación: se usaron adaptadores de doble cadena diseñados para unirse a los extremos de los fragmentos generados por la digestión y así generar templados para la amplificación. Se utilizó la mezcla de adaptadores Eco R I/ Mse I y la enzima T4 DNA ligasa, incluidos en el

kit de preparación de templado de la marca LI-COR. Los tubos con las muestras se incubaron durante dos horas a 20°C. Enseguida las muestras fueron diluidas 10 veces.

3) Preamplificación: para la primera amplificación se usó la mezcla de iniciadores o “primers” de preamplificación incluida en el kit de preparación de templado de LI-COR o se preparó la mezcla con iniciadores sintetizados en el laboratorio de Genómica del CINVESTAV, Unidad Irapuato.

Se usaron dos iniciadores complementarios a los adaptadores usados en la ligación con un nucleótido selectivo: Eco R I + A y Mse I + A. En ambos casos se usó la enzima Taq ADN polimerasa de Fermentas a 5 U/μL. Para la preamplificación fue necesario desarrollar 20 ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por un minuto y 72°C por un minuto; al terminar, la mezcla se almacenó a 4°C. Previo a la amplificación selectiva las muestras fueron diluidas 30 veces con agua destilada desionizada.

4) Amplificación selectiva: Se amplificó usando primers marcados con fluorescencia con tres bases extras. Se utilizó un Eco R I + ACC marcado a 700 nm y Eco R I + AGG marcado a 800 nm; los *primers* sin marcaje fueron Mse I + ACCC y Mse I + ACGT, generando así cuatro combinaciones diferentes. Para la amplificación selectiva fue necesario desarrollar un ciclo a 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos y 72°C por un minuto. Después se utilizaron doce ciclos donde se fue disminuyendo la temperatura de alineamiento 0.7°C en cada ciclo, manteniendo a 94°C la temperatura de desnaturalización por 30 segundos y 72°C por un minuto para la extensión. Al final se desarrollaron 23 ciclos a 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos y 72°C por un minuto. El producto del PCR se almacenó a 4°C y se protegió de la luz para evitar que la fluorescencia a los *primers* decayera.

5) Gel de electroforesis: la amplificación selectiva fue separada por electroforesis en un gel de poliacrilamida en la cámara del analizador marca LI-COR. El gel se recorrió a 2000V con un amortiguador TBE 5X durante 20 minutos. Se cargaron 0.8 μL de muestra previamente desnaturalizada a 94°C durante tres minutos y se colocaron en el regulador de carga “Blue Stop”. El patrón de fragmentos fue visualizado y analizado con el software de imágenes marca LI-COR, que identifica la presencia de una banda con un signo (+), o la ausencia con

(-) y los datos perdidos con el carácter (F) mediante el programa SAGAMX de AFLPR Quantar.

Análisis de variación genética

Se asumió que cada fragmento correspondía a un alelo dominante en un determinado loci polimórfico, y por cada taxón se calculó el número y porcentaje de loci polimórficos, así como la diversidad genética de Nei (1978), con la ayuda del software AFLP_SURV (Vekemans *et al.*, 2002).

Posteriormente se revisó la matriz obtenida, y se eliminaron los individuos que presentaron errores de corrida, o bien, muchos datos perdidos (más del 20% del total de las bandas). Esta matriz bimodal se corrió en el software FreeTree para generar una matriz de similitud utilizando el coeficiente de Ne-Li\Dice. Esta matriz fue procesada para generar un árbol de similitud utilizando el algoritmo UPGMA, realizándose un análisis de remuestreo jackknife con 3000 repeticiones.

Análisis de ploidías

Para analizar el probable efecto del manejo humano y el nivel de domesticación de algunas poblaciones cultivadas y su influencia en el nivel de ploidías, se hizo un análisis citométrico para reconocer la cantidad de ADN en las poblaciones analizadas. Este análisis se llevó a cabo en el Departamento de Secuenciación y Genómica del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del CINVESTAV Irapuato, Guanajuato.

Se tñió el ADN nuclear con un agente de tinción UV con el reactivo DAPI, este es un marcador de tipo específico (solo indica enlaces A-T). Se midió en un citómetro de flujo marca Partec® modelo PA II y se extrapoló. Para calcular el contenido total de ADN No fue necesario utilizar un marcador intercalar ya que el objetivo era únicamente detectar los niveles de ploidía y no conocer con exactitud el contenido de ADN, ni el número de pares de bases de las plantas analizadas.

El nivel de ploidía se estimó utilizando como patrón plantas de *Zea mays* y de *Agave tequilana* var. *azul*, ya que su contenido de ADN es bien conocido y se encuentra relativamente cerca del registrado para algunas especies de *Agave*, *Zea mays* 2C de ADN=5.433 pg (Dolezel *et al.*, 1998) y *Agave tequilana* var. *azul* 2C ADN=8.389 pg (Palomino *et al.*, 2003).

Se analizaron cinco individuos por población. Cada individuo a su vez fue analizado cinco veces y cada uno de estos análisis tuvo tres repeticiones. Los datos de cada análisis se conjuntaron para obtener las gráficas de contenido de ADN relativo. Se tomaron 0.5 cm² de tejido fresco del individuo a medir y de la especie patrón, respectivamente. Ambas muestras se colocaron en una caja Petri con 0.5 mL de solución buffer CyStain® UV Ploidy, posteriormente se cortaron finamente con una navaja de bisturí para liberar los núcleos. Una vez cortado el tejido se adicionó 1.5 mL de buffer CyStain® UV Ploidy y se incubó la solución por 3 a 5 minutos. Esta solución se filtró con nylon desechable, se colocó en un tubo de lectura y fue analizada en el citómetro de flujo (Fig. 6). Las especificaciones del citómetro del flujo en las lecturas fueron las siguientes: Velocidad = 15, Gain = 55, Lectura máxima = 700 y Lectura mínima = 50.

RESULTADOS

Análisis estadísticos

Se identificaron 26 caracteres que presentaron un valor muy bajo de significancia y alto de correlación. Esto indica que son caracteres que presentan valores muy similares en todos los taxones, y por lo tanto fueron eliminados de los análisis posteriores: alto de la roseta, diámetro de la roseta, ancho de la hoja, color de la hoja, grosor de la hoja en la base, distancia entre la parte más ancha y la base, forma de la hoja, tipo de superficie, ancho de los dientes en la base, distancia entre dientes, diámetro de la espina en la base, decurrencia de la espina, número de ramas de la inflorescencia, largo de la rama de la inflorescencia, número de la rama más larga, ancho de la bráctea basal, largo del ovario, largo del tubo del perianto, largo del tépalo externo, inserción de los filamentos, largo del filamento, ancho de la antera, ancho del estigma, ancho de la cápsula, ancho de la semilla y semillas totales por fruto.

Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (PCA), se hizo con base en 20 variables que mostraron variación importante. Este análisis nos permite observar cuales variables tienen mayor peso para explicar la variabilidad total de los taxones y por lo tanto deben de ser consideradas en su delimitación. Como resultado de este análisis se observa que los primeros ocho componentes engloban el 79.5% de toda la variación (cuadro 3).

Cuadro 3. Componentes principales que explican el 79% de la variación de los datos observados.

Componente	Valor Eigen	Proporción	Acumulativo
1	4.36916	0.2185	0.2185
2	3.00313	0.1502	0.3686
3	2.12638	0.1063	0.4749
4	1.87086	0.0935	0.5685
5	1.45433	0.0727	0.6412
6	1.19611	0.0598	0.7010
7	1.02015	0.0510	0.7520
8	0.867574	0.0434	0.7954

Al analizar los primeros cuatro componentes principales observamos cuales de las variables tiene mayor peso en cada uno de los componentes (cuadro 4). El primer componente representa el 21% de toda la varianza, tiene relación positiva con el largo de la espina, la inflorescencia, la antera, el estilo y la semilla y se relaciona negativamente con la inserción de los filamentos. El segundo que representa el 15% de toda la varianza, se relaciona positivamente con el número de dientes, el largo de la bráctea y ancho del tubo, y negativamente con la relación pedúnculo/panícula, el largo del ovario y de la cápsula, así como la proporción de semillas. El tercer componente representa el 10% de la variación, y está relacionado positivamente con el número y largo de las hojas, el largo de los dientes y los órdenes de ramificación, y se relaciona negativamente con el diámetro del ovario. El componente 4 representa el 9% de la variación total y está relacionado positivamente con el largo del pedicelo y el largo de los tépalos.

Cuadro 4. Proporción de cada una de las variables los primeros tres componentes principales

Variable	Componente 1	Componente 2	Componente 3
Número de hojas	0.1947	-0.0810	0.3905
Largo de la hoja	0.2007	0.2755	0.3342
Número de dientes	-0.2430	0.3394	0.0212
Largo de los dientes	0.1867	-0.0483	0.5267
Largo de la espina	0.3741	-0.1825	0.0949
Largo de la inflorescencia	0.3015	0.1251	0.1467
Relación pedúnculo/panícula	-0.0826	-0.3155	0.1640
Órdenes de la ramificación	-0.1158	-0.0128	0.3599
Largo de la bráctea	0.2187	0.3140	0.1518
Largo del pedicelo	-0.0997	0.1788	0.1304
Largo del ovario	0.2173	-0.2378	-0.2353
Diámetro del ovario	0.2173	0.2096	-0.2302
Ancho del tubo periántico	0.0381	0.3062	-0.1772
Largo del tépalo externo	0.0807	0.2263	-0.0218
Inserción de los filamentos	-0.3233	0.0303	0.1737
Largo de la antera	0.3483	0.0684	-0.1157
Largo del estilo	0.3197	-0.0836	-0.0385
Largo de la cápsula	0.1379	-0.2563	-0.1115
Largo de la semilla	0.2567	0.0216	-0.1674
Proporción de semillas maduras	-0.0500	-0.4434	0.0721

Al analizar los dos primeros componentes, que representan el 36% de toda la varianza, se puede observar la dispersión y tendencias fenotípicas de los taxones examinados (fig. 7). El diagrama muestra cómo se separan claramente algunos de los taxones como *Agave angustifolia* var. *angustifolia* (5), *Agave tequilana* (1), *Agave angustifolia* Espadín (2) y *Agave angustifolia* var. *angustifolia* de Sonora (4). Al mismo tiempo observamos que *Agave angustifolia* var. *rubescens*(3) tiene un comportamiento muy disperso.

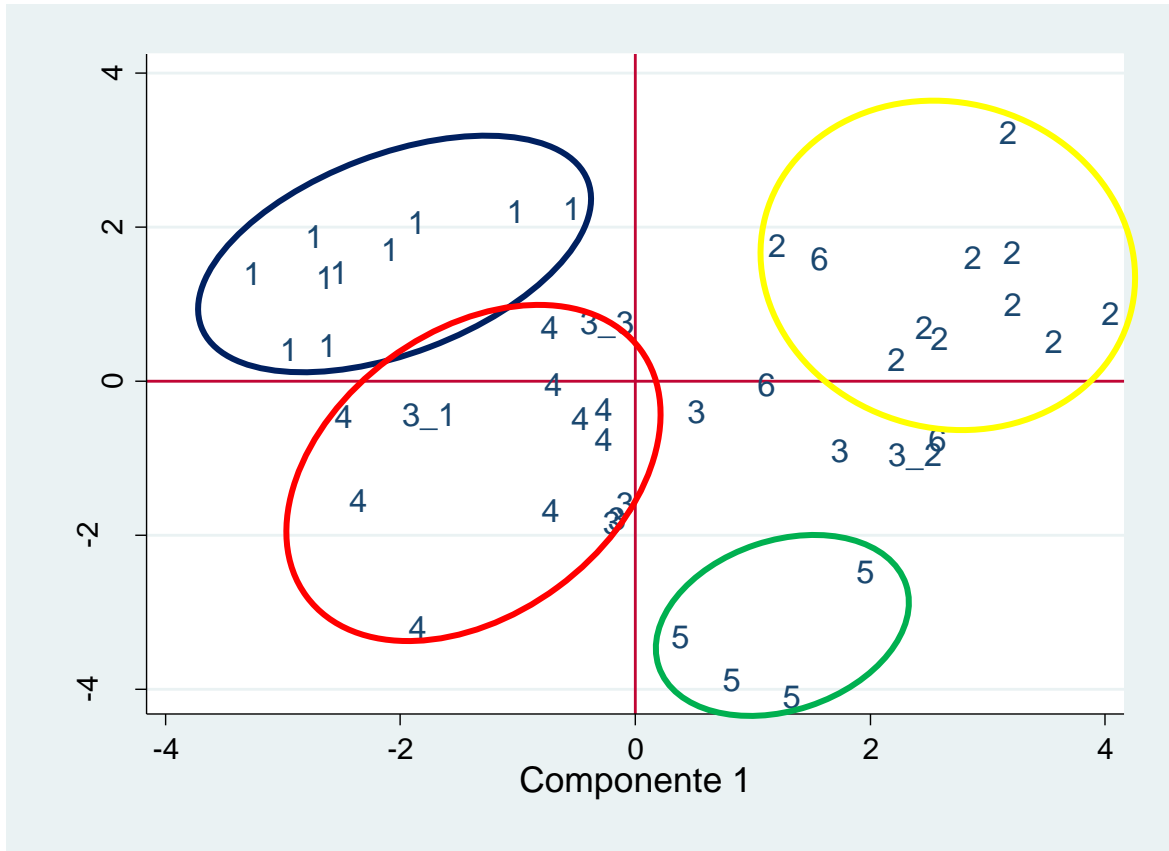


Figura 7. Dispersión y tendencias fenotípicas de los taxones analizados por PCA. Componentes 1 y 2. 1) *Agave tequilana*, 2) *Agave angustifolia* Espadín, 3) *Agave angustifolia* var. *rubescens*, 4) *Agave angustifolia* var. *angustifolia* de Sonora, 5) *Agave angustifolia* var. *angustifolia* de Oaxaca 6) *Agave rhodacantha*

Análisis de discriminantes canónicas

Con el análisis previo de correlación se descartaron 28 de los 46 caracteres, 26 de éstos presentan un alto valor de correlación y muy bajo de significancia: alto de la roseta, diámetro de la roseta, ancho de la hoja, color de la hoja, grosor de la hoja en la base, distancia entre la parte más ancha y la base, forma de la hoja, tipo de superficie, ancho de los dientes en la base, distancia entre dientes, diámetro de la espina en la base, decurrencia de la espina, número de ramas de la inflorescencia, largo de la rama de la inflorescencia, número de la rama más larga, ancho de la bráctea basal, largo del ovario, largo del tubo del perianto, largo

del tépalo externo, inserción de los filamentos, largo del filamento, ancho de la antera, ancho del estigma, ancho de la cápsula, ancho de la semilla y semillas totales por fruto.

Otros dos caracteres fueron excluidos: órdenes de ramificación e inserción de los filamentos, debido a que el análisis de discriminantes canónicas utiliza únicamente caracteres continuos. Al realizar el análisis de discriminantes canónicas se necesitaron cinco funciones discriminantes para explicar el 100% de la varianza de los datos (cuadro 5).

Cuadro 5. Funciones discriminantes y el porcentaje de la varianza que explican a partir de los datos analizados.

Función	Correlación canónica	Valor		
		Eigen	Proporcional	Acumulada
1	0.9924	65.3875	0.6241	0.6241
2	0.9721	17.1768	0.1640	0.7881
3	0.9570	10.8796	0.1038	0.8919
4	0.9420	7.87901	0.0752	0.9671
5	0.8804	3.44492	0.0329	1.0000

Cuadro 6. Proporción de cada una de las variables en las primeras tres funciones discriminantes.

Variables	Función		
	1	2	3
Número de hojas	.008	.175	.615
Largo de la hoja	-1.188	.323	.153
Número de dientes	.927	-.303	1.235
Largo de los dientes	1.422	-.267	1.209
Largo de la espina	.201	.672	.521
Largo de la inflorescencia	-.001	.290	-.850
Pedúnculo/panícula	.109	.153	-.327
Largo de la bráctea estéril	-.454	.555	.157
Largo del pedicelo	-.060	-.163	.648
Largo del ovario	.479	-.033	.456
Diámetro del ovario	.317	.471	.443
Ancho del tubo periántico	-.137	-.198	.471
Largo del tépalo externo	.213	-.676	.036
Largo de la antera	.011	.860	.008
Largo del estilo	-.095	-.260	.223
Largo de la cápsula	-.127	-.060	.397
Largo de la semilla	-.333	.611	-.244
Proporción de semillas maduras	1.318	.220	.023

Después de la tercera función discriminante obtenemos una varianza acumulada de cerca del 90%, por lo cual es suficiente para establecer que las primeras tres funciones discriminantes representan la gran mayoría de la varianza de nuestros caracteres. Al analizar las cinco funciones podemos observar cuáles de las variables tiene mayor peso en cada uno de los componentes (cuadro 6).

La primera función acumula el 62.5% de la varianza total de los datos. Está relacionada positivamente con los caracteres largo de los dientes, proporción de semillas maduras y número de dientes, y de manera negativa con el largo de la hoja. La segunda función añade el 16.4% y está relacionada positivamente con el largo de la antera, la espina y la semilla y se relaciona negativamente con el largo del tépalo externo. La tercera función representa el 10% de la varianza total de los datos, se relaciona positivamente con el número y largo de los dientes y largo del pedicelo, negativamente con el largo de la inflorescencia.

Al contrastar los coeficientes estandarizados de las primeras dos funciones se obtiene una gráfica de dispersión fenotípica de los datos analizados, en esta podemos ver como los taxones se agrupan claramente (fig. 8).

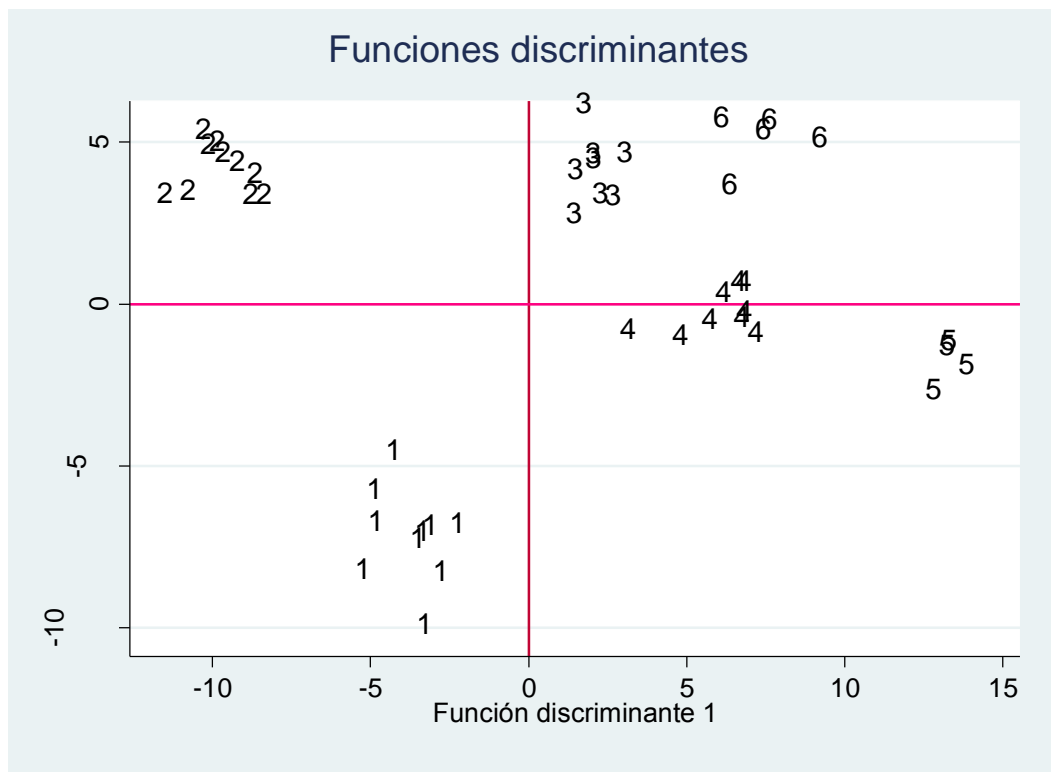


Figura 8. Dispersión y tendencias fenotípicas de los taxones analizados por CDA. 1= *Agave tequilana*. 2= *A. angustifolia* Espadín. 3= *A. angustifolia* var. *rubescens*. 4= *A. angustifolia* de Sonora. 5= *A. angustifolia* var. *angustifolia*. 6= *A. rhodacantha*.

Este análisis asigna el 100% de las especies en sus grupos respectivos establecidos a priori, utilizando una distribución uniforme de las probabilidades previas de 16.6% a cada uno de ellas (cuadro 7).

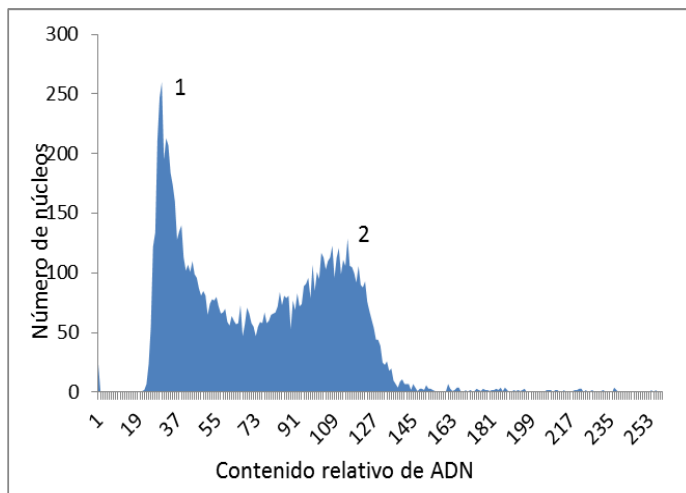
Cuadro 7. Probabilidad que los taxones hayan sido designados a priori en los grupos establecidos
 1= *Agave tequilana*. 2= *A. angustifolia* Espadín. 3= *A. angustifolia* var. *rubescens*. 4= *A. angustifolia* de Sonora. 5= *A. angustifolia* var. *angustifolia*. 6= *A. rhodacantha*

Especie	Clasificación						Total
	1	2	3	4	5	6	
1	10	0	0	0	0	0	10
	100	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100
2	0	10	0	0	0	0	10
	0.00	100	0.00	0.00	0.00	0.00	100
3	0	0	8	0	0	0	8
	0.00	0.00	100	0.00	0.00	0.00	100
4	0	0	0	9	0	0	9
	0.00	0.00	0.00	100	0.00	0.00	100
5	0	0	0	0	4	0	4
	0.00	0.00	0.00	0.00	100	0.00	100
6	0	0	0	0	0	5	5
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100	100
Total	10	10	8	9	4	5	46
	21.74	21.74	17.39	19.57	8.70	10.87	100
Probabilidad previa	0.1667	0.1667	0.1667	0.1667	0.1667	0.1667	

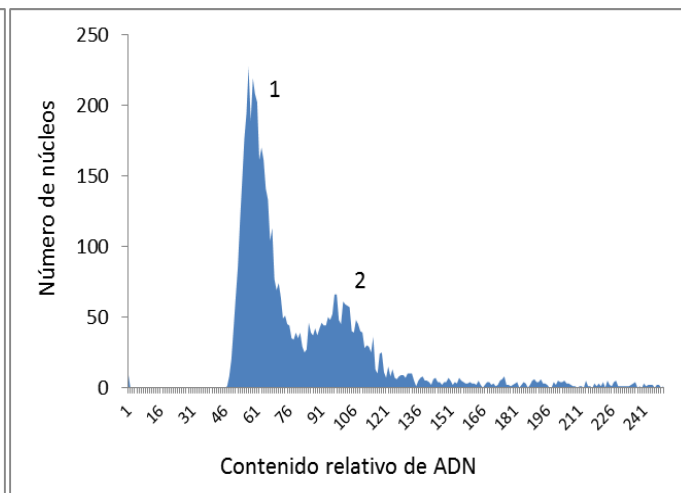
Análisis de ploidías

En las muestras analizadas se encontraron taxones diploides y poliploides. Los diploides corresponden a *Agave angustifolia* var. *angustifolia*, de Oaxaca y de Sonora y *Agave angustifolia* var. *rubescens*; mientras que las plantas que presentan poliploidía son *Agave angustifolia* Espadín, *Agave rhodacantha* y *A. tequilana* (fig. 9).

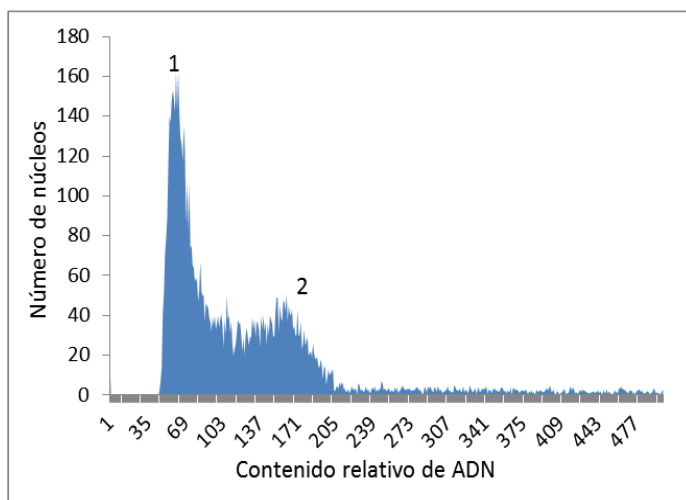
Existen varios trabajos que reportan diferentes niveles de ploidía en diferentes taxones dentro del complejo. Uno de los primeros es de Banerjee y Sharma (1987), en el cual se reportan dos distintos niveles de ploidía para *Agave tequilana*: diploide $2x=60$ y triploide $2x=90$. Castorena-Sánchez *et al.* (1991) señalan que *A. fourcroydes* es pentaploide con $5x=150$, y a *A. angustifolia* como hexaploide $6x=180$. Palomino *et al.* (2003) determinaron el nivel de ploidía en ocho variedades de *A. tequilana*; en este trabajo se registra una serie poliploide, encontrando poblaciones diploides: $2x=60$ (liñeno, azul, azul listado, moraleño, xigüín y pata de mula), triploides: $3x=90$ (bermejo), tetraploides: $4x=120$ (chato) y pentaploides: $5x=150$ (chato). Palomino *et al.* (2005) analizaron poblaciones tanto de *A. angustifolia* var. *angustifolia*, como de *Agave angustifolia* Espadín; indicando que el primero es diploide: $2x=60$ y el segundo triploide: $3x=90$. A su vez, Moreno-Salazar *et al.* (2007), mencionan que las poblaciones de *A. rhodacantha* del estado de Sonora son triploides: $3x=90$. Esto difiere con lo aquí encontrado para las poblaciones de Oaxaca.



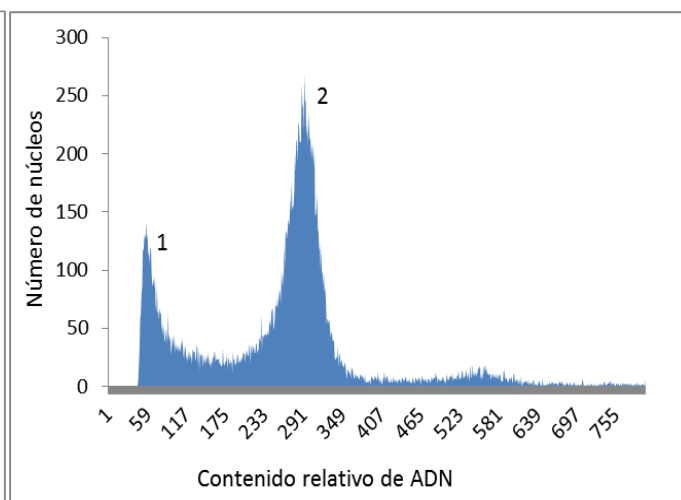
1) *Zea mays* 2) *Agave angustifolia* var. *angustifolia*



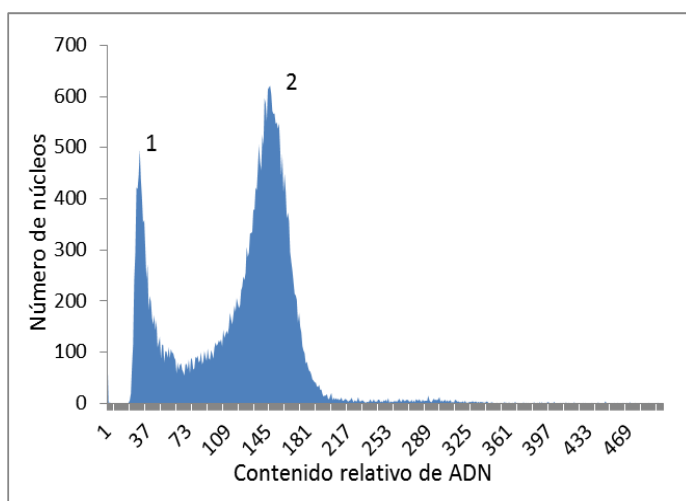
1) *Zea mays* 2) *Agave angustifolia* var. *rubescens*



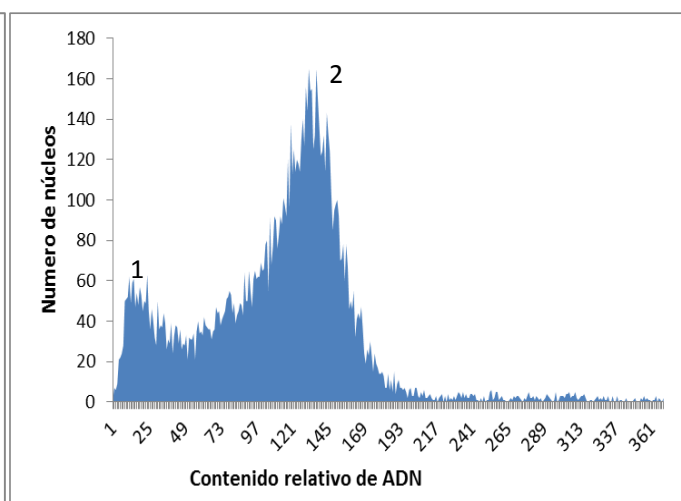
1) *Zea mays* 2) *Agave angustifolia* de Sonora



1) *Zea mays* 2) *Agave angustifolia* Espadín



1) *Zea mays* 2) *Agave rhodacantha*



1) *Zea mays* 2) *Agave tequilana*

Figura 9. Contenido relativo de ADN de los taxones analizados: A) *A. angustifolia* var. *rubescens*. B) *A. angustifolia* var. *rubescens*. C) *A. angustifolia* de Sonora. D) *A. angustifolia* Espadín. E) *A. rhodacantha*. F) *Agave tequilana*.

Análisis morfológico

Por medio del análisis de agrupamiento se obtuvo el siguiente árbol de distancia (fig. 10).

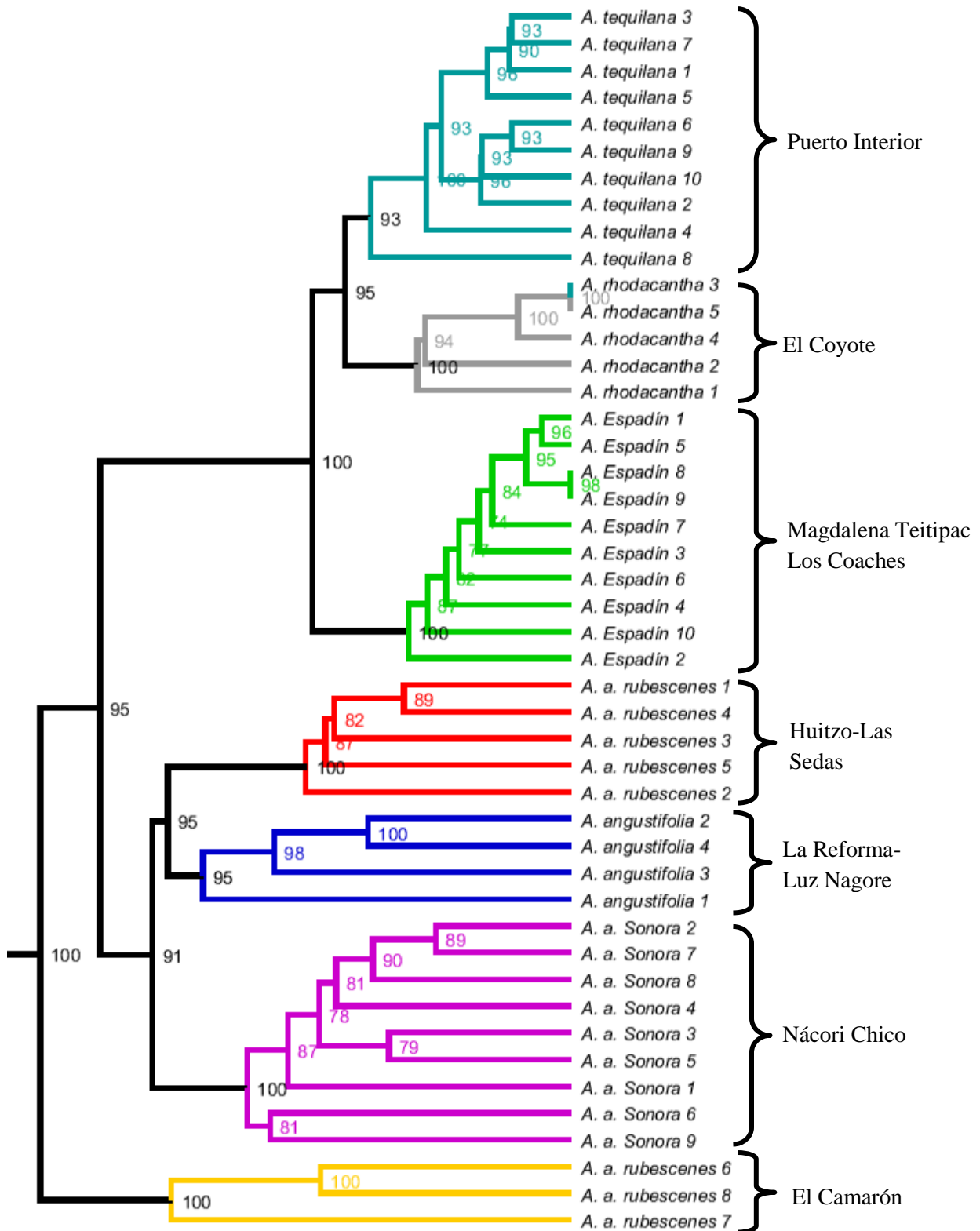


Figura 10. Arbol de distancias morfológicas de los taxones analizados. Los números en los nodos indican el valor de soporte jackknife.

En el árbol se observan tres grupos. El primero está formado por las especies domesticadas *Agave tequilana*, *A. angustifolia* “Espadín” y *A. rhodacantha*. El segundo contiene dos subgrupos, en uno están *A. angustifolia* var. *angustifolia* y *A. angustifolia* var. *rubescens* de Las Sedas; en el segundo están *A. angustifolia* var. *angustifolia* del estado de Sonora, todos ellos constituidos por plantas silvestres. El tercer grupo está conformado por individuos correspondientes a *A. angustifolia* var. *rubescens* de la localidad “El Camarón”.

En el grupo de los taxones silvestres se observa cómo se separa *Agave angustifolia* var. *rubescens* de la localidad de Las Sedas, de las plantas provenientes de El Camarón. Asimismo, las poblaciones de *A. angustifolia* del estado de Oaxaca se separan de las de Sonora.

Obtención de los AFLP

Se extrajo el ADN de las 87 muestras colectadas en campo (fig. 11), de las cuales 55 fueron utilizadas en el análisis de distancia genética, ya que cumplían con los requisitos necesarios de datos perdidos y claridad en la lectura de las bandas (fig. 12) . Con estos individuos se obtuvo el árbol de distancias genéticas (fig. 13).

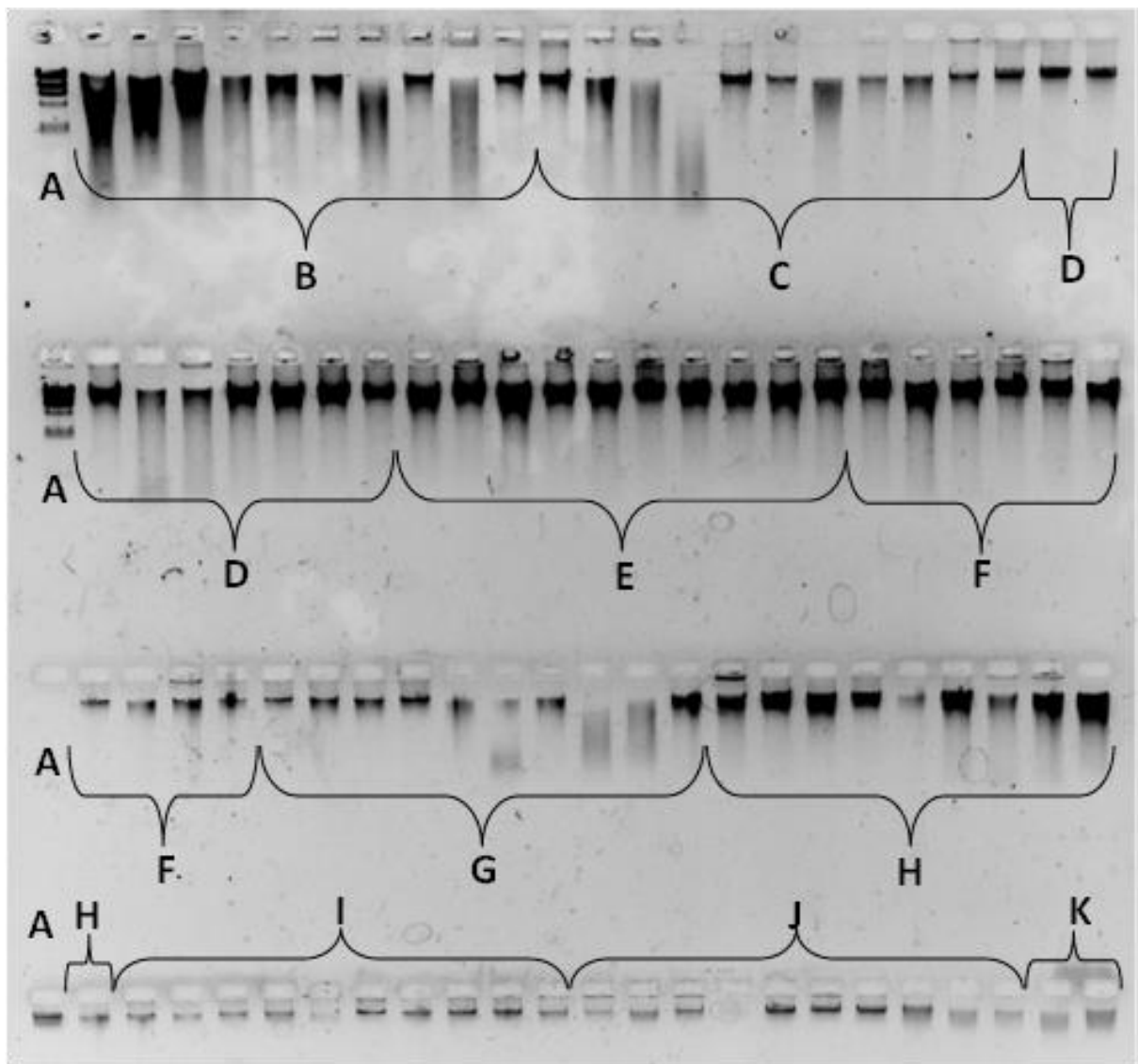


Figura 11. DNA extraído de tejido foliar, en gel de electroforesis. A) Marcador de peso molecular. B) *A. angustifolia* var. *rubescens*, Las Sedas. C) *A. angustifolia* Espadín, Magdalena Teitipac. D) *A. rhodacantha*, El Coyote. E). *A. tequilana*, Puerto Interior. F) *A. angustifolia* var. *angustifolia*, La Luz Nagore. G) *A. angustifolia* var. *angustifolia*, La Reforma. I) *A. angustifolia* var. *rubescens*, El Camarón. J) *A. angustifolia* Espadín, Los Coaches. K) *A. angustifolia* de Sonora.

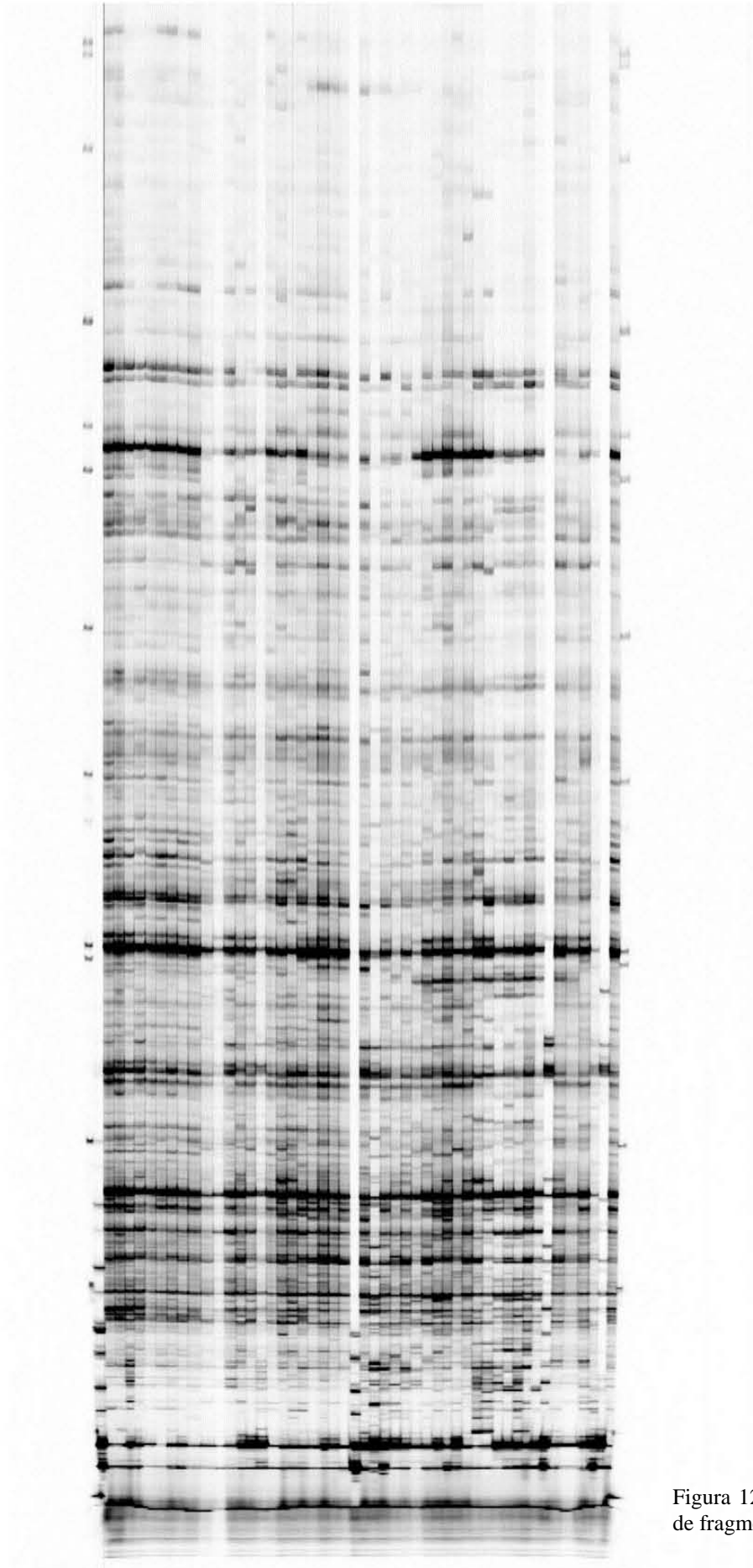


Figura 12. Gel de poliacrilamida mostrando las bandas de fragmentos de DNA de los individuos analizados

Los análisis de diversidad genética realizados muestran un gran número de polimorfismos y un gran porcentaje de loci polimórficos entre los taxones estudiados, esto se refleja en un índice de diversidad genética alto. El número más bajo de polimorfismos lo reporta *A. tequilana*, probablemente al nivel de manejo al cual ha sido sometido, mientras que las plantas que presentan un índice de diversidad más alto son los taxones silvestres: *A. angustifolia* var. *angustifolia* y *A. angustifolia* var. *rubescens*(cuadro 8).

Cuadro 8. Parámetros de diversidad genética obtenidos mediante AFLP. N=número de individuos. NLE=número de loci encontrados. NLP=número de loci polimórficos. PLP=porcentaje de loci polimórficos. He=Diversidad genética de Nei. DE He= Desviación estándar de He.

Taxon	N	NLE	NLP	PLP	He	DEHe
<i>A. angustifolia</i> var. <i>angustifolia</i>	14	289	281	97.2	0.31371	0.00873
<i>A. angustifolia</i> var. <i>rubescens</i>	10	289	280	96.9	0.31064	0.00886
<i>A. angustifolia</i> Espadín	13	289	277	95.8	0.31734	0.00854
<i>A. rhodacantha</i>	7	289	238	82.4	0.23402	0.01019
<i>A. tequilana</i>	5	289	231	79.9	0.20550	0.00983
<i>A. angustifolia</i> Sonora	6	289	226	78.2	0.26062	0.01003

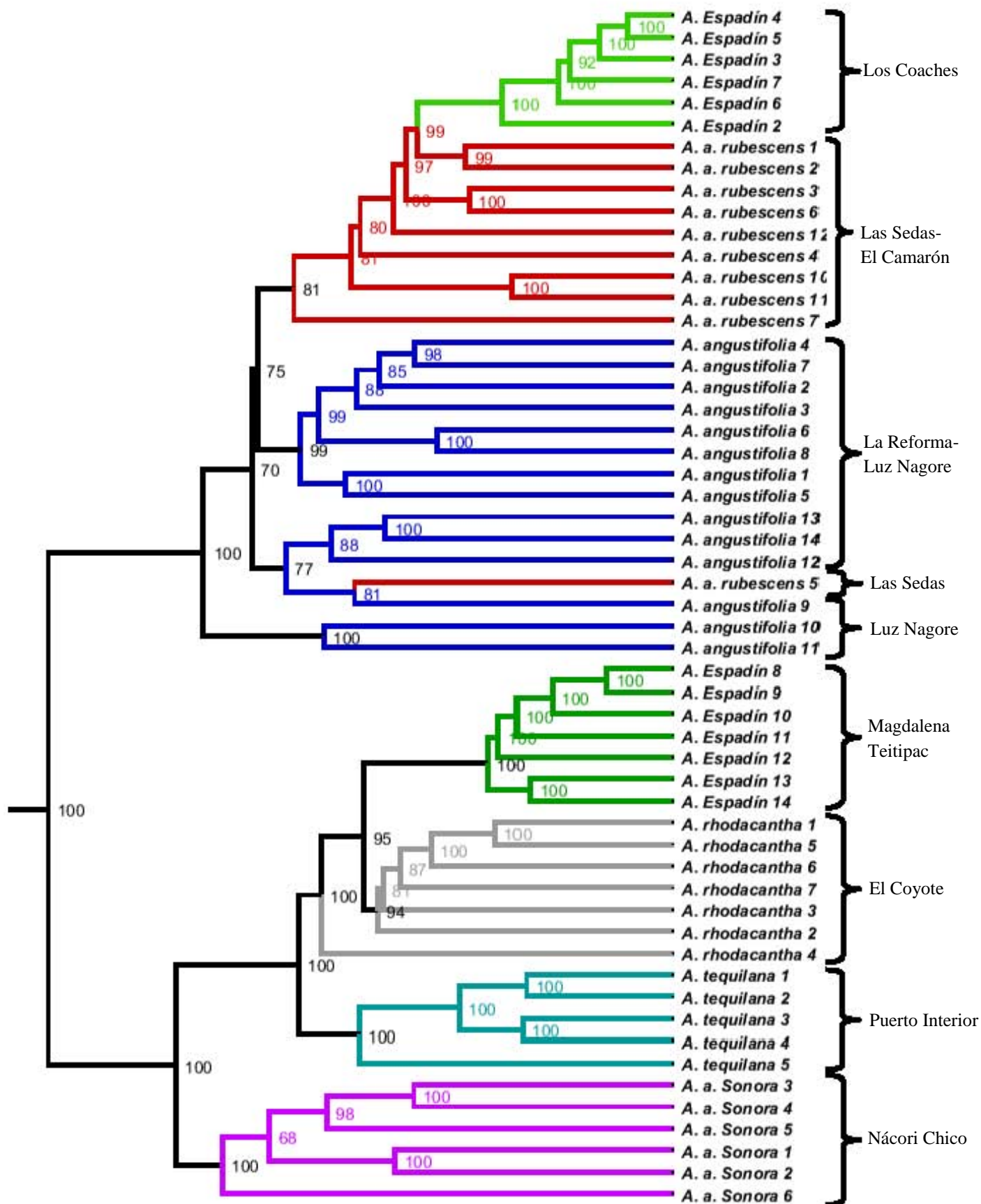


Figura 13. Arbol de distancias genéticas de los individuos analizados. Los números en los nodos indican el valor de soporte de jackknife.

En el árbol se observan dos grupos, uno formado por *Agave tequilana*, *A. rhodacantha*, *A. angustifolia* de Sonora y la población de Magdalena Teitipac de *A. angustifolia* “Espadín”. En el otro gran grupo encontramos a las poblaciones silvestres de *A. angustifolia* var. *angustifolia* y *A. angustifolia* var. *rubescens*, así como la población de Los Coaches, Totolapan de *A. angustifolia* “Espadín”.

En el primer grupo encontramos muy cercanos a la población de Magdalena Teitipac de *Agave angustifolia* “Espadín” y *A. rhodacantha*, mientras que un poco más alejado esta *A. tequilana* y en la parte más externa se ubica *A. angustifolia* del estado de Sonora.

En el segundo grupo se ubican los taxones silvestres, sólo la población de *Agave angustifolia* var. *angustifolia* de la localidad tipo La Reforma se separa y los individuos de la población de Huajuapán se encuentran dispersos. De igual forma, las poblaciones de *A. angustifolia* var. *rubescens* forman un grupo más o menos definido, en éste se inserta la otra población de *A. angustifolia* “Espadín”. Existen ciertos casos extraordinarios donde los individuos de diferentes poblaciones se mezclan, entre ellos: *A. rhodacantha* 4 de la localidad El Coyote, *A. angustifolia* var. *rubescens* 5 de Las Sedas y *A. angustifolia* var. *angustifolia* 10 y 11 de Huajuapán. Para estos individuos ubicados “erróneamente”, sería necesario repetir la designación de los canales de corrida de cada muestra de los AFLP y definir su posición relativa en el árbol.

Comparación morfología-AFLP

Al comparar los grupos obtenidos por distancias morfológicas y genéticas, se encontraron varias correspondencias entre ellos (fig. 14).

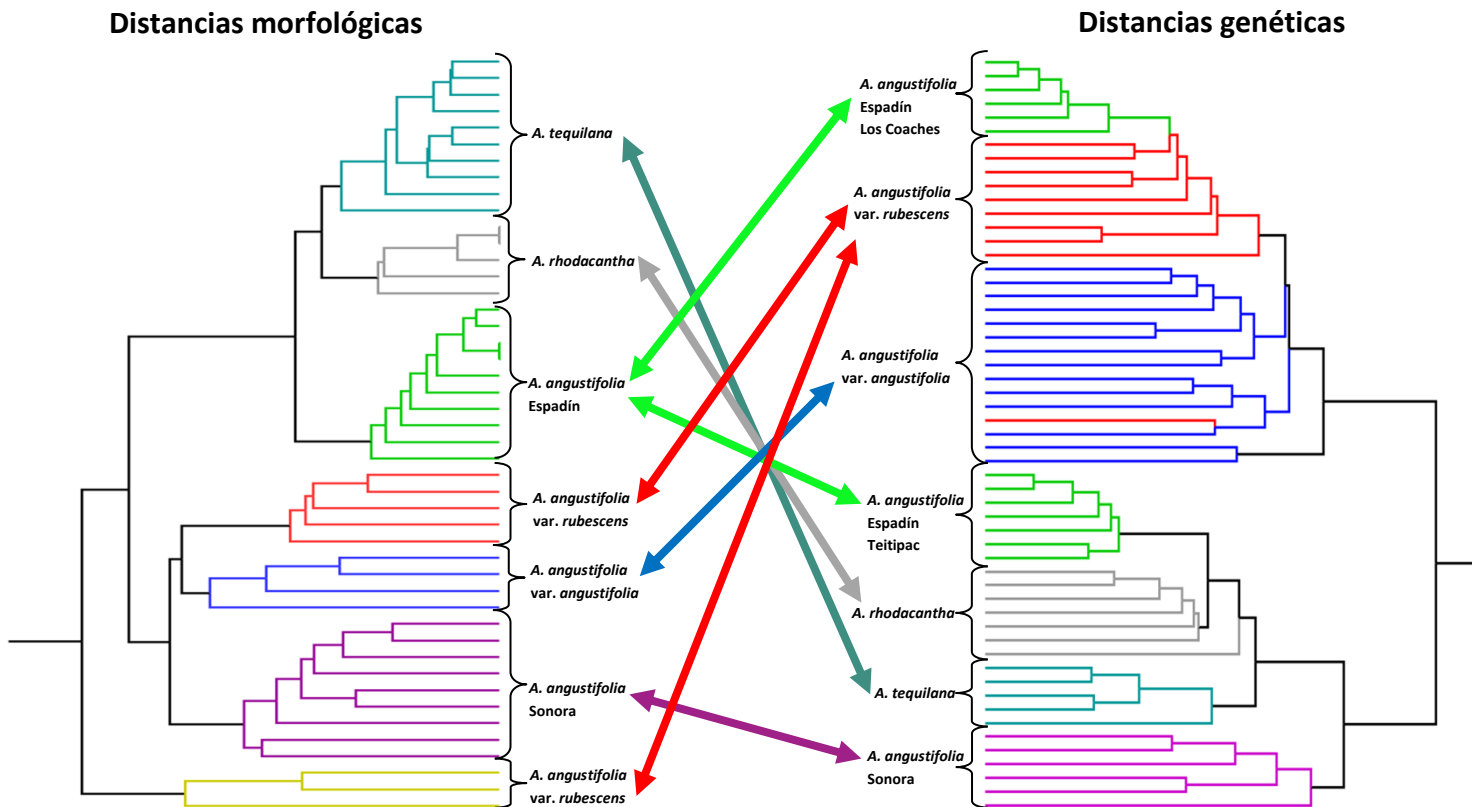


Figura 14. Correspondencia entre los grupos obtenidos en los análisis morfológicos y moleculares.

Las principales diferencias entre el análisis morfológico y en el molecular son la posición de *Agave angustifolia* de Sonora: en el análisis morfológico se agrupa con los otros taxones silvestres y en el molecular se encuentra cercano a los taxones cultivados. Las dos poblaciones de *A. angustifolia* var. *rubescens* en el análisis morfológico presentan ubicaciones muy distintas, la población tipo de Las Sedas (en rojo) se encuentra muy cercana a *A. angustifolia* var. *angustifolia* y la población de El Camarón (en amarillo) se separa tanto de los taxones cultivados como de los silvestres. Cabe resaltar que esta población es la que presenta la variación morfológica más alta en el largo y ancho de la hoja, número y largo de los dientes.

En cambio en el análisis molecular, las dos poblaciones de *A. angustifolia* var. *rubescens* conforman un grupo estable. Esto puede indicar que las diferencias morfológicas encontradas en la población de Las Sedas, sean consecuencia de adaptación a las condiciones ambientales, como precipitación, temperatura, altitud, exposición a la luz solar, etc.

Por último, en el análisis morfológico la población de *Agave angustifolia* Espadín de Los Coaches, no se distingue de la otra población de Espadín proveniente de Magdalena Teitipac. Individuos de ambas poblaciones forman un grupo, mientras que en el análisis AFLPs las poblaciones se encuentran muy distantes. Magdalena Teitipac se ubica en el grupo de los taxones cultivados muy cerca de *A. rhodacantha*, y la población de Los Coaches se encuentra en el grupo formado por los taxones silvestres, muy cercana de *A. angustifolia* var. *rubescens*. Cabe mencionar, que estas dos poblaciones se encuentran geográficamente cercanas y su época de floración es en los meses de junio y julio.

DISCUSIÓN

El análisis de correlación permitió reconocer los caracteres altamente correlacionados y es un ejercicio que tiene que realizarse en todo estudio morfométrico (Lattin *et al.* 2003). En este trabajo, 26 de los 46 caracteres analizados presentaron este comportamiento. Esto servirá para futuros análisis dentro del género o en grupos cercanos con una problemática similar, y así poder ahorrar tiempo y esfuerzo al evitar la medición de caracteres innecesarios.

De los dos análisis multivariados utilizados, PCA y CDA, este último es el que demostró ser más útil para el complejo, ya que permite explicar un porcentaje importante (80%) con sólo dos funciones, mientras que el PCA necesita de ocho componentes para explicar el mismo porcentaje de varianza. Resultados similares han sido reportados en estudios previos llevados a cabo por Colunga-GarcíaMarín *et al.* (1996) y Castro-Castro *et al.* (2010), donde el análisis de PCA requirió de muchos componentes para explicar un porcentaje importante de la varianza.

El análisis de discriminantes canónicas permitió identificar los caracteres que explican mejor la variación morfológica de los taxones y poblaciones analizadas. En este caso, los caracteres vegetativos largo de la hoja, número de dientes, largo de los dientes y largo de la espina, son útiles en la delimitación de los taxones propuestos, mientras que, largo de la antera, largo de la semilla y proporción de semillas maduras, son los caracteres reproductivos que explican la varianza del complejo. En la dispersión y tendencias fenotípicas de las dos primeras funciones canónicas (representan 80% de la varianza), se muestra una clara separación en los taxones propuestos, lo que nos indica que, en función de los caracteres con mayor peso (largo de la hoja, número de dientes, largo de los dientes, largo de la espina, largo de la bráctea estéril, largo de la antera, largo del ovario, largo de la semilla y proporción de semillas maduras), por lo que con la combinación de estos caracteres nos es posible poder identificar morfológicamente los taxones.

En relación al nivel de ploidía de las poblaciones, *a priori* se identificaron algunas características morfológicas y fisiológicas que a su vez han sido reportadas como caracteres propios de plantas poliploides como son: disminución en capacidad reproductiva (menor

número de frutos y semillas maduras), gigantismo y aumento de la capacidad de reproducción asexual (Colunga-GarcíaMarín *et al.* 1996; Levin, 2002). Este nivel de ploidía ha sido indicado anteriormente para poblaciones de *Agave angustifolia* Espadín de Oaxaca (Palomino *et al.*, 2005); sin embargo, en el caso de *A. rhodacantha* lo aquí observado difiere de otros trabajos publicados, donde se reporta que individuos de *A. rhodacantha*, correspondientes a poblaciones del estado de Sonora son diploides (Moreno-Salazar *et al.*, 2007), esto aunado a algunas características morfológicas como presencia de tallo (García-Mendoza y Franco, inédito), nos indican diferencias consistentes entre las poblaciones de *A. rhodacantha* de Oaxaca de las establecidas en el noroeste de la república.

Cabe destacar que *A. rhodacantha* es un taxón poco estudiado. Según Gentry (1982) se distribuye de Sonora a Nayarit, con una población disyunta en Oaxaca (estudiada en este trabajo); Vargas (2007) y Vargas *et al.* (2007) la citan para el estado de Jalisco, donde se utiliza para la producción de mezcal y Gonzalez *et al.* (2009) la registran para el estado de Durango. Los pocos ejemplares colectados anteriormente de este taxón comprendían únicamente material vegetativo, y es hasta este trabajo que se cuenta con ejemplares reproductivos completos. Por estas razones es necesario analizar plantas de toda el área de distribución de *A. rhodacantha*, para corroborar diferencias y similitudes entre las poblaciones y así poder constatar si se trata de un único taxón o de varios.

En el análisis fenético se observa un comportamiento similar al observado en los análisis multivariados, ya que es posible identificar a los taxones fácilmente. Estos se agrupan en relación con su nivel de manejo. Por un lado se agrupan los cultivados como *A. tequilana* y *A. angustifolia* Espadín y *A. rhodacantha*, y por otro los taxones silvestres. El único caso atípico son algunos individuos de *A. angustifolia* var. *rubescens* de la localidad El Camarón (Aar21, 22 y 23); estos presentan diferencias importantes en relación con la otra población de *A. angustifolia* var. *rubescens* muestreadas en la localidad de Huitzo-Las Sedas (Aar1, 2, 3, 4 y 5). Si este análisis lo comparamos con el multivariado, podemos encontrar un comportamiento similar al obtenido con el de componentes principales, ya que estos ejemplares presentaban una gran dispersión; sin embargo, en el de discriminantes canónicas este taxón presenta tendencias fenotípicas constantes entre todos los individuos, esto puede indicar que las diferencias se pueden deber a cuestiones metodológicas.

El tamaño gigante de *Agave angustifolia* Espadín y de *A. rhodacantha* con respecto a los taxones silvestres, probablemente se deba a la poliploidización que presentan, producto de la domesticación a que han sido sometidas sus poblaciones durante largo tiempo tal como sucede en otras poblaciones (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1996). Esta característica ha sido descrita como una consecuencia morfológica en las plantas poliploides, en relación con otras especies o poblaciones diploides (Levin, 2002). Esto coincide con el análisis fenético de ambos tipos de caracteres (morfológicos y moleculares), que muestran que los taxones cultivados (*A. tequilana* y *A. angustifolia* Espadín) se encuentran cercanos a *A. rhodacantha*.

En el análisis molecular se observa un arreglo similar al morfológico, con los taxones silvestres separados de los cultivados, con una excepción, la población de *Agave angustifolia* Espadín de Magdalena Teitipac. Esta población se encuentra ubicada en el grupo de los taxones silvestres, muy cercano a *A. angustifolia* var. *rubescens*. Este comportamiento es inusual, ya que dos poblaciones del mismo taxón se esperan que se encuentren muy cercanas; sin embargo, al efectuar un análisis combinado, individuos de ambas poblaciones forman un sólo grupo consistente, lo que puede deberse a que, a pesar de que ambos análisis tienen altos valores de remuestreo jackknife en las ramas, el análisis morfológico tiene más peso dentro del análisis combinado.

Debido a las diferencias constantes y significativas entre las poblaciones silvestres de *Agave angustifolia* y las cultivadas conocidas como Espadín, es necesario proponerlas como taxones distintos. La categoría taxonómica en la cual deban ubicarse requiere de un análisis nomenclatural y antropológico más profundo. Existen dos hipótesis contrastantes para explicar el origen del maguey Espadín en los valles centrales de Oaxaca. Por un lado, las evidencias genéticas y morfológicas, así como la información obtenida en campo con distintos agricultores de los distritos de Ejutla, Miahuatlán y Tlacolula. Los productores identifican la introducción del espadín para la producción de mezcal a partir de mediados del siglo XX, e indican una probable relación con *Agave tequilana*. Los niveles de ploidía encontrados en las poblaciones de espadín (triploide), son un indicio de la relación de las poblaciones de espadín del estado de Oaxaca, particularmente con algunas variedades de *A. tequilana*, en específico con la variedad bermejo, ya que esta presenta el mismo nivel de ploidía (Palomino, 2003). Esta posible relación del espadín con *A. tequilana* fue también sugerida por Gentry (1982).

Por otro lado, existen registros históricos y antropológicos que proponen el origen del espadín en el distrito de Tlacolula, en la región de los Valles Centrales de Oaxaca (Benítez, 1980; Urrutia, 1986). Estas fuentes indican que las poblaciones de Espadín fueron modificadas a partir de poblaciones naturales de *Agave angustifolia* para la explotación intensiva generada por el auge de la industria mezcalera en la década de los 40's. Si nos basamos en esta hipótesis, podríamos atribuir las características morfológicas distintivas del espadín, como el gran tamaño de la planta, la poliploidía y el bajo porcentaje de semillas maduras, a los fenómenos de domesticación (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1996; Levin, 2002). Sin embargo, es muy poco tiempo para que la selección artificial haya modificado las poblaciones analizadas. Por lo tanto, siguiendo las evidencias aquí mostradas encontramos necesario proponer a las poblaciones de *Agave angustifolia* Espadín como un taxón nuevo, tomando en cuenta la gran cercanía con *A. tequilana*.

Del mismo modo, las poblaciones de *Agave angustifolia* del estado de Sonora, son consistentemente diferentes de las de Oaxaca, tanto molecular como morfológicamente, por lo tanto, es necesario considerarlas como un taxón distinto. Estas poblaciones fueron tratadas por Trelease (1920) como una especie distinta de *A. angustifolia*, nombrándola *A. pacífica*. Sin embargo, Gentry (1982) a falta de evidencias consistentes, la consideró como un sinónimo de *A. angustifolia*. Con las pruebas aquí presentadas, es posible reconsiderar el nombre *A. pacífica* para estas poblaciones del noroeste de México. Esta propuesta ha sido apoyada por García-Mendoza en la revisión de los agaves de Sonora (García Mendoza y Franco, inédito).

Por otro lado, es necesario estudiar *Agave angustifolia* y *A. rhodacantha* en toda su área de distribución, y así poder identificar de manera clara su relación con los cultivares cercanamente relacionados, como son *A. tequilana*, *A. fourcroydes* y el Espadín. Se requiere aclarar la taxonomía de este complejo y así sentar bases sólidas para la generación de reglamentos que permitan la explotación sustentable de estos recursos naturales.

CONCLUSIONES

- Los análisis morfológicos y moleculares realizados fueron capaces de encontrar diferencias constantes entre los taxones estudiados.
- Los caracteres largo de los dientes, proporción de semillas maduras, número de dientes, largo de la hoja, largo de la antera, largo de la espina, largo de la semilla, largo del tépalo externo, largo del pedicelo y largo de la inflorescencia en conjunto son los más importantes en la delimitación morfológica de los taxones.
- Es necesario hacer un análisis más comprensivo de *Agave rhodacantha* en toda su área de distribución para poder aseverar que las evidencias encontradas son suficientes para proponer la población de Oaxaca como una novedad taxonómica.
- Las poblaciones de *Agave angustifolia* Espadín muestran diferencias morfológicas y moleculares consistentes, por lo que se justifica su separación taxonómica de las poblaciones silvestres de *A. angustifolia*.

LITERATURA CITADA

- Alfaro-Sánchez, G. 2004. Suelos. En: A. J. García-Mendoza, M. J. Ordoñez y M. Briones-Salas (Eds.). *Biodiversidad de Oaxaca*, pp. 55-66, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fund, México, D.F.
- APG I. Angiosperm Phylogeny Group. 1998. An ordinal classification for the families of flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **85**: 531-553.
- APG II. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* **141**: 399-436.
- APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* **161**: 105-121.
- Barraza-Morales, A., Esqueda, M., Gardea, A., Robert, M., y Sánchez Teyer, F. L. 2006. Variabilidad genética en *Agave angustifolia* Haw., de la Sierra Sonorense, México, determinada con marcadores AFLP. *Revista Fitotecnia Mexicana* **29**: 1-8.
- Banerjee, S. y Sharma, A. K. 1987. Cytophotometric estimation of nuclear DNA in different species and varieties of *Agave*. *Cytologia* **52**(1): 85-90.
- Benítez, Z. R. 1980. Sociedad y política en Oaxaca, 15 estudios de caso. Instituto De Investigaciones Sociológicas-Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, Oaxaca, Oaxaca.
- Berger, A. 1915. Die Agaven. Beiträge zu einer Monographie. G. Fischer, Jena.
- Castro-Castro A., Rodríguez, A., Vargas-Amado, G. y Ramírez-Delgadillo, R. 2010. Variación morfológica del género *Prochnyanthes* (Agavaceae). *Acta Botanica Mexicana* **92**: 29-49.

- Castorena-Sánchez, I., Escobedo, R. M., y Quiroz, A. 1991. New cytotaxonomical determinants recognized in six taxa of *Agave* in the sections *Rigidae* and *Sisalanae*. *Canadian Journal of Botany* **69**: 1257-1264.
- Centeno-García, E. 2004. Configuración geológica del estado. En: A. J. García-Mendoza, M. J. Ordoñez y M. Briones-Salas (Eds.). *Biodiversidad de Oaxaca*, pp. 29-42, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fund, México, D.F.
- Chiapella, J. O., DeBoer, V. L., Amico, G. C., y Kuhl, J. C. 2011. A morphological and molecular study in the *Deschampsia cespitosa* complex (Poaceae; Poeae; Airinae) in northern North America. *American Journal of Botany* **98**: 1366-1380.
- Colunga-GarcíaMarín, P., Estrada-Loera E., y May-Pat F., 1996. Patterns of morphological variation, diversity and domestication of wild and cultivated populations of *Agave* in Yucatan, Mexico. *American Journal of Botany* **83**: 1069-1082.
- Colunga-GarcíaMarín, P., y May-Pat, F. 1997. Morphological variation of henequen (*Agave fourcroydes*, Agavaceae) germplasm and its wild ancestor (*A. angustifolia*) under uniform growth conditions: diversity and domestication. *American Journal of Botany* **84**: 1449-1449.
- Cristofolini, G., y Crema, S. 2005. A morphometric study of the *Quercus crenata* species complex (Fagaceae). *Botanica Helvetica* **115**: 155-167.
- Cron, G. V., Balkwill, K., & Knox, E. B. 2007. Multivariate analysis of morphological variation in *Cineraria deltoidea* (Asteraceae, Senecioneae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **154**: 497-521.
- Dahlgren, R. M., Clifford, H. T., y Yeo, P. F. 1985. The families of the monocotyledons. Structure, evolution, and taxonomy. Springer, Berlin.
- Dolezel, J., Greilhuber, J., Lucretti, S., Meister, A., Lysák, M. A., Nardi, L., y Obermayer, R. 1998. Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Annals of Botany*, **82**: 17-26.

- DuMortier, B. C. 1829. Analyse des familles des plantes: avec l'indication des principaux genres qui s'y rattachent. Casterman, Tournay.
- García-Mendoza, A. J. 2004. Agaváceas. En: A. J. García-Mendoza, M. J. Ordoñez y M. Briones-Salas. (Eds.). *Biodiversidad de Oaxaca*. Pp. 159-170, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México-Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fund, México, D. F.
- García-Mendoza, A. J. 2007. Los agaves de México. *Ciencias* **87**: 14–23.
- García-Mendoza, A. J. 2011. Agavaceae. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, D.F.
- García-Mendoza, A. J. y Chiang F. 2003. The confusion of *Agave vivipara* L. and *A. angustifolia* Haw., two distinct taxa. *Brittonia* **55**: 82-87.
- García-Mendoza, A. J., y Meave, J. A. 2011. Diversidad florística de Oaxaca: de musgos a angiospermas (colecciones y lista de especies). Universidad Nacional Autónoma de México y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México D. F.
- García-Mendoza, A. J. y Franco S. 2012. El complejo *Agave angustifolia*: avances en su delimitación taxonómica. Inédito.
- Gentry, H. S. 1982. Agaves of Continental North America. University of Arizona Press, Tucson.
- Gil-Vega, K., Díaz, C., Nava-Cedillo, A., y Simpson, J. 2006. AFLP analysis of *Agave tequilana* varieties. *Plant Science* **170**: 904-909.
- Gil-Vega, K., Díaz-Quezada, C. E., Nava-Calvillo, A., García-Mendoza, A., y Simpson, J. 2007. Análisis AFLP del género *Agave* refleja la clasificación taxonómica basada en caracteres morfológicos y otros métodos moleculares. En: P. Colunga-GarcíaMarín, A. Saavedra, L. Eguiarte y D. Zizumbo-Villarreal. (Eds.). En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros *Agaves*. Pp. 23-39. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., Mérida, Yucatán.

- González-Elizondo, M., R. G. Villanueva, I. L. Enriquez, L. R. Rojas y M. Gonzalez-Elizondo. 2009. Agaves -magueyes, lechuguillas y noas- del Estado de Durango y sus alrededores. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Durango del Instituto Politécnico Nacional-Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Durango.
- García, E. 1981. Modificación al Sistema de Clasificación Climática de Köppen, para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México
- Hooker, J. D. 1871. *Agave ixtlioides*. *Curtis Botanical Magazine* **97**: I 5893.
- Hutchinson J. 1934. The families of flowering plants. Vol. II. Monocotyledons. Macmillan, Londres.
- Jacobi, G. N. von. 1864-1867. *Versuch zu einer systematischen Ordnung der Agaveen*. Vol. 20-21. Hamburger Garten & Blumen-Zeitung, Hamburg.
- Keb-Llanes, M., González, G., Chi-Manzanero, B. e Infante, D. 2002. A rapid and simple method for small-scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants. *Plant Molecular Biology Reporter* **20**: 299-300.
- Kim, J. H., Kim D. J., Forest F. y Chase M. W. 2010. Molecular phylogenetics of Rusceae *sensu lato* and related families (Asparagales) based on plastid and nuclear DNA sequences. *Annals of Botany* **106**: 775-779
- Köppen, W. 1948. Climatologia. Fondo Cultura Economica, Ciudad de México.
- Lattin, J., Carrol J. D. y Green P. 2003. Analyzing multivariate data. Thomson Learning, Toronto.
- Levin, D. A. 2002. The role of chromosomal change in plant evolution. Oxford University Press, New York.
- Linnaeus, C. 1753. *Species plantarum. Impensis Laurentii Salvii*, Estocolmo.

- Moreno-Salazar, S. F., Esqueda, M., Martínez, J. y Palomino, G. 2007. Tamaño del genoma y cariotipo de *Agave angustifolia* y *A. rhodacantha* de Sonora, México. *Revista Fitotecnica Mexicana* **30**: 13-27.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**:583–590.
- Ortiz P., M. A., Hernández, J. R. y Figueroa J. M. 2004. Reconocimiento fisiográfico y geomorfológico. En: A. J. García-Mendoza, M. J. Ordoñez y M. Briones-Salas. (Eds.). *Biodiversidad de Oaxaca*. Pp. 43-54. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fund, México, D. F.
- Palomino, G., Dolezel, J., Méndez, I. y Rubluo, A. 2003. Nuclear genome size analysis of *Agave tequilana* Weber. *Caryologia* **56**: 37-46.
- Palomino, G., Martínez, J. y Méndez, I. 2005. Citotipos en *Agave angustifolia* Haw. Determinados por citometría de flujo y análisis de sus cariotipos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* **21**: 49-54.
- Pavlíček, A., Hrdá, S. y Flegr, J. 1999. FreeTree – a freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and for bootstrap/Jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biologica* **45**: 97–99.
- Rentería, M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. En: L. E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre, (Compiladores). *Ecología molecular*. Pp. 541-566. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, D. F.
- Rohlf, F. J. 2008. NTSYSpc numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.20q. Exeter Software, New York.
- Salm-Dyck, J. 1834. Hortus dyckensis oder Verzeichniss der in dem Botanischen Garten zu Dyck wachsenden Pflanzen. Düsseldorf.

- Salisbury, R. A. 1866. *Genera plantarum*. John van Voorst, London.
- Simpson, J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms (AFLP). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **60**: 119-122.
- Strandby, U., Christensen, K. I., y Sørensen, M. 2009. A morphometric study of the *Abies religiosa-hickelii-guatemalensis* complex (Pinaceae) in Guatemala and Mexico. *Plant Systematics and Evolution* **280**: 59-76.
- Thiele, K. 1993. The Holy Grail of the perfect character: The cladistic treatment of morphometric data. *Cladistics* **9**: 275–304.
- Trejo, I. 2004. Clima. En: A. J. García-Mendoza, M. J. Ordoñez y M. Briones-Salas. (Eds.). *Biodiversidad de Oaxaca*. Pp. 67-86. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fund, México, D. F.
- Trelease 1907. *Agave macroacantha* and allied Euagaves. *Annual Report Missouri Botanical Garden* **18**: 231-256.
- Trelease, W. 1908. *Agave rigida-Furcraea rigida-Agave angustifolia*. *Annual Report Missouri Botanical Garden* **19**: 273–287.
- Trelease, W. 1910. Species in *Agave*. *Proceedings of the American Philosophical Society* **49**: 232-237.
- Trelease, W. 1913. *Agave* in the West Indies. *Memoirs of the National Academy of Sciences* Vol.: **11**. US Government Printing Office.
- Trelease, W. 1915. The Agaveae of Guatemala. *Transactions of the Academy of Science of St. Louis* **23**: 129-150.
- Trelease, W. 1920. *Agave*. En: P. C. Standley (Ed.). Trees and shrubs of Mexico. *Contributions from the United States National Herbarium* **23**: 107-142.
- Urbaniak, J. 2010. Analysis of morphological characters of *Chara baltica*, *C. hispida*, *C. horrida*, and *C. rudis* from Europe. *Plant Systematics and Evolution* **286**: 209–221.

- Urrutia Cruz, S. P. 1986. Etnobotánica de los Agaves en los Valles Centrales de Oaxaca. Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.
- 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. Mérida.
- Vargas-Ponce, O., Zizumbo-Villarreal, D. y Colunga GarciaMarin, P. 2007. *In situ* diversity and maintenance of traditional *Agave* landraces used in spirits production in West-Central Mexico. *Economic Botany* **61**: 362-375.
- Vekemans X., T. Beauwens, M. Lemaire e I. Roldan-Ruiz. 2002. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology*. **11**:139-151.
- Ventenat, E. P. 1793. *Furcraea*. *Bulletin des Science, par la Société Philomatique* **1**: 65-67.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Pelemam, J., Kuiper, M. y Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**: 4407-4414.
- Zuccarini, J. G. 1833. Gattungen *Agave* und *Fourcroya*. *Nova Acta Physico-Medica Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Naturae Curiosorum* **16**: 661-678.