



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA
SISTEMÁTICA

Variación morfológica y genética de *Agave karwinskii* (Agavaceae) en los estados de Oaxaca y Puebla

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Nancy Vázquez Pérez

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

Dr. Abisaí Josué García Mendoza
Instituto de Biología, U. N. A. M.

COMITÉ TUTOR:

Dr. Eloy Solano Camacho
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, U. N. A. M.

Dr. Salvador Arias Montes
Instituto de Biología, U. N. A. M.

TUTORA INVITADA:

Dra. June Kilpatrick Simpson Williamson
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I. P. N. Unidad Irapuato

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

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 de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 27 de octubre de 2014, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS de la alumna VÁZQUEZ PÉREZ NANCY con número de cuenta 513014662 con la tesis titulada "Variación morfológica y genética de *Agave Karwinskii* (Agavaceae) en los estados de Oaxaca y Puebla", realizada bajo la dirección del DR. ABISAÍ JOSUÉ GARCÍA MENDOZA:

Presidente:	DR. RAFAEL LIRA SAADE
Vocal:	DRA. HEIKE DORA MARIE VIBRANS LINDEMANN
Secretario:	DR. ÁNGEL SALVADOR ARIAS MONTES
Suplente:	DRA. BEATRIZ RENDÓN AGUILAR
Suplente:	DR. ELOY SOLANO CAMACHO

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



ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 28 de septiembre de 2015.

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 darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y la formación académica otorgada.

Con distinción agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca recibida con número de becario- CVU: 480815.

A mi director de tesis, Dr. Abisaí Josué García Mendoza gracias por darme la oportunidad de ser su alumna y de su apoyo académico para este proyecto sin igual.

A los miembros de mi comité tutor: al Dr. Eloy Solano por su postura siempre rigurosa, pero muy formidable con el manuscrito. Al Dr. Salvador Arias por darme su confianza y acrecentar sus buenas observaciones durante el desarrollo de este proyecto y a mi desarrollo profesional. A la Dra. June Simpson por recibirme en su laboratorio de genética del desarrollo y mostrar siempre mucha gentileza y cumplimiento a la parte genética de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

En CINVESTAV, Irapuato a Katia Gil, Emmy y demás compañeros de ese momento por ayudarme en las actividades de laboratorio, los conocimientos compartidos, seminarios, salidas de campo y mucho más eventos que hicieron muy amena mi estancia.

A los integrantes de mi jurado de examen; Dr. Rafael Lira Saade, Dra. Heike Dora Marie Vibrans Lindemann, Dr. Ángel Salvador Arias Montes, Dra. Beatriz Rendón Aguilar y Dr. Eloy Solano Camacho por aportar sus comentarios y sugerencias que enriquecieron y formalizaron este trabajo escrito.

Mi más profundo y sincero agradecimiento a los pueblos de Oaxaca durante los años 2012-2014 por auxiliar con gran apoyo e interés mi trabajo en campo. A las autoridades municipales de Santa Catarina Minas, Ocotlán, en especial a Eduardo Ángeles Carreño y a su esposa Aída e hijos, por su valiosa ayuda y hospitalidad que nunca olvidaré. En San Pedro Totolapan, Tlacolula, a los Sres. Mario Pantoja, Misael Ramírez y Nicandro Ruiz por su amable y atento recibimiento. En San Agustín Amatengo, Ejutla, a los Sres. Genaro y Jesús Sierra por su cordial apoyo. En el municipio de San Luis Amatlán, Miahuatlán, a mi abuelo Miguel Pérez por su paciencia y sus conocimientos brindados acerca del maguey.

A mis amigos que con mucha atención y sin menospreciar su tiempo me ofrecieron elementos profesionales que tuvieron una profunda ayuda en el desarrollo de este proyecto: Dr. José Blancas, Biól. Alejandra Cavazos y Biól. Canek Rivera del Instituto de Biología, UNAM. En la UAM Unidad Iztapalapa: Maestra Irma Reyes, Dr. Francisco Varona, Maestro Marco Aurelio, a Jorge Santana del herbario UAMIZ y a usted Maestro Gilberto Hernández, por darnos al término de nuestra licenciatura un acercamiento a Santa Catarina Minas, Ocotlán, Oaxaca, lo que dio inicio a este proyecto.

Con gran estima, a todos aquellos que generosamente tomaron de su tiempo para apoyarme en todas las tareas de este trabajo hasta lo último, mi familia.

A ti mi amigo[†] entrañable, aunque ya no estés, toda mi vida estaré agradecida por darme tu valiosa compañía y ayuda durante las actividades más significativas de mi proyecto.

Más aún, a mí por tener siempre la fuerza responsable y la necesidad de hacer este trabajo.

DEDICATORIA

A los pueblos y maestros mezcaleros de los Valles Centrales y de la Sierra Sur de Oaxaca; tan sólo por tener la grandeza y el arte de hacer mezcal. Que esta obra sea una tilde de comienzo en su reconocimiento, originalidad y esfuerzo.

Mil cosas avanzan. Novecientas noventa y nueve retroceden.
Esto es el progreso.

Henry F. Amiel

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	6
ANTECEDENTES	7
MÉTODOS	15
ZONA DE ESTUDIO	16
TRABAJO DE CAMPO	18
ANÁLISIS MORFOMÉTRICO	19
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	21
ANÁLISIS GENÉTICO AFLP	23
ANÁLISIS DEL NIVEL DE PLOIDÍA POR CITOMETRÍA DE FLUJO	26
RESULTADOS	27
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIÓN	59
LITERATURA CITADA	60
Anexo 1. Lista de caracteres evaluados para el análisis morfométrico en <i>Agave karwinskii</i>	69
Anexo 2. Diagramas de caja de los 51 caracteres evaluados	73

FIGURAS

		Pagina
1.	Distribución geográfica de <i>Agave karwinskii</i> en Oaxaca y Puebla a partir de datos de ejemplares de herbario	15
2.	Ubicación geográfica de las zonas de estudio	16
3.	Poblaciones de <i>Agave karwinskii</i>	29
4.	Poblaciones de <i>Agave karwinskii</i>	30
5.	Poblaciones de <i>Agave karwinskii</i>	31
6.	Poblaciones de <i>Agave karwinskii</i>	32
7.	Fenograma de distancias morfológicas de once poblaciones de <i>Agave karwinskii</i>	35
8.	Patrón de agrupamiento de las once poblaciones con base en las variables de los componentes principales 1 y 2	39
9.	Agrupamiento de los individuos de cada población a partir de los caracteres de las funciones discriminantes 1 y 2 con mayor peso	44
10.	Extracción y calidad de ADN de las 99 muestras de <i>Agave karwinskii</i> en gel de agarosa	47
11.	Amplificación selectiva de la longitud de las bandas polimórficas de las once poblaciones de <i>Agave karwinskii</i>	48
12.	Fenograma de distancias genéticas con marcadores AFLP's en once poblaciones de <i>Agave karwinskii</i>	50
13.	Niveles de ploidía en las distintas poblaciones de <i>Agave karwinskii</i>	53
14.	Niveles de ploidía en las distintas poblaciones de <i>Agave karwinskii</i>	54

CUADROS

		Pagina
1.	Ubicación geográfica y descripción ambiental de las zonas de estudio	17 y 18
2.	Selección de poblaciones a partir de nombres comunes y ejemplares colectados	19 y 20
3.	Variabes altamente correlacionadas	33
4.	Porcentaje de la variación acumulada en los componentes principales 1 y 2	36
5.	Caracteres con máxima variación de los componentes 1 y 2	37
6.	Promedios de las medidas de los caracteres con mayor peso de los componentes principales 1 y 2	40
7.	Porcentaje de la variación acumulada en las funciones discriminantes 1 y 2	41
8.	Variabes de las funciones discriminantes 1 y 2 con mayor porcentaje de variación	42
9.	Valores de lambda de Wilks de cada población analizada	45
10.	Agrupamiento significativo de los individuos en sus respectivas poblaciones	45
11.	Promedios de los caracteres con mayor peso de las funciones discriminantes 1 y 2	46
12.	Índices de similitud genética y porcentaje polimórfico en las once poblaciones de <i>Agave karwinskii</i>	51

RESUMEN

Se analizó la variación morfológica y genética mediante AFLP's y el nivel de ploidía por citometría de flujo en once poblaciones de *Agave karwinskii* de diferentes localidades: una población silvestre del estado de Puebla y diez poblaciones correspondientes a los Valles Centrales y Sierra Sur de Oaxaca en condiciones silvestres, con manejo incipiente y con mayor uso y manejo en la producción de mezcal. El objetivo fue identificar posibles entidades infraespecíficas para la especie. Se evaluaron 51 caracteres morfológicos en una muestra de siete individuos por cada población. Se obtuvo un fenograma de distancias morfológicas a partir del método UPGMA, que mostró un patrón de agrupamiento con dos diferentes subconjuntos poblacionales. El primer subconjunto fue formado por poblaciones silvestres: cachitún del estado de Puebla, cuishe, sierrudo, cirial y espina negra de los Valles Centrales de Oaxaca; el segundo formado por las poblaciones con manejo incipiente y con mayor uso en la producción del mezcal: tobasiche, marteño, tripón y San Martín de los Valles Centrales y bicuishe y madrequishe de la Sierra Sur. El análisis de componentes principales demostró una agrupación similar con la conformación de poblaciones discretas diferenciables. La prueba canónica de funciones discriminantes concluyó que, los caracteres vegetativos altura y diámetro de la roseta, ancho en la parte media de la hoja, color de la hoja, ancho y distancia entre dientes, color y tamaño de los dientes, forma y tamaño de la inflorescencia son útiles para separar a tres poblaciones del estado de Oaxaca; madrequishe, San Martín y tripón entre sí, y del resto de las poblaciones silvestres e incipientes. Las distancias genéticas evaluadas mediante el índice de similitud de Nei y Li/Dice (1979) y el método UPGMA, así como, los diferentes niveles de ploidía presentes, confirmaron los grupos morfológicos discretos formados, excepto para las poblaciones silvestres e incipientes de los Valles Centrales de Oaxaca que resultan morfológica y genéticamente variables en el porcentaje polimórfico y niveles de ploidía que no permiten separarlas como entidades reconocibles. Se concluye que, *Agave karwinskii* es una sola especie con tres poblaciones morfológica y genéticamente diferenciables para el estado de Oaxaca, con la posibilidad de reconocerlas en categorías infraespecíficas; madrequishe de Miahuatlán de la Sierra Sur como una probable subespecie y San Martín de Ejutla y tripón de Ocotlán de los Valles Centrales como posibles cultivares.

ABSTRACT

Morphological and genetic variation by AFLP's and ploidy level by flow cytometry were analyzed in eleven populations of *Agave karwinskii* from different localities: a wild population of the state of Puebla and ten populations corresponding of the Central Valleys and Southern Región of Oaxaca, in a wild state, with incipient management and with greater use and management in the production of mezcal. The aim was to identify possible infraspecific entities of the species. Fifty-one morphological characters were evaluated in a sample of seven individuals per population. A phenogram of morphological distances was obtained with the UPGMA method, which showed clusters of two different population subsets: the first consisted of wild populations: cachitún from the state of Puebla, cuishe, sierrudo, cirial and black spine of the Central Valleys of Oaxaca, the second of incipient forms and with greater use in the production of mezcal: tobasiche, marteño, tripon and San Martin of the Central Valleys and bicuishe and madrequishe of Southern Región of Oaxaca. The principal component analysis resulted in a similar grouping with the formation of discrete differentiable populations. The analysis of canonical discriminant functions showed that the vegetative characteristics height and diameter of the rosette, width at the middle the of leaf and leaf color, width and distance between teeth, color and tooth size, shape and inflorescence size are useful to separate three populations of Oaxaca; madrequishe, San Martin and tripón between themselves as well as the rest of wild and incipient management populations. The genetic distances evaluated by the similarity index of Nei y Li/Dice (1979) and UPGMA method, as well as the different levels of ploidy present, confirmed that discrete morphological groups formed, except in the wild and incipient populations of the Central Valleys of Oaxaca resulting morphologically and genetically variable in the percentage of polymorphisms and ploidy levels, that do not allow separate as recognizable entities. It is concluded that *Agave karwinskii* is a single species with three morphologically and genetically differentiated populations for the state of Oaxaca, with the possibility of recognizing in infraspecific categories; madrequishe of Miahuatlán the South Sierra as a probable subspecies and San Martin of Ejutla and tripón of Ocotlán the Central Valley as potential cultivars.

INTRODUCCIÓN

El género *Agave* pertenece a la familia Agavaceae del orden Asparagales. La familia posee ocho géneros divididas en dos subfamilias: *Agave*, *Beschorneria*, *Furcraea*, *Manfreda*, *Polianthes* y *Prochnyanthes* incluidos en Agavoideae, y *Hesperaloe* y *Yucca* en Yuccoideae (Dahlgren *et al.*, 1985).

Existe cierta controversia acerca de esta clasificación. APG III, (2009) reconoce a Agavaceae como una subfamilia denominada Agavoideae, y la ubica en la familia Asparagaceae con base a estudios moleculares. Sin embargo, Kim *et al.*, (2010) demostraron que la familia Asparagaceae *sensu lato* es parafilética. Ante las incongruencias que aún existen, en este trabajo se prefirió seguir la propuesta de Dahlgren *et al.*, (1985) y tratar el género *Agave* como parte de la familia Agavaceae.

Esta familia es endémica de América y contiene 330 especies. Se distribuye desde los límites de Canadá con los Estados Unidos hasta Bolivia, incluyendo las islas del Caribe. México y el suroeste de los Estados Unidos se consideran el centro de origen de las agaváceas. Su origen y diversidad están relacionados con el surgimiento de las zonas áridas de Norteamérica y la evolución de su flora desde mediados del Mioceno hasta el presente (Eguiarte y Souza, 2007). En México se encuentran 251 especies, de las cuales 177 son endémicas (García-Mendoza, 2004). Oaxaca es la entidad con mayor diversidad de taxones con 58 especies, que representa el 25% del total registrado para el país (García-Mendoza, 2004; García-Mendoza y Meave, 2011).

El género *Agave* es el más diverso y con más amplia distribución en la familia, crece desde el sur de los Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela, incluyendo las islas del Caribe (García-Mendoza, 2002). De sus 200 especies en América, 150 se distribuyen en México, y aproximadamente 103 son endémicas. Oaxaca, con 38 especies, nuevamente es el estado con mayor diversidad. Le siguen Puebla, Sonora, Querétaro y Durango con 31, 30, 26 y 24 especies respectivamente (García-Mendoza, 2004).

Las especies de *Agave* se caracterizan por tener raíces fibrosas; tallo por lo general corto, subterráneo, en ocasiones aéreo; hojas suculentas, dispuestas en espiral, margen dentado y ápice con una espina córnea, la epidermis tiene una cutícula gruesa con los estomas hundidos. Las inflorescencias son racemosas, de apariencia espiciforme o paniculada; las flores son bisexuales, epíginas, de color verdoso, amarillento o purpúreas,

con perigonio tubular; estambres 6, libres o insertos en el tubo, exertos; estilo filiforme y estigma trilobado. Los frutos son cápsulas leñosas con dehiscencia loculicida, semillas; negras, lunulares, aplanadas y angostamente aladas en su porción convexa. La mayoría de las especies son monocárpicas, es decir, florecen una sola vez en su vida y mueren después de fructificar. Su ciclo de vida varía entre 10 y 25 años en plantas de gran tamaño, y de tres a cinco años en plantas pequeñas. (Granados-Sánchez, 1993). Presentan un elevado número cromosómico de tipo asimétrico, $2n= 60$, con cinco pares de cromosomas grandes y 25 pequeños; alta frecuencia de poliploidía e hibridación interespecifica. Lo anterior ha jugado un papel importante en la evolución del género, teniendo como consecuencia una alta variación morfológica (Pinkava *et al.*, 1985; Castorena-Sánchez *et al.*, 1991; Rocha *et al.*, 2005; Eguiarte y Souza, 2007; Palomino *et al.*, 2007). Los agaves se propagan de manera sexual mediante polinización cruzada, y de manera asexual mediante hijuelos originados en el tallo, o bulbilos que se desarrollan en las ramas florales. Gentry, (1982) dividió el género *Agave* en dos subgéneros: *Agave* y *Littaea* con base en la forma de sus inflorescencias, las de aspecto espiciforme pertenecen a *Littaea*, y las de apariencia paniculada a *Agave*. Poseen metabolismo ácido crasuláceo (CAM), que les permite supervivir en los ecosistemas áridos y semiáridos de América. En tales ecosistemas son especies clave, debido a la gran cantidad de recursos que proporcionan a otros organismos a través de sus hojas, flores, polen, néctar y frutos (Eguiarte *et al.*, 2000).

Las agaváceas y en especial las especies del género *Agave* forman uno de los grupos de plantas más importantes desde el punto de vista cultural y económico. En las diversas culturas de Mesoamérica y antes de la conquista, se utilizaron para satisfacer una serie de necesidades básicas como; alimento, fibras, forraje, medicamento, construcción, elaboración de bebidas fermentadas y en rituales. Existen registros de su uso como fuente de alimento y fibra en las cuevas de Guilá Naquitz, Oaxaca, desde hace por lo menos 10, 000 años (Flannery, 1986). Los españoles lo consideraron el árbol de las maravillas, por los múltiples beneficios que ofrecía (Gentry, 1982; Cruz-Ramírez, 2000). Hoy en día, aún son importantes, pues cubren las necesidades básicas de diversos grupos humanos de nuestro país (García-Mendoza, 2004; Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 2007). La extracción de bebidas fermentadas como el aguamiel, fructanos e inulina (Mora-López *et al.*, 2011), y las bebidas destiladas como el tequila y el mezcal son actualmente una actividad agroindustrial

económicamente muy importante (García-Mendoza, 2004; Colunga-GarcíaMarín y Zizumbo-Villarreal, 2007; Vargas-Ponce *et al.*, 2007).

El mezcal se produce a partir de 28 especies de *Agave* usadas y manejadas en más de 20 estados (García-Mendoza, 2010). Oaxaca es el principal estado productor de mezcal con el 75% de la producción total nacional. El área productora comprende una extensa zona del territorio oaxaqueño denominada “Región del Mezcal”, que incluye siete distritos: Ejutla, Miahuatlán, Ocotlán, Sola de Vega, Tlacolula, Yautepec y Zimatlán. Pertenecen a la región de los Valles Centrales, excepto Miahuatlán que corresponde a la región Sierra Sur (Espinosa-Paz *et al.*, 2002; Bautista *et al.*, 2008).

La producción de mezcal se considera la base y el sustento de la vida socioeconómica, política y cultural de muchos pobladores oaxaqueños (Cruz-Ramírez, 2000). En el estado se han inventariado ocho especies y 17 formas silvestres de agaves mezcaleros (Espinosa-Paz *et al.*, 2002). La especie más usada para producir mezcal, es cultivada y se conoce como espadín (*Agave angustifolia* Haw.). En menor grado son aprovechadas varias especies silvestres con diferentes grados de domesticación: cirial (*A. karwinskii* Zucc.), tobalá (*A. potatorum* Zucc. y *A. seemanniana* Jacobi) y tepeztate (*A. marmorata* Roezl), y algunas otras variedades domesticadas cultivadas como arroqueño (*A. americana* L. var. *oaxacensis* Gentry) y mexicano (*A. rhodacantha* Trel.) (Berumen-Barbosa, 2009; León-Vázquez, 2009; García-Mendoza, 2004; 2010; 2011).

De *Agave karwinskii* se conocen diferentes poblaciones con aspecto morfológico muy variable en áreas geográficas particulares de Oaxaca y Puebla. Sobre todo, en la región mezcalera de Oaxaca existe una gran diversidad de variantes locales con distintos nombres comunes, reconocidos por pobladores y productores; quienes durante generaciones han mantenido un manejo tradicional para producir mezcal y el uso de diferentes partes de la planta (Gentry, 1982; Rivera-Cazares, 1983; Espinosa-Paz *et al.*, 2002; García-Mendoza, 2004; Conabio, 2006; Flores-Maya *et al.*, 2010). Estas variantes locales hacen suponer que puedan tratarse de diferentes taxones. Por lo que, en este trabajo se analiza la variación morfológica y genética de poblaciones de *Agave karwinskii* de diferentes localidades de los Valles Centrales y Sierra Sur de Oaxaca, así como del Valle de Tehuacán, Puebla.

OBJETIVOS

General

Determinar la variación morfológica, genética y el nivel de ploidía de las poblaciones silvestres y manejadas de *Agave karwinskii* para identificar posibles categorías infraespecíficas.

Particulares

- Identificar los caracteres morfológicos útiles para discriminar las diversas poblaciones de *Agave karwinskii* empleando herramientas morfométricas y estadísticas.
- Describir la variación genética presente entre las distintas poblaciones de *Agave karwinskii* mediante el uso de la técnica AFLP y el nivel de ploidía por citometría de flujo.
- Inferir el nivel de variabilidad genética presente en los grupos morfológicos discretos formados.

ANTECEDENTES

Agave karwinskii pertenece a la sección Rigidae del género, que reúne a trece especies caracterizadas por tener hojas angostas rígidas y en forma de espada; inflorescencias con pocas ramas, pedúnculos con brácteas triangulares pequeñas y cartáceas; flores verde amarillentas con tépalos que se marchitan rápidamente y frutos con cápsulas ovoidales que contienen semillas grandes con alas marginales pequeñas (Gentry, 1982). En esta sección presentan una alta variación en sus estructuras vegetativas, mientras que, las reproductivas son más homogéneas. Algunas de las variaciones no son consistentes interespecíficamente, lo que ha hecho particularmente difícil la delimitación de algunas especies (Gentry, 1982). Esto es de suma importancia para aquellas especies que han estado sujetas a manejo humano durante siglos, como es el caso de la especie objeto de estudio.

Agave karwinskii incluye plantas rosetófilas, caulescentes, coloniales, con tallos de 30 a 70 cm alto. Hojas lanceoladas, rígidas, fibrosas, algo cóncavas, verde-oscuras a verde amarillentas, persistentes a lo largo del tallo, con el margen recto, dentado, dientes con base amplia, antrorsos, negruzcos o rojizos, distantes entre sí, espina terminal, cónica, amplia o angostamente acanalada en el haz, negruzca. Las inflorescencias son paniculadas de 3 a 4 m de alto, umbelas laxas hasta de tercer orden de ramificación; pedúnculo verde; brácteas triangulares, cartáceas, pardas. Las flores son de 4-5 cm largo, hipocrateriformes, verdes a amarillentas; tépalos oblongos, erectos; tubo del perigonio 1-1.1 cm largo, 1 cm diámetro en la porción distal; estambres con filamentos de 3.5-4.0 cm largo, insertos en la mitad del tubo del perigonio o ligeramente por arriba, verdosos, anteras amarillentas; ovario cilíndrico. Los frutos son cápsulas de 4-5 cm largo, 2.5-3.0 cm diámetro, oblongas, obpiriformes o subglobosas; semillas negras. Tiene bulbilos foliosos. Las formas manejadas para producir mezcal en los Valles Centrales (VCO) y Sierra Sur de Oaxaca son de inflorescencias que generalmente alcanzan de 3 a 4 m de altura; las rosetas son más grandes y tienen un mayor número de hojas que las plantas silvestres. *Agave karwinskii* es endémica de México, únicamente se distribuye en los estados de Oaxaca y Puebla (García-Mendoza, 2011). De acuerdo con Conabio, (2006) limita su distribución a las zonas áridas del Valle de Tehuacán, Puebla (VTP) y a los Valles Centrales de Oaxaca.

Las poblaciones del VTP florecen en septiembre y octubre y fructifican de noviembre a enero (García-Mendoza, 2011), mientras que, las poblaciones de los VCO florecen de agosto a noviembre y fructifican de diciembre a febrero (Rivera-Cazares, 1983; Espinosa-Paz *et al.*, 2002; León-Vázquez, 2009; 2013).

Localización y descripción del área de distribución de *Agave karwinskii*

El Valle de Tehuacán-Cuicatlán (VTC) abarca un área pequeña en el sureste de Puebla y porciones adyacentes de Oaxaca. Se localiza entre los 17° 31' 39" a 18° 52' 38" N y los 96° 41' 5" a 97° 55' 03" W. La región fue decretada como Reserva de la Biósfera por la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas en 1998. Desde el punto de vista fitogeográfico este Valle, pertenece a la Región Xerofítica Mexicana dentro del Reino Neotropical (CONANP, 1998; Rzedowski, 2006). La reserva contiene una gran cantidad de endemismos, resultado de una heterogeneidad de hábitats con características bióticas y abióticas particulares (Rzedowski, 2006).

La altitud del Valle va desde los 440 hasta los 3200 m. Su clima varía de los secos (B) a los templados subhúmedos C (Wo) con lluvias en verano. La precipitación promedio anual con lluvias en verano va de 200 a 1800 mm. Tiene una riqueza etnoflorística considerable, con 61.2% de la flora vascular utilizada por los pobladores (Lira *et al.*, 2009).

Dentro de los elementos florísticos importantes destaca la familia Agavaceae, con 30 especies (Dávila *et al.*, 2002; García-Mendoza, 2004). En esta región, se tienen estudios arqueológicos en los que se ha documentado el uso de especies de *Agave* desde los 7,600 a. C., a partir de excavaciones donde se encontraron bagazos de maguey mascado, espinas, restos de canastas, petates y sandalias hechas con fibras de maguey (Brena-Bustamante, 2012). Actualmente persiste el aprovechamiento de estructuras morfológicas de algunas especies de agaves, entre las que se encuentra *A. karwinskii*. Su tallo se usa para la elaboración de mezcal, las hojas para construcción, medicina y fibra, la planta completa para cercos vivos, y las inflorescencias como ornamento del hogar o para conmemorar celebraciones religiosas (Brena-Bustamante, 2012; García-Mendoza, 2011). Los nombres comunes que recibe esta especie en el VTC son: candelillo, cachitún, lechuguilla, y tobasiche (Arias-Toledo *et al.*, 2000; García-Mendoza, 2011).

Los VCO conforman una de las doce subprovincias fisiográficas reconocidas en el estado de Oaxaca. Se localizan entre los 16° 20' y 17° 40' N y los 95° 55' y 97° 30' W. La altitud varía de 1500 m a 3700 m. Sus características topográficas, geológicas, orográficas e hidrográficas determinan un clima muy variado. El clima abarca los grupos A (wo) cálidos, semicálidos (A) C (wo) y templados subhúmedos C (wo) en las partes altas, hasta los semiáridos BS1hw y muy áridos BW (h') w en las planicies, todos con lluvias en verano. La precipitación promedio anual es de 500 a 727.7 mm (Ortiz *et al.*, 2004; Trejo, 2004). Incluye siete distritos: Centro, Ejutla, Etlá, Ocotlán, Tlacolula, Zaachila y Zimatlán. (INEGI, 2001). La vegetación predominante es el matorral xerófilo, asociada a vegetación de chaparral; destacan el guamúchil, mezquites, cactáceas, agaves, pastos, algunas especies de árboles como fresnos, zapotes, amate y remanentes de bosques de pinos y encinos (Coronel-Ortiz, 2006). Entre los elementos más sobresalientes del matorral xerófilo está el género *Agave*, es abundante y es uno de los grupos de plantas más importantes desde el punto de vista ecológico, económico y socio-cultural. Actualmente persiste el uso de estructuras morfológicas de agaves silvestres y con diferentes grados de domesticación, entre los que destaca *A. karwinskii*. De esta especie se ha documentado el uso del tallo, base de hojas, pedúnculo floral y flores para alimento. Jugos de tallos y base de hojas cocidos para la destilación de mezcal. Sus inflorescencias y hojas para forraje. La planta completa para cercas vivas y una vez secas para combustible (Palma, 1991, 1998). Los nombres comunes que recibe la especie en los VCO son: marteño, cirial, sierrudo, espina negra, tripón, cuishe, San Martín y tobasiche (García-Mendoza, 2004; 2010; Espinosa-Paz *et al.*, 2002; León-Vázquez, 2009).

La Sierra Sur es una región que conforma una de las doce subprovincias fisiográficas reconocidas en el estado de Oaxaca. Se localiza entre los 15° 40' 55" a 16° 29' 45" N y entre los 95° 11' 41" a 97° 34' 57" W. Abarca tres distritos: Miahuatlán, Sola de Vega y Yautepec. Es una región formada por un conjunto de lomeríos, premontañas y montañosa. Las diferencias sobre la altitud son contrastantes, van desde los 1100 m hasta los 3000 m en las partes altas donde se desarrollan una gran cantidad de pináceas, bosques mixtos de encino y pino, oyamel, hormiguillo y de cactáceas y agaváceas en las partes bajas de la sierra. Los climas son variados, por lo general más húmedos que los anteriores: cálido húmedo (Am), semicálido húmedo (ACw) y el templado húmedo C (m). La temperatura

promedio es de 10 °C a 22 °C en toda la región. Las lluvias tienen un promedio anual de 800 a 2000 mm (Trejo, 2004). *Agave karwinskii* es conocido como bicuishe y madrequishe en el distrito de Miahuatlán. Se ha documentado el uso de jugos de tallos y base de hojas cocidos para la destilación de mezcal. Inflorescencias y hojas para forraje (Espinosa-Paz *et al.*, 2002).

Domesticación de plantas

La domesticación de los seres vivos es un proceso evolutivo continuo. Se basa en la selección natural, combinada con la selección artificial por los humanos y cultural de los mismos; actúa sobre plantas nativas incipientes, semi-domesticadas y totalmente domesticadas (Perales *et al.*, 2008; Casas *et al.*, 2007). La domesticación incipiente es el resultado de prácticas dirigidas a aumentar la disponibilidad o mejorar la calidad de los recursos obtenidos de especies vegetales de importancia local. Estas prácticas pueden tener diferentes intensidades, formando poblaciones desde silvestres a toleradas, fomentadas, protegidas y promovidas (Mariaca-Mendez, 1997; Bye, 1998; Caballero *et al.*, 1998; Rendón-Aguilar *et al.*, 2001; Casas *et al.*, 2007; Albino-García *et al.*, 2011; Figueredo-Urbina *et al.*, 2012).

Las especies del género *Agave*, generalmente son toleradas según el criterio de Casas *et al.*, (2007), por ser especies consideradas con una importancia local. Su domesticación incipiente se deriva de una práctica arraigada y ancestral, que involucra dejar plantas silvestres en pie durante el aclareo de la vegetación o la apertura de terrenos para la agricultura. Esta es una forma de domesticación presente en varias especies de agaves, entre los que se podrían mencionar: *A. americana* L., *A. cupreata* Trel. & A. Berger, *A. durangensis* Gentry, *A. funkiana* K. Koch & C. D. Bouché, *A. inaequidens* K. Koch, *A. karwinskii* Zucc., *A. lechuguilla* Torr., *A. marmorata* Roezl., *A. maximiliana* Baker, *A. potatorum* Zucc. y *A. rhodacantha* Trel. (Urrutia-Cruz, 1986; Conabio, 2006; Carrillo-Galván, 2011; Cruz-García *et al.*, 2013).

En otras especies del género, se han documentado distintos grados de domesticación dentro de una misma especie, que van del uso de poblaciones silvestres, pasando por los diferentes niveles incipientes de domesticación (toleradas, fomentadas, protegidas y promovidas), hasta ser totalmente domesticadas y cultivadas, tales como: espadín (*Agave*

angustifolia Haw.), henequén (*A. fourcroydes* Lem.), *A. hookeri* Jacobi, *A. mapisaga* Trel., *A. rhodacantha* Trel., *A. salmiana* y *A. tequilana* Weber ‘Azul’ (Urrutia-Cruz, 1986; Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1996, 1999; Gil-Vega *et al.*, 2006; Vargas-Ponce *et al.*, 2007, 2009; Mora-López *et al.*, 2011; Figueredo-Urbina *et al.*, 2012; Rivera-Lugo, 2014).

Algunos autores han documentado las divergencias morfológicas y genéticas dentro y entre las distintas poblaciones de estas especies mediante herramientas estadísticas y moleculares, demostrando que hay nombres tradicionales que corresponden con las entidades distintivas agromorfológicas y genéticas. Las unidades taxonómicas más utilizadas para describir dichos recursos han sido: especie, subespecie, variedad botánica y cultivar, con el objetivo de ofrecer una información básica para su clasificación, la bioconservación y el aprovechamiento integral del germoplasma (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1996; 1998; 2007; Vargas-Ponce *et al.*, 2007; Rivera-Lugo, 2014).

Análisis morfométrico

La morfometría es el análisis numérico y estadístico de las estructuras morfológicas. Es ampliamente usado para detectar variación discontinua en caracteres morfológicos taxonómicos y aquellos asociados a modificaciones debidas a la domesticación. Se reconocen similitudes y diferencias existentes entre OTU’s (Unidades Taxonómicas Operativas), analizadas a partir de un cierto número de caracteres mediante técnicas de agrupamiento fenético y métodos de ordenación (Crisci y López-Armengol, 1983; Rohlf, 2008).

Mediante estos métodos, en *Agave fourcroydes* se reconoció que hay cultivares que tienen un tamaño de rosetas más grandes, mayor cantidad de fibras y menor cantidad de espinas, en relación con poblaciones silvestres de *A. angustifolia* (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1996; 1997; 1998). Los agaves productores de fibras del centro-occidente de México (*Agave angustifolia* y *A. rhodacantha*) mostraron variaciones morfológicas significativas como gigantismo, mayor fibrosidad y menor espinosidad en las poblaciones manejadas (Carrillo-Galván, 2011). En agaves pulqueros (*A. salmiana* var. ‘Salmiana’, *A. salmiana* var. ‘Ayoteco’ *A. mapisaga* ‘Negro’ y ‘Xilometl’) se identificaron los siguientes caracteres discriminatorios asociados a mayores grados de domesticación: dientes pequeños y rosetas grandes (Mora-López *et al.*, 2011). Entre poblaciones silvestres y cultivadas de agaves

mezcaleros del occidente de México (*Agave angustifolia*, *A. tequilana* ‘Azul’, *A. rhodacantha*) los cultivares tradicionales se identificaron como entidades morfológicas diferenciadas (Vargas-Ponce *et al.*, 2007). Este método también ha sido aplicado para esclarecer y resolver problemas taxonómicos. En el género *Prochnyanthes* se analizó la variación morfológica, y se determinó que está compuesto por una sola especie (*Prochnyanthes mexicana*) y no de tres (*P. bulliana* y *P. viridescens*), como se había propuesto en trabajos anteriores (Castro-Castro *et al.*, 2010). El análisis canónico de funciones discriminantes ha sido utilizado en agaves mezcaleros (*A. angustifolia*, *A. rhodacantha* y *A. tequilana*), ha demostrado que los caracteres morfológicos discriminatorios obtenidos corresponden con los nombres tradicionales que usan los productores y son entidades genéticas diferenciables (Vargas-Ponce *et al.*, 2007; Rivera-Lugo, 2014).

Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son útiles para documentar divergencias genéticas. Tienen ventajas en comparación con las mediciones morfológicas, ya que no varían con el ambiente ni dependen del estado de desarrollo del individuo, siguen las bases de la herencia mendeliana y son ideales para estudios de diversidad, filogenia y como una herramienta para la clasificación taxonómica (Simpson, 1997). Existen distintos tipos de marcadores con base en distintos criterios de uso; solo un grupo determinado estiman cuantitativamente a nivel infraespecífico que tan similares o diferentes son genéticamente dos fragmentos de ADN. Los más comunes son isoenzimas, microsatélites o SSRs (repeticiones de secuencias simples), RFLP (polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción), RAPD (polimorfismos de ADN amplificados al azar) y AFLP (polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (Awise, 1994; Vos *et al.*, 1995). Dichos métodos utilizan la distancia genética como comparativo dentro y entre poblaciones, entre variedades o subespecies y entre especies, bajo el supuesto de que las diferencias genéticas se incrementan con la distancia taxonómica que los separa; distancias menores indican una estrecha similitud genética, mientras que distancias mayores indican una relación genética más distante. Con excepción de los microsatélites e isoenzimas que además se pueden examinar las relaciones evolutivas.

En el género *Agave*, se han aplicado varias de estas técnicas para investigar las relaciones que existen entre poblaciones silvestres y domesticadas. Se usaron isoenzimas para conocer las evidencias de las relaciones filogenéticas entre el germoplasma del henequén (*A. fourcroydes*) y algunas poblaciones silvestres de *A. angustifolia* del estado de Yucatán. Este trabajo confirmó, que *A. angustifolia* es el ancestro silvestre del henequén. Esta especie silvestre, presenta una alta variación isoenzimática; mientras que en los cultivares del henequén todos los individuos son idénticos entre sí o con diferencias genéticas mínimas (Colunga-García-Marín *et al.*, 1999).

También se han hecho comparaciones combinadas de morfología y genética. Por ejemplo, las poblaciones silvestres manejadas *in situ* y cultivadas de *Agave hookeri* y *A. inaequidens* (de los que se obtiene mezcal raicilla y pulque) se estudiaron mediante la técnica de microsatélites. En ambas especies se detectaron divergencias genéticas que fueron comparadas con las divergencias morfológicas. Por el grado de similitud entre ellos se determinó, que *A. hookeri* proviene de *A. inaequidens* (Figueredo-Urbina *et al.*, 2012). En este caso los caracteres morfológicos y genéticos coincidieron. Por el contrario, en los agaves pulqueros del nororiente del estado de México, estudiados con marcadores tipo RAPD, se agruparon de manera clara de acuerdo a las especies taxonómicas y a las variantes que reconocen los productores pulqueros; sin embargo, estos resultados no fueron congruentes con el dendograma de características morfológicas (Alfaro-Rojas *et al.*, 2007).

En *Agave tequilana* ‘Azul’ se estimó la variación genética dentro y entre campos tequileros mediante marcadores RAPDs; se obtuvieron valores de disimilitud menores de 0.01 y sólo se detectaron dos fragmentos polimórficos entre 40 individuos (Gil-Vega *et al.*, 2001). Sin embargo, con la técnica AFLP los resultados indicaron que ciertas variedades cercanas genotípicamente a *A. tequilana* tenían un nivel significativo de diversidad genética presente (Gil-Vega, 1997; Gil-Vega *et al.*, 2006). Este estudio coincidió con las diferencias genéticas encontradas en el nivel de ploidía y tamaño del genoma entre las distintas variedades de *A. tequilana* evaluadas por citometría de flujo (Palomino *et al.*, 2003). Según estos resultados los niveles diploides, triploides y tetraploides de tales variedades correspondieron con los subgrupos formados en el dendograma.

La técnica AFLP fue propuesta por Vos *et al.*, (1995). Su función es realizar un corte de ADN genómico combinado con enzimas de restricción y la técnica de reacción en

cadena de la polimerasa (PCR). Permite detectar múltiples *loci* polimórficos en el genoma por cambios en los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción. Fue modificada para su utilización en agaves por Simpson (1997) y contribuyó exitosamente a resolver problemas taxonómicos en el género. Gil-Vega *et al.*, (2007) utilizaron dicha técnica a nivel de los subgéneros *Littaea* y *Agave* y demostraron que la clasificación genética obtenida está en correlación con las clasificaciones morfológicas clásicas aceptadas. El uso de estos marcadores ha resultado ser útil y recomendable para identificar la variación genética estrechamente relacionada entre poblaciones y variedades de especies de *Agave* y, su buena contribución en resoluciones taxonómicas (Keb-Llanes *et al.*, 2002; Infante *et al.*, 2003; Barraza-Morales *et al.*, 2006; Gil-Vega *et al.*, 2007; Rivera-Lugo, 2014).

Análisis de ploidía.

Los cambios en los niveles de ploidía son eventos importantes en la evolución de plantas superiores. El contenido de ADN en una especie se refiere al peso del genoma en picogramos (pg).

En *Agave* se ha informado la presencia de niveles diploides de 8, triploides de 12.5, tetraploides de 16, pentaploides de 20, hexaploides de 24 y octoploides de 32 pg, respectivamente. Y, se ha confirmado que existe una relación entre el tamaño del genoma y el nivel de ploidía. Generalmente a mayores niveles de ploidía corresponden a poblaciones de agaves con algún grado de domesticación (Palomino *et al.*, 2003, 2005; Moreno-Salazar *et al.*, 2007). El contenido de ADN nuclear o tamaño del genoma y los niveles de ploidía son estimados mediante la técnica de citometría de flujo, el cual es un método útil, rápido y preciso cuando los estudios de cariotipo se dificultan (Doležel, 1997; Banerjee *et al.*, 1987; Serrato-Cruz *et al.*, 2000; Palomino *et al.*, 2003, 2005; Moreno-Salazar *et al.*, 2007).

En este trabajo se utilizan estos tres métodos: análisis morfométrico, análisis genético mediante la técnica de AFLP y el nivel de ploidía por citometría de flujo, para elucidar las relaciones morfológicas y genéticas entre las distintas poblaciones silvestres y manejadas de *Agave karwinskii* y poder identificar posibles categorías infraespecíficas.

MÉTODOS

Revisión bibliográfica

Se revisó la literatura taxonómica y biológica de *Agave karwinskii*: la descripción original de Zuccarini (1833), el trabajo de Gentry (1982) para el grupo Rigidae y la descripción de la especie por García-Mendoza, (2011) para el Valle de Tehuacán-Cuicatlán. La fuente de información para los Valles Centrales de Oaxaca se obtuvo de tesis de Licenciaturas y manuales (Rivera-Cazares, 1983; Espinosa-Paz *et al.*, 2002; León-Vázquez, 2009; 2013). También se analizaron trabajos relacionados con los distintos grados de domesticación que han sido publicados para especies de agaves mezcaleros, pulqueros y proveedores de fibras (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1996; 1998; 2007; Vargas-Ponce *et al.*, 2007).

Revisión de ejemplares de herbario

Se revisaron 28 ejemplares de herbario depositados en MEXU y las bases de datos REMIB y UNIBIO para *Agave karwinskii*. A partir de ellos, se generó un mapa de distribución geográfica de colectas de la especie, con el fin de seleccionar nuestras localidades y poblaciones a estudiar. Fig. 1.

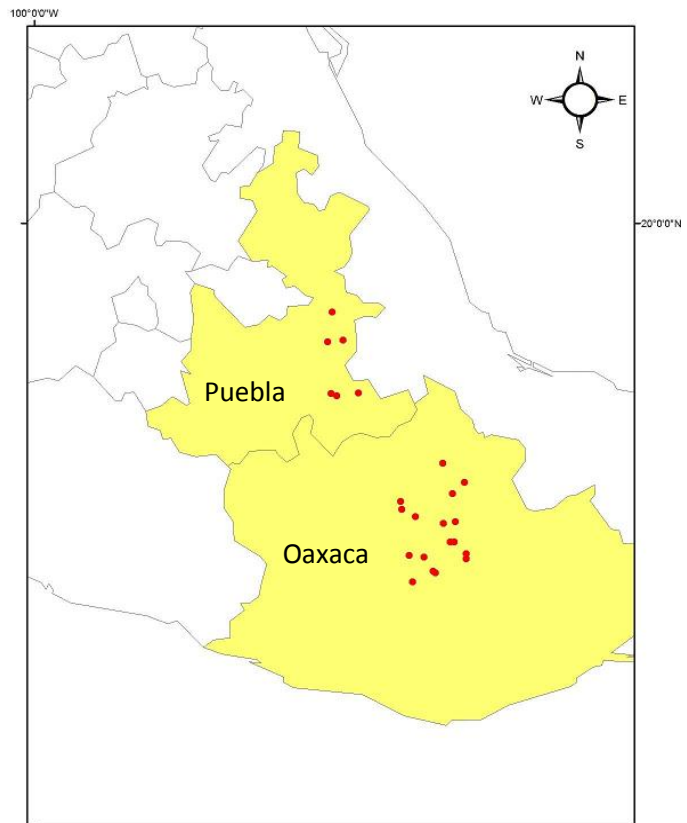


Fig. 1. Distribución geográfica de *Agave karwinskii* en Oaxaca y Puebla a partir de datos de ejemplares de herbario. Elaboración propia en Arc View GIS 3.2

ZONA DE ESTUDIO

Se eligieron un municipio de Puebla, Zapotitlán de las Salinas (ZSP), y un municipio por cada uno de los distritos de Tlacolula, Ocotlán y Ejutla de los VCO y dos municipios para Miahuatlán de la Sierra Sur de Oaxaca (Fig. 2). El Cuadro 1 describe la ubicación geográfica, el ambiente y clima de cada municipio correspondiente a las zonas de estudio. Los datos fueron tomados a partir de la información más reciente del prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos (INEGI, 2012 a, b, c, d) y de las estaciones climatológicas más cercanas a las zonas muestreadas (CONAGUA). Las formulas climáticas se obtuvieron de acuerdo a García (1998).

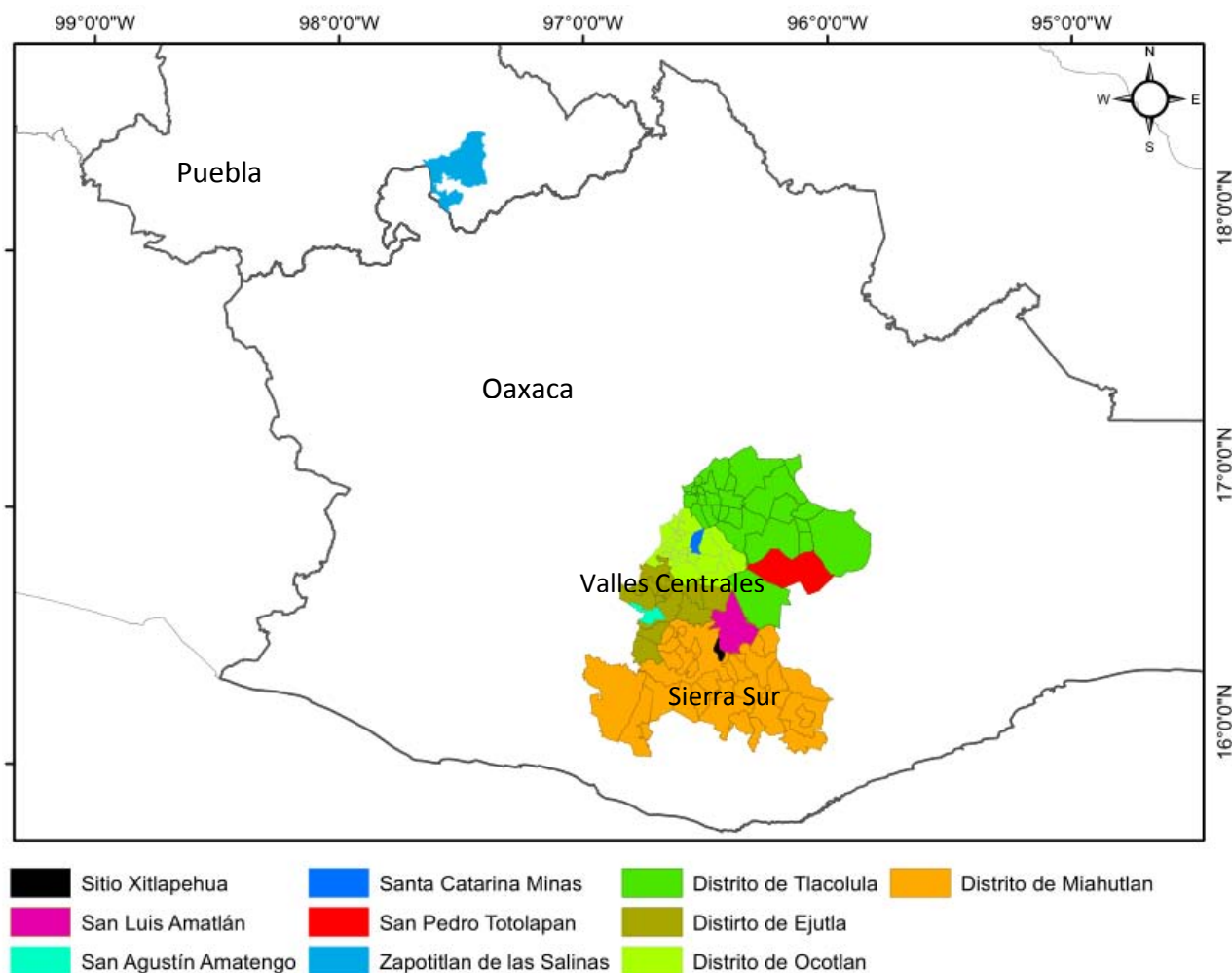


Fig. 2. Ubicación geográfica de las zonas de estudio.
Elaboración propia en Arc View GIS 3.2

Cuadro 1. Ubicación geográfica y descripción ambiental de las zonas de estudio.

Estado	Distrito	Municipio	Descripción climática y ambiental municipal	Localidades muestreadas
Puebla		Zapotitlán de las Salinas	<p>Coordenadas. 18° 07' y 18° 25' N y 97° 24' y 97° 41' W</p> <p>Altitud: 1 200-2 500 m.</p> <p>Provincia fisiográfica: Eje neovolcánico y sierras de Puebla</p> <p>Temperatura media anual: 14 – 26°C</p> <p>Intervalo de precipitación: 400 – 700 mm</p> <p>Clima: Secos; BSo w(w) y semicálido con lluvias en verano BS (w) (h') h</p> <p>Tipo de vegetación: Matorral xerófilo</p>	Ruta a las Canteras de Ámbar
Oaxaca	Ocotlán	Santa Catarina Minas	<p>Coordenadas. 16°44' y 16°51' N y 96°35' y 96°39' W</p> <p>Altitud: 1500- 2 300 m.</p> <p>Provincia fisiográfica: Valles Centrales de Oaxaca</p> <p>Temperatura media anual: 16 – 22°C</p> <p>Intervalo de precipitación: 600 – 800 mm</p> <p>Clima: semicálido subhúmedo con lluvias en verano BS₁ (w) h' (h)</p> <p>Tipo de vegetación: remanentes de bosque de encino, bosque de pino y selva baja caducifolia en las partes altas. En las partes bajas; matorral xerófilo, bosque ripario y vegetación secundaria.</p>	<p>El Calicanto,</p> <p>El Portillo,</p> <p>El Encino.</p> <p>Los</p> <p>Huamúchil's.</p> <p>Los</p> <p>Piñuelares.</p> <p>La Jicarita y calle Nicolás del Puerto (Terreno de cultivo)</p>
Oaxaca	Ejutla	San Agustín Amatengo	<p>Coordenadas. 16°27' y 16°34' N y 96°45' y 96°54' W</p> <p>Altitud: 1300-2 500 m.</p> <p>Provincia fisiográfica: Valles Centrales de Oaxaca</p> <p>Temperatura media anual: 18 – 22°C</p> <p>Intervalo de precipitación: 600 – 1 000 mm</p> <p>Clima: Semiseco B So (w) h' (h) y semicálido con lluvias en verano BS₁ (w) h' (h).</p> <p>Tipo de vegetación: selva baja caducifolia, matorral xerófilo, bosque ripario y vegetación secundaria.</p>	La Huerta y Loma bonita
Oaxaca		San Luis Amatlán	<p>Coordenadas. 16°20' y 16°36' N y 96°21' y 96°35' W</p> <p>Altitud: 1100- 2300 m.</p> <p>Provincia fisiográfica: Sierra Madre del Sur</p> <p>Temperatura media anual: 16 – 24°C</p> <p>Intervalo de precipitación: 400 – 700 mm</p> <p>Clima: Semiseco B So (w) h' (h) y semicálido con lluvias en verano BS₁ (w) h' (h).</p> <p>Tipo de vegetación: matorral xerófilo, matorral espinoso y vegetación secundaria.</p>	<p>Camino a la secundaria,</p> <p>rumbo a</p> <p>Guicheque.</p> <p>Yocabo y camino a</p> <p>Zagala.</p>
	Miahuatlán			

		Xitlapehua	Coordenadas. 16°19' y 16°25' N y 96°30' y 96°34' W Altitud: 1 400-1 800 m. Provincia fisiográfica: Sierra Madre del Sur Temperatura media anual: 18 – 22°C Intervalo de precipitación: 500 – 600 mm Clima: Seco BS ₀ w (h'), Semiseco B So (w) h' (h) y semicálido con lluvias en verano BS ₁ (w) h' (h). Tipo de vegetación: matorral xerófilo, matorral espinoso y vegetación secundaria	Sobre carretera al sur de Xitlapehua. Sobre carretera hacia Miahuatlán
Oaxaca	Tlacolula	San Pedro Totolapan	Coordenadas. 16°34' y 16°45' N y 96°03' y 96°27' W Altitud: 600- 2 500 m. Provincia fisiográfica: Valles Centrales de Oaxaca Temperatura media anual: 16 – 26°C Intervalo de precipitación: 400 – 700 mm Clima: Cálido subhúmedo con lluvias en verano BS ₁ (w) (h') Tipo de vegetación: selva baja caducifolia y matorral xerófilo.	Zona el aguacate y el llano de macahuite

Trabajo de campo

Selección de poblaciones, material vegetal colectado y herborizado

Se hicieron doce salidas al campo durante el período de junio de 2012 a enero de 2014. La primera salida fue de prospección. Se diseñó un recorrido de acuerdo a la literatura y a los datos de herbario consultados. Durante el recorrido se consultó a pobladores y productores de mezcal en la Sierra Sur y los Valles Centrales de Oaxaca y de Zapotitlán de las Salinas, Puebla, haciendo énfasis en los nombres comunes que la gente les asigna a los diferentes morfotipos en cada municipio. Con base a esta prospección, se seleccionaron once poblaciones de diferentes localidades: una correspondió a Zapotitlán de las Salinas, Puebla y diez para el estado de Oaxaca; dos para la Sierra Sur y ocho para los Valles Centrales. (Cuadro 2). Se evaluaron las condiciones en las que se localizó cada población a partir de las condiciones del ambiente, del manejo y uso que le dan las personas y productores mezcaleros. Con ello se aproximó a describir el tipo de manejo en cada población.

Las posteriores salidas fueron dedicadas a la colecta de material vegetativo y reproductivo para la obtención de datos morfométricos y para ejemplares de herbario. Se hicieron mediciones de las plantas en campo, por ejemplo: diámetro y altura de la roseta,

altura y circunferencia del tallo, altura total de la inflorescencia, longitud de las ramas, coloración de partes florales (ver la siguiente sección y Anexo 1). Se colectaron tres hojas y 15 flores en líquido GAA para su conservación y cinco frutos por cada individuo para hacer las mediciones en gabinete. Aparte, se colectaron hojas, flores y frutos por triplicado para ejemplares de herbario. El material vegetal se transportó en fresco al Laboratorio de la Colección de Agaváceas del Jardín Botánico de la UNAM, donde se llevaron a cabo las mediciones, así como el herborizado. Además, se colectaron un total de 99 hijuelos, 9 por cada población, los cuales se mantuvieron cultivados en macetas en el Jardín Botánico de la UNAM para el análisis molecular-AFLP.

Análisis morfométrico

Selección de caracteres

Se generó una lista de 51 caracteres morfológicos para ser medidos (Anexo1). Se seleccionaron con base en los caracteres que se han utilizado en las descripciones taxonómicas para *Agave* (Gentry, 1982) y a los que probablemente podrían indicar tendencias de domesticación de acuerdo con Colunga-GarcíaMarín *et al.*, (1996); 44 de ellos son de multiestado-cuantitativos. De los siete caracteres restantes, tres son multiestado-cualitativos sin secuencia lógica y cuatro doble-estado excluyentes.

Cuadro 2. Selección de poblaciones a partir de nombres comunes y ejemplares colectados.

Estado	Distrito	Municipio	Localidad	Nombre común	Ejemplares	Hijuelos
Puebla		Zapotitlán de las Salinas	Ruta a las Canteras de Ámbar	cachitún	7	9
	Ocotlán	Santa Catarina Minas	El Calicanto, El Portillo, El Encino y Los -Huamúchil's	sierrudo	7	9
			El Calicanto, El Portillo y El Encino	cirial	7	9
			Los Piñuelares y Calle Nicolás del Puerto	martelño	7	9

Oaxaca			Predio de la Sra. Inés (terreno de cultivo de maíz) y La Jicarita (predios abandonados)	tripón	7	9
			Calle Nicolás del Puerto (Terreno de cultivo de maíz) y El Rejo	espina negra	7	9
	Miahuatlán	San Luis Amatlán y Xitlapehua	Camino a la secundaria, rumbo a Guicheque predios abandonados y sobre carr. al sur de Xitlapehua	madrecuishe	7	9
			Yocabo. Predios de terrenos y sobre carr. al sur de Xitlapehua y carr. a Miahuatlán	bicuishe	7	9
	Ejutla	San Agustín Amatengo	La Huerta y Loma Bonita (terrenos de cultivo de maíz y predios abandonados)	tobasiche	7	9
				san Martín	7	9
	Tlacolula	San Pedro Totolapán	El Llano de Macahuite y El Aguacate	cuishe	7	9

Trabajo de gabinete; medición de caracteres

Las medidas para los 44 caracteres cuantitativos se realizaron con el uso de un vernier digital para escalas pequeñas (mm) y con una regla y un flexómetro para escalas mayores (cm y m). Los tres caracteres de tipo multiestado-cualitativos sin secuencia lógica se transformaron asignando una función ordinal (1, 2 y 3). Los cuatro caracteres de tipo doble-estado excluyentes se asignaron con dígitos de 1 y 2 (Anexo 1). Después se hizo una matriz básica de datos en formato Excel conformada por 77 filas correspondientes a los individuos (siete individuos por cada población) y 51 columnas pertenecientes a los caracteres cuantitativos.

Análisis estadísticos

Análisis exploratorio de datos

Los 51 caracteres cuantitativos evaluados fueron sometidos a un Análisis Exploratorio de Datos (AED) para reconocer patrones generales de dispersión y aquellos valores atípicos de las medidas (datos) de cada carácter. Se hicieron diagramas de caja para observar la mediana reflejada en forma de muesca, los cuartiles y valores extremos para cada carácter (Salgado-Ugarte, 1992). La finalidad del AED, es examinar previamente los datos antes de la aplicación de cualquier técnica estadística. De esta forma se consigue un entendimiento básico de las relaciones existentes entre las variables analizadas que proporcionan una proximidad rápida de las diferencias o no de ellas, dentro y entre las poblaciones estudiadas (Salgado-Ugarte, 1992).

Estandarización de los datos

Se estandarizaron los datos de los caracteres multiestado cuantitativos. Esta función remueve y mantiene a un mismo nivel las escalas del conjunto de datos de cada variable sin afectar su peso y su dimensión, importante para realizar el método de agrupamiento fenético.

Se aplicó el algoritmo con el programa NTSYS.2.1. (Crisci y López-Armengol, 1983):
$$Y' = \frac{Y - a}{b}$$

Donde: Y' : valor estandarizado de un carácter morfológico.

Y : valor real de dicho carácter.

a : valor promedio del carácter.

b : desviación estándar del carácter.

Análisis de correlación de las variables

Mediante el programa XL-STAT, se hizo un análisis de correlación de Pearson de las 51 variables estandarizadas inicialmente propuestas. La intención fue identificar aquellos caracteres altamente correlacionados y así poder descartarlos de la matriz básica de datos. Esto nos permite identificar qué variables son las que están aportando la mayor variación y utilizarlas para proseguir con los métodos de agrupación y ordenación (Salgado-Ugarte,

1992; Rivera-Lugo, 2014). Dicho coeficiente oscila entre -1 y $+1$. Un valor de $+1$ indica una relación lineal positiva perfecta. Una correlación próxima a cero indica que no hay relación lineal entre las dos variables (Salgado-Ugarte, 1992).

Análisis de Agrupamiento Fenético

Después del análisis de correlación se eliminaron 14 caracteres altamente correlacionados (cuadro 3) y la matriz básica de datos se redujo a 37 caracteres estandarizados. Enseguida se generó una matriz de similitud con el algoritmo de “correlación” mediante el programa NTSYS-Pc2.1 y se construyó el fenograma de distancias morfológicas con la técnica de ligamiento media aritmética no ponderada (UPGMA). Se valoró la robustez de la construcción del fenograma mediante el coeficiente de correlación cofenético (valor de r); aquellos valores cercanos a uno indican una clasificación robusta respecto a las agrupaciones formadas (Crisci y López-Armengol, 1983). Este análisis de agrupamiento fenético tiene la finalidad de formar grupos de objetos en relación con el grado de similitud entre dos OTU's o grupos de estas, cuantificables al aplicar un coeficiente de similitud a una matriz básica de datos (Sokal *et al.*, 1963). El objetivo es sintetizar la información y obtener el reconocimiento de la similitud entre la totalidad de las OTUS, clasificadas u ordenadas jerárquicamente en un fenograma, tal como se han hecho en *Agave* (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1996; 1997; 1998, Vargas-Ponce *et al.*, 2007; Carrillo-Galván, 2011; Mora-López *et al.*, 2011; Castro-Castro *et al.*, 2010; Rivera-Lugo, 2014). Este método es parte de un enfoque fenético, que clasifica entidades biológicas infraespecificas taxonómicamente en la proporción de las similitudes y diferencias sin considerar el proceso genealógico (Crisci y López-Armengol, 1983).

Análisis de Componentes Principales

A partir de la matriz básica de datos con las 37 variables estandarizadas y mediante el uso del programa NTSYS-Pc2.1, se generó una matriz de similitud con el algoritmo varianza-covarianza y se obtuvieron los componentes principales 1 y 2 junto con las gráficas bidimensionales que mostraron la dispersión y agrupación de los individuos a partir de las similitudes y diferencias de los vectores de cada carácter. Los componentes principales son una combinación lineal de las variables originales, de tal manera, que sólo unas pocas

variables reúnen el mayor porcentaje de la variabilidad de los datos, principalmente en los componentes 1 y 2 (Crisci y López-Armengol, 1983). Este método ha sido aplicado en el género *Agave* (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1996; 1997Castro-Castro *et al.*, 2010; Rivera-Lugo, 2014) y en algunos casos ha sido un complemento para las clasificaciones fenéticas hechas, lo que ha funcionado como un respaldo para confirmar dichos resultados.

Análisis Canónico de Funciones Discriminantes

Se hizo un análisis canónico de funciones discriminantes mediante el programa IBM SPSS, versión 19 para demostrar si las variables consideradas en este estudio son buenos estimadores para diferenciar y clasificar grupos. Este análisis permite comprobar la hipótesis inicialmente planteada, partiendo del supuesto de que si fueran diferentes taxones, en función de los nombres comunes que manejan los pobladores de los VCO y Sierra Sur, los límites de cada población estarán definidos por una menor cantidad de variables a partir de las 37 inicialmente establecidas. Dicha prueba de significancia contendrá la información útil que hará la discriminación entre los distintos taxones que resulten. Es una regla más sencilla para clasificar OTU's en subgrupos de tipos semejantes, o entre poblaciones silvestres y manejadas como han sido aplicados en agaves (Vargas-Ponce *et al.*, 2007; Rivera-Lugo, 2014). Enseguida se contrastó la hipótesis nula mediante la prueba de Lambda de Wilks, el cual toma en cuenta las medias multivariantes de los datos de cada grupo (los centroides). Aquellos valores próximos a cero indican una gran similitud entre los grupos formados, mientras que, valores próximos a uno señalan una gran diferencia entre ellos (Montanero, 2008). También se evaluó el porcentaje de clasificación de cada población agrupada, a partir del modelo que propone el diagrama de funciones discriminantes.

Análisis genético

Antes de obtener los AFLP's se hizo la extracción de ADN. Las muestras de tejido vegetal se obtuvieron de 99 hijuelos de las poblaciones indicadas (Cuadro 2). Las hojas jóvenes de los hijuelos se envolvieron en papel periódico húmedo y se transportaron en una caja de cartón a las instalaciones del Laboratorio de Genética del Desarrollo del Departamento de Ingeniería Genética del Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Unidad Irapuato del

Instituto Politécnico Nacional. Las hojas se limpiaron con alcohol etílico al 70% y se eliminaron, la espina terminal y los dientes. Se cortaron muestras de tejido con un bisturí y sobre placas de vidrio piezas de aproximadamente 1 x 1 cm. Estas porciones de hoja se colocaron en nitrógeno líquido (-196 °C) y se almacenaron en un ultra congelador (-70°C a -80°C) para la consecuente extracción de ADN y obtención de AFLP's.

La extracción de ADN se hizo mediante el uso del DNeasy Plant Mini Kit de la marca Qiagen. El kit proporciona una manera rápida y fácil para purificar ADN con alta calidad. Posteriormente se llevaron a cabo los siguientes pasos, siguiendo el manual del Laboratorio de Ingeniería Genética de esta Unidad Académica para verificar la calidad del ADN y proseguir con el análisis de AFLP:

- Lectura de la concentración de ADN en Nanodrop.
- Dilución del ADN.
- Determinación de la calidad de ADN en geles de agarosa.

Obtención de AFLP

Se prosiguió con el análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados del ADN. Esta técnica permite complementarse con los tres análisis morfométricos anteriormente aquí establecidos, que a diferencia de otros marcadores moleculares no lo hacen, al menos para *Agave*. Son un indicador de confiabilidad bajo esta relación, ya que se ha demostrado la relación que hay sobre la clasificación genética y la clasificación morfológica clásica aceptada, entre especies y variedades del género *Agave*. (Gil-Vega *et al.*, 2007; Rivera-Lugo, 2014). Se basa en detectar la variación genética mediante patrones electroforéticos de ADN donde se reconocen los “*loci* polimórficos”. Representan datos cualitativos, luego se convierten a estimaciones cuantitativas y se evalúan en “distancias genéticas”. Determinan que tan similares o diferentes genéticamente son dos fragmentos de ADN de los individuos analizados (Avice, 1994; Simpson, 1997; Gil-Vega *et al.*, 2007).

En este caso, al obtener las distancias genéticas en las distintas poblaciones de *Agave karwinskii* se podrá inferir si dicha clasificación genética coincide con la conformación de los grupos morfológicos discretos obtenidos en la parte del análisis fenético, de componentes principales y del análisis canónico de funciones discriminantes.

Para la obtención de AFLP's se siguió el protocolo de Vos *et al.*, (1995) y se usó a *Agave angustifolia* como especie comparativa. Los pasos fueron los siguientes:

- 1.- La digestión se realizó en tubos nuevos de PCR con 100 ng de ADN genómico y dos enzimas de restricción (una de corte raro, *Eco* RI, y la otra de corte frecuente, *Mse* I) para obtener pequeños fragmentos de ADN. Se incubaron en un termociclador para PCR durante 2 horas a 37°C, y uno por 15 minutos a 70°C para inactivar las enzimas.
- 2.- Para la ligación, en los tubos anteriores se añadieron los adaptadores de doble cadena de ADN, que se ligan a los extremos de los fragmentos de ADN restringido, para generar plantillas para la amplificación. Los reactivos utilizados fueron los incluidos en el kit de preparación de templado LI-COR.
- 3.- En la pre-amplificación se usaron los *primers* iniciadores *Eco* RI+A y *Mse* I+A para amplificar las regiones flanqueantes que contienen el sitio de unión del *primer* y el sitio de restricción.
- 4.- En la amplificación selectiva se emplearon *primers* marcados con fluorescencia con tres nucleótidos selectivos en el extremo 5' y sin marcar. Se hicieron cuatro combinaciones diferentes, en hielo y sin exposición a la luz.

Después las muestras fueron centrifugadas brevemente y se incubaron en un termociclador para PCR con un ciclo a 94°C y 65°C por 30 segundos cada temperatura y 72°C por un minuto. Enseguida se aplicaron doce ciclos para disminuir subsecuentemente la temperatura de alineamiento a 0.7°C por ciclo, después a 94°C por 30 segundos para desnaturalizar y 72°C por un minuto para elongar las cadenas. Al final se mantuvieron 23 ciclos a 94°C y 56°C por 30 segundos respectivamente y 72°C por un minuto y se mantuvieron almacenados a 4°C.

La amplificación selectiva se separó por electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida con 2 µL de la solución amortiguadora blue-stop y 3 µL de cada muestra (PCR), se mezclaron y se centrifugación brevemente. Después se desnaturalizaron por 3 minutos a 94 °C y se mantuvieron en hielo, cubiertas con papel aluminio. Finalmente, se recorrió el gel a 2000V con el buffer TBE 5X durante 20 minutos. Enseguida se cargó el gel de poliacrilamida con 0.8 µL de cada muestra desnaturalizada. Se usó el marcador de peso molecular estándar de 50-700 pb, marcados a 700 y 800 IRDye. Se obtuvo el patrón de fragmentos con el analizador de imágenes marca LI-COR 4300.

Análisis del nivel de ploidía por Citometría de Flujo

Se evaluó el nivel de ploidía en cada población como un comparativo para el análisis morfológico y genético-AFLP. Se analizó si dicho nivel de ploidía está influenciado por el grado de manejo humano y, si es un indicativo de su nivel de domesticación en las poblaciones manejadas como se han hecho en agaves (Palomino *et al.*, 2003, 2005; Moreno-Salazar *et al.*, 2007; Rivera-Lugo, 2014)

Se tomaron muestras de las hojas de hijuelos de tres individuos por cada población que fueron colectados en las localidades indicadas (en total 33 muestras, por cada individuo se hicieron tres repeticiones). Este análisis se llevo a cabo en el Departamento de Servicios Genómicos del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del CINVESTAV Unidad Irapuato, Guanajuato.

Se usó un citómetro de flujo de la marca Partec® modelo PA II. Se utilizó un agente de tinción CyStain® UV ploidy de la marca Partec para la tinción fluorescente de ADN nuclear, este es un marcador de tipo específico (solo indica enlaces A-T) para determinar el nivel de ploidía de las 33 muestras. La lectura de las muestras se siguió de acuerdo a las instrucciones del protocolo de la marca Partec. Se usó como patrón estándar a *Agave tequilana* ‘Azul’ de nivel diploide con ADN de 8.389 pg, ya que su contenido de ADN es bien conocido y se encuentra relativamente cerca del reportado para algunas especies de *Agave* (Palomino *et al.*, 2003). La primera lectura se inicio con los núcleos del tejido de la base de la hoja del patrón estándar. Se determinó una escala y a partir de ella se evaluaron y compararon los niveles de ploidía de las muestras de *A. karwinskii*. El método consistió en:

- a) Se tomó 0.5 cm² de tejido fresco de la base de la hoja de todas las muestras y se colocó en una caja petri.
- b) Se añadió 0.5 mL de solución buffer CyStain® UV Ploidy. Enseguida se cortó el tejido con una navaja de bisturí para liberar los núcleos.
- c) Se adicionó 1.5 ml del buffer CyStain® UV Ploidy y se dejó incubar la solución por 5 minutos para teñir los núcleos. Enseguida la mezcla fue filtrada a través de un filtro CellTrics® de 50 µm yellow, de la marca Partec.
- d) La mezcla se colocó en un tubo de lectura y fue analizada en el citómetro de flujo.
- e) Una vez establecidas las escalas arbitrarias, se prosiguió a medir cada una de las muestras de las once poblaciones de *Agave karwinskii*.

RESULTADOS

Poblaciones colectadas: tipo de manejo y uso

En total se muestrearon once diferentes poblaciones. Una población se colectó en el municipio de Zapotitlán de las Salinas, Puebla conocida comúnmente como cachitún. Se localizó asociada con *Agave karwinskii*, *A. kerchovei*, *Cephalocereus columna-trajani*, *Neobuxbaumia tetetzo* y *Prosopis laevigata* (Fig. 3. A-C).

Las diez poblaciones restantes se colectaron en diferentes localidades de Oaxaca. Ocho se colectaron en los VCO: una en el municipio de San Pedro Totolapan, distrito de Tlacolula conocida como cuishe en áreas semiconservadas. Se encontró asociada con *Acacia cochliachantha*, *Agave karwinskii*, *Bursera*, *Cephalocereus quadricentralis*, *Escontria chiotilla* y *Nopalea auberi* (Fig. 3. D-F).

Cinco se colectaron en el municipio de Santa Catarina Minas, distrito de Ocotlán: sierrudo (Fig. 3. G-I), cirial (Fig. 4. A-C), espina negra (Fig. 4. D-F), marteño (Fig. 4. G-I) y tripón (Fig. 5. A-C). Dos de ellas; cirial y sierrudo se localizaron en zonas alejadas del pueblo en lomeríos deforestados formando colonias asociadas con *Acacia farnesiana*, *Malpighia*, *Prosopis laevigata*, *Rhynchelytrum repens*, compuestas y remanentes de la vegetación original, fresnos y encinos; en ocasiones la gente recurre a ellas para producir mezcal. La población de espina negra se colectó lejos del pueblo en cercas vivas de predios abandonados, asociada con *Acacias* y *Prosopis*; tiene poco uso en la producción de mezcal. La población de Marteño se colectó únicamente en cercas vivas que delimitaban terrenos para la agricultura y caminos del pueblo, asociada con vegetación secundaria. Se usa frecuentemente en la producción de mezcal. Finalmente la población de tripón se localizó muy escasa en cercas vivas de terrenos para la agricultura y en forma de colonias en predios abandonados, asociada con vegetación secundaria. Se aprovecha intensivamente para la producción de mezcal.

Dos poblaciones se localizaron en el municipio de San Agustín Amatengo, distrito de Ejutla: tobasiche se colectó en cercas vivas de terrenos para la agricultura y caminos del pueblo asociadas con *Acacia*, *Prosopis* y vegetación secundaria, tiene poco uso en la producción del mezcal (Fig. 7. D-F). La población de maguey San Martín se encontró muy escaso y se colectaron individuos en huertos abandonados y en linderos de terrenos de maíz

asociada con vegetación secundaria, tiene aprovechamiento intensivo en la producción de mezcal (Fig. 8. D-E).

Finalmente en la región Sierra Sur se colectaron dos poblaciones en los municipios de San Luis Amatlán y Xitlapehua, distrito de Miahuatlán: una correspondió a bicuishe (Fig. 7. G-I) y la otra a madrequishe (Fig. 8. A-C); ambas delimitaban terrenos para la agricultura y caminos del pueblo, otras formaban colonias dentro de predios abandonados en ambientes muy alterados. Ambas poblaciones son usadas en la producción de mezcal, aunque con mayor intensidad se utiliza la segunda.

Aunque este trabajo no contempló un estudio etnobotánico, se identificaron los diferentes usos y tipos de manejo en las poblaciones antes mencionadas, relevantes para comprender los resultados en la parte morfométrica y genética. Con base en las observaciones hechas, se puede considerar que las poblaciones de *Agave karwinskii* silvestres corresponden a cachitún del estado de Puebla, cuishe de Tlacolula, cirial y sierrudo de Ocotlán de los VCO. Las poblaciones con un manejo incipiente se consideraron: espina negra, marteño y tripón de Ocotlán, tobasiche de Ejutla de los VCO y, bicuishe de Miahuatlán de la Sierra Sur, todas con uso en la producción de mezcal, a excepción de espina negra que es ocasionalmente usada. Finalmente, las poblaciones de San Martín de Ejutla de los VCO y madrequishe de Miahuatlán de la Sierra Sur se consideraron con mayor uso y manejo en la producción de mezcal.

Los meses de floración en las diferentes poblaciones variaron de agosto a noviembre y la fructificación de octubre a febrero. En la población de San Martín no se obtuvo ningún dato reproductivo, debido a que siempre fueron cortados los quiotes para la cosecha y producción de mezcal y a la escasez de los individuos. En la población de tripón no se obtuvieron datos de su fructificación, al tener un desarrollo anormal de frutos.



Fig. 3. Poblaciones de *Agave karwinskii* silvestres. A-C. cactitún en Zapotitlán de las Salinas, Puebla, A. Planta en floración, B. Rosetas jóvenes, C. Flores. D-F. Maguey cuishe en San Pedro Totolapan, Tlacolula, VCO, D. Planta después de la fructificación, E. Roseta, F. Infrutescencia. G-I. Maguey sierrudo en Santa Catarina Minas, Ocotlán, VCO, G. Planta en fructificación formando una colonia, H. Rosetas, I. Flores.



Fig. 4. Poblaciones de *Agave karwinskii* en Santa Catarina Minas, Ocotlán, VCO. A-C. Maguey cirial (silvestre), A. Plantas con inflorescencia en colonia, B. Rosetas, C. Inflorescencia. D-F. Maguey espina negra (incipiente), D. Planta en floración, E. Rosetas, F. Inflorescencia. G-I. Maguey marteño (incipiente), G. Planta en floración, H. Roseta, I. Flores.

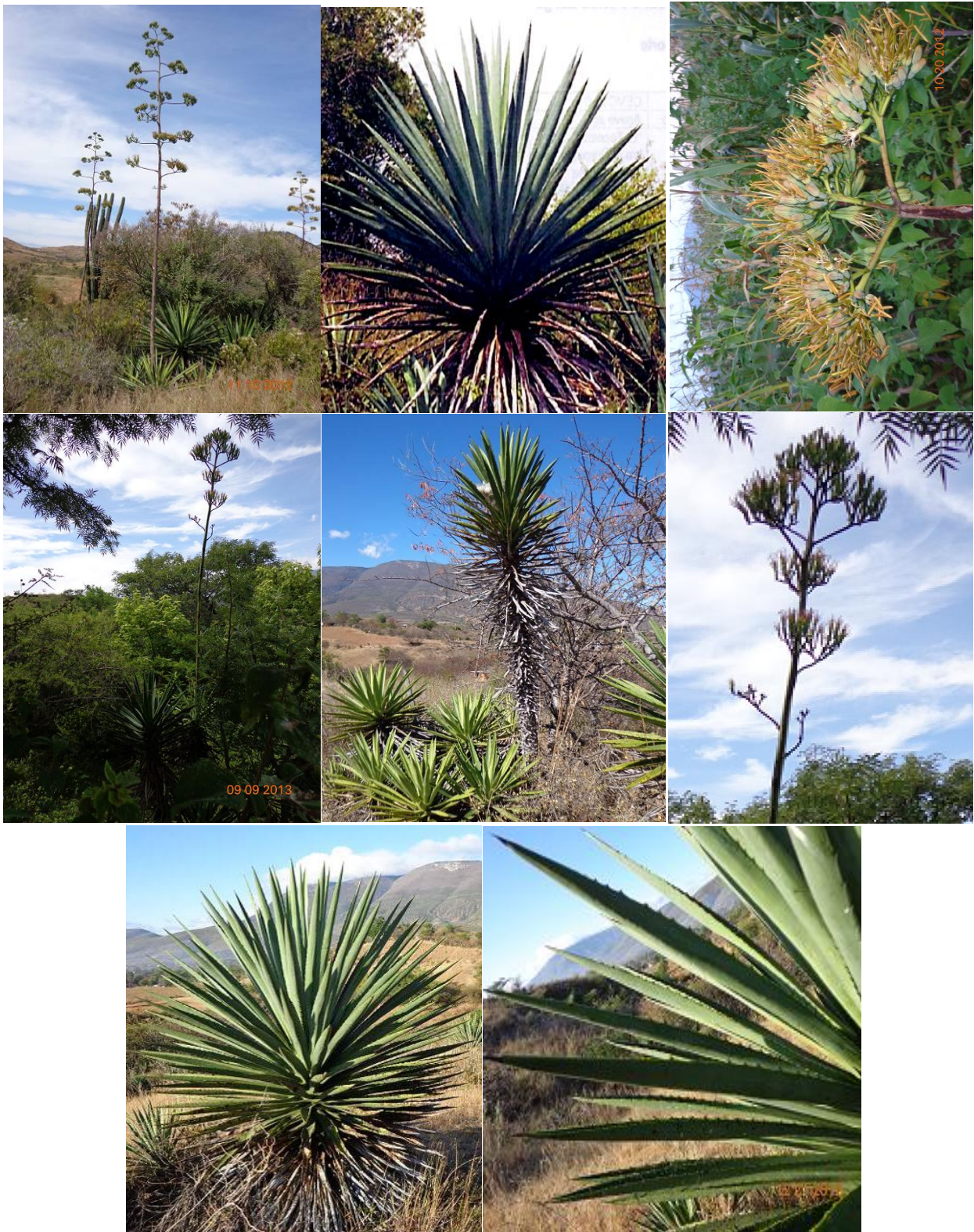


Fig. 5. Poblaciones de *Agave karwinskii* VCO. A-C. Maguey tripón (incipiente) en Santa Catarina Minas, Ocotlán, A. Plantas en floración, B. Roseta en cerco vivo, C. Flores. D-H. En San Agustín Amatengo, Ejutla. D-F. Maguey tobasiche (incipiente), D. Planta en floración a orilla de camino, E. Rosetas jóvenes en colonia, F. Inflorescencia. G-H. Maguey San Martín (con mayor uso y manejo en la producción de mezcal), H. hojas.



Fig. 6. Poblaciones de *Agave karwinskii* en San Luis Amatlán, Miahuatlán, Sierra Sur de Oaxaca. A-C. Magüey bicuishe (incipiente), A. Planta en floración a orilla de camino, B. Rosetas en cerco vivo, I. Flores. D-F. Magüey madrequishe (con mayor uso y manejo en la producción de mezcal), D. Planta con inflorescencia en botón, E. Roseta, F. Flores.

Análisis estadísticos

Análisis exploratorio de datos

Todos los caracteres analizados mostraron diferencias entre todas las poblaciones analizadas de *Agave karwinskii* a partir de las diferencias de las medias poblacionales de las muestras de los 51 caracteres. Algunos mostraron valores atípicos en el conjunto de datos de un carácter en una misma población (Anexo 2).

Análisis de correlación de las variables

Se identificaron catorce caracteres altamente correlacionados de los 51 que fueron analizados (cuadro 3). La matriz básica de datos se redujo a 37 caracteres, con los cuales se realizaron los siguientes análisis fenético, de componentes principales y canónico de funciones discriminantes.

Cuadro 3. Variables altamente correlacionadas.

	Caracteres
1	Forma de la hoja
2	Distancia entre el ancho y la base de la hoja
3	Grosor en la base de la hoja
4	Distancia entre la base de la espina y el primer diente
5	Ordenes de ramificación
6	Número de rama más larga de la inflorescencia
7	Longitud del pedicelo (mm)
8	Longitud del ovario (mm)
9	Longitud del tubo del perianto (mm)
10	Longitud del tépalo externo (mm)
11	Longitud del tépalo interno (mm)
12	Inserción de los filamentos (mm)
13	Longitud del estilo (mm)
14	Proporción de semillas maduras (mm)

Análisis de Agrupamiento Fenético

El fenograma de distancias morfológicas de la Fig. 7 mostró la separación de dos grupos poblacionales (A y B) a un bajo nivel de similitud de -0.15.

El primero con 0.10 reúne a las poblaciones con manejo incipiente y con mayor grado de manejo y uso en la producción de mezcal. A su vez se divide en dos subgrupos (A1 y A2). A1 con menor nivel de similitud incluye dos conjuntos poblacionales (A1.1 y A1.2): A1.1 es el más alejado por su bajo nivel de similitud, agrupa a la población de bicuishe considerada incipiente, asociada con cuatro individuos de sierrudo considerados silvestres y A1.2 reúne a las poblaciones con mayor grado de manejo y uso en la producción de mezcal; madrequishe y San Martín de mayor similitud cada una y similares entre sí. Enseguida de estas dos, se aísla la población de tobasiche considerada incipiente que se muestra con bajo nivel de similitud.

El subgrupo A2 está conformado por dos conjuntos de poblaciones consideradas incipientes; primero con baja similitud está marteño con un individuo aislado de sierrudo (silvestre), enseguida se asocia la población de tripón que muestra mayor similitud.

El grupo (B) se separa del grupo (A) con un valor de 0.12 de similitud morfológica y corresponde a cuatro poblaciones consideradas silvestres, se subdividen en tres conjuntos poblacionales (B1.1, B1.2 y B1.3). En B1.1 se encuentra la población de cachitún de ZSP, es la más alejada respecto a las poblaciones de los VCO. En B1.2, se agrupa la población de cuishe con dos individuos aislados de sierrudo. En B1.3, con mayor similitud se agrupa la población de cirial y espina negra con un individuo aislado de marteño (éste último considerado incipiente).

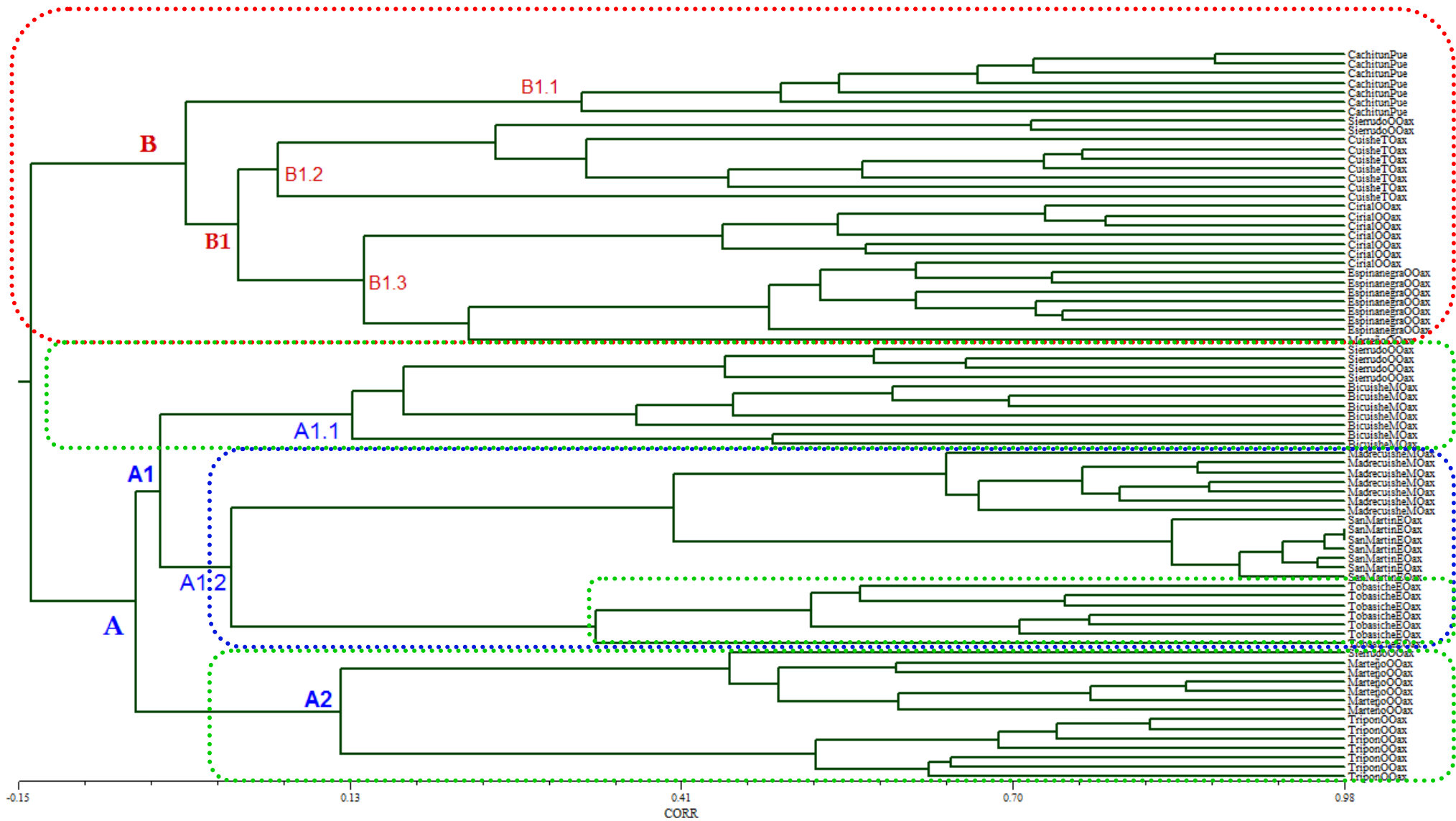


Fig. 7. Fenograma de distancias morfológicas de once poblaciones de *Agave karwinskii* de diferentes localidades del estado de Oaxaca y Puebla, a partir de 37 estados de carácter. El coeficiente utilizado fue el de correlación y el agrupamiento se hizo con el método UPGMA.

Silvestres
Incipientes
Con mayor uso y manejo en la producción de mezcal

Análisis de Componentes Principales

Los primeros dos componentes explicaron un 31 % de la varianza. El primer componente reunió el 21% y el segundo el 10% (Cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentaje de la variación acumulada en los componentes principales 1 y 2.

Componente	Valor Eigen	Porcentaje	Porcentaje acumulado
1	7.72276159	20.8723	20.8723
2	3.84630879	10.3954	31.2678

Las variables de los componentes 1 (C1) y 2 (C2) con máxima variación se muestran en el Cuadro 5. El primer componente con 21% de la variación explicada denota únicamente variables con relación negativa: altura y diámetro de la roseta, longitud y ancho de la hoja, número y color de los dientes, perímetro del pedúnculo en la base, longitud total de la inflorescencia, número de ramas de la inflorescencia y ancho de los tépalos interno y externo (sombreados en color amarillo).

El segundo componente con el 10% de la variación reunida, se encuentran las variables con relación positiva: longitud y distancia entre dientes, longitud de la rama más larga de la inflorescencia, longitud y ancho de la bráctea estéril de la inflorescencia. También abarcó algunas con relación negativa: forma de la inflorescencia, la longitud y el ancho de las semillas.

Cuadro 5. Caracteres con máxima variación de los componentes 1 y 2.

Caracteres	Peso de las variables del C1	Peso de las variables del C2
Altura del tallo cm	0.3903	0.0671
Perímetro del tallo cm.	-0.1087	-0.4779
Altura de la roseta cm.	-0.5507	0.2655
Diámetro de la roseta cm.	-0.7736	0.2806
Longitud de la hoja cm.	-0.8506	0.2669
Ancho en la parte media la hoja cm.	-0.7386	0.0308
Perfil de la lámina	0.3687	0.0911
Color de la hoja	-0.4237	-0.1283
Ancho en la base de la hoja	-0.434	-0.0442
Número de hojas	-0.1924	0.0717
Longitud de la espina cm	0.4101	0.0524
Número de dientes	-0.6583	-0.3201
Color de dientes	-0.678	-0.0536
Ancho de dientes en su base	0.2412	0.3531
Longitud de los dientes mm.	-0.2892	0.4933
Distancia entre dientes mm.	-0.2396	0.447
Diámetro de la espina mm.	-0.2518	-0.1863
Longitud total de la inflorescencia cm.	-0.615	0.3187
Forma de la inflorescencia	0.0086	-0.5763
Perímetro del pedúnculo en la base cm.	-0.5658	-0.1429
Relación pedúnculo-panícula	0.048	0.3026
Longitud de la rama más larga de la inflorescencia cm.	-0.4923	0.485
Número de ramas de la inflorescencia	-0.6201	0.0129
Longitud de la bráctea estéril de la inflorescencia cm.	-0.3581	0.5405
Ancho de la bráctea estéril de la inflorescencia cm.	-0.3599	0.4803
Diámetro del ovario mm.	-0.3394	-0.2615
Diámetro del tubo del perianto mm.	-0.5176	-0.3074
Ancho del tépalo externo mm.	-0.6306	-0.2044
Ancho del tépalo interno mm.	-0.6155	-0.2017
Longitud del filamento mm.	-0.3761	-0.0789
Longitud de la antera mm.	-0.3829	0.1642
Ancho de la antera mm.	-0.3446	-0.0361
Longitud de la cápsula cm.	0.2802	-0.3138
Diámetro de la capsula cm.	-0.2128	-0.3834
Longitud de la semilla mm.	-0.2649	-0.6021
Ancho de la semilla mm.	-0.422	-0.5715
Número total de semillas fértiles	-0.3367	-0.4008

En la Fig. 8, se observa la distribución de seis grupos morfológicos discretos en relación con las variables de los componentes 1 y 2 que reúnen el mayor porcentaje de la variación acumulada.

El componente uno divide, por un lado a las poblaciones silvestres de ZSP (cachitún) y de los VCO (cuishe, sierrudo y cirial) ubicadas en la parte superior e inferior derecha de los cuadrantes respecto a las poblaciones con manejo incipiente (marteco, tripón, tobasiche y bicuishe) y de aquellas con mayor uso y manejo en la producción de mezcal ubicadas en la parte izquierda (San Martín y madrequishe). Aunque en la parte de las poblaciones silvestres de los VCO ocurre una mezcla con algunas formas incipientes; espina negra, marteco y bicuishe.

El componente dos, a su vez separa a la población silvestre de cachitún de ZSP de las poblaciones silvestres de los VCO. Después separa a las poblaciones con manejo incipiente (tripón, tobasiche, algunos martecos) y con mayor grado de uso en la producción de mezcal de los VCO (San Martín) ubicadas en la parte superior izquierda entre las que pertenecen a la Sierra Sur en la parte inferior izquierda (bicuishe y madrequishe).

De manera general, las poblaciones silvestres se distinguen por su carácter vegetativo de menor tamaño de rosetas, menor longitud y ancho de las hojas, menor número de dientes de color negro. Contrario a lo que representan las poblaciones incipientes y con mayor grado de uso y manejo en la producción de mezcal que poseen mayor tamaño de los caracteres vegetativos, mayor número de dientes de color pardo rojizo, mayor grosor del perímetro del pedúnculo en la base, mayor longitud de las inflorescencias y mayor tamaño de estructuras florales (cuadro 6).

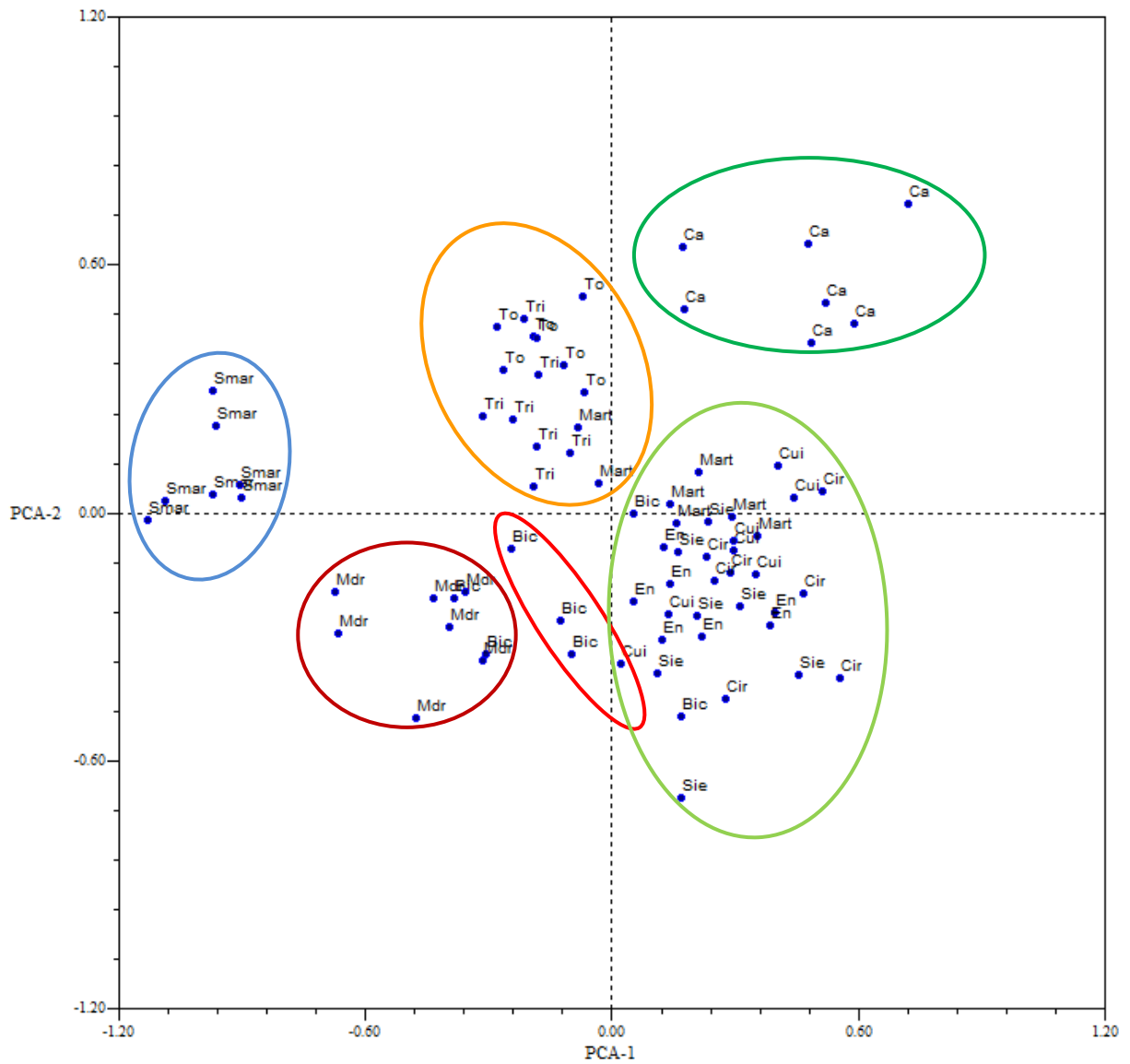


Fig. 8. Patrón de agrupamiento de las once poblaciones con base en las variables de los componentes principales 1 y 2 de máxima variación. Ca: cachitún, Sie: sierrudo, Per: cirial, Mart: marteño, En: espina negra, Tri: tripón, Bic: bicuishe, Mdr: madrequishe, To: tobasiche, Smar: San Martín, Cui: cuishe

Cuadro 6. Promedios de las medidas de los caracteres con mayor peso en los componentes principales 1 y 2.

Caracteres del 1er CP	Poblaciones silvestres				Poblaciones incipientes con poco uso o frecuente en la producción de mezcal					Poblaciones con mayor uso y manejo en la producción de mezcal	
	Cachitún ZSP	Cuishe VCO	Sierrudo VCO	Cirial VCO	Espina negra VCO	Marteño VCO	Tripón VCO	Tobasiche VCO	Bicuishe S. Sur	San Martín VCO	Madrecuishe Sierra Sur
Altura de la roseta (cm)	76	82	92	82	110	122	81	122	126	165	126
Diámetro de la roseta (cm)	113	118	97	88	66	126	126	144	125	159	199
Longitud de la hoja (cm)	51	56	50	43	51	51	70	63	58	83	87
Ancho de la hoja en la parte media (cm)	2	5	6	5	6	5	6	6	6.5	8	8
Número de dientes	21	27	32	25	22	17	21	24	36	33	44
Color de dientes	negros	negros	negros	negros	negros	Pardo rojizos	Pardo rojizos	negros	Pardo rojizos y negros	Pardo rojizos	Pardo rojizos
Perímetro del pedúnculo en la base (cm)	12	12	24	17	14	24	23	12	24	--	24
Longitud total de la inflorescencia											
Número de ramas de la inflorescencia	27	36	27	20	14	38	28	41	29	--	38
Ancho de los sépalos internos (mm)	4	4	4	4	4	4	5	4	5		6
Ancho de los sépalos externos (mm)	5	5	4	4	4	4	6	5	5	--	6
Caracteres del 2do CP											
Longitud de dientes (mm)	4	3	4	3	3	3	5	4	3	6	4
Distancia entre dientes (mm)	13	14	12	13	12	25	28	20	9	17	17
Long. de la bráctea estéril cm	16	7	18	10	9	20	19	15	14	--	16
Ancho de la bráctea estéril cm	5	5	6	5	5	8	6	7	7	--	6
Forma de la inflorescencia	oblonga	romboide	romboide	oblonga	oblonga	romboide	romboide	oblonga y romboide	romboide	--	romboide
Long., de las semillas (mm)	8	9	7	9	9	9	--	6	7	--	10
Ancho de las semillas (mm)	6	7	6	7	6	7	--	5	6	--	7

Análisis Canónico de Funciones Discriminantes

En las dos primeras funciones discriminantes se acumuló 68% de la variación, la primera con 49% y la segunda con 19 % (Cuadro 7).

Cuadro 7. Porcentaje de la variación acumulada en las funciones discriminantes 1 y 2.

Función	Valor Eigen	% de varianza	% acumulado	Correlación Canónica
1	95.676	49.4	49.4	0.995
2	36.067	18.6	68.1	0.986

En la primera función discriminante (FDC1) las variables positivas con mayor peso fueron ancho y color de la hoja, ancho y distancia entre dientes, forma de la inflorescencia y la relación pedúnculo panícula, mientras que como variable negativa se encuentra la altura de la roseta (Cuadro 8).

En la segunda función discriminante (FDC2) las variables positivas con mayor peso son la altura de la roseta, ancho en la base de la hoja, longitud de la bráctea estéril de la inflorescencia, longitud de la antera, diámetro de la cápsula y longitud de la semilla. Las variables negativas son la longitud de la hoja, forma de la inflorescencia, perímetro del pedúnculo en la base y longitud de la cápsula (Cuadro 8).

Cuadro 8. Variables de las funciones discriminantes 1 y 2 con mayor porcentaje de variación.

Caracteres	FDC1	FDC2	Caracteres	FDC1	FDC2
Altura del tallo cm.	0.128	-0.12	Ancho del tépalo interno mm.	-0.47	0.013
Perímetro del tallo cm.	0.371	-0.013	Longitud del filamento mm.	0.058	-0.111
Altura de la roseta cm.	-0.927	0.522	Longitud de la antera mm.	-0.077	1.424
Diámetro de la roseta cm.	-0.056	0.309	Ancho de la antera mm.	0.161	0.506
Longitud de la hoja cm.	0.444	-0.618	Longitud de la cápsula cm.	0.051	-1.11
Ancho de la hoja parte media cm.	0.609	0.076	Diámetro de la cápsula cm.	-0.011	0.506
Color de la hoja	1.818	-0.341	Longitud de la semilla mm.	0.354	1.402
Ancho en la base de la hoja cm.	0.12	1.044	Ancho de la semilla mm.	0.157	-0.375
Número de hojas	-0.296	-0.196	Número total de semillas fértiles	0.062	-0.085
Longitud de la espina cm.	-0.17	-0.198			
Número de dientes	0.178	0.383			
Color de dientes	0.402	1.27			
Ancho de los dientes	0.71	0.29			
Longitud de los dientes mm.	-0.201	-0.9			
Distancia entre dientes mm.	0.709	-0.453			
Diámetro de la espina mm.	-0.126	-0.333			
Longitud total de la inflorescencia cm.	0	-0.44			
Forma de la inflorescencia	0.686	-0.529			
Perímetro del pedúnculo en la base cm.	-0.507	-0.592			
Relación pedúnculo panícula	1.135	-0.175			
Longitud de la rama más larga de la inflorescencia cm.	0.344	0.606			
Número de ramas de la inflorescencia	0.02	0.346			
Longitud de la bráctea estéril de la inflorescencia cm.	0.287	1.025			
Ancho de la bráctea estéril de la inflorescencia cm.	-0.338	-0.327			
Diámetro del ovario mm.	0.092	-0.104			
Diámetro del tubo del perianto mm.	-0.112	0.126			
Ancho del tépalo externo mm.	0.498	-0.247			

En la Fig. 9, en un espacio bidimensional, los caracteres con mayor peso de las funciones canónicas 1 y 2 demuestran que es significativo el agrupamiento de los individuos respecto a cada una de las poblaciones previamente consideradas *a priori*, a partir de los nombres comunes que manejan pobladores y productores de los VCO y de la Sierra Sur. De acuerdo con la lambda de Wilks obtenida, el 81.8% de los individuos correspondieron a las poblaciones previamente establecidas. En este caso los grupos (centroides) tienen valores igual a 0, lo que indica una gran similitud entre los grupos formados (Cuadro 9). Por lo que, cada población resultó ser significativamente distinta (Cuadro 10). Estos resultados coincidieron con el análisis de componentes principales, donde las poblaciones consideradas incipientes y con mayor uso y manejo en la producción de mezcal se separan de las formas silvestres, solo que ahora en una mínima cantidad de caracteres con mayor porcentaje de variación acumulada comparada con los componentes principales 1 y 2.

La primera función discriminante en la parte inferior derecha agrupa a dos poblaciones silvestres, cachitún de ZSP y cirial del distrito de Ocotlán de los VCO. Enseguida se agrupa una población considerada incipiente, tobasiche del distrito de Ejutla (VCO). En la otra parte inferior izquierda de esta función se ubican dos poblaciones; una considerada incipiente, espina negra y una población considerada silvestre, sierrudo, ambas del distrito de Ocotlán de los VCO.

En la parte superior izquierda de la segunda función discriminante, se agrupan por un lado tres poblaciones; una considerada silvestre, cuishe de Tlacolula y dos son consideradas incipientes: marteño de Ocotlán de los VCO y bicuishe de Miahuatlán de la Sierra sur. Y, en la parte superior derecha de este componente se agrupa la población con mayor uso en la producción de mezcal, madrequishe. Las otras poblaciones de tripón (incipiente) y San Martín (con mayor uso en la producción de mezcal) se mostraron dispersos. Tripón con cierta similitud con las poblaciones incipientes y silvestres. San Martín con individuos similares a tobasiche, tripón y madrequishe.

Básicamente, ambas funciones discriminantes delimitan la separación de la población de madrequishe (con mayor uso y manejo en la producción de mezcal) del resto de las poblaciones incipientes y silvestres. Madrequishe a partir de la primera función discriminante posee una altura mayor de rosetas, hojas de color glauco con mayor longitud y ancho, la forma de la inflorescencia es romboide (aunque al igual con formas incipientes)

sin embargo son de mayor altura. A partir de la segunda función discriminante posee mayor grosor en el diámetro del pedúnculo con brácteas de mayor tamaño y caracteres reproductivos de mayor tamaño a diferencia de las demás formas. Aunque dicho análisis marca los grupos morfológicos discretos formados como significativamente distintos, existe gran similitud morfológica entre las poblaciones silvestres de los VCO con las formas incipientes. Por decir, cirial y sierrudo (silvestres) por un lado se muestran similares con espina negra y tobasiche (incipientes) son poblaciones que comparten menor altura de rosetas, hojas verde-amarillas, menor distancia entre dientes, menor tamaño de brácteas y con inflorescencias oblongas. Por otro lado, cuishe (silvestre) se muestra similar con marteño y bicuishe (incipientes), poseen mayor altura de rosetas, color verde de las hojas, mayor distancia entre dientes, mayor tamaño de las brácteas y forma de las inflorescencias romboides.

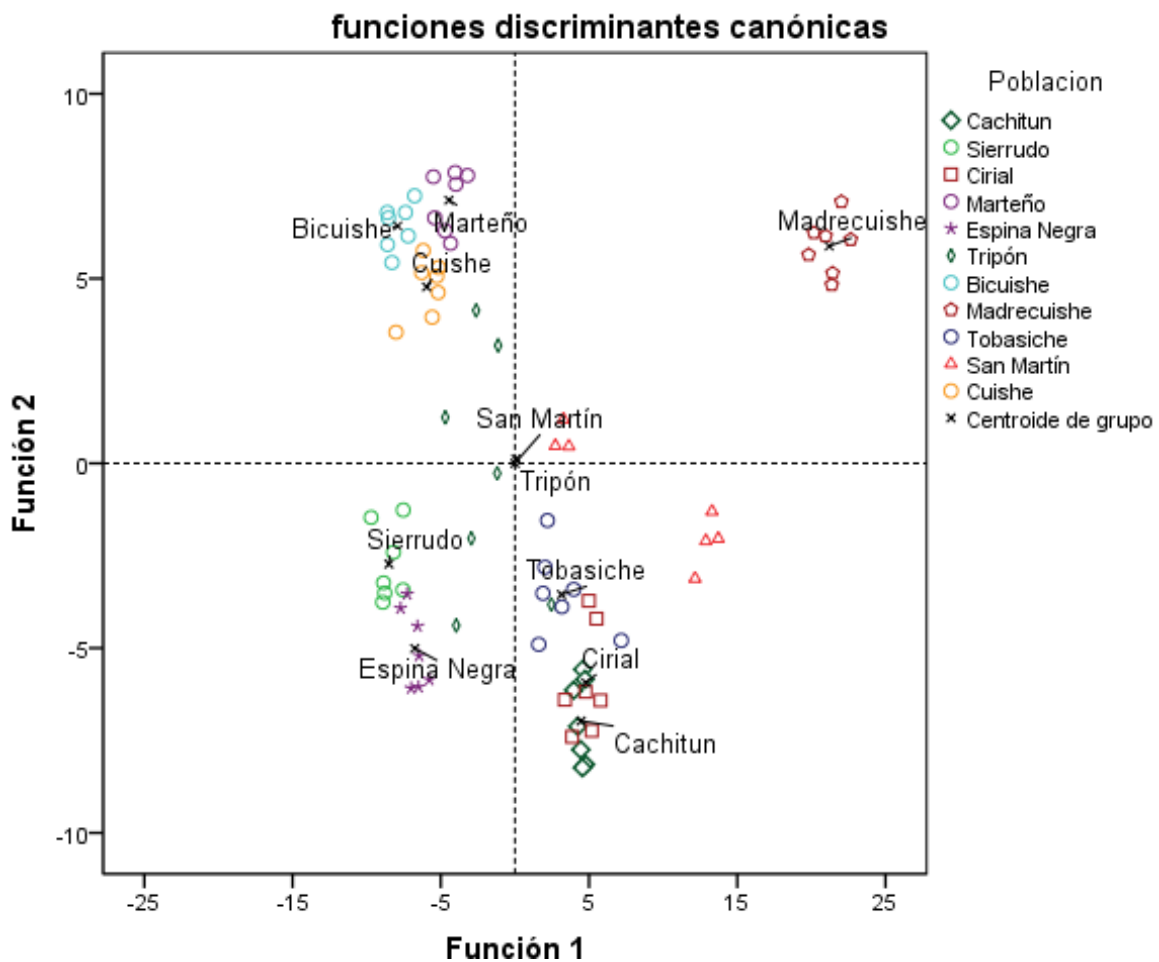


Fig. 9. Agrupamiento de los individuos de cada población a partir de los caracteres de las funciones discriminantes 1 y 2 con mayor peso.

Cuadro 9. Valores de lambda de Wilks de cada población analizada.

Contraste de las funciones	Lambda de Wilks	Chi-cuadrado	gl	Sig.
1 a la 8	.000	850.559	288	.000
2 a la 8	.000	669.990	245	.000
3 a la 8	.000	527.287	204	.000
4 a la 8	.000	397.901	165	.000
5 a la 8	.001	293.792	128	.000
6 a la 8	.006	204.347	93	.000
7 a la 8	.044	123.257	60	.000
8	.285	49.547	29	.010

Cuadro 10. Agrupamiento significativo de los individuos en sus respectivas poblaciones.

Población			Grupo de pertenencia pronosticado				
			cachitún	sierrudo	cirial	martelño	espina negra
Original	Recuento	cachitún	7	0	0	0	0
		sierrudo	0	7	0	0	0
		cirial	0	0	7	0	0
		martelño	0	0	0	7	0
		espina negra	0	0	0	0	7
		bicuishe	0	0	0	0	0
		madrecuishe	0	0	0	0	0
		tobasiche	0	0	0	0	0
		cuishe	0	0	0	0	0
		%	cachitún	100.0	.0	.0	.0
	sierrudo	.0	100.0	.0	.0	.0	
	cirial	.0	.0	100.0	.0	.0	
	martelño	.0	.0	.0	100.0	.0	
	Espina Negra	.0	.0	.0	.0	100.0	
	bicuishe	.0	.0	.0	.0	.0	
	madrecuishe	.0	.0	.0	.0	.0	
	tobasiche	.0	.0	.0	.0	.0	
	cuishe	.0	.0	.0	.0	.0	
			Grupo de pertenencia pronosticado				Total
			bicuishe	madrecuishe	tobasiche	cuishe	
Original	Recuento	cachitún	0	0	0	0	7
		sierrudo	0	0	0	0	7
		cirial	0	0	0	0	7
		martelño	0	0	0	0	7
		Espina Negra	0	0	0	0	7
		bicuishe	7	0	0	0	7
		madrecuishe	0	7	0	0	7
		tobasiche	0	0	7	0	7
		cuishe	0	0	0	7	7
		%	Ccachitun	.0	.0	.0	.0
	sierrudo	.0	.0	.0	.0	100.0	
	cirial	.0	.0	.0	.0	100.0	
	martelño	.0	.0	.0	.0	100.0	
	Espina Negra	.0	.0	.0	.0	100.0	
	bicuishe	100.0	.0	.0	.0	100.0	
	madrecuishe	.0	100.0	.0	.0	100.0	
	tobasiche	.0	.0	100.0	.0	100.0	
	cuishe	.0	.0	.0	100.0	100.0	

Cuadro 11. Promedios de los caracteres con mayor peso de las funciones discriminantes 1 y 2

Caracteres de la 1era FD	Poblaciones silvestres				Poblaciones incipientes con poco uso o frecuente en la producción de mezcal					Poblaciones con mayor uso y manejo en la producción de mezcal	
	Cachitún ZSP	Cuishe VCO	Sierrudo VCO	Cirial VCO	Espina negra VCO	Marteño VCO	Tripón VCO	Tobasiche VCO	Bicuishe S. Sur	San Martín VCO	Madrecuishe Sierra Sur
Altura de la roseta (cm)	76	82	92	82	110	122	81	122	126	165	126
Ancho de la hoja en la parte media (cm)	2	5	6	5	6	5	6	6	6.5	8	8
Color de la hoja	Verde amarillo	verde	verde	Verde amarillo	verde	verde	verde	Verde amarillo y glauco	verde	Verde y glauco	glauco
Ancho de dientes en la base (mm)	9	5	4	3	3	5	5	4	5	4	3
Distancia entre dientes (mm)	13	14	12	13	12	25	28	20	9	17	17
Forma de la inflorescencia	oblonga	romboide	romboide	oblonga	oblonga	romboide	romboide	oblonga y romboide	romboide	--	romboide
Longitud del pedúnculo y panícula (m)	1.9 y 1.32	1.83 y 1.60	1.84 y 1.92	2.50 y 1.05	2.40 y 0.74	1.97 y 1.80	2.36 y 1.70	1.94 y 2.01	1.81 y 2.13	--	2.05 y 2.50
Caracteres de la 2da FD											
Ancho de la hoja en la base (cm)	2	4	4	2	4	5	5	5	5	5	7
Perímetro del pedúnculo en la base (cm)	12	12	24	17	14	24	23	12	24	--	24
Long., de la bráctea estéril cm	16	7	18	10	9	20	19	15	14	--	16
Long., de la antera mm	20	25	18	21	17	26	23	23	26		25
Long., de la cápsula cm	6	5	5	5	6	5	--	4	5	--	5
Diámetro de la cápsula cm	5	8	7	8	7	7	--	6	7	--	8
Long., de las semillas mm	8	9	7	9	9	9	--	6	7	--	10

Análisis genético AFLP

Determinación de la calidad de ADN en geles de agarosa. Fig. 10.

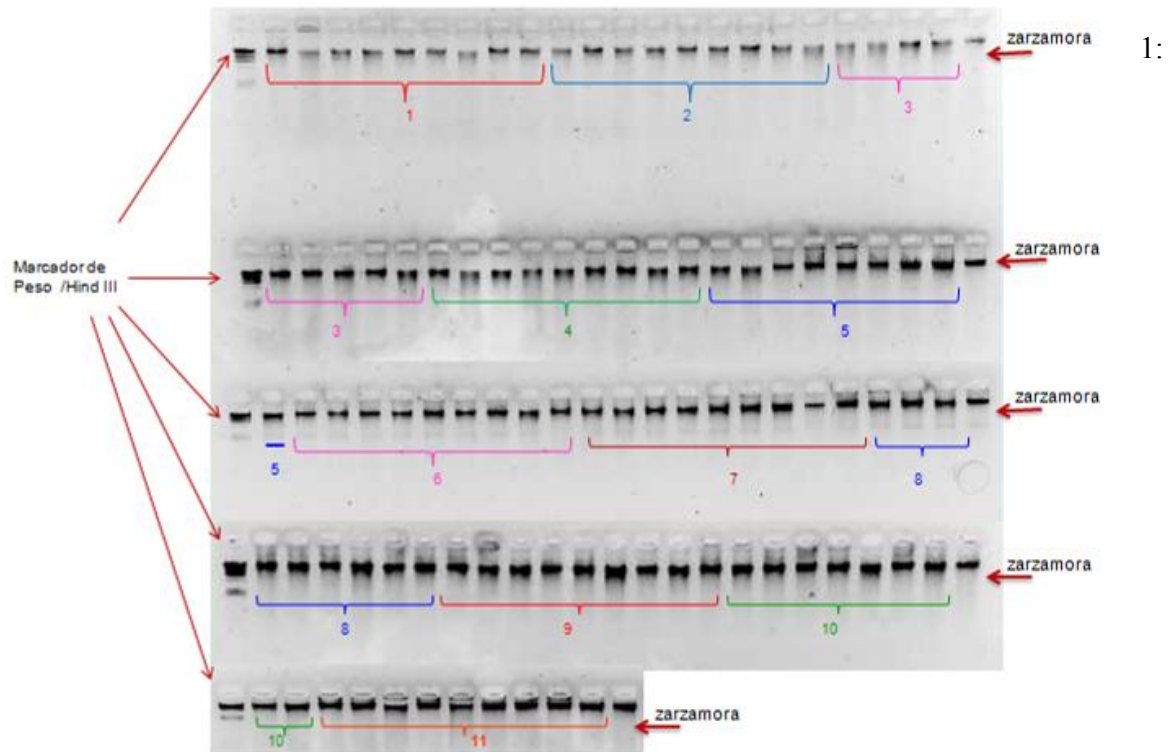


Fig. 10. Extracción y calidad de ADN de las 99 muestras de *Agave karwinskii* en gel de agarosa. 1, cachitún. 2, sierrudo. 3, cirial. 4, marteño. 5, espina negra. 6, tripón. 7, Bicuishe. 8, madrequishe. 9, tobasishe. 10, San Martín. 11, cuishe.

Patrón de fragmentos de AFLP's obtenidos en las muestras de *Agave karwinskii*. Fig 11.

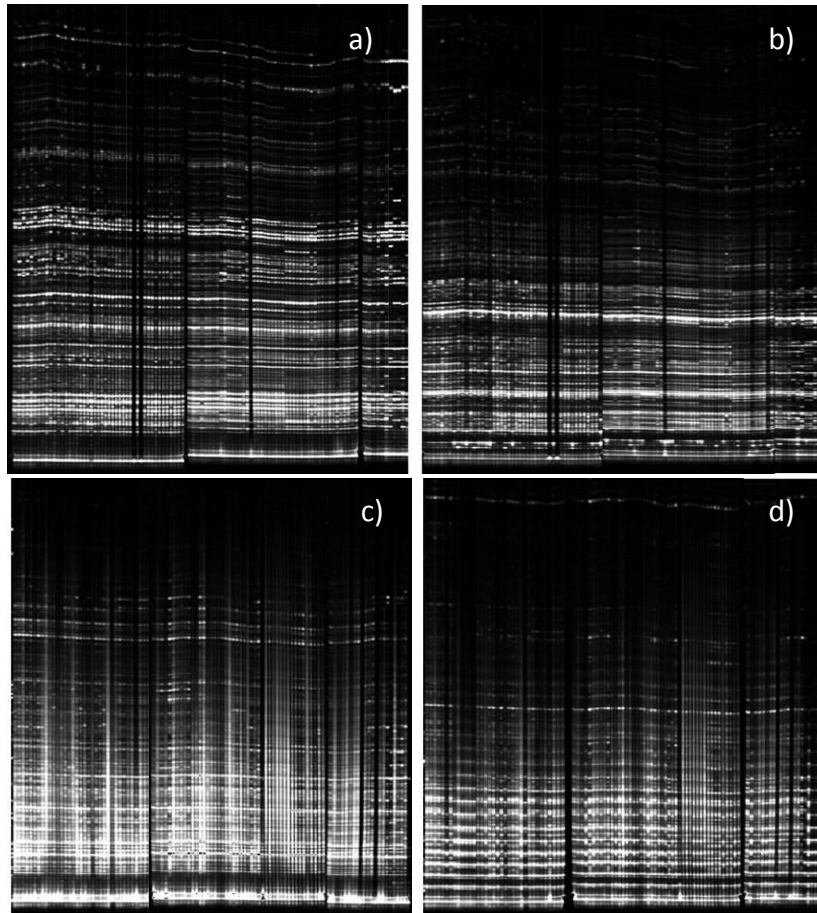


Figura 11. Amplificación selectiva de la longitud de las bandas polimórficas de las once poblaciones de *Agave karwinskii* obtenidas en gel de poliacrilamida. Combinación de *primers*. a) M+ACCC/E+ACC 700nm y b) M+ACCC/E+AGG 800nm. c) M+ACGT/E+ACC 700nm y d) M+ACGT/E+AGG 800nm.

Lectura de las bandas

Se leyeron las bandas y se eliminaron aquellas que presentaron datos perdidos. Después se generó una matriz binaria en formato excell, se asignó el número 1 a la presencia y un 0 a la ausencia de la banda. Enseguida se generó una matriz de similitud con el coeficiente de Nei y Li/Dice (1979). Se construyó el dendograma con el método UPGMA y el software FreeTree vers. 0.9.1 (Pavlíček *et al.*, 1999). Se aplicó un remuestreo de 5000 replicas y se obtuvieron los valores de soporte de cada rama con el método Bootstrap. Se evaluó el índice de similitud genética y el porcentaje polimórfico a nivel interpoblacional e intrapoblacional. El porcentaje polimórfico se obtuvo dividiendo el número de bandas polimórficas presentes entre el número total de bandas leídas y se multiplico por el 100%.

Agrupamiento genético

Se obtuvo el fenograma de distancias genéticas (Fig. 12). Se observaron dos grupos; el más distante está conformado por dos individuos de *Agave angustifolia* que corresponde a la especie comparativa (conjunto A). El segundo grupo (B) está conformado por las once poblaciones de *Agave karwinskii* clasificados en once subconjuntos.

El grupo B mostró un valor bootstrap de 100%, lo que significó que la clasificación respecto a los once subconjuntos conformados de *Agave karwinskii* fue robusta. En cada uno de ellos los valores fueron distintos. Los menos representativos corresponden a los subconjuntos enumerados del uno al cuatro, incluyen a las poblaciones silvestres con baja similitud genética. El primero contiene tres individuos de sierrudo y uno de cirial de Ocotlán (VCO) entremezclados. El segundo lo forman cinco individuos de cuishe de Totolapa (VCO). El tercero lo forman cuatro individuos de cachitún, y el cuarto subconjunto lo forman tres individuos de cachitún con cuatro individuos de sierrudo y tres de cirial de los VCO. Sólo cuishe y cachitún mostraron valores bootstrap de 93% y 100% respectivamente.

Enseguida se conformaron las poblaciones con valores bootstrap mayores a 50% pero menores a 99%, corresponden a los subconjuntos del cinco al ocho con poblaciones incipientes, excepto por el subconjunto seis que reúne a individuos silvestres. El quinto lo conforma la población de marteño con 95% bootstrap. El sexto reúne cuatro individuos de cirial y uno de sierrudo. El subconjunto siete lo conforman dos conjuntos poblacionales, uno con baja similitud genética es espina negra (90% bootstrap) y el otro con mayor similitud es tobasiche (99% bootstrap). El subconjunto ocho lo conforma la población de tripón con 99% valor bootstrap.

Los subconjuntos nueve, diez y once corresponden a las poblaciones con valores bootstrap de 100%. El nueve lo conforma San Martín de Ejutla (VCO). El diez son tres individuos de cuishe y el once lo conforman dos poblaciones, madre cuishe y bicuishe de Miahuatlán (Sierra Sur). Los tres subconjuntos poseen la mayor similitud genética y son consideradas con mayor uso y manejo en la producción de mezcal, excepto por bicuishe que tiene menos uso que estas dos y los individuos de cuishe que son incipientes y se desconoce su uso en la producción de la bebida.



Fig. 12. Fenograma de distancias genéticas con marcadores AFLP's en once poblaciones de *Agave karwinskii* mediante el índice de similitud de Nei y Li (1979), con el método de agrupamiento UPGMA. Los números en los nodos indican los valores Bootstrap. Silvestres: Incipientes. Con mayor uso y manejo en la producción de mezcal.

Índices de similitud genética y porcentaje polimórfico

En el cuadro 12 se muestra el índice de similitud genética. Varió interpoblacionalmente de 0.914 a 0.948 y a nivel intrapoblacional osciló de 0.928 a 1.0. El nivel de variación genética es bajo, sin embargo, se puede observar una mayor distancia entre las poblaciones silvestres de sierrudo, cirial, cuishe, cachitún y dos poblaciones incipientes, marteño y espina negra que se diferencian de aquellas que representan la mayor similitud genética como son: tripón (incipiente), San Martín (con mayor uso en la producción de mezcal) y bicuishe (incipiente). Así como de aquellas con máxima similitud genética; tobasiche de Ejutla (incipiente) y madrequishe de Miahuatlán (con mayor uso en la producción de mezcal). El porcentaje polimórfico es variable en cada población, lo que coincide en que cada población sea distinta.

Cuadro 12. Índices de similitud genética y porcentaje polimórfico en las once poblaciones de *Agave karwinskii*.

Poblaciones	índice de similitud genética entre poblaciones	Índice de similitud genética por cada población	Número de bandas analizadas	Número de bandas polimórficas	Porcentaje de polimorfismos
madrequishe	Poblaciones manejadas 0.938 a 0.948	0.980 a 1.0	173	21	12 %
bicuishe		0.960 a 0.980	179	41	23 %
cuishe		0.993 a 0.998	186	70	38%
san martín		0.975 a 0.99	175	37	20 %
tripón		0.96 a 0.99	174	39	22 %
tobasiche		0.975 a 1.0	178	36	21 %
espina negra	Poblaciones silvestres 0.914 a 0.938	0.960 a 0.980	186	68	36 %
marteño		0.946 a 0.985	175	97	55%
cachitún		0.950 a 0.999	185	72	39%
cuishe		0.945 a 0.990	186	70	38 %
Cirial		0.955 a 0.980	189	97	51%
sierrudo		0.928 a 0.945	192	106	55%
Total	0.914 a 0.948		193	145	75%

Análisis del nivel de ploidía por Citometría de Flujo

Lectura del patrón estándar y de las once poblaciones de *Agave karwinskii*.

La lectura de *Agave tequilana* ‘Azul’ demostró que es diploide con la siguiente escala: velocidad = 2, gain = 540, lectura máxima = 999 y lectura mínima = 65. (Fig. 13. a). Para las once poblaciones de *Agave karwinskii* se obtuvieron niveles diploides en cuatro poblaciones: dos de ellas consideradas silvestres; sierrudo y cirial de Ocotlán (Fig. 13. b y c) y en dos poblaciones consideradas incipientes; espina negra y marteño de Ocotlán (Fig. 13. d y e). Estas poblaciones presentaron una relación de 2:2 respecto a *Agave tequilana* ‘Azul’. Fueron leídas a una escala de velocidad = 2, gain = 504, lectura máxima = 944 y mínima = 65.

Se obtuvieron niveles triploides: en tres individuos de la población silvestre de sierrudo (Fig. 13. f), en la población de cuishe de Tlacolula considerada silvestre (Fig. 13. g) y en dos poblaciones de Ejutla: tobasiche considerada incipiente y san Martín considerada con mayor uso y manejo en la producción de mezcal (Fig. 14. h-i). Presentaron una relación de 3:2 respecto a *Agave tequilana* ‘Azul’. Las escalas fueron: velocidad = 2, gain = 504, lectura máxima = 944 y mínima = 65.

Tres poblaciones correspondieron a niveles tetraploides, dos son incipientes; tripón de Ocotlán y bicuishe de Miahuatlán y una población con mayor uso en la producción de mezcal, madrequishe de Miahuatlán (Fig. 14. k, l y m). Presentaron una relación 4:2 respecto al patrón estándar de *Agave tequilana* ‘Azul’. Evaluadas a una escala de velocidad = 2, gain = 504, lectura máxima = 944 y lectura mínima = 65.

De la población de cachitún de ZSP, considerada silvestre, no obtuvimos una respuesta clara de si corresponde a un nivel triploide o tetraploide, aun cuando se hicieron varias repeticiones (Fig. 14. j).

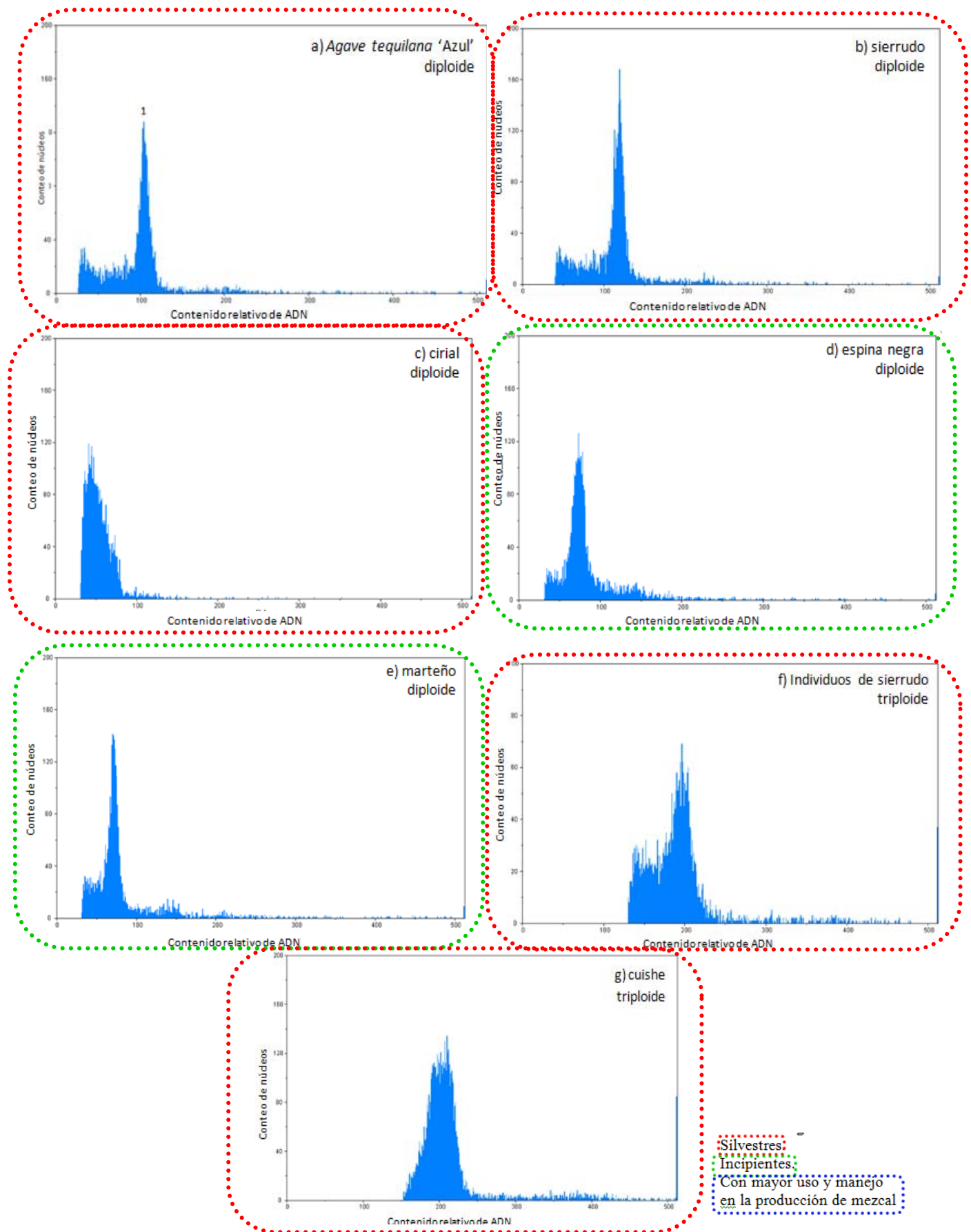


Fig. 13. Niveles de Ploidía en las distintas poblaciones de *Agave karwinskii*.

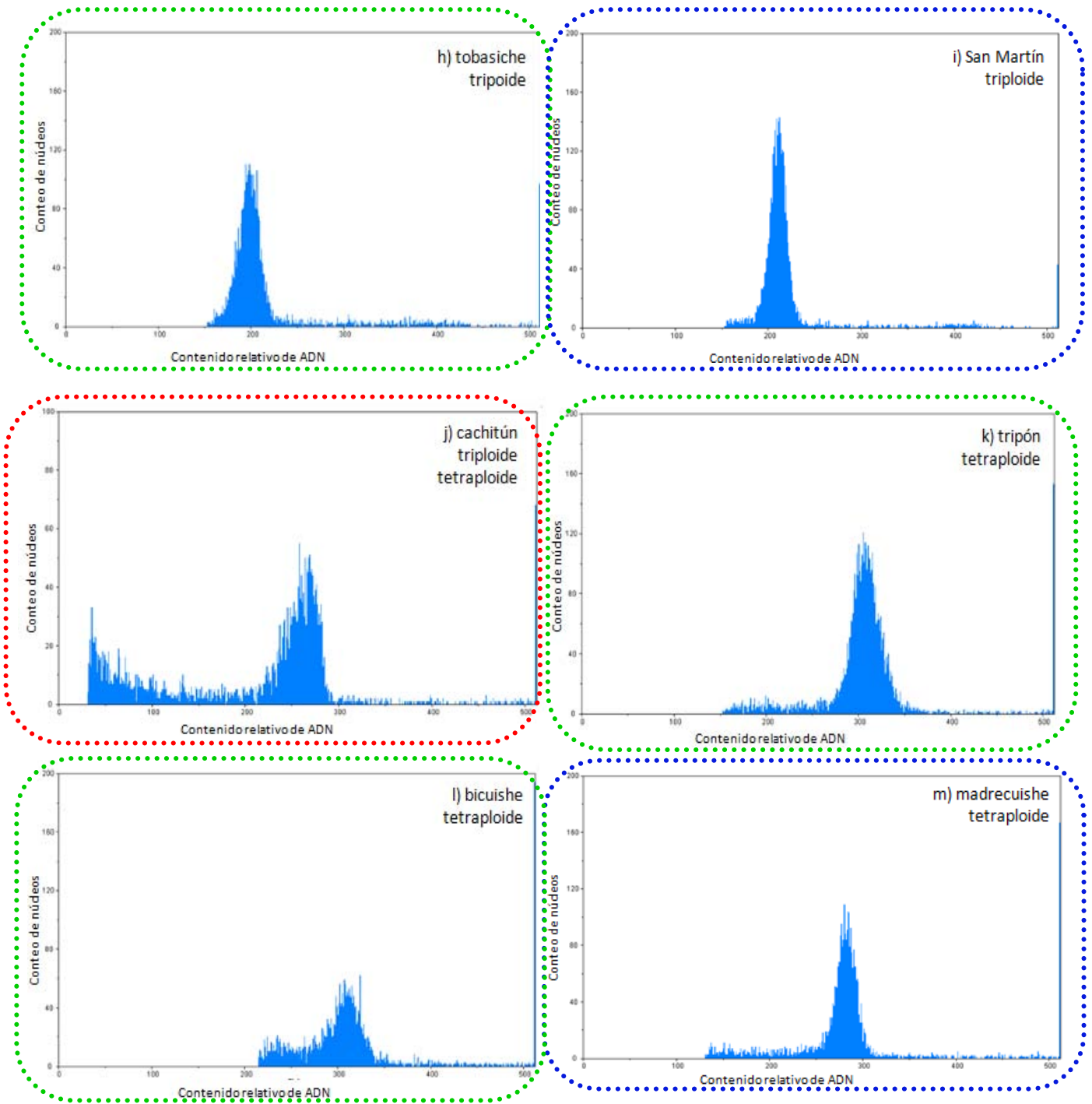


Fig. 14. Niveles de Ploidía en las distintas poblaciones de *Agave karwinskii*.
●●●●● Silvestres; ●●●●● Incipientes; ●●●●● Con mayor uso y manejo en la producción de mezcal.

DISCUSIÓN

El análisis exploratorio de datos mostró alta variación intra e interpoblacional en los 51 caracteres estudiados de *Agave karwinskii*, así como con valores atípicos. Con ello, se tomó la decisión de realizar la matriz de similitud con el coeficiente de varianzas-covarianzas para los métodos de ordenación y así evitar perder información desde los datos tomados en campo; un paso importante, tal como lo menciona Salgado-Ugarte, (1992). Tratar con datos biológicos cuando estos son altamente variables es importante para reconocer su utilidad en los posteriores análisis estadísticos (Anexo 2).

El análisis de correlación mostró 14 variables altamente correlacionadas, fueron de menor cantidad comparadas con otros trabajos similares (Rivera-Lugo, 2014). Esto puede deberse a que nuestros individuos analizados son altamente variables, tanto en caracteres vegetativos como en algunos reproductivos. La mayor cantidad de caracteres correlacionados fueron florales, lo que puede indicar valores muy similares entre las once poblaciones analizadas y su relación entre ellas. Sin embargo, no se puede descartar para futuros análisis similares, puesto que en estos resultados se ve la importancia de algunos caracteres florales y de frutos que varían y son las que están delimitando a las poblaciones formadas en el análisis de funciones discriminantes.

El dendograma morfológico (Fig.7) obtenido, mostró un arreglo claro en la separación de las entidades con mayor uso y manejo en la producción de mezcal de aquellas poblaciones silvestres e incipientes. Este arreglo de clasificación coincidió con los grupos morfológicos discretos formados a partir de los métodos de ordenación estudiados, análisis de componentes principales y el análisis canónico de funciones discriminantes. En ellos se muestra que las poblaciones morfológicas discretas tienen un patrón de agrupamiento distribuido en forma de gradiente, tal como se ha reportado en trabajos similares hechos para agaves mezcaleros, pulqueros y proveedores de fibras, bajo ciertos niveles de domesticación (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1996; 1997; 1998; Vargas-Ponce *et al.*, 2007; Mora-López *et al.*, 2011; Carrillo-Galván, 2011). En ellos, las plantas silvestres se ubicaron en la parte superior e inferior derecha del espacio, que se caracterizan con un tamaño menor de los caracteres vegetativos de rosetas y hojas. Enseguida en la parte media del espacio se distribuyeron las poblaciones incipientes con un aumento del tamaño de dichos caracteres vegetativos, hasta ubicar en la parte izquierda del espacio las poblaciones

con mayor uso y manejo en la producción de mezcal, las cuales poseen mayor tamaño de rosetas y hojas. Sin embargo, en ambos métodos de ordenación ocurre una mezcla entre individuos de las poblaciones silvestres con individuos de las poblaciones con manejo incipiente.

Se considera al análisis canónico de funciones discriminantes que ha mostrado mayor claridad en los grupos morfológicos discretos formados (Fig. 9). Las once poblaciones estudiadas de *Agave karwinskii* son entidades morfológicamente diferenciables, consideradas a partir de los nombres comunes que manejan pobladores y productores de los Valles Centrales y Sierra Sur de Oaxaca, aunque sigue coexistiendo gran similitud entre las poblaciones silvestres e incipientes. Este resultado fue congruente con trabajos previos en agaves mezcaleros, donde se obtuvieron entidades morfológicamente diferenciables a partir de las variedades comerciales y taxones previamente conocidos a partir de una mínima cantidad de caracteres discriminatorios (Vargas-Ponce *et al.*, 2007; Rivera-Lugo, 2014).

El análisis genético mediante AFLP's, mostró una fracción pequeña de variación genética presente entre todas las poblaciones analizadas, similar a trabajos reportados en agaves (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 1998; Gil-Vega *et al.*, 1997, 2006, 2007; Keb-Llanes *et al.*, 2002; Infante *et al.*, 2003; Barraza-Morales *et al.*, 2006; Vargas-Ponce *et al.*, 2007; Rivera-Lugo, 2014). El agrupamiento de las poblaciones obtenida mediante el dendograma AFLP (Fig. 12) resultó similar con la clasificación morfológica (Fig. 7), del análisis de componentes principales (Fig. 8) y el análisis canónico de funciones discriminantes (Fig. 9), al demostrar la separación que hay entre las poblaciones con mayor uso y manejo en la producción de mezcal de las poblaciones incipientes y silvestres. Sin embargo, a diferencia de los análisis morfológicos, el análisis AFLP definió con mayor fiabilidad la conformación de las poblaciones con mayor uso y manejo en la producción de mezcal; madrequishe de Miahuatlán (Sierra Sur) y San Martín de Ejutla (VCO), así como las poblaciones incipientes de bicuishe de Miahuatlán (Sierra Sur), tripón de Ocotlán y tobasiche de Ejutla. Con menor claridad se separaron las poblaciones incipientes; marteño y espina negra de Ocotlán y el resto de las poblaciones silvestres que muestran valores bootstrap poco o nada robustos, similar a las clasificaciones morfológicas donde ocurren entremezclas.

El porcentaje polimórfico apoyó los resultados anteriores, el cual fue variable para cada población: es mayor en las poblaciones silvestres y menor en las poblaciones incipientes y sobre todo las que tienen mayor uso y manejo en la producción de mezcal (madrecuishe y San Martín), comparable a lo que se ha obtenido en *A. tequilana* ‘Azul’ y sus distintas variedades (Gil-Vega, 1997; Gil-Vega *et al.*, 2006). Se mostró, un mismo porcentaje polimórfico en las poblaciones de sierrudo y marteño de Ocotlán (55%), probablemente porque corresponden al mismo municipio, sin embargo, a estas poblaciones las describimos con un tipo de manejo distinto en cada una; sierrudo crece en ambientes silvestres, contrario a marteño que solo se encuentra sólo como cercos vivos.

Los diferentes niveles de ploidía evaluados, coincidieron con los subconjuntos de poblaciones formados en el dendograma genético AFLP y las poblaciones morfológicas discretas obtenidas. Las poblaciones silvestres fueron diploides. Las formas incipientes y con mayor uso y manejo en la producción de mezcal fueron triploides y tetraploides, lo que coincide con trabajos antes reportados sobre los diferentes cultivares de *Agave tequila* ‘Azul’ (Gil-Vega, 1997; Gil-Vega *et al.*, 2006) y otras especies mezcaleras que han mostrado variaciones en el nivel de ploidía (triploides y tetraploides), mostrando mayor tamaño de caracteres vegetativos al ser sometidos a diferentes procesos de manejo (Palomino *et al.*, 2003, 2005; Moreno-Salazar *et al.*, 2007; Rivera-Lugo, 2014). Sin embargo, nuevamente se registraron variaciones en el nivel de ploidía en individuos de dos poblaciones silvestres; un individuo de la población silvestre de sierrudo de Ocotlán que resultó triploide y, de la población de cachitún de ZSP no se tiene certeza si corresponde a un nivel triploide o tetraploide ya que todas las muestras de los individuos analizados reflejaron un nivel intermedio. Para estas poblaciones sería necesario realizar un estudio cariotípico. En el caso de la población de marteño de Ocotlán, siendo incipiente y ante un mayor tamaño de caracteres vegetativos, esperaríamos mayores niveles de ploidía, sin embargo fue diploide.

Existe solo una clara separación genética y morfológica congruente en la población de madreuishe de Miahuatlán con caracteres vegetativos y florales que la distinguen del resto de las poblaciones; hojas de color glauco y de mayor longitud, inflorescencias de más de 4m de altura, elementos florales de mayor tamaño y mayor cantidad y tamaño de semillas fértiles. Pertenece a la Sierra Sur y se encuentra tanto en formas silvestres en lomeríos y

cerros semiconservados con vegetación original (*Acacia farnesiana*, *Agave karwinskii*, *Escontria chiotilla* y *Prosopis laevigata*) así como en cercos vivos del pueblo, con utilidad en la producción de mezcal. Es la única población que podría ser considerada como una subespecie taxonómica. La población de San Martín (con mayor uso en la producción de mezcal) tiene una clara separación genética y de caracteres vegetativos de mayor tamaño con falta de elementos reproductivos que las distingue de las demás poblaciones, tienen uso y manejo intenso en la producción de mezcal. Se le encuentra en cercas vivas y en forma de linderos en terrenos de maíz, por lo que puede ser considerada como un cultivar. El resto de las poblaciones incipientes que los productores reconocen; tripón, espina negra y marteño de Ocotlán, tobasiche de Ejutlá y bicuishe de Miahuatlán pueden ser consideradas en la categoría de formas ya que genéticamente tienen cierto grado de separación de las poblaciones silvestres y un manejo incipiente que los pobladores y productores hacen. Estas últimas (cachitún de ZSP, cuishe de Tlacolula, sierrudo y cirial de Ocotlán) se mantendrán como especie típica.

Finalmente, cabe reconocer que se necesita un análisis más profundo de la etnobotánica, ecología, citogenética y bioquímica de azúcares, entre otros estudios, para tener un entendimiento más detallado sobre el impacto del manejo de las plantas por el ser humano en la variación morfológica de las plantas. En estos estudios habrá que considerar el traslado de plantas que se hace en todos los Valles Centrales y Sierra Sur de Oaxaca para producir mezcal, y que impacta no sólo a las poblaciones naturales, sino también enriquece y modifica el conocimiento cultural de las mismas. Esto nos ayudaría a entender mejor el por qué tenemos individuos que morfológicamente considerados silvestres se agruparon con las poblaciones incipientes o con mayor uso y manejo en la producción de mezcal.

CONCLUSIONES

El análisis morfométrico y el análisis genético AFLP son útiles para delimitar las poblaciones de *Agave karwinski* en relación con su grado de manejo.

El análisis canónico de funciones discriminantes resultó más efectivo, agrupó a los individuos conforme a los nombres comunes que manejan los pobladores y los productores de los Valles Centrales y Sierra Sur de Oaxaca.

Los caracteres: altura de la roseta, ancho en la parte media y base de la hoja, color de las hojas, relación pedúnculo-panícula, forma de las inflorescencias, longitud de las brácteas estériles de la inflorescencia, longitud de la antera, longitud de la cápsula y longitud de las semillas son los más útiles en la delimitación de los grupos morfológicos.

El análisis genético AFLP y los niveles de ploidía son congruentes con el análisis morfológico. Los grupos poblacionales de *Agave karwinskii* formados son similares.

Los niveles de ploidía se relacionaron con el grado de manejo que presentan las poblaciones.

El análisis morfológico y genético muestra una mezcla entre poblaciones silvestres y con manejo incipiente, nos indica que son poblaciones en proceso de domesticación. San Martín es la población más domesticada.

Desde un punto de vista taxonómico, se puede considerar a la población de madrequishe como una subespecie. Pertenece a la Sierra Sur y el grado de diferenciación morfológica y genética es mayor, no así con el resto de las poblaciones que muestran intergradaciones.

Con fines prácticos se puede considerar como cultivar a la población de San Martín ya que registró distancias genéticas y caracteres vegetativos mayores.

Se pueden considerar como formas aquellas poblaciones que registraron distancias genéticas mayores y que los pobladores reconocen como: tripón, espina negra, marteño, tobasiche y bicuishe.

LITERATURA CITADA

- Albino-García, C., H. Cervantes, M. López, L. Ríos-Casanova y R. Lira. 2011. Patrones de diversidad y aspectos etnobotánicos de las plantas arvenses del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: el caso de San Rafael, municipio de Coxcatlán, Puebla. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **82**: 1005-1019.
- Alfaro-Rojas, G., J.P. Legaría-Solano y J.E. Rodríguez-Pérez. 2007. Diversidad genética en *Agaves* pulqueros (*Agave* spp.) del nororiente del Estado de México. *Revista Fitotecnia Mexicana* **30** (1): 1-12.
- 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.
- Arias-Toledo, A. A., M.T. Valverde-Valdés y J. Reyes-Santiago. 2000. Las plantas de la región de Zapotitlán Salinas, Puebla. 80 pp. Instituto de Ecología y Jardín Botánico del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Awise, C.J. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. 68 pp. Chapman & Hall, New York.
- Barraza-Morales, A., M. Esqueda, A. Gardea, M. Robert y F.L. Sánchez-Teyer. 2006. Variabilidad genética en *Agave angustifolia* Haw. de la Sierra Sonorense, México, determinada por marcadores AFLP. *Revista Fitotecnia Mexicana* **29**: 1-8.
- Bautista, J.A. y J. J. Ramírez. 2008. Agricultura y pluriactividad de los pequeños productores de agave en la región del mezcal, Oaxaca, México. *Agricultura Técnica en México* **4** (34): 443-451.
- Banerjee, S. y A.K. Sharma. 1987. Cytophotometric estimation of nuclear DNA in different species and varieties of *Agave*. *Cytologia* **52** (1): 85-90.
- Berumen-Barbosa, M. E. 2009. Oaxaca: La Actividad productiva maguey-mezcal. 87 pp. Laboratorio de análisis de mezcal y unidad de capacitación CAPET en Santiago Matatlán, Oaxaca. Manuscrito. Oaxaca, México.
- Brena-Bustamante, P. 2012. El aprovechamiento y la estructura poblacional de *Agave kerchovei* Lem., en Tehuacán-Cuicatlán, México. 65 pp. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco. Estado de México, México.

- Bye, R. 1998. La intervención del hombre en la diversificación de las plantas en México. En: T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, J. Fa (Comp.). *Diversidad biológica de México: orígenes y distribución*. Pp. 700-708. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Caballero, J, A. Casas, L. Cortés y C. Mapes. 1998. Patrones en el conocimiento, uso y manejo de plantas en pueblos indígenas de México. *Revista de Estudios Atacameños* **16**: 181–196.
- Carrillo-Galván, M. G. 2011. Domesticación de agaves productores de fibras en el centro occidente de México: una aproximación etnobotánica y morfológica. 121 pp. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. Mérida, Yucatán.
- Casas, A., A. Ortero-Arnaiz, E. Pérez-Negrón y A. Valiente-Banuet. 2007. *In situ* management and domestication of plants in mesoamerica. *Annals of Botany* **100**: 1101-1115.
- 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., R.M. Escobedo y A. Quiroz. 1991. New cytotaxonomical determinants recognized in six taxones of *Agave* in the sections *Rigidae* and *Sisalanae*. *Canadian Journal of Botany* **69**:1257-1264.
- Crisci, J. V. y M.F. López-Armengol.1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. 132 pp. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina. Departamento de Asuntos Científicos y Tecnológicos de la Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Washington..
- Cruz-Ramírez, H. 2000. Situación y perspectivas del Sistema Agroindustrial Mezcal en el Estado de Oaxaca. Tesis Profesional. 89 pp. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- Cruz-García, H., J.R. Enríquez-del Valle, V.A. Velasco-Velasco, J. Ruíz-Luna, G.V. Campos-Ángeles y D.E. Aquino-García. 2013. Nutrimientos y carbohidratos en plantas de *Agave angustifolia* Haw. y *Agave karwinskii* Zucc. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* **6**:1161-1173.
- Colunga-GarcíaMarín, P., E. Estrada-Loera y F. May-Pat. 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 F. May-Pat. 1997. Morphological variation of henequen (*Agave fourcroydes*, Agavaceae) germoplasm and its wild ancestor (*A. angustifolia*) under uniform growth conditions: diversity and domestication. *American Journal of Botany* **84** (11): 1449-1465.
- Colunga-GarcíaMarín, P. 1998. Origen, variación y tendencias evolutivas del henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **62**: 109-128.
- Colunga-GarcíaMarín, P., J. Coello-Coello, L. Eguiarte y D. Piñero. 1999. Izosymatic variation and phylogenetic relations between henequén *Agave fourcroydes* Lem. and its wild ancestor *Agave angustifolia* Haw. *American Journal of Botany* **86** (1): 115-123.
- Colunga-GarcíaMarín, P., D. Zizumbo-Villarreal y T.J. Martínez. 2007. Tradiciones en el aprovechamiento de los agaves mexicanos: una aportación a su protección legal y conservación biológica y cultural. En: P. Colunga-GarcíaMarín, S. Larqué A., L.E. Eguiarte, y D. Zizumbo-Villarreal (eds). *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves*. Pp. 229-248. CICY-CONACYT-CONABIO-INE. México, D.F.
- Colunga-GarcíaMarín, P. y D. Zizumbo-Villarreal. 2007. Tequila and other *Agave* spirits from west-central Mexico: current germplasm diversity, conservation and origin. *Biodiversity and Conservation* **16**: 1653-1667.
- CONABIO. 2006. Mezcales y diversidad, 2da ed. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, D. F.
- Conabio. Sierra Sur y Costa de Oaxaca.
www.conabio.gob.mx/conocimiento/regionalizacion/doctos/rtp_129.pdf. Año 2014.
- Comisión Nacional del Agua. Normales climatológicas por estación. Oaxaca.
http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=183&tmpl=component
- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP). 1998. Decreto por el que se declara área natural protegida, con el carácter de reserva de la biosfera, la región denominada Tehuacan-Cuicatlán ubicada en los estados de Oaxaca y Puebla.
<http://www.conanp.gob.mx/sig/decretos/reservas/Tehuacan.pdf>. Año 2012.
- Coronel-Ortiz, D. 2006. Zapotecas de los Valles Centrales de Oaxaca. 56 pp. Comisión Nacional para el Conocimiento de los Pueblos Indígenas. México, D. F.
- Dahlgren, R. M., Clifford, H. T., y Yeo, P. F. 1985. The families of the monocotyledons. Structure, evolution, and taxonomy. Springer-Verlag. Berlin.

- Dávila P., M. del C. Arizmendi, A. Valiente-Banuet, J.L. Villaseñor, A. Casas y R. Lira. 2002. Biological diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, México. *Biodiversity and Conservation* **11**: 421–442.
- Doležel, J. 1997. Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics* **38**:285-302.
- Eguiarte, L.E., V. Souza y A. Silva-Montellano. 2000. Evolución de la familia Agavaceae: Filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **66**: 131-150.
- Eguiarte, L.E. y V. Souza. 2007. Historia natural del Agave y sus parientes: evolución y ecología. En: P. Colunga-GarcíaMarín, S.A. Larqué, L.E. Eguiarte, y D. Zizumbo-Villarreal (eds). *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves*. Pp. 3-39. CICY-CONACYT-CONABIO-INE. México. D. F.
- Espinosa-Paz, H., V. Arredondo, M. Cano, A. Canseco y F. Vázquez. 2002. La materia prima para producir el mezcal oaxaqueño: Catálogo de la diversidad de *Agaves*. 68 pp. Folleto técnico 2. INIFAP. SAGARPA. Santo Domingo Barrio Bajo, Etna, Oaxaca.
- Figueredo-Urbina, C. J. y A. Casas. 2012. Domesticación y divergencias morfológicas y genéticas entre las poblaciones silvestres y cultivadas de *Agave inaequidens* y *A. hookeri*. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas* **9** (2): 6-9.
- Flannery K. V. 1986. Guilá Naquitz in spatial, temporal, and cultural context. En Flannery K. V. (Ed.). *Guilá Naquitz: Archaic Foraging and Early Agriculture in Oaxaca, Mexico*. Pp. 31-42. *Academic Press*. Orlando, FL.
- Flores-Maya, S., J. C. Moreno-Ramírez, S. Romero-Range y C. Rojas-Zenteno. 2010. Análisis morfológico y cariológico de *Agave karwinskii* Zucc., y *Agave macrocantha* Zucc., en el municipio de Zapotitlán de las Salinas, Puebla. *BIOCYT. FES Iztacala, UNAM*. **3** (11): 181-196.
- García, E. 1998. Modificaciones al sistema climático de Köppen. Cartas de clima de la República Mexicana, escala 1 000 00. Serie libros N°6. 24-55 pp. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- García-Mendoza, A.J. 2002. Distribution of the genus *Agave* (Agavaceae) and its endemic species in Mexico. *Cactus and Succulent Journal (US)* **74**: 177-187.

- García-Mendoza, A.J. 2004. Agaváceas. En: A.J. García-Mendoza, M. J. Ordoñez y M. Briones-Salas (Eds.). *Biodiversidad de Oaxaca*. Pp. 159-169. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México -Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza- World Wildlife Fund, México.
- García-Mendoza, A.J. 2010. Revisión taxonómica del complejo *Agave potatorum* Zucc. (Agavaceae): Nuevos taxa y neotipificación. Instituto de Ecología. *Acta Botanica Mexicana* **91**: 71-93.
- 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. 2011. Agavaceae. En: Medina Lemos, R. (Ed.). Fascículo 89. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Pp. 27-29. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F.
- Gentry, H. S. 1982. *Agaves of Continental North America*. University of Arizona Press. Tucson, Arizona. 670 pp
- Granados-Sánchez. D. 1993. *Los Agaves en México*. 252 pp. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, México.
- Gil-Vega, K. 1997. Caracterización de *Agave ssp.*, utilizando marcadores moleculares. Tesis de Maestría. 78 pp. Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Campus Irapuato. Irapuato, Guanajuato.
- Gil-Vega, K., M. González, O. Martínez V., J. Simpson y G. Vandemark. 2001. Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. azul using RAPD markers. *Euphytica* 119: 335-341.
- Gil-Vega, K, C. Díaz, A. Nava-Cedillo y J. Simpson. 2006. AFLP analysis of *Agave tequilana* varieties. *Plant Science* **170**: 904-909.
- Gil-Vega, K., C.E. Díaz-Quezada, A. Nava-Calvillo, A. García-Mendoza y J. Simpson. 2007. Análisis AFLP del género *Agave* refleja la clasificación taxonómica basada en caracteres morfológicos y otros métodos moleculares. En: Colunga-GarcíaMarín, P., Saavedra, A., Eguiarte L. 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, AC, Mérida.

Infante, D., G. González, L. Peraza-Echeverría y M. Keb-Llanes. 2003. Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes*. *Plant Science* **164**: 223-230.

Instituto Nacional de Estadística Geografía e Información (INEGI). Marco Geoestadístico Municipal 2011, versión 3.1.

http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/geoestadistica/consulta_localidades.aspx

Kim, J. H., D. J. Kim, F. Forest y M. W. Chase 2010. Molecular Phylogenetics of Ruscaceae *sensu lato* and related families (Asparagales) based on plastid and nuclear DNA sequences. *Annals of Botany* **106**: 775-779.

Keb-Llanes, M., G. González, B. Chi-Manzanero y D. Infante. 2002. A rapid and simple method for small-scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants. *Plant Molecular Biology Reporter* **20**: 229a-229e.

Lira R., A. Casas, R. Rosas-López, M. Paredes-Flores, E. Pérez-Negrón, S. Rangel-Landa, L. Solís, I. Torres, y P. Dávila. 2009. Traditional knowledge and useful plant richness in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. *Economic Botany*. **63** (3): 271-287.

León-Vázquez, N. I. 2009. Descripción de las especies de *Agave* mezcalero utilizadas en Santa Catarina Minas, Ocotlán. 88 pp. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. Oaxaca, Oax.

Mariaca-Méndez, R. 1997. ¿Qué es la agricultura?; bajo una perspectiva xolocotziana. 60 pp. Universidad Autónoma de Chapingo-Universidad Autónoma del Estado de México, México.

Montanero, J. 2008. Estadística multivariada. Manual Universidad de Extremadura. Manual. Campus de Mérida, España. 197 p.

Moreno-Salazar, S.F., M. Esqueda, J. Martínez y G. Palomino. 2007. Tamaño del genoma y cariotipo en *Agave angustifolia* y *A. rhodacantha* de Sonora, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* **30** (1): 13-23.

Mora-López, J., J.A. Reyes-Agüero, J.L. Flores-Flores, C.B. Peña-Valdivia y J.R. Aguirre-Rivera. 2011. Variación morfológica y humanización de la sección Salmianeae del género *Agave*. *Agrociencia*. México **45**: 465-477.

- Nei, M. y W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 5269–5273.
- Ortiz P., M. A., Hernández, J. R. y J. M Figueroa. 2004. Reconocimiento fisiográfico y geomorfológico. En: García-Mendoza, A. J., Ordoñez, M. J. y Briones-Salas, M. (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.
- Palma, C.F. 1991. El género *Agave* L. y su distribución en el estado de Oaxaca. *Huaxyacac* **16**: 12-16.
- Palma, C.F. 1998. Agaves productores de fibras duras en el estado de Oaxaca. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **66**: 93-102.
- Palomino, G., J. Doležel, I. Méndez y A. Rubluo. 2003. Nuclear genome size analysis of *Agave tequilana* Weber. *Caryologia* **56**:37-46.
- Palomino, G., J. Martínez e I. Méndez. 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., S. Hrdá y J. Flegr. 1999. FreeTree – a freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and for bootstrap/Bootstrap analysis of the tree robustness. *Folia Biologica* **45**:97–99.
- Perales, H.R., y J.R. Aguirre. 2008. Biodiversidad humanizada. En: Sarukhán, J. (Coord. Gral.). *Capital Natural de México*, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Pp. 565- 603. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. D.F.
- Pinkava, D. J. y M.A. Baker. 1985. Chromosome and hybridization studies of *Agaves*. *Desert Plants* **7** (2): 93-100.
- Rendón-Aguilar, B., S. Rebollar-Domínguez, J. Caballero-Nieto y M.A. Martínez-Alfaro. 2001. *Plantas, cultura y sociedad. Estudio sobre la relación entre seres humanos y plantas en los albores del siglo XXI*. 317 pp. Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa. SEMARNAT. México, D.F.
- Rivera-Cazares, J. 1983. Estudio citogenético y fitogeográfico de *Agave* aff. *tequilana* y *Agave karwinskii* Zucc. En los Valles de Tehuacán, Puebla y Centrales de Oaxaca, México. 208

- pp. Tesis de Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Rivera-Lugo, M. 2014. Variación morfológica y genética de *Agave angustifolia* Haw., en el estado de Oaxaca. 58 pp. Tesis de maestría. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Rocha, M., A. Valera y L. E. Eguiarte. 2005. Reproductive ecology of five sympatric *Agave Littaea* (Agavaceae) species in Central Mexico. *American Journal of Botany* **92** (8): 1330-1341.
- Rohlf, F.J. 2008. NTSYSpc numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.20q. Exeter Software, New York.
- Rzedowski, J. 2006. Vegetación de México. Primera edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. D. F.
www.biodiversidad.gob.mx/publicaciones/.../VegetacionMx_Cont.pdf
- Salgado-Ugarte, I. H. 1992. El análisis exploratorio de datos biológicos. Fundamentos y aplicaciones. 243 pp. Escuela Nacional de Estudios Profesionales, Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Sokal, R.R. y P.H.A. Sneath. 1963. Principles of numerical taxonomy. 359 pp. San Francisco, California.
- Simpson, J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms (AFLP). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **60**:119-122.
- Serrato-Cruz, M.A., M. Hernández-Rodríguez, Y. Savidan y N. Barcenás-Ortega. 2000. Determinación de la ploidía en progenies de *Tagetes* spp, mediante citómetro de flujo. Universidad Autónoma de Chapingo, Estado de México. *Agrociencia* **34**: 735-740.
- Trejo, I. 2004. Clima. En: A. J. García-Mendoza, M.J. Ordoñez, y M. Briones-Salas (Eds.) *Biodiversidad de Oaxaca*. Pp. 67-85. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza-World Wildlife Fund, México, D.F.
- Urrutia-Cruz, S. P. 1986. Etnobotánica en los Valles Centrales de Oaxaca. Tesis de licenciatura. 97 p. Facultad de Estudios Superiores, Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México, México. Tlalnepantla, Estado de México.

- Valadez-Moctezuma, E. y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas. Teoría y protocolos de laboratorio. 309 pp. Mundi-Prensa.
- Vargas-Ponce, O., D. Zizumbo-Villarreal y P. Colunga-GarcíaMarín. 2007. In situ diversity and maintenance of traditional *Agave* landraces used in spirits production in West-Central Mexico. *Economic Botany* **61** (4): 362-375.
- Vargas-Ponce, O., D. Zizumbo-Villarreal, C.J. Martínez, C.J. Coello y P. Colunga-GarcíaMarín. 2009. Diversity and structure of landraces of *Agave* grown for spirits under traditional agriculture: A comparison with wild populations of *A. angustifolia* (Agavaceae) and *A. tequilana* commercial plantations. *American Journal of Botany* **96**: 448-457.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, M. Van de Lee, T. Hornes, M. Frijters, A. Pot, J. Peleman, J. Kuiper y M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for ADN fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**: 4404-4414.
- Zuccarini, J.G. 1833. Gattungen *Agave* und *Fourcroya*. *Nova Acta Physico-Medica Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Naturae Curiosorum* **16**:661-678.

Anexo 1. Lista de caracteres evaluados para el análisis morfométrico en *Agave karwinski*.

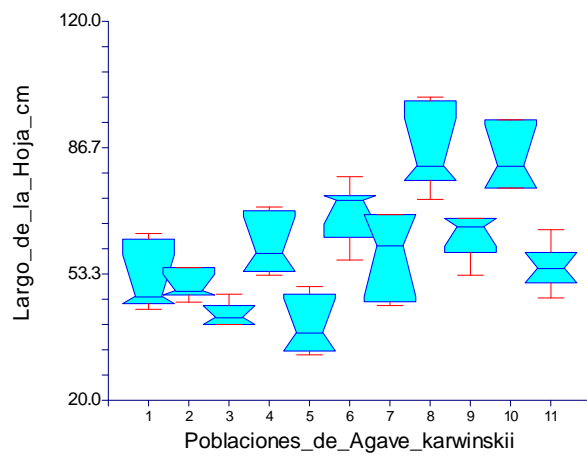
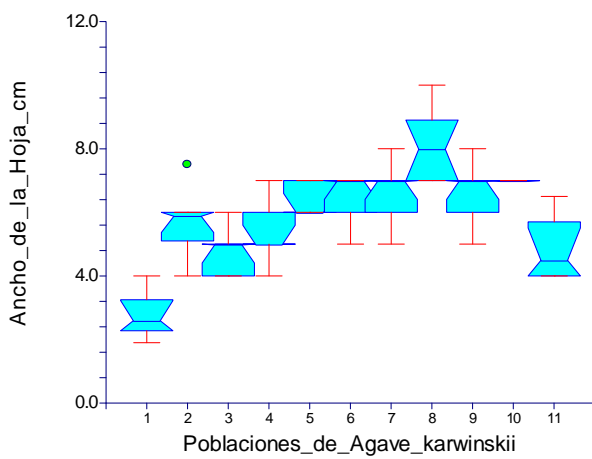
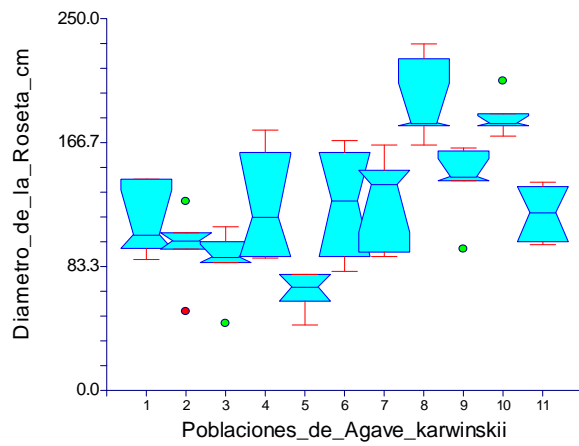
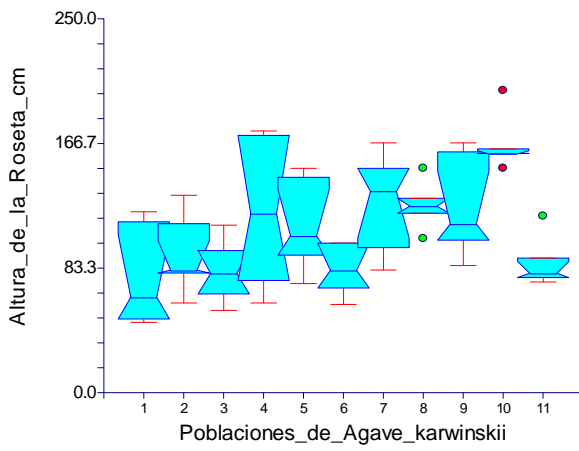
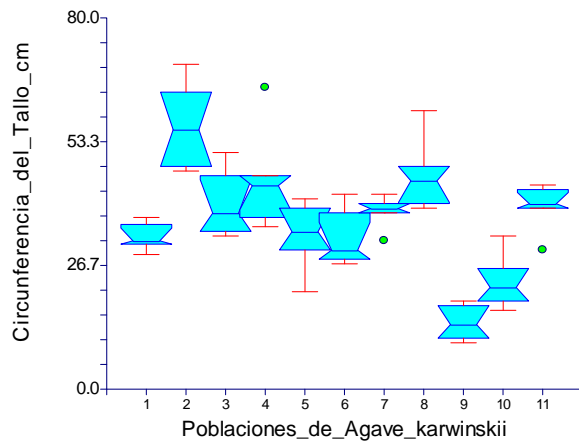
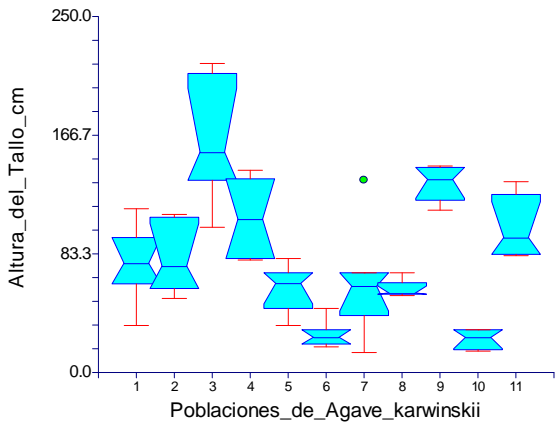
Tipos de datos	caracteres	# de caracteres	Estado de carácter	Clave	Descripción y codificación de datos cualitativos	observación
Multiestado Cualitativos	Hoja	1	color de la hoja (tipo de estado, sin secuencia lógica)	ColH	Verde: 1 verde-amarillo: 2 Glauco: 3	
		2	Forma de la hoja (tipo de estado, sin secuencia lógica)	FormH	Lanceolada: 1 Ampliamente lanceolada: 2 linear: 3	
		3	perfil de la lámina (tipo doble-estado, excluyente)	PerfLám	Cóncava: 1 Plana: 2	
	Dientes	4	color de los dientes (tipo oble-estado, excluyente)	CoID	Negros: 1 Pardo-rojizos: 2	
	Flores	5	Inserción de los filamentos (tipo doble-estado, excluyente)	InserFil	1; parte media 2; porción distal del tubo del perianto	
	Inflorescencia	6	forma de la inflorescencia (tipo doble-estado, excluyente)	ForInfl	Piramidal: 1 Oblonga: 2	
		7	Ordenes de ramificación (tipo de estado, sin secuencia lógica)	OrdRamF	3, 4 y 5	

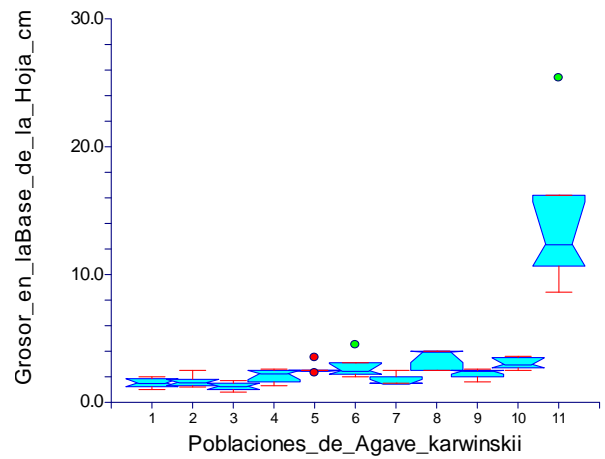
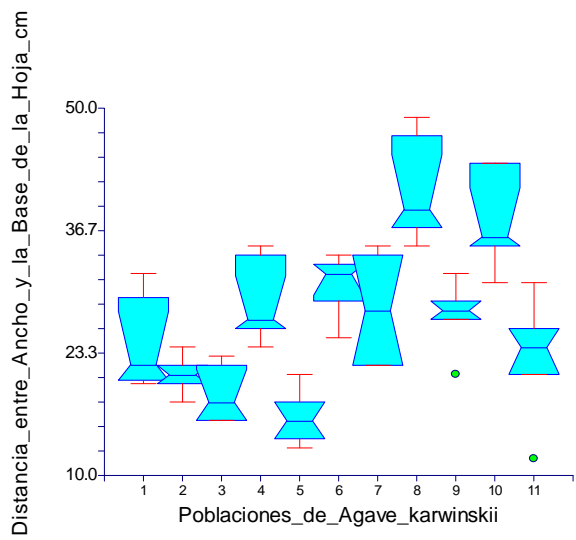
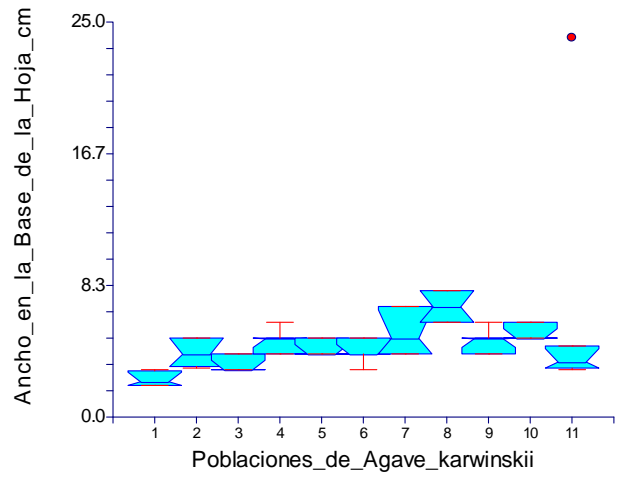
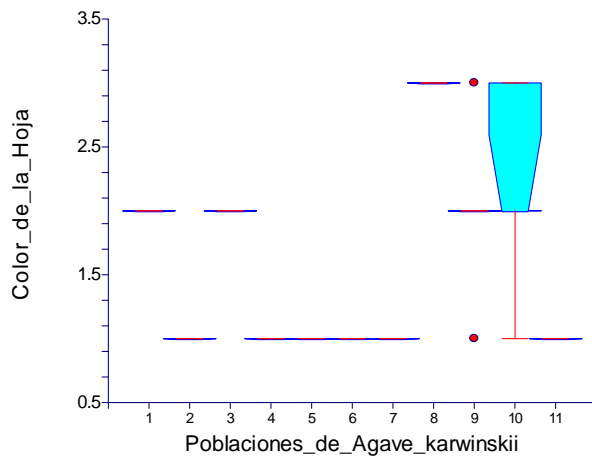
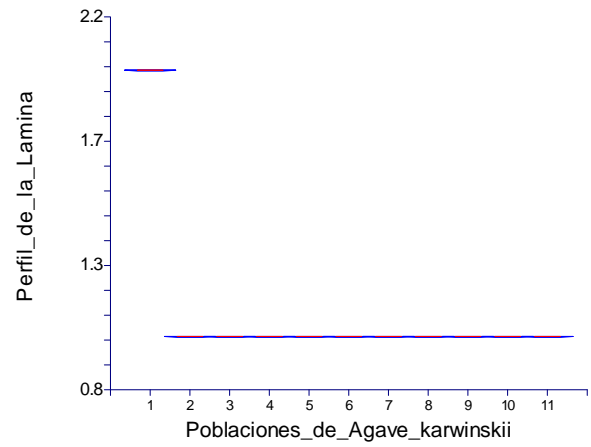
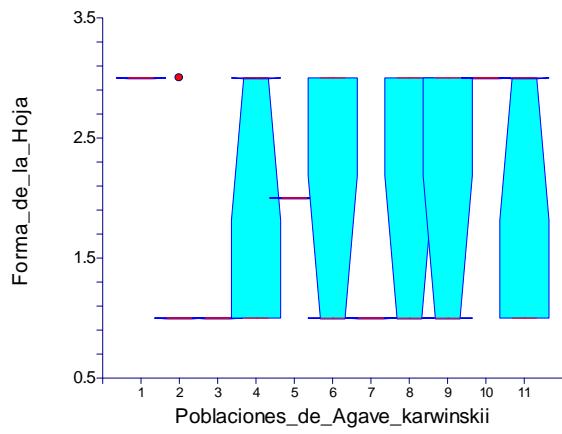
Multiestado Cuantitativos Contínuos	Tallo	8	Altura del tallo (cm)	AIT	desde la base hasta el inicio de la roseta, incluye hojas secas	
		9	Longitud de perímetro del tallo en la porción media (cm)	PerT	parte media del tallo	
	Roseta	10	Altura de la roseta (cm)	Altura de la roseta	desde el comienzo de las hojas verdes hasta el ápice de las últimas hojas	
		11	Diámetro de la roseta (cm)	Diámetro de la roseta	Parte media de la roseta	
	Hojas	12	longitud de la hoja (cm)	LH	desde la base hasta el ápice de la espina	una hoja por planta, madura, se seleccionaron de la hoja 35 a la 45, a partir del centro de la roseta
		13	Ancho de la hoja (cm)	AH	parte media de la lámina	
		14	ancho en la base de la hoja (cm)	ABH	base de la hoja	
		15	Distancia entre la base y la parte más ancha de la hoja (cm)	Dist/A y BH	De la parte media de la hoja hacia la base	
		16	Grosor en la base de la hoja (mm)	GBH		
	Espina apical	17	Longitud de la espina (cm)	LEsp		
		18	Distancia entre la base de la espina y el primer diente (cm)	DisBasEy1D		
	Dientes	19	Ancho de los dientes en su base (mm)	AD	Promedio de cinco dientes de la parte media de la hoja (de un solo lado de la hoja)	
		20	Longitud de los dientes (mm)	LD		
		21	Distancia entre dientes (mm)	DisD		

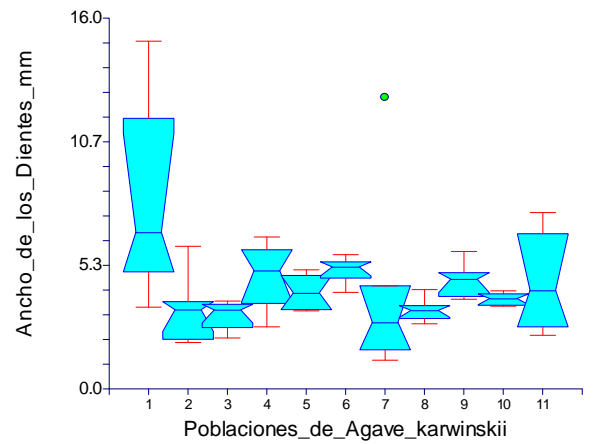
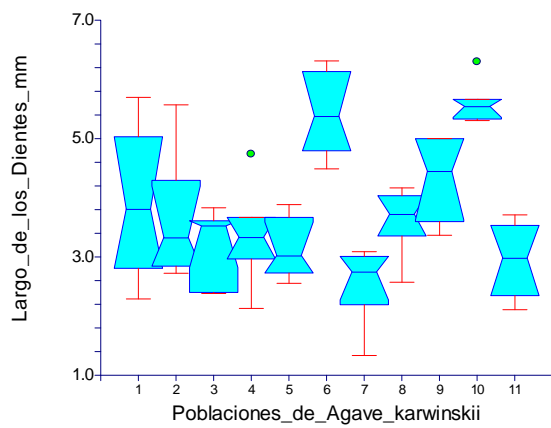
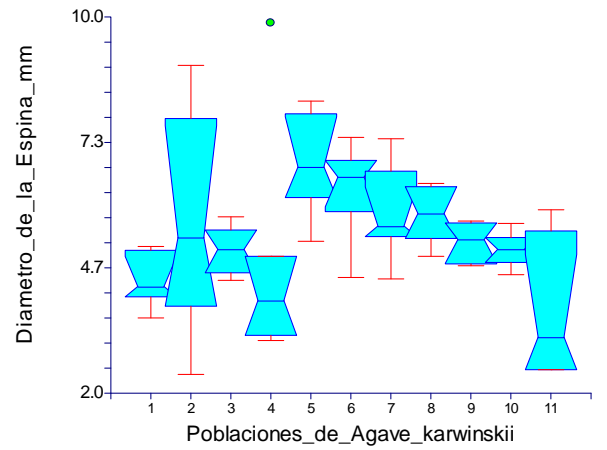
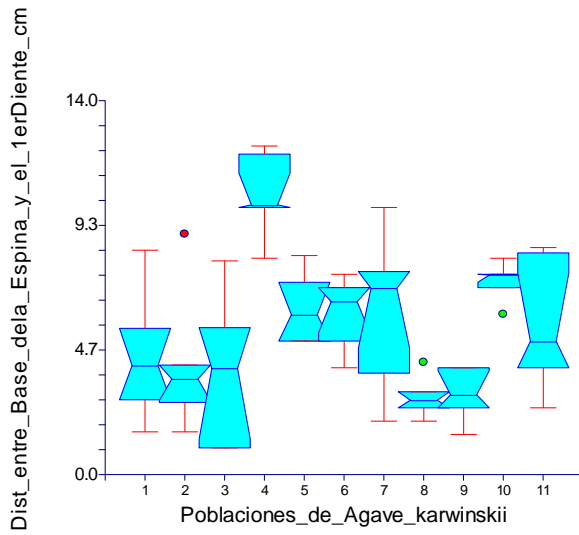
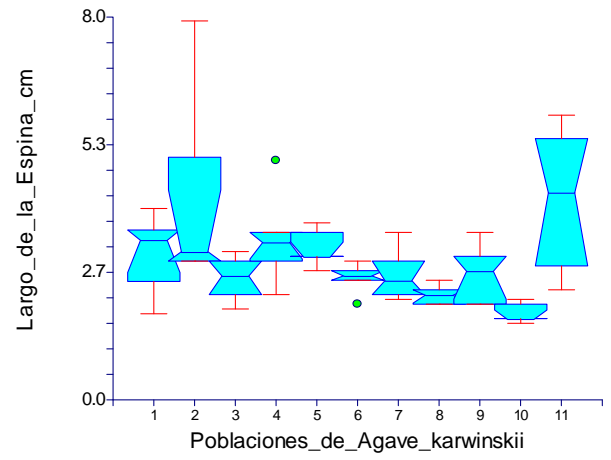
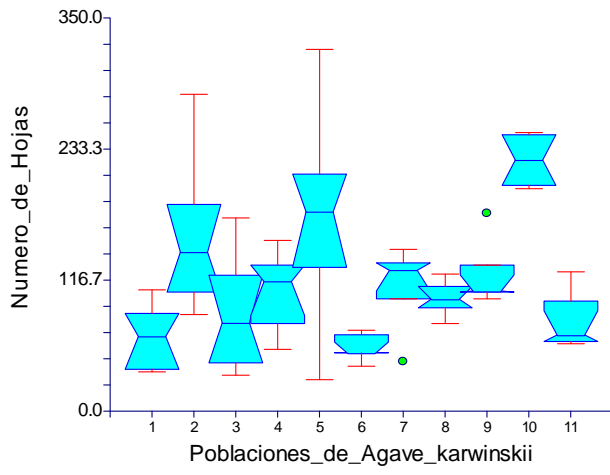
		22	Diámetro de la espina en la base (mm)	DiamE		
Inflorescencia		23	longitud total de la inflorescencia (cm)	Linf	de la base del pedúnculo hasta la última rama superior	Una inflorescencia por planta
		24	Longitud de perímetro del pedúnculo en la base (cm)	LongC_PdúB		
		25	relación pedúnculo/panícula (cm)	R_Ped/Pan	½, 1/3 ó 1/4 de la longitud de la inflorescencia	
		26	longitud de la rama más larga de la inflorescencia (cm)	LRam+Linfl		
		27	longitud de la bráctea estéril (cm)	Larg_BráctE_Infl		
		28	ancho de la bráctea estéril (cm)	An_BráctE_Infl		
Flores		29	longitud del pedicelo (mm)	Lped	desde el raquis hasta la base del ovario	Cinco flores por planta
		30	Longitud del ovario (mm)	LOv	desde la base hasta la inserción del estilo	
		31	diámetro del ovario (mm)	DOv	en la parte media	
		32	Longitud del tubo del perianto (mm)	LTubPer	Desde la base del tubo hasta la base de los tépalos	
		33	diámetro del tubo del perianto (mm)	DTubPer	en la porción distal	
		34	longitud del tépalo externo (mm)	LTépE	desde la base hasta el ápice del tépalo	
		35	ancho del tépalo externo (mm)	ATépE	en la parte media	
		36	longitud del tépalo interno (mm)	LTépl	desde la base hasta el ápice del tépalo	

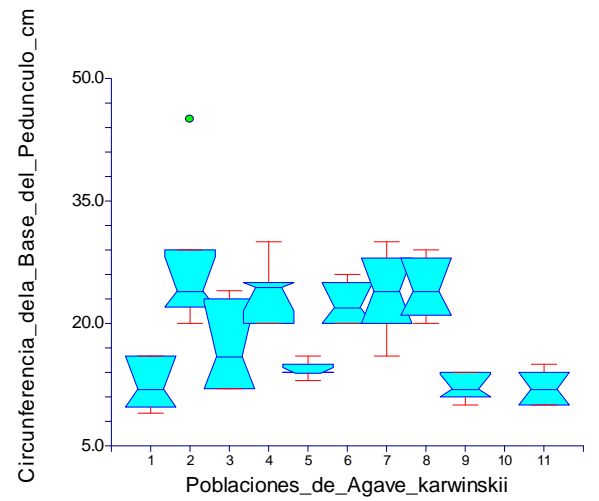
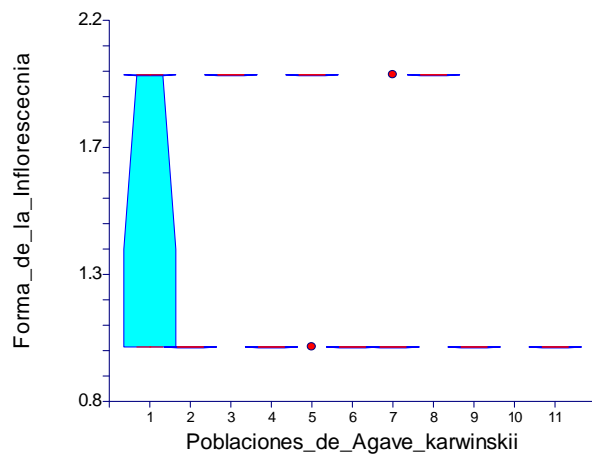
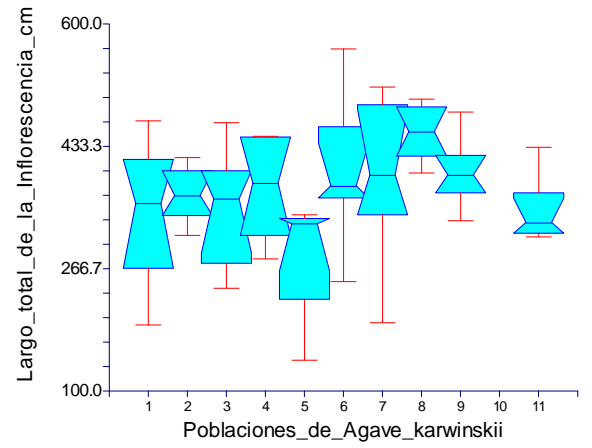
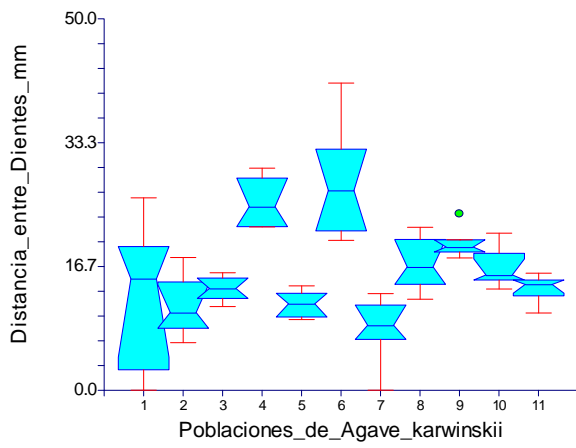
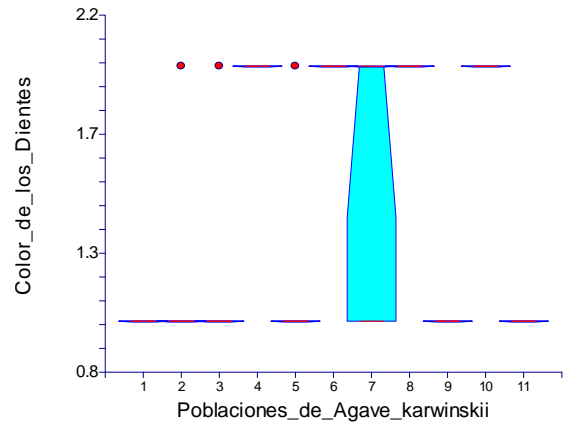
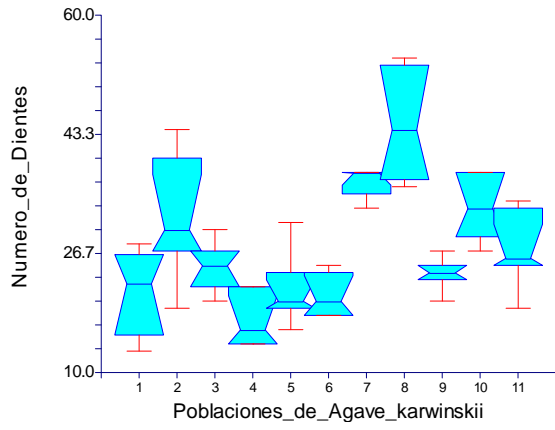
		37	ancho del tépalo interno (mm)	ATépl	en la parte media		
		38	longitud del filamento (mm)	LFil			
		39	longitud de la antera (mm)	LAnt	en flores con el androceo y el gineceo maduros		
		40	ancho de la antera (mm)	AAnt			
		41	longitud del estilo (mm)	LEsti			
	Frutos		42	longitud de la cápsula del fruto (cm)	LCáp	Cápsulas maduras	Cinco frutos por planta
			43	Diametro de la cápsula del fruto(cm)	DCáp		
	Semillas		44	longitud de la semilla (mm)	LS		
			45	ancho de la semilla (mm)	AS		
			46	número total de semillas	NToS		
			47	proporción de semillas maduras	PPSM		
Cuantitativos discontinuos	Hojas	48	número de hojas	NH	total de hojas verdes		
		49	Número de dientes	ND	Contados de un solo lado del margen de la hoja	En una hoja	
		50	Número de ramas de la inflorescencia	NRamsInfl		Una inflorescencia por planta	
	Inflorescencia	51	Número de la rama más larga de la inflorescencia	NRamLI			

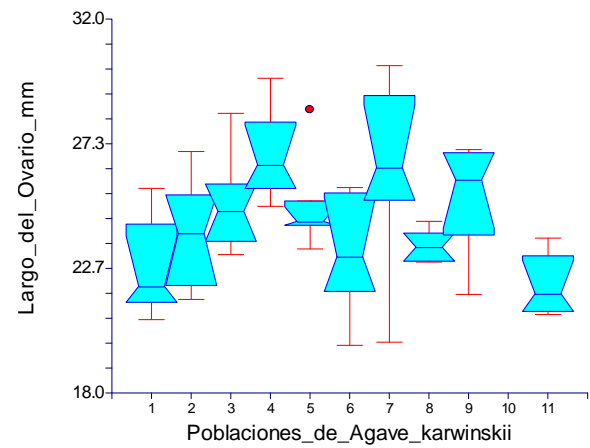
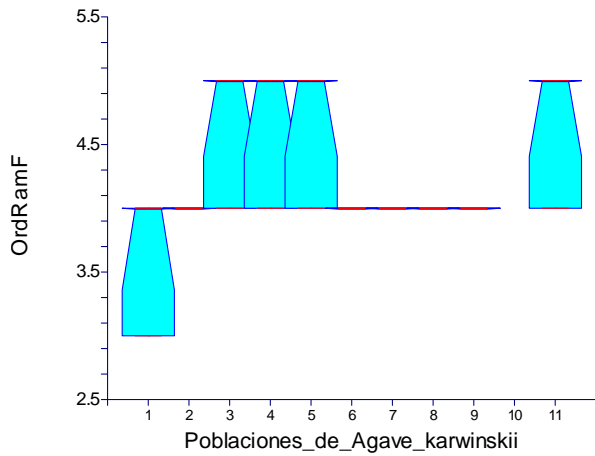
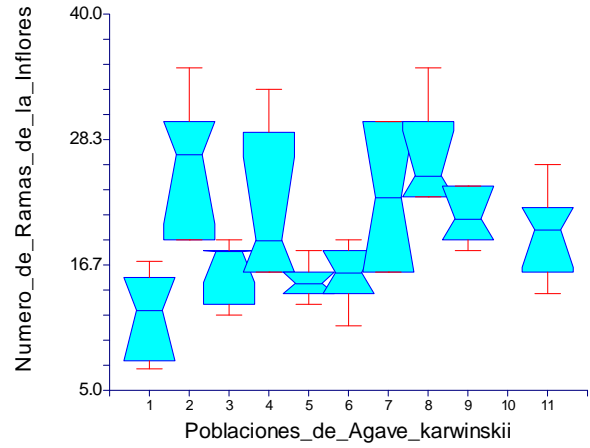
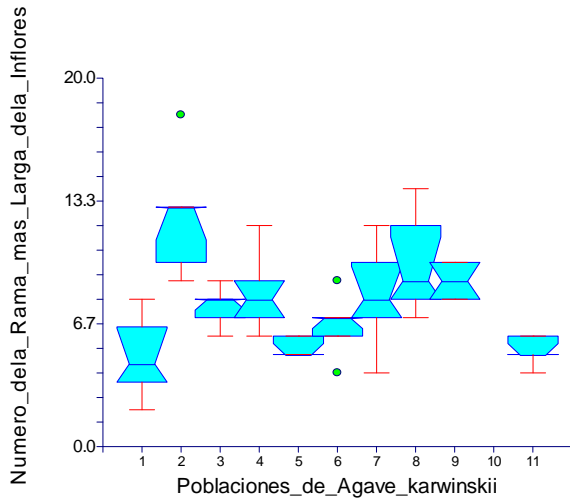
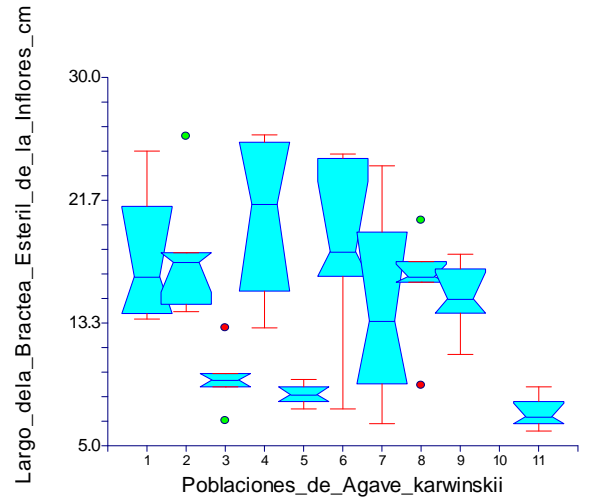
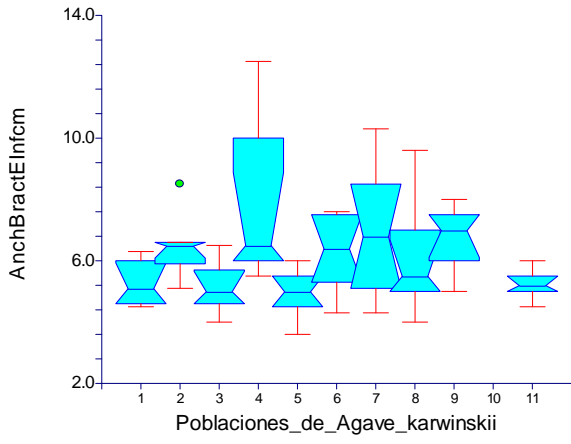
Anexo. 2. Diagramas de caja de los caracteres evaluados

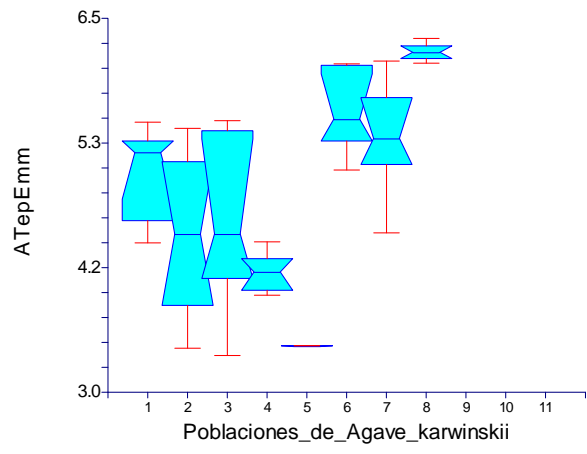
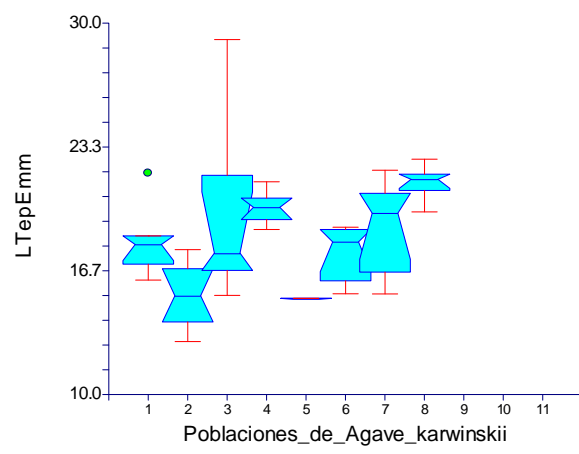
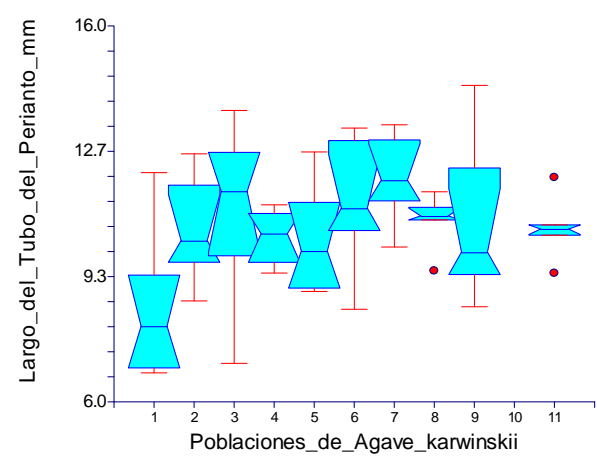
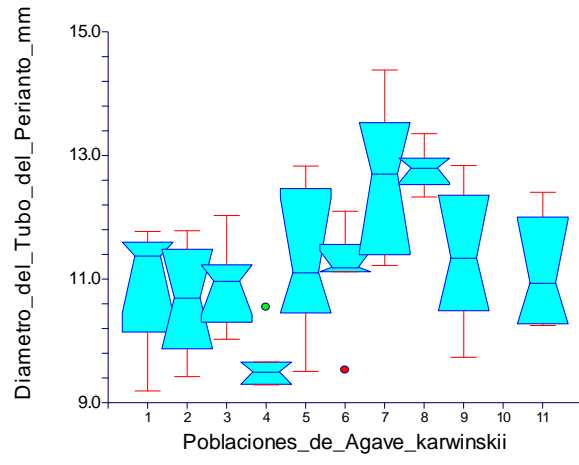
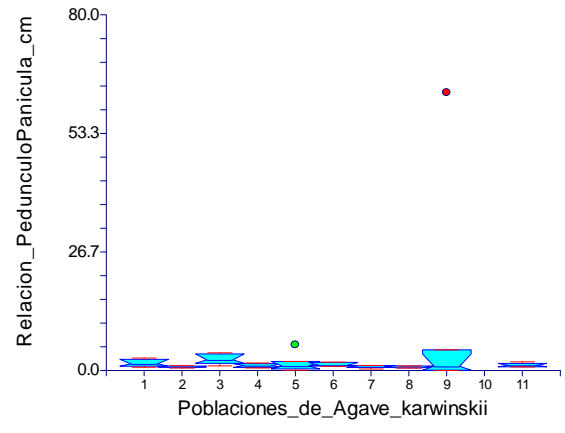
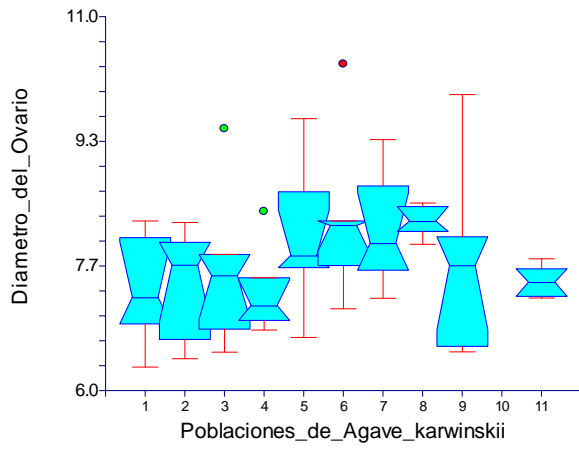


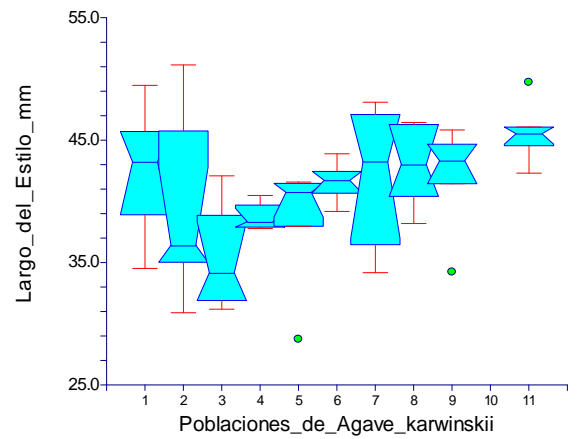
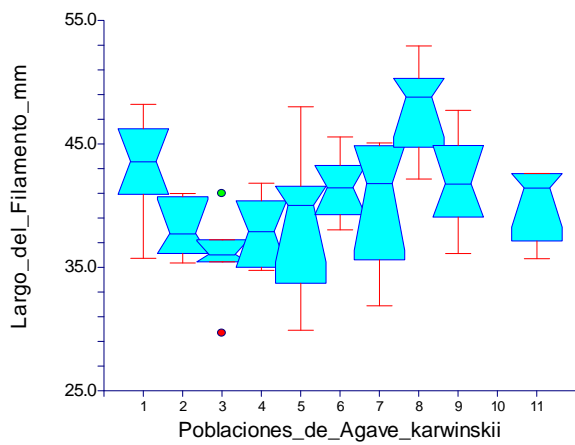
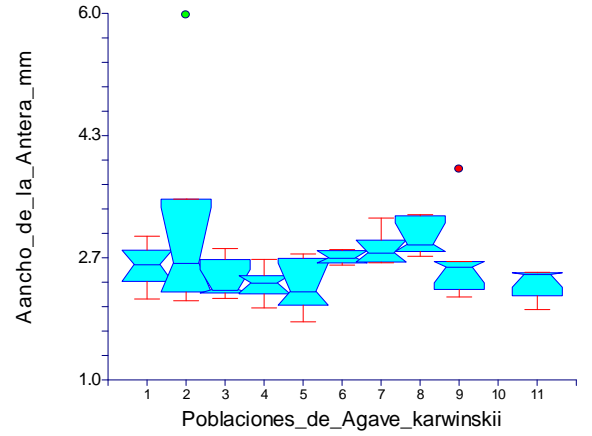
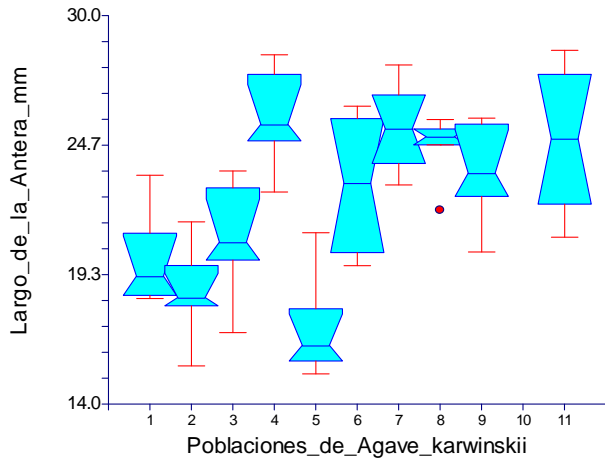
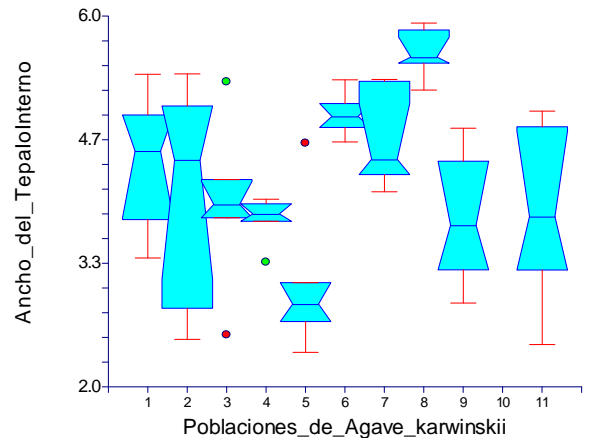
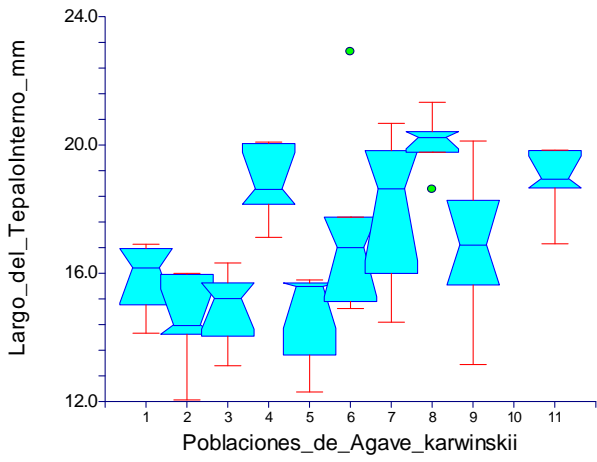


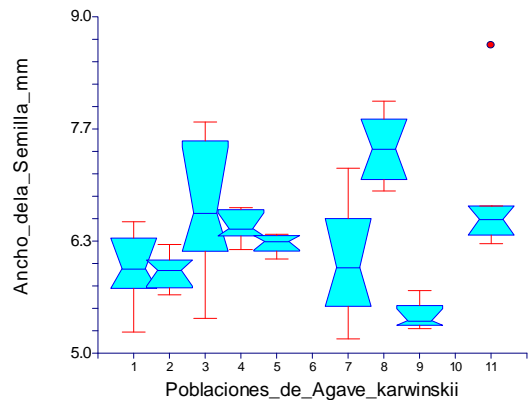
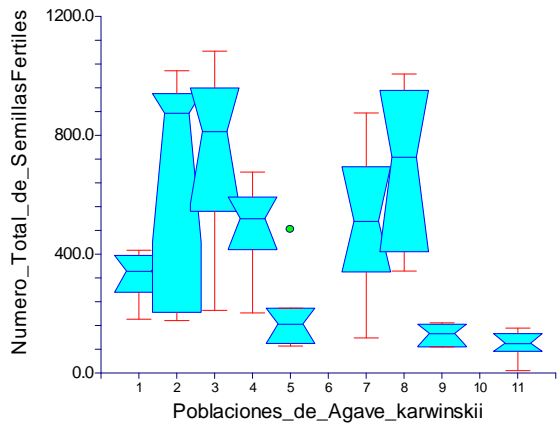
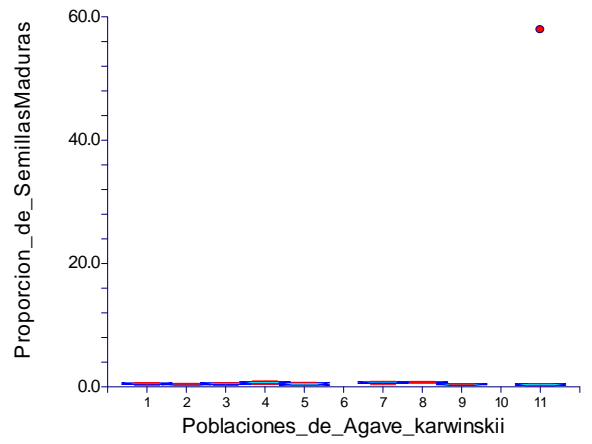
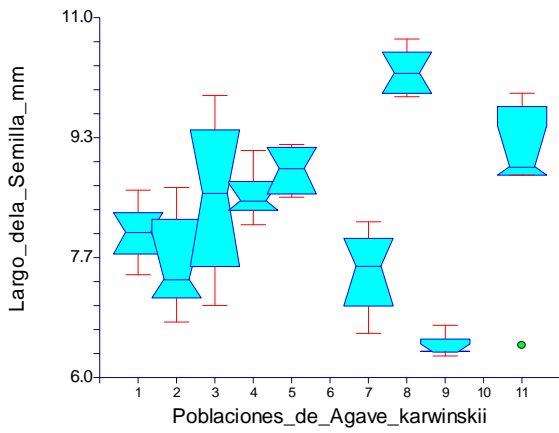
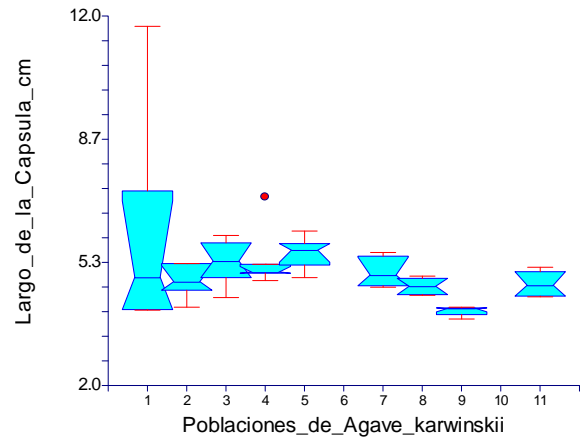
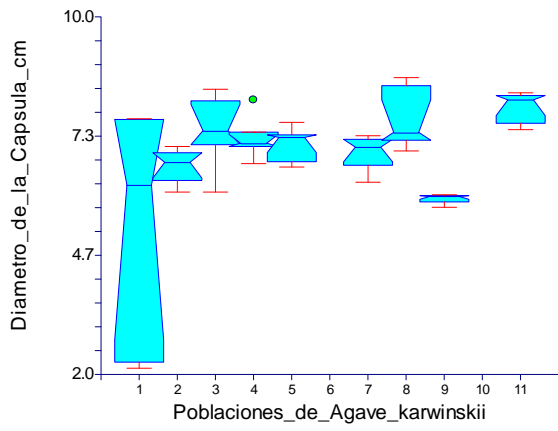


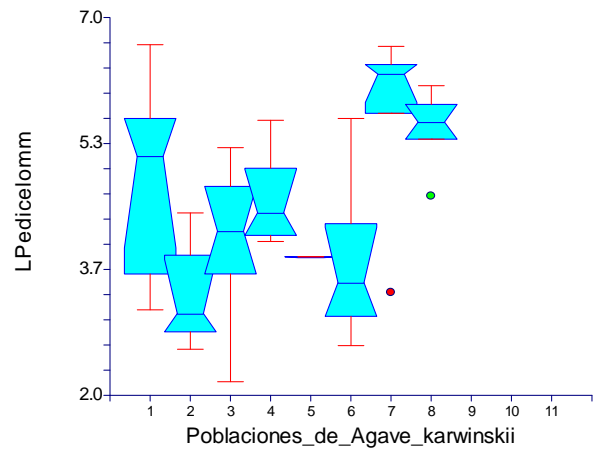
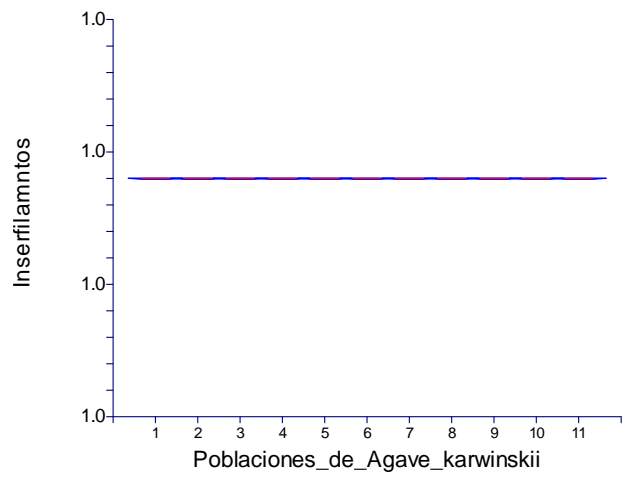












Poblaciones de *Agave karwinskii*

- 1: cachitún
- 2: sierrudo
- 3: cirial
- 4: marteño
- 5: espina negra
- 6: tripón
- 7: bicuishe
- 8: madrequishe
- 9: tobasiche
- 10: San Martín
- 11: cuishe

