



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO  
DE MORELOS**

---

---

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN**

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y FENOTÍPICA DE TRES TAXONES DE *Agave  
salmiana* (ASPARAGACEAE) DE LA REGIÓN POBLANO-VERACRUZANA.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN BIOLOGÍA INTEGRATIVA DE  
LA BIODIVERSIDAD Y LA CONSERVACIÓN**

PRESENTA:

**BIOL. ROGELIO LARA GONZALEZ**

**DIRECTORA: Dra. ALEJANDRA VÁZQUEZ LOBO YURÉN**

**CO-DIRECTORA: Dra. ALEJANDRA C. MORENO LETELIER**



**CUERNAVACA, MORELOS.**

**Enero, 2019**

## RESUMEN

*Agave* es un género endémico de América con centro de origen en México, crece en ambientes semiáridos y comprende aproximadamente 210 especies. Uno de los grupos con mayor relevancia cultural y económica es el de los agaves pulqueros. Se analizaron tres taxones de maguey pulquero: Manso (*Agave salmiana* ssp. *salmiana*), Verde (*Agave salmiana* ssp. *crassispina*) y Tepezorra (*Agave salmiana* var. *ferox* Trel), de la Región central Poblano-Veracruzana. Se usaron 96 individuos de una plantación experimental en el ejido de Tenextepec, municipio de Perote, Veracruz. Se registraron 18 caracteres morfométricos y número de hojas e hijuelos por planta. En la genética se utilizaron polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP's por sus siglas en inglés) obtenidos de secuenciación masiva utilizando la técnica de secuenciación de ADN asociado a sitios de restricción (RAD-seq por sus siglas en inglés). Se encontraron diferencias significativas entre taxones para: altura, diámetro y cobertura de la planta, número de hojas, largo de hojas, ancho de hojas, número de dientes y longitud de la espina principal. El 74% de la variabilidad total fue explicada por los cuatro primeros componentes principales. La mayoría de los caracteres se agrupan mejor en la primera función discriminante. En la caracterización genotípica usando 5,006 SNPs, la heterocigosis esperada promedio ( $H_e$ ) fue de  $0.201 \pm 0.002$  (media  $\pm$  error estándar). Los análisis de STRUCTURE, distancia genética y PCA revelan que los tres grupos se diferencian marcadamente y no tienen señales de compartir alelos por flujo génico reciente. Los coeficientes de endogamia fueron negativos, con mayor magnitud en manso y verde, posiblemente resultado de una alta tasa de reproducción clonal, en contraste con Tepezorra, que muestra señales de entrecruzamiento. *Agave salmiana* presenta alta variabilidad fenotípica, con diferenciación entre los tres taxones y variación dentro de cada grupo, *Agave salmiana* var. *ferox* es más variable y molecularmente se detectó la existencia de dos grupos genéticos al interior de Tepezorra. Los análisis multivariados revelan que en el proceso de domesticación se ha favorecido un mayor tamaño de la roseta y la reducción de estructuras de protección mecánica. En este sentido se ha encontrado que *Agave*

*salmiana* ssp. *salmiana* puede ser el taxón con mayor grado de domesticación con dientes pequeños y rosetas grandes, asociada a los cultivos y/o linderos de parcelas agrícolas.

Palabras clave: *Agave salmiana*, Domesticación, Variación fenotípica, GBS, RAD-seq, Diferenciación genética.

## SUMMARY

Agave is an endemic genus of America with center of origin in Mexico. Grows in semi-arid environments and comprises approximately 210 species. One group with a great cultural and economic relevance is the of pulquero agave. Three taxa of maguey pulquero were analyzed: Manso (*Agave salmiana* ssp. *salmiana*), Verde (*Agave salmiana* ssp. *crassispina*) and Tepezorra (*Agave salmiana* var. *ferox* Trel), from the Central Poblano-Veracruzana Region. 96 individuals from an experimental plantation were analyzed in the ejido of Tenextepec, municipality of Perote, Veracruz. 18 morphometric characters and number of leaves and children were recorded per plant. In genetics, single nucleotide polymorphisms (SNPs) obtained from genotyping by sequencing using the DNA sequencing technique associated with restriction sites (RAD-seq). Significant differences between taxa were found for height, diameter and coverage of the plant, number of leaves, length of leaves, width of leaves, number of teeth and length of the main spine. 74% of the total variability was explained by the first four principal components. Most characters are best grouped in the first discriminant function. In genotypic characterization using 5,006 SNPs, the average expected heterozygosity ( $H_e$ ) was  $0.201 \pm 0.002$  (mean  $\pm$  standard error). STRUCTURE, genetic distance and PCA analyzes reveal that the three taxa are differentiated and have no signs of admixture. Inbreeding coefficients were negative, with greater magnitude in manso and verde, possibly as result of a high clonal reproduction rate, in contrast to Tepezorra, which shows signals of outcrossing. *Agave salmiana* presents high phenotypic variability, defining the three separate groups and within groups, *Agave salmiana* var. *ferox* is more variable and molecularly two genetic groups were detected within Tepezorra. Multivariate analyzes reveal trends in the domestication process towards a larger rosette size and reduction of mechanical protection structures. In this sense it has been found that *Agave salmiana* ssp. *salmiana* can be the taxon with the highest degree of domestication with small teeth and large rosettes, associated with crops and/or boundaries of agricultural plots.

Keywords: *Agave salmiana* , Domestication, Phenotypic variation,, GBS, RAD-seq, Genetic differentiation.

## ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	8
Historia del maguey	9
Distribución geográfica	10
Importancia y Usos	11
Taxonomía del género <i>Agave</i>	13
Reproducción de los agaves	14
Caracterización de la diversidad genética	15
II. HIPÓTESIS	18
III. OBJETIVOS	18
IV.I. General	18
IV.II. Particulares	18
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	19
V.I. Área de estudio	19
V.II. Agaves en estudio	21
V.III. Plantación experimental de tres taxones del género <i>Agave</i>	22
V.IV. Variables fenotípicas a evaluar de los taxones de agave pulquero	25
V.V. Análisis de la variación genética	27
V. RESULTADOS	29
VI.I. Caracterización Fenotípica	29
VI.I.I. Análisis de componentes principales	31
VI.I.II. Análisis Discriminante	32
VI.II. Caracterización Genética con marcadores tipo SNPs	35
VI.I.III. Diferenciación genética de los tres taxones	37
VI. DISCUSIÓN	40
VII. CONCLUSIONES	42
VIII. LITERATURA	43
IX. ANEXOS	57

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Caracteres fenotípicos registrados en las plantas de <i>Agave salmiana</i> de la plantación experimental.....	25
<b>Cuadro 2.</b> Estadísticos descriptivos ( $\bar{X} \pm S$ ) para cada uno de los caracteres fenotípicos y diferencias significativas (en rojo), entre los tres taxones de <i>Agave salmiana</i> de la región poblano-veracruzana.....	29
<b>Cuadro 3.</b> Resultados del análisis de componentes principales de 16 caracteres fenotípicos de tres variedades de <i>Agave salmiana</i> .....	30
<b>Cuadro 4.</b> Centroides de Grupo para cada taxón que nos determinan las funciones discriminantes y los grupos.....	31
<b>Cuadro 5.</b> Estadísticos correspondientes y que validan las funciones discriminantes.....	32
<b>Cuadro 6.</b> Estadísticos descriptivos de diversidad genética de los 5006 SNPs. Se muestran los valores por taxón de: N= Tamaño de muestra, Na= No. De alelos diferentes, Ne= No. De Alelos efectivos, No de Alelos privados, I= Índice de información de Shanon's, Ho= Heterocigosidad observada, He= Heterocigosidad esperada, y el porcentaje de sitios polimórficos.....	34
<b>Cuadro 7.</b> Estructuración poblacional mediante los valores de Fst pareados entre taxones.....	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ubicación del área de estudio y puntos de proveniencia de los individuos incluidos de la parcela de <i>Agave salmiana</i> .....	20
<b>Figura 2.</b> Imágenes de cada uno de los taxones aproximadamente a los seis meses después de que se estableció la plantación, a) <i>Agave salmiana var salmiana</i> , b) <i>Agave salmiana var crassispina</i> y c) <i>Agave salmiana var ferox</i> ; y cuatro años después, d) <i>Agave salmiana var salmiana</i> , e) <i>Agave salmiana var crassispina</i> y f) <i>Agave salmiana var ferox</i> .....	23
<b>Figura 3.</b> Esquema que muestra la separación entre planta y planta de la parcela de tres taxones de <i>Agave salmiana</i> en el ejido de Tenex-tepec, Perote, Veracruz.....	24
<b>Figura 4.</b> Imágenes de la parcela experimental de los tres taxones de <i>Agave salmiana</i> en el ejido de Tenex-tepec, municipio de Perote, Veracruz.....	24
<b>Figura 5.</b> Se muestran valores promedio y error estándar de las variables integradas en el primer componente principal.....	30
<b>Figura 6.</b> Agrupación de los caracteres por taxón.....	32
<b>Figura 7.</b> Influencia de los caracteres morfométricos en el análisis discriminante, y su agrupación por cada taxón.....	33
<b>Figura 8.</b> Distribución de la varianza genética en función de los 5006 SNPs. Se observan los tres taxones como grupos genéticos diferentes. Los dos primeros componentes principales (panel superior) explican cerca del 42 % de la variación genética total, teniendo los valores de eigenvalores más robustos en el modelo (diagrama de barras, recuadro superior derecha).....	36
<b>Figura 9.</b> Análisis de distancia genética de Nei. El filograma muestra el agrupamiento monofilético de la tres variedades analizadas: Tepezorra (morado), Verde (verde) y Manso (azul).....	38
<b>Figura 10.</b> Análisis de estructura entre los tres taxones. Se muestran los resultados del análisis de STRUCTURE el agrupamiento más probable (K=3) y el siguiente nivel de agrupación (K=4).....	39

## I. INTRODUCCIÓN

Las plantas del género *Agave* (Asparagaceae) han sido parte importante de la historia de nuestro país y fueron de las primeras utilizadas por los pueblos prehispánicos para satisfacer sus necesidades básicas. México es considerado el centro de origen y diversificación de este género endémico de América (García-Mendoza, 2007; Good-Avila *et al.*, 2006; Nobel, 1998), con una amplia distribución geográfica, desde el sur de Estados Unidos hasta Bolivia y Paraguay (Paredes *et al.*, 2012). El número de especies descritas para el género de acuerdo con García-Mendoza (2007) es de cerca de 200 especies, de las cuales 128 se encuentran en México y 113 son endémicas del territorio (Espejo, 2012), así México es el área con mayor diversidad del género en el mundo. Estas plantas son características de zonas áridas y semiáridas, presentando adaptaciones morfológicas, fisiológicas y anatómicas para sobrevivir en condiciones de alta insolación y poca humedad. Aunque estas plantas sean típicas de estas regiones, como cualquier otra especie, requieren de condiciones microambientales particulares para lograr el éxito biológico (Aguirre *et al.*, 2001; García-Mendoza, 2007; Samo *et al.*, 2008).

En la región Poblano-Veracruzana existe un fuerte proceso de cambio de uso de suelo, siendo una zona semiárida y la cubierta vegetal es escasa. El género *Agave* se considera clave en la restauración de ciertos ecosistemas, tiene una relevante importancia ecológica por su apoyo en la reducción de la erosión, captura de carbono, así como la provisión de refugio y forraje (José-Jacinto y García-Moya, 1995, García-Herrera *et al.* 2010, Castro-Díaz y Guerrero-Beltrán 2013).

Los agaves pulqueros (taxones del grupo Salmianae), también conocido como árbol de las maravillas, es una planta xerofita, adaptada a vivir en condiciones climáticas desfavorables y suelos pobres. En la actualidad, el rescate y reactivación del maguey pulquero significa la posibilidad de generar riqueza social y cultural, y resarcir a los pobladores originales el legado biológico y cultural que crearon. A pesar de que tiene numerosos usos, existe un desinterés y se pierden espacios para su permanencia y su cultivo. No se cuenta con una estrategia de conservación en la región, ni se cuenta con suficiente información sobre la variación genética o fenotípica de cada taxón. Tradicionalmente los taxones están delimitados taxonómicamente bajo



claves dicotómicas (Gentry 1982, Álvarez-Salazar, 2004), pero se dificulta identificar las plantas en campo bajo estos criterios. Sin embargo, es posible identificarlas bajo ciertas condiciones ambientales y tipo de suelo. De esta manera, *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck es una de las especies de *Agave* con mayor plasticidad, por lo que presenta un mayor número de variedades, capaces de sobrevivir en ambientes humanizados como agostaderos y plantaciones (García-Mendoza, 2011; Mora-López, *et al.*, 2011). Es una de las especies de mayor importancia económica, debido a que es una de las especies de las cuales se obtiene pulque y existe evidencia como raspadores líticos prehispánicos de más de 3500 años que posiblemente utilizaron para recolectar el aguamiel además de obtener fibra (Gentry, 1982; Fish *et al.*, 1985; Parsons y Parsons, 1990 y Aguirre *et al.*, 2001), asimismo cada una de sus partes, e incluso algunas de sus plagas, pueden ser aprovechadas. En la región Poblano-Veracruzana *Agave salmiana* posee relevancia por el uso que tiene desde tiempos prehispánicos lo cual se confirma por su cercanía a los sitios arqueológicos que muestran su uso como alimento (entre 600 y 1000 años d.C.).

La importancia en general de los Agaves y específicamente de *Agave salmiana* puede ampliarse, al considerar aspectos ecológicos, como retención y formación de suelo, por lo anterior representa una alternativa de desarrollo al aprovechamiento total (García-Mendoza, 2011; Aguilar-Juárez *et al.* 2014, Narváez *et al.*, 2016). Sin embargo, su reproducción y diversidad genética ha sido afectada por el tipo de manejo, que en la zona se producía de manera intensa para la producción del pulque (Payno, 1864).

Los taxones usados en la producción de pulque, Manso (*Agave salmiana* ssp. *salmiana*), Verde (*Agave salmiana* ssp. *crassispina*) y Tepezorra (*Agave salmiana* var. *ferox* Trel), en la Región central Poblano-Veracruzana, considerados en la NOM-070-SCFI-1994 con reporte de uso para mezcal. Según la denominación de origen, una especie de *Agave* es considerada para la elaboración del mezcal mientras no se utilice como materia prima para otras bebidas con denominación de origen (CONABIO, 2005; Colunga-García *et al.*, 2007; Gentry, 1982). En esta zona se presenta un maguey comúnmente denominado como maguey verde *Agave salmiana* ssp. *crassispina*

(*metometl*: maguey divino), el más importante del pasado indígena y de la historia de México para producir vino sagrado (pulque).

Con el propósito de estudiar y caracterizar a estas variedades en la región Poblano-Veracruzana, se estableció una parcela experimental de una hectárea con plantas de diferentes proveniencias de tres taxones de *Agave salmiana* antes mencionados. Las plantaciones experimentales permiten analizar la variación fenotípica de diferentes poblaciones en el mismo ambiente, lo cual garantiza que la variación fenotípica observada será influenciada más por el componente genético que por el componente ambiental (Aguirre-Dugua y González-Rodríguez, 2016; Futuyma, 2009). Por lo tanto, el análisis de las plantas de esta plantación permitirá la caracterización genética y fenotípica de los tres taxones y determinar el grado de diferenciación genética asociado a la variación fenotípica. Este tipo de aproximación ya se ha aplicado para el agave pulquero en una región del Estado de México (Rojas *et al.*, 2007) encontrando diferenciación del maguey verde respecto a otras variedades de *A. salmiana*. Este último trabajo no incluye dos de las variedades identificadas en nuestro estudio, y sus plantas provienen exclusivamente de plantaciones y no de poblaciones naturales, por lo que los resultados pueden estar sesgados por la selección previa del cultivo.

Debido a ello es necesario emprender estudios que permitan conocer la variabilidad en las características morfológicas además de caracterizar la variabilidad genética y fenotípicamente, además de delimitar tres taxones de maguey pulquero (*Agave salmiana*) en la región Poblano-Veracruzana, para también contribuir a establecer una estrategia de manejo y conservación del valioso recurso genético.

### **Historia del maguey**

Las evidencias arqueológicas asociadas con ocupaciones humanas tempranas muestran que hace unos 9,000 años, el maguey era uno de los alimentos esenciales (Parsons y Parsons, 1990; MacNeish, 1992), como lo indican los innumerables bagazos recuperados en las cuevas secas del Valle de Tehuacán, Puebla, y en la Cueva de Guilá Naquitz, Oaxaca (Flannery, 1986). Los agaves fueron descritos por Carl Linneus en 1753, utilizando a *Agave americana* como la especie tipo del género. Él

mismo bautizó a este género con el nombre *Agave*, palabra que deriva del griego y significa “admirable” (García-Mendoza, 2011). *Agave* es un término científico de uso mundial a partir de 1753. En México, estas plantas se conocían con diferentes nombres tales como metl (Náhuatl), *huadá o bomi’ni* (Otomí), *dua o doba* (zapoteco), *tacamba* (purépecha) y *yabi* (Mixteco). Fueron los españoles quienes trajeron la voz caribeña “maguey” para nombrar estas plantas y ahora es el nombre común más difundido. Los grupos humanos que se establecieron en lo que ahora es México aprovecharon los magueyes desde hace por lo menos diez mil años, seleccionando algunas características varios de ellos, sin llegar a una domesticación propiamente dicha. Además de utilizarlos por sus fibras o aguamiel, de algunos obtenían el mexcalli, maguey cocido con altas concentraciones de azúcares (García-Mendoza, 2012).

### **Distribución geográfica**

Dentro la familia Asparagaceae se encuentra la subfamilia Agavoideae, la cual es originaria del continente Americano, con distribución desde el sur de Canadá hasta el norte de América del Sur y las islas del Caribe, con aproximadamente 293 especies comprendidas en nueve géneros (Bogler *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2006). En cuanto a diversidad de especies destaca el género *Agave*, ya que de acuerdo a Rocha *et al.*, (2006) se considera que los dos subgéneros *Littaea* y *Agave*, comprenden un total de 208 especies.

Los agaves son perennemente verdes con características que les facilitan una adaptabilidad en ambientes hostiles, donde se desarrollan y multiplican fácilmente. Es originario de Mesoamérica, México es el centro de origen además de ser el centro de diversidad de especies (García-Mendoza, 2010). La distribución del género abarca desde el Sur de Estados Unidos hasta Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú y Bolivia incluyendo las islas del Caribe desde Bahamas a Aruba, Curacao, Trinidad y Tobago, son características de las zonas áridas y semiáridas cuyo centro de origen y diversificación se localiza en México, donde existe mayor variación morfológica, filogenética, evolutiva y sobretodo cultural (García-Mendoza, 2007, Lodé y Pino 2008).

En México encontramos estas plantas en diversos ecosistemas y altitudes, desde el nivel del mar, creciendo sobre dunas costeras hasta algunos bosques

mesófilos de montaña y llegando a altitudes mayores de 3400 msnm. Sin embargo, la mayoría de las especies crece entre los 1000 y los 2500 msnm asociadas con vegetación de clima árido y semiárido. Estas plantas son elementos importantes del paisaje mesoamericano. Crecen en lugares con buen drenaje hidráulico, soleados, pedregosos, en laderas de montañas, barrancas y en lugares planos (García-Mendoza, 2010; García-Mendoza, 2011).

### **Importancia y Usos**

La relación de la planta del maguey con los grupos humanos en México es antigua siendo una de las plantas que acompañaron la transición de grupos nómadas de cazadores-recolectores a agricultores sedentarios. Tal como ocurrió con otras plantas, la explotación eficiente de las posibilidades que ofrecía el maguey fue consecuencia de una larga interacción con el humano, que a la larga aprendió qué partes le eran útiles, cuál era el mejor momento para manipularla y de qué manera hacerlo para no interferir en su ciclo natural de desarrollo. En México, los agaves han tenido y tienen una gran importancia económica y cultural para numerosos pueblos indígenas y mestizos, usándolos como alimento, bebida, medicina, combustible, cobijo, ornato, fibras extraídas de las hojas (ixtle), abono y construcción de viviendas, entre otros usos, mismos que aún siguen vigentes (Aguirre *et al.*, 2001; García-Mendoza, 2007; Enríquez, 2012 y Cervantes-Dueñas, 2016).

Se han registrado 74 especies útiles y 28 taxa infraespecíficos de *Agave*, enfatizando en las productoras de fibra, forraje, alimento humano, bebidas destiladas y fermentadas, sin embargo se han señalado más de 70 formas de empleo (García-Mendoza, 1998; Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 2007; García-Herrera *et al.*, 2010). Así también se han registrado 42 especies como productoras de bebidas destiladas (mezcal) en 24 entidades federativas y *A. salmiana* es de las especies más utilizadas (Colunga-GarcíaMarín *et al.*, 2007a; Gentry, 1982; Aguirre *et al.*, 2001). Gentry (1982) menciona que las especies *A. salmiana*, *A. mapisaga*, *A. atrovirens*, *A. ferox*, *A. hookeri* y *A. americana* son fuente de materia prima para la obtención de pulque (bebida fermentada del agua miel). Dicha bebida tenía un profundo sentido religioso, de

manera que el maguey, en especial *A. salmiana* representado con Mayahuel (diosa del maguey) y el pulque ocuparon un lugar importante entre las antiguas divinidades mexicanas (Rendón, 1990).

Actualmente, la explotación del maguey se enfoca primordialmente en la elaboración de mezcales y tequilas. Particularmente de *A. salmiana* se explota en la elaboración de pulque aunque es común también su uso en la elaboración de barbacoas y mixiotes donde se remueve la cutícula de las hojas y la capa u hoja transparente obtenida se usa para envolver alimento brindando un exquisito sabor al platillo llamado mixiote (Nobel, 1998; Colunga-García *et al.*, 2007; García-Herrera *et al.*, 2010; Castro-Díaz y Guerrero-Beltrán, 2013); e incluso algunas plagas asociadas al maguey, como algunas larvas de insectos (gusanos) se siguen consumiendo como alimento (Aguilar *et al.*, 2014).

También presenta potencial como forraje, que de acuerdo a Pinos-Rodríguez *et al.* (2008), la composición química de las hojas frescas y ensiladas son buena fuente de carbohidratos solubles y las plántulas y plantas maduras son la etapa adecuada como forraje de rumiantes. Dentro de la agricultura, aún se le utiliza para delimitar parcelas y terrenos y es fundamental para las terrazas de cultivo y las parcelas que se sitúan en las laderas, pues permite la retención del suelo y previene la erosión. Es de resaltar que del aguamiel que se extrae del maguey no sólo se produce pulque, sino también se ha consumido en forma de miel deshidratada y vinagre.

### **Taxonomía del género *Agave***

Anteriormente, el género *Agave* tradicionalmente se divide en dos subgéneros, *Littaea*, que tiene flores espigadas en pares o agrupadas o más raramente racimosas en pequeños grupos distintos y *Agave* que tiene flores paniculadas en grandes grupos umbelados sobre pedúnculos laterales (Tello-Balderas, 1988). El subgénero *Littaea* está integrado por 8 secciones con 54 especies, 4 subespecies, 6 variedades y 7 formas y el subgénero *Agave* lo integran 12 secciones con 82 especies, 21 subespecies y 23 variedades, en total 197 taxones (Gentry, 1982; García *et al.*, 2010).

La propuesta por Dahlgren y colaboradores 1985, ha sido por varios años más aceptada pues ha sido basada en análisis morfológicos y moleculares; en ella Dahlgren

y colaboradores, consideraban que la familia Agavaceae incluye 8 géneros con 295 especies, de los cuales 125 especies 75% se encuentran en México (Cervantes-Dueñas, 2016).

De acuerdo a estudios recientes, el género *Agave* y los 8 géneros relacionados se ubican en la subfamilia Agavoideae dentro de la familia Asparagaceae. Según estudios recientes, los agaves pertenecen a la familia Asparagaceae y forman la subfamilia Agavoideae. La familia es endémica de América y se distribuye desde Estados Unidos de América hasta Bolivia y Paraguay (García-Mendoza *et al.*, 2017).

### **Reproducción de los agaves**

La mayoría de los agaves presentan estrategias de reproducción sexual y asexual. La reproducción sexual implica la producción de flores, frutos y semillas, las flores son protándricas, la antesis ocurre por la tarde, permaneciendo el estigma receptivo desde el atardecer hasta la mañana siguiente, con polinización principalmente alogámica, Los murciélagos y polillas han sido clasificados como polinizadores exitosos (Nobel, 1998; Arizaga y Ezcurra, 2002), aunque también en menor grado otros insectos diurnos (abejas, abejorros) y aves (colibríes, aves percheras) (Nava-Rodríguez, 2014). El final de la vida del agave lo marca la producción de las semillas las cuales aseguran la descendencia y una alta diversidad genética en la población.

En la propagación vegetativa, la mayoría de los agaves pueden producir tallos subterráneos denominados rizomas, que es un tallo subterráneo etiolado, el cual emerge del tallo principal de la planta madre y del final del rizoma emerge una nueva planta o hijuelo (Gentry, 1982; García-Mendoza, 2002; Esparza-Ibarra *et al.* 2015). También pueden desarrollarse por yemas vegetativas (propágulos) y bulbillos, que son pequeños rosetones que brotan en el tallo de la inflorescencia (García-Mendoza, 2002; Esparza-Ibarra *et al.* 2015). Considerando que los agaves son plantas semélparas (es decir que, se reproducen una sola vez en su vida y después mueren), la clonalidad es un mecanismo eficaz que aumenta la probabilidad de sobrevivencia, puesto que la muerte de la roseta es irreversible cuando llega a la madurez (Barrientos *et al.*, 1985; Granados, 1993; Arizaga y Ezcurra, 1995 y Esparza-Ibarra *et al.* 2015). *Agave salmiana*, es considerada monocárpica (hablando exclusivamente de

plantas) o semélpara (término usado para los organismos en general), es decir, que en la reproducción sexual producen la inflorescencia una sola vez en su ciclo de vida y posteriormente mueren (Eguiarte *et al.*, 2000).

En *A. salmiana*, la propagación asexual es la de mayor importancia, ya que la mayoría de las plantas son de hijuelos o de rizomas (Esparza-Ibarra *et al.* 2015), no obstante, esta forma de propagación puede tener como consecuencia una disminución de la variación genética de las poblaciones (Nava-Rodríguez, 2014).

### **Caracterización de la diversidad genética**

La caracterización de la diversidad genética y de la variación fenotípica de las especies es de vital importancia para la toma de decisiones sobre el manejo y la conservación (Piñero *et al.* 2008, Mandujano-Bueno *et al.* 2018). La medición de atributos ecológicos (densidad, estructura y demografía poblacional), así como de la variabilidad genética y fenotípica (dentro y entre poblaciones), nos permite diagnosticar la viabilidad de las poblaciones desde el punto de vista demográfico y genético (Godínez-Álvarez *et al.*, 2008; Golubov *et al.*, 2007). La genética de la conservación ha surgido en los últimos 20 años, cuando se reconoce que la genética es una herramienta importante para mantener y restaurar la biodiversidad (Piñero *et al.*, 2008). La biodiversidad se define como la variación de todas las especies de organismos vivientes (en diversos niveles), y depende de la diversidad genética ya que es improbable el mantenimiento de las poblaciones, las comunidades y los ecosistemas a largo plazo, si se pierde la diversidad genética.

La diversidad genética se puede considerar en dos niveles. Por un lado, la diversidad interespecífica o entre especies, se refiere al número de especies diferentes presentes en un ecosistema. Por otro lado, la diversidad intraespecífica o dentro de una especie, refleja el nivel de variación genética que se da entre individuos dentro de una población o una especie dada (diversidad intrapoblacional) o entre diferentes poblaciones de la misma especie (diversidad interpoblacional)(Piñero *et al.*, 2008).

La variación genética dentro de las poblaciones se puede medir como la frecuencia de los individuos de la población que son heterocigotos para un locus dado (heterocigosis observada) o como el número de alelos distintos presentes en el

conjunto de genes de la población (heterocigosis esperada) (Piñero *et al.*, 2008; Eguiarte *et al.*, 2010). La variabilidad genética, se origina por mutaciones, recombinaciones erróneas y alteraciones en el cariotipo (el número, forma, tamaño y ordenación interna de los cromosomas). De manera general, los procesos que fijan o eliminan la variación genética son la selección natural y la deriva genética (Futuyma, 2009).

El genotipo es la suma total del material hereditario de un organismo y el fenotipo de un organismo es el aspecto (morfología, fisiología, sistema reproductivo, formas de vida) que podemos observar o cuantificar. El fenotipo cambia continuamente a lo largo de la vida de un organismo; el genotipo, sin embargo, permanece constante con la excepción de algunas mutaciones ocasionales (Futuyma, 2009). Los fenotipos que se expresarán dependerán del ambiente en que se produzca el desarrollo. En resumen, las interacciones entre productos génicos y el ambiente determinan el fenotipo. Diferentes genotipos dentro de una población pueden expresarse diferencialmente en diferentes ambientes, lo cual se denomina norma de reacción (Núñez-Farfán *et al.* 2003). La variación fenotípica observada dentro de una especie puede ser resultado también de plasticidad o de adaptación local a las condiciones ambientales donde crece cada población (Eguiarte y Souza, 2007).

Para el estudio genético de las poblaciones, regularmente se usan los marcadores moleculares que pueden ser específicos de una región o generales que permiten analizar diferentes regiones del genoma (Dreisigacker, 2013; Piñero *et al.* 2018). Es importante seleccionar el marcador adecuado para el nivel de análisis a realizar, porque de acuerdo con sus características se podrán observar aspectos específicos de los datos y la historia que presentan (López De Heredia, 2016). Los marcadores moleculares son una herramienta que permiten estudiar el polimorfismo o la variabilidad genética en diferentes organismos, ya que pueden acceder directamente al genoma, permitiendo caracterizar y estimar las relaciones genéticas entre grupos de interés (Elshire *et al.* 2011; Poland and Rife, 2012; Mandujano *et al.* 2018).

El uso de marcadores moleculares tiene diversos objetivos, destacando la identificación de factores genéticos útiles en las poblaciones, introgresar genes de



interés en las líneas de mejoramiento, analizar la interacción entre genotipo y el ambiente, analizar la diversidad genética y la identificación de variedades con potencial productivo (López De Heredia, 2016). Estos surgen como una herramienta para el objetivo de mejoramiento genético, conjugando la variabilidad genética y fenotípica, y utilizados como criterio de selección (Poland and Rife, 2012).

Anteriormente, para evaluar simultáneamente diferentes regiones del genoma, los marcadores disponibles estaban basados en marcadores morfológicos, los marcadores microsatélites (SSR), el polimorfismo en el largo de los fragmentos amplificados (AFLP's), polimorfismos en el largo de los fragmentos de restricción (RFLP's), por mencionar algunos. En su momento mostraron efectividad al identificar genes que codifican características simples, pero no fue así en el caso de características complejas donde interactúan muchos genes y en distinta proporción (López De Heredia, 2016). Es así que los polimorfismos de nucleótidos simples (SNP), son marcadores que ha tenido gran importancia en los últimos años por su abundancia en el genoma y por las tecnologías desarrolladas para su identificación (Poland and Rife, 2012; Elshire *et al.* 2011; Deschamps *et al.*, 2012, Brandrud *et al.*, 2017).

La secuenciación genética masiva de alto rendimiento es actualmente una de las herramientas con mayor rapidez de desarrollo y demanda, puesto que los costos de secuenciación están siendo reducidos, la calidad de las secuencias mejorada y la tecnología utilizada para el análisis secuencial cada vez está más disponible (Goodwin *et al.*, 2016). Aunado a esto, la cantidad de información que se puede obtener es mayor en comparación con otras técnicas genéticas, lo que reduce considerablemente el costo por marcador (Andrews *et al.*, 2016).

Actualmente se cuenta con tecnologías que permiten el genotipado de miles de sitios del genoma de varios individuos sin la necesidad de una identificación previa de los loci (Metzker, 2010; Goodwin *et al.*, 2016). Así surgen los métodos de preparación de librerías, la secuenciación y el análisis bioinformático en la identificación de SNP's basándose en la resecuenciación del genoma en pequeños fragmentos de ADN de las distintas muestras a genotipar. Esta secuenciación a gran escala permite identificar

una gran cantidad de marcadores en el genoma a un costo más reducido (Shendure y Ji, 2008; López De Heredia, 2016).

Existen diversas técnicas que permiten preparar el ADN que va a ser secuenciado, las más utilizadas se enfocan en el uso de enzimas de restricción, que hacen cortes en regiones específicas del genoma que permiten y obtener una representación reducida de este (López De Heredia, 2016). Las principales técnicas son la secuenciación de representación reducida (RRL), la secuenciación de ADN asociada a los sitios de restricción (por sus siglas en inglés RAD-seq) y la secuenciación de baja cobertura para genotipado donde encontramos al genotipado por secuenciación (GBS) (Elshire *et al.* 2011; Deschamps *et al.*, 2012, Brandrud *et al.*, 2017).

Por ejemplo, la, técnica RAD-seq se basa en la representación reducida de un genoma completo en sitios restringidos por digestión enzimática, permitiendo así muestrear poblaciones enteras para obtener información de gran resolución a nivel genómico; Así, de este modo es posible encontrar marcadores asociados a parentesco, flujo genético y características fenotípicas (Peterson *et al.* 2012; Andrews *et al.*, 2016; Anderson *et al.*, 2017).

Los polimorfismos de un solo nucleótido (por sus siglas en inglés SNP's) son uno de los marcadores moleculares actualmente más utilizados, ya que son fácilmente obtenibles a través de esta técnica y debido a su abundancia en el genoma y su heredabilidad, pueden servir para analizar poblaciones naturales en las que existe limitada o nula cantidad de secuencias genómicas reportadas (Bachlava *et al.* 2012; Deschamps *et al.*, 2012).

## **II. HIPÓTESIS**

Las variedades de agaves pulqueros de la región Poblano-Veracruzana mostrarán diferenciación fenotípica y genética, resultado de los procesos de selección artificial por el manejo. Dado que gran parte de la propagación y selección se realiza mediante propagación vegetativa, se encontrará mayor diversidad genética en la variedad silvestre y alta estructuración.

## **III. OBJETIVOS**

### **General**

Caracterizar y comparar la variación genética y fenotípica dentro y entre tres taxones de *Agave salmiana*, en la región Poblano-Veracruzana.

### **Particulares**

Evaluar la variabilidad fenotípica de tres taxones de *A. salmiana* en caracteres morfo-anatómicos en plantas desarrolladas en un jardín común.

Determinar la variabilidad genética y el grado de estructuración de tres taxones en *A. salmiana* usando los marcadores tipo SNP's mediante genotipado por secuenciación (RAD-seq).

#### IV. MATERIALES Y MÉTODOS

##### Área de estudio

El área de estudio es dentro de la región Poblana-Veracruzana, particularmente en una parcela experimental que se estableció en el Ejido de Tenextepec, municipio de Perote, Veracruz (Fig. 1). El maguey en la zona Poblana-Veracruzana prospera desde los 2300 a 3100 msnm. El clima va de frío-seco con lluvias a semiseco templado, la precipitación pluvial varía de 399.2 hasta 481.8 mm anuales, de la cual el 70.4 % se presenta en la época de lluvias (junio a octubre) y el resto (20.1 %) en la época seca (de marzo a mayo). La evaporación total normal oscila de 1620.3 a 1741.8 mm.

La actividad primaria de la región es la agricultura, destacando la producción maíz, frijol, papa, haba y maguey. Las poblaciones de magueyes se encuentran coexistiendo con relictos de bosques de *Pinus cembroides* (Pino piñonero), *Pinus oaxacana* (Ocote), *Juniperus deppeana* (Sabino), *Cupressus benthamii* (Ciprés), *Dasyllirion acrotriche* (Cucharilla), *Nolina parviflora* (Nolinaceae) y *Beschorneria calcicola* (Asparagaceae), hasta matorral y pastizal. Con relación a la fauna podemos encontrar conejos, gavián, gorrión, queshque, primavera, lagartija, cascabel, escorpión, liebres, zorro, roedor y ardillas.

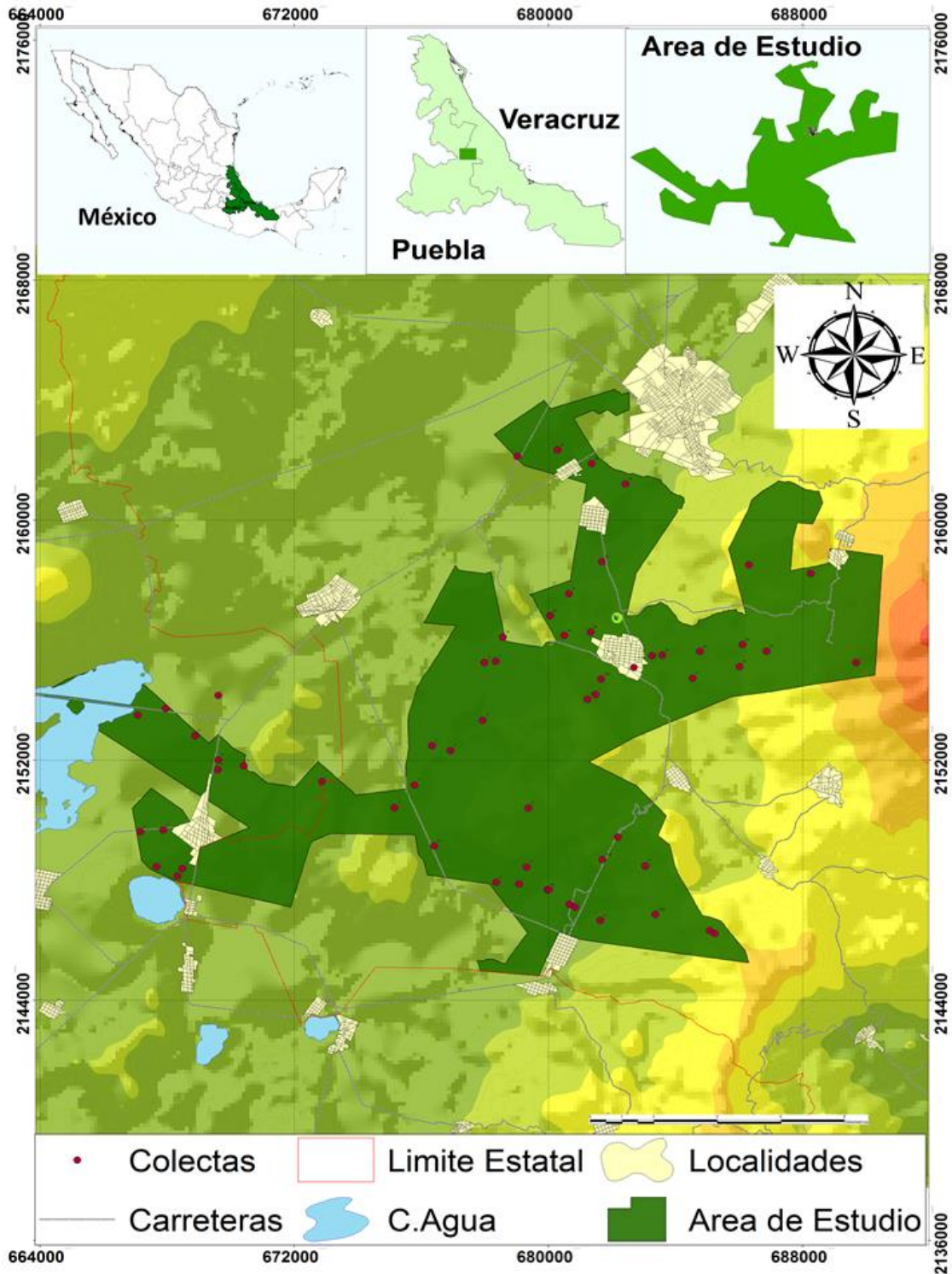


Figura 1. Ubicación del área de estudio correspondiente a tres ejidos de Perote, Veracruz y un ejido de Alchichica, Puebla; y puntos de proveniencia de los individuos incluidos de la parcela de *Agave salmiana* ubicada en el ejido de Tenextepac.

## **Agaves en estudio**

*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck crece en suelos muy diversos, en los bordes de bosques de pino-encino, bosque tropical caducifolio y matorral xerófilo, en altitudes de 1500-2600 msnm, aunque en la zona de estudio se presenta desde los 2300 hasta los 3100 msnm. Son plantas robustas, generalmente reconocidas por presentar un buen número de hojas de 30 a 70 por individuo, de 1 a 2 m de longitud. Cada individuo produce una inflorescencia de 6 a 8 m de alto iniciando en octubre-noviembre, la floración sucede de abril a septiembre, con 15 a 20 umbelas. Las flores son protándricas, son visitadas tanto por animales diurnos, aves y colibríes; y nocturnos tales como murciélagos, caracterizados por ser los polinizadores más importantes.

Son plantas de tamaño mediano a grande, utilizado principalmente para la producción de pulque y fibra, es conocido como: “maguey manso”, “maguey de pulque” y “maguey de quiote”, sus rosetas son frecuentemente plantadas como lindero y para delimitar huertas. Es una especie monocárpica, con presencia de propagación asexual, endémica de México, con una amplia distribución en los estados de Coahuila, Durango, San Luis Potosí, Estado de México, Ciudad de México, Morelos, Hidalgo, Tlaxcala, Oaxaca, Puebla y Veracruz (Martínez y Eguiarte, 1987; Granados, 1993; Eguiarte *et al.*, 2000; García-Mendoza, 2011).

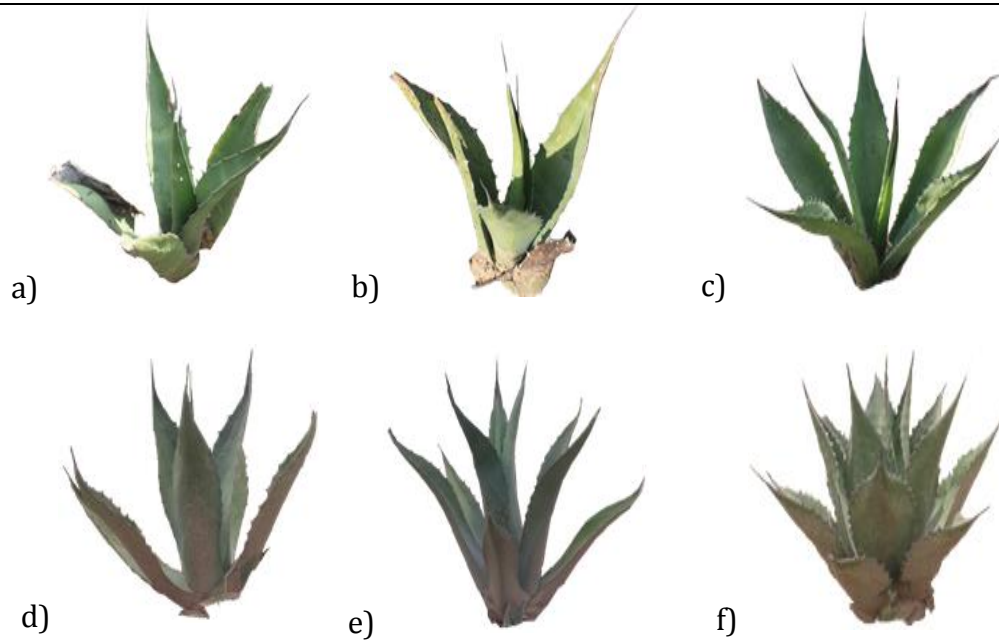
Maguey Manso, Maguey Verde y Maguey Tepezorra, como se conocen de forma común, son los taxones de *Agave salmiana* que se encuentra en la región Poblano-Veracruzana, y son los utilizados en la plantación experimental. En las laderas, planicies, en un sistema de terrazas llamado metepantles, en terrenos con más vegetación, menos áridos y con mejor desarrollo aparente y lugares de más altitud, existe maguey Manso (*Agave salmiana* ssp. *salmiana*). En la explanada volcánica con zacatal se encuentra el maguey Verde (*Agave salmiana* Otto ex Sal-Dyck ssp. *crassispina* (Trel.) Gentry), este también se presenta en planicies, escasamente en laderas, en vegetación es más de tipo árido, zonas más bajas y secas. En cambio, en los afloramientos rocosos de caliza, regularmente estrepitoso y árido se encuentra en

mayor abundancia el maguey Tepezorra (*Agave salmiana* Otto ex Sal-Dyck var. *ferox* (Trel.) Gentry).

En la zona, la distribución de las poblaciones de maguey está relacionada al uso y a la calidad del suelo; o sea, los taxa empleados para producir pulque se encuentran en las áreas de cultivo y los taxa que no han sido o ya no se utilizan (taxones en desuso, los utilizados alguna vez para pulque u otras especies que se conoce se usan en otros lados para mezcal y fibra) crecen en sitios no aptos para la agricultura.

### **Plantación experimental de tres taxones del género *Agave***

La identificación de plantas, la extracción de hijuelos y el trasplante se realizó con base en el conocimiento empírico de ejidatarios con experiencia en la selección, extracción y tamaño de los hijuelos para la siembra y con información documentada por Payno (1864), Segura (1901), Macedo (1950), Parsons y Parsons (1990). Aguirre et al. (2001) y Ramírez-Rodríguez (2004). Se extrajeron vástagos o hijuelos de plantas madre en estado silvestre de tres taxones de maguey pulquero (*Agave salmiana* ssp. *salmiana*, *Agave salmiana* ssp. *crassispina*, *Agave salmiana* var. *ferox*) y se transplantaron a la parcela (Fig. 2 a, b, y c). Se eligieron de plantas madres grandes, sanas y sin daño aparente, hijuelos sanos, sin ataque de insectos, ni daño mecánico con un tamaño entre 40 y 70 cm de altura.



---

Figura 2. Imágenes de cada uno de los taxones aproximadamente a los seis meses después de que se estableció la plantación, a) Maguey manso: *Agave salmiana* ssp *salmiana*, b) Maguey verde: *Agave salmiana* ssp *crassispina* y c) Maguey Tepezorra: *Agave salmiana* var *ferox*; y cuatro años después d) Manso, e) Verde y f) Tepezorra.

La siembra de los vástagos o hijuelos de 240 plantas por cada taxón se realizó en mayo antes de las lluvias y en hoyos de 0.25 x 0.30 m y a una distancia de 3 x 4 m (Fig. 3), totalizando 740 plantas (Fig. 4). Los individuos se distribuyeron bajo un diseño completamente al azar (Anexo 1).



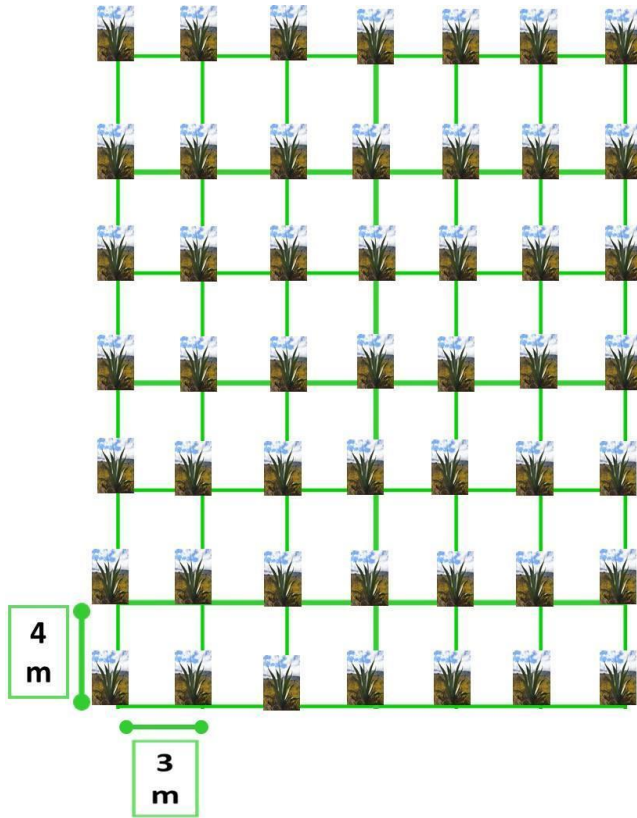


Figura 3. Esquema que muestra la separación entre planta y planta de la parcela de tres taxones de *Agave salmiana* en el ejido de Tenex-tepec, Perote, Veracruz.



Figura 4. Imágenes de la parcela experimental de los tres taxones de *Agave salmiana* en el ejido de Tenex-tepec, municipio de Perote, Veracruz.

## Variables fenotípicas a evaluar de los taxones de agave pulquero

En la plantación se registraron 20 caracteres fenotípicos de la planta y las hojas además de contabilizar el número de hijuelos producidos por planta (Cuadro 1).

Cuadro 1. Caracteres fenotípicos registrados en las plantas de *Agave salmiana* de la plantación experimental.

Caracteres Morfométricos			
Parte de la planta	Clave	Descripción del carácter	Unidad de medida
Planta	ALP	Altura de la Planta = distancia desde la superficie del suelo a la punta de la púa del cogollo (meristemo apical)	Metros (m)
	DBP	Diámetro Basal = diámetro basal, este es de la piña en la base de la planta	Centímetros (cm)
	CoP	Cobertura Foliar = distancia entre dos hojas opuestas de la periferia de la planta y a partir de las puntas de las púas	Metros (m)
	NHo	Número de Hojas	Conteo
	NHi	Número de Hijuelos	Conteo
Meristemo apical	LM	Largo del Meristemo Apical o meyolote = distancia de la base hasta la punta de la púa	Centímetros (cm)
Hoja	FH	Forma de la Hoja	1 - Lanceolada
			2 - Muy lanceolada
			3 - Laminar
	PH	Perfil de la Hoja	1 - Cóncava
			2 - Convexa
			3 - Plana
	LH	Largo de la Hoja (tercera hoja) = distancia a partir de la base hasta la púa.	Centímetros (cm)
	ABH	Ancho Basal de la Hoja	Centímetros (cm)
	PMAH	Medición en la Parte más Ancha de la Hoja	Centímetros (cm)
	CEAH	Color de la Espina Apical de la hoja	Color
	LEH	Largo de La Espina de la hoja= longitud de espina principal de la misma hoja	Centímetros (cm)
AEH	Ancho de la Espina de la Hoja	Centímetros (cm)	
DEyD	Distancia de la Espina y primer Diente	Centímetros (cm)	
ND	Número de Dientes de un lado de la hoja = número de espinas laterales	Centímetros (cm)	
Dientes	DiD	Distancia entre Dientes	Centímetros (cm)
	CD	Color del diente	Color
	LD	Largo de diente	Centímetros (cm)
	AD	Ancho Basal del diente	Centímetros (cm)

Los análisis estadísticos de análisis de covarianza de las variables y las comparaciones múltiples de medias con la prueba de Tukey se realizaron con el programa estadístico STATISTICA 7. Para determinar cuáles son las variables con mayor importancia en la diferenciación de los grupos se aplicó un análisis discriminante con el programa Statgraphics XVI.

### **Análisis de la variación genética**

El ADN se extrajo de muestras de tejido de epidermis de hojas de agave de al menos 32 plantas de cada uno de los tres taxones provenientes de la plantación experimental. Se utilizó el método de extracción basado en el detergente catiónico CTAB (modificado de Doyle y Doyle, 1991, Anexo 2). Previamente, las muestras se guardaron en bolsas resellables acompañadas con gel de sílice para ser transportadas al laboratorio donde se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su extracción. La calidad de la extracción se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa-TBE al 0.8% visualizados mediante tinción con Bromuro de Etidio y la concentración se cuantificó mediante un equipo Nanodrop y las muestras seleccionadas para la genotipación se analizaron mediante un fluorómetro Qubit.

Para la obtención de genotipos, se empleó el método de representación reducida basado en secuenciación masiva RAD-seq. Se realizó la extracción del material genómico de 96 individuos, obteniendo una buena calidad y cantidad de DNA. El material genómico de cada individuo se envió a secuenciar en una placa de 96 muestras a una concentración por muestra de  $20\mu\text{l}$ . A partir del DNA genómico, se realizó la construcción de librerías, utilizando enzimas de digestión (sencillas y dobles). Se seleccionaron las enzimas PstI/MspI, las cuales permiten obtener un mayor número de fragmentos cortos de DNA a lo largo del genoma. Cada fragmento de DNA fue amplificado por medio de PCR, con el objetivo de aumentar el número de copias de cada fragmento y obtener tamaño de fragmento de 150 pares de bases. Posteriormente se realizó el ligamiento de cada fragmento a los adaptadores de Illumina para realizar la secuenciación y se unieron los “barcodes” (combinaciones de 8 bases únicas para cada individuo), para identificar cada muestra. Se realizó un lavado, para eliminar el exceso de reactivos de PCR, y se evaluó el tamaño de los

fragmentos amplificados. Los fragmentos amplificados para cada una de las 96 muestras, fueron secuenciados por medio de la plataforma Illumina HiSeq 2000 @ 150 PE (Pair-End). La construcción de las librerías y la secuenciación del DNA, se realizó en la Universidad de Wisconsin.

A partir de los resultados de secuenciación, se utilizó el comando *process\_radtags*, programa que forma parte de la paquetería Stacks v2 (Catchen *et al.*, 2013). Con la lista de barcodes y el comando *process\_radtag*, se obtuvo las secuencias genómicas crudas y se removieron los adaptadores. Con las secuencias crudas, se realizó el análisis de calidad de las secuencias. Con el programa fastqc, se analizó el valor de calidad PHRED de cada base secuenciada, el contenido de GC (Guanina-Citosina), las secuencias sobre-representadas y la distribución de secuenciación de cada una de las bases. Con los resultados de valores de calidad, se aplicó un filtrado de calidad de la secuenciación, utilizando un valor de corte PHRED  $\geq 30$  (1 base incorrecta por cada 1000). Este primer filtrado de calidad se hizo utilizando un programa de biopython. Con las secuencias filtradas y con calidad PHRED  $\geq 30$ , se realizó la unión de las secuencias forward (R1) y reverse (R2), con el objetivo de obtener secuencias de mayor longitud. La unión de las secuencias R1 y R2, se hizo con el programa PEAR.

Las secuencias unidas (R1 y R2), fueron tratadas como single-end. A partir de estas secuencias, se realizó el ensamble *de novo* de estos fragmentos para obtener los catálogos, siguiendo el pipeline *denovo\_map.pl* en el programa Stacks. El ensamble se hizo por partes, siguiendo el siguiente procedimiento:

- 1) *ustacks*: se utilizó para construir el ensamble *de novo* de cada loci a partir de las secuencias en formato fastq.

En este paso se evaluó diferentes valores de cobertura para el catálogo, con el parámetro “m”; distancia entre cada uno de los catálogos “M”; y el número máximo de catálogos para un solo locus (para especies poliploides) con el parámetro “max\_locus\_stacks”.

- 2) *cstacks*: A partir de los catálogos ensamblados, se obtiene una secuencia consenso de cada locus. En este paso, se evalúa un rango de valores, para la distancia entre cada catálogo de loci “n”. De la misma manera, en este paso se

utilizó el archivo Population map, con la información de la asignación de población para cada una de las 96 muestras.

3) Sstacks: analiza los sets de loci construidos por ustacks, en los catálogos creados por cstacks, utilizando la información del Population map.

De los SNPs obtenidos del llamado de genotipos se excluyeron aquellos individuos con >70% de datos faltantes. Posteriormente, la matriz de SNPs se filtró para considerar únicamente aquellos SNPs que estuvieran presentes en al menos el 90% de los individuos y con una frecuencia mínima del alelo (MAF) mayor a 0.05. Con la matriz resultante se calcularon los índices estándar de diversidad genética para cada población, como el número de alelos ( $N_a$ ), número de alelos efectivos ( $N_{ae}$ ), Índice de información de Shannon ( $I$ ), Heterocigosidad observada ( $H_o$ ), Heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), Índice de fijación ( $F$ ), utilizando el programa GenALEX (Peakall y Smouse 2006).

La diversidad genética y el grado de diferenciación de los taxones estudiados fueron también examinados aplicando el Análisis de Componentes Principales (ACP), usando el paquete Adegenet (Jombart 2008) implementado en la plataforma R 3.6.1 (R development Core Team, 2019). Además se evaluó las distancias genéticas entre los individuos obteniendo un árbol de *Neighbor Joining* con las distancias genéticas de Nei mediante la paquetería Adegenet implementada en R.

La estructura poblacional se analizó en el programa STRUCTURE (Pritchard et al. 2000a). Para cada análisis, el número de grupos genéticos ( $K$ ) evaluados fue de 1 a 10, con 10 iteraciones por cada valor de  $K$ , con corridas de 10,000 repeticiones y un periodo de *burn-in* de 3,000. Se utilizó el modelo de admixture (mezcla), considerando frecuencias alélicas independientes, y sin incorporar información previa acerca del origen de los individuos (Falush et al. 2003). El mejor agrupamiento fue seleccionado en el programa Harvester, de acuerdo al criterio de Evanno.

## V. RESULTADOS

### Caracterización Fenotípica

Se presentaron diferencias significativas de la mayoría de los caracteres morfométricos para cada uno de los de los taxones, excepto para el número de hijuelos, forma de la hoja, perfil de la hoja, color de la espina principal de la hoja y color de diente (espinas laterales de la hoja) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Estadísticos descriptivos ( $\bar{x} \pm S$ ) para cada uno de los caracteres fenotípicos y diferencias significativas (en rojo) según el Análisis de Varianza (ANOVA), entre los tres taxones de *Agave salmiana* de la región poblano-veracruzana.

Carácter	Taxón						ANOVA				
	Manso			Tepezorra			Verde		F	p	
	$\bar{x}$	$\pm$	S	$\bar{x}$	$\pm$	S	$\bar{x}$	$\pm$			S
Altura de la planta	113.1	$\pm$	19.1	64.2	$\pm$	15.6	80	$\pm$	17.2	130.85	0.000
Diámetro de la planta	36.4	$\pm$	6.5	26.6	$\pm$	5.2	27	$\pm$	6.5	61.43	0.000
Cobertura de la planta	2.4	$\pm$	0.9	0.8	$\pm$	0.4	1.1	$\pm$	0.6	133.43	0.000
Número de hojas	2.8	$\pm$	0.7	4.7	$\pm$	1.5	3	$\pm$	0.7	178.57	0.000
Número de hijuelos	5	$\pm$	3	4.4	$\pm$	4.3	4.2	$\pm$	3.3	0.24	0.784
Largo del Meristemo Apical	86.7	$\pm$	14.1	44.6	$\pm$	10.4	59.2	$\pm$	13.7	183.79	0.000
Forma de la Hoja	2	$\pm$	1	1.7	$\pm$	0.7	1.6	$\pm$	0.8	0.372	0.690
Perfil de la Hoja	1.4	$\pm$	0.8	2.4	$\pm$	0.8	1.3	$\pm$	0.7	1.121	0.330
Largo de Hoja	105	$\pm$	51	47.8	$\pm$	13.2	73.7	$\pm$	16	318.27	0.000
Ancho Basal de Hoja	22.8	$\pm$	4.6	15.3	$\pm$	3.1	16.8	$\pm$	4.2	45.69	0.000
Parte más Ancha de Hoja	26.4	$\pm$	4.1	20.5	$\pm$	3.9	21.9	$\pm$	4.6	26.56	0.000
Color de Espina Apical Hoja	3.1	$\pm$	0.6	3.3	$\pm$	1	3	$\pm$	0.7	2.351	0.101
Largo de Espina de Hoja	7.3	$\pm$	1.7	5.5	$\pm$	1.1	6.6	$\pm$	1.3	30.94	0.000
Ancho de Espina de Hoja	0.7	$\pm$	0.2	0.8	$\pm$	0.3	0.7	$\pm$	0.2	4.06	0.020
Distancia de la Espina y 1er Diente	15.5	$\pm$	3.6	7.5	$\pm$	2.3	9.8	$\pm$	3.1	112.75	0.000
Número de Dientes	30.4	$\pm$	8.5	21.8	$\pm$	7.3	24.5	$\pm$	7.4	14.86	0.000
Distancia entre diente y Diente	5.8	$\pm$	1.2	3.6	$\pm$	1.1	4.3	$\pm$	1.1	39.66	0.000
Color de Diente	2.5	$\pm$	0.7	2.4	$\pm$	0.7	2.4	$\pm$	0.9	1.274	0.285
Largo de Diente	1.1	$\pm$	0.4	0.9	$\pm$	0.3	0.9	$\pm$	0.2	8.04	0.001
Ancho de Diente	1.3	$\pm$	0.3	1.2	$\pm$	0.3	1.3	$\pm$	0.3	4.92	0.009

## Análisis de componentes principales

Más del 75% de la varianza total acumulada es explicada por los primeros 4 componentes principales (Fig. 5). En el primer componente 10 variables tuvieron la mayor influencia: la altura, el diámetro y cobertura de la planta junto con el largo del meristemo apical y largo de la hoja integran el primer componente y cual explica el 51.17 % de la variabilidad total para las tres variedades de *Agave salmiana*, ( $p < 0.05$ ; Tabla 3)

Cuadro 3. Resultados del análisis de componentes principales de 16 caracteres fenotípicos de tres variedades de *Agave salmiana*.

Componente	% de la varianza	% acumulado de la varianza
I	51.173	51.173
II	8.267	59.440
III	8.055	67.495
IV	7.599	75.094

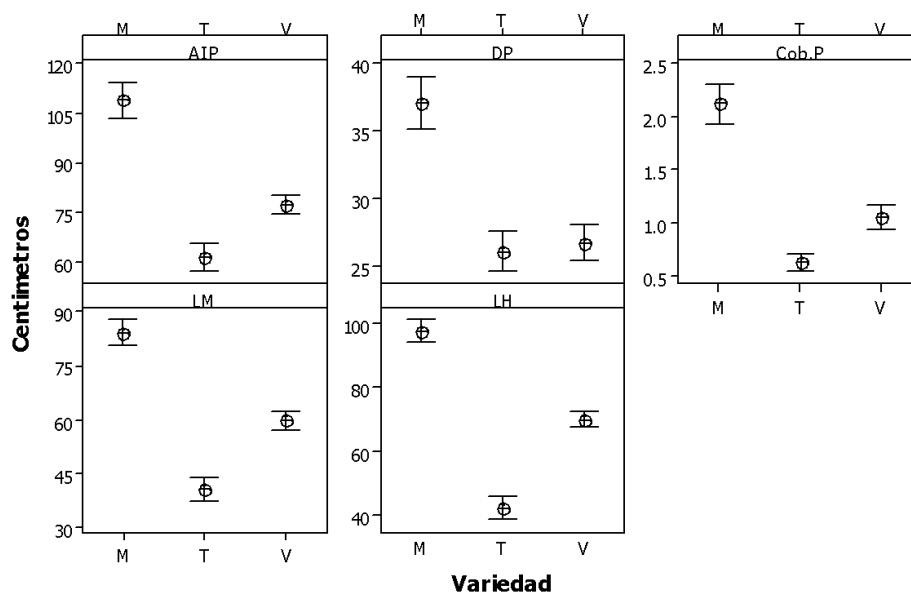


Figura 5. Se muestran valores promedio y error estándar de las variables integradas en el primer componente principal. M: Manso, V: Verde y T: Tepezorra. Mostrando que en tamaño manso es la más grande y Tepezorra es la más chica.

### Análisis Discriminante

Las funciones discriminantes nos permiten separar los datos de manera óptima mediante una combinación lineal de los caracteres morfométricos. En nuestro caso la primera función discriminante tiene un porcentaje de varianza relativo del 46.7 %, mientras que la segunda función sólo explica el 10.9 % y la tercera el 9.6% de la varianza de los datos [Wilks lambda=.06326, F(10, 178)=52.970, p=0.0000]. En las funciones discriminantes nos muestra que, excepto el largo, ancho y número de las hojas, la mayoría de los caracteres se agrupan mejor en la primera función. Sin embargo, ambas funciones discriminantes son estadísticamente significativas con un 95% de confianza, aunque la primera función es capaz de separar mejor los datos de acuerdo a los centroides de cada grupo (cuadro 4), y se comprueba la existencia de tres grupos separados (Figura 6).

Cuadro 4. Centroides de Grupo para cada taxón que determinan las funciones discriminantes y los grupos.

Grupo	1	2
M	2.61496	0.334874
T	-2.95978	0.230046
V	0.344823	-0.56492

La ordenación de los grupos se hace teniendo en cuenta las funciones de clasificación, a través de coeficientes para cada una de los taxones y así se obtiene una puntuación en cada uno de los grupos para cada uno de los datos de la muestra, lo que nos sirve para la clasificación de los grupos con los valores más altos (Cuadro 5). Así es como el análisis discriminante permite distinguir los taxones de *A. salmiana* con los caracteres morfométricos antes descritos, los cuales claramente se separan por grupos de acuerdo a los caracteres fenotípicos utilizados (Figura 7).



Cuadro 5. Estadísticos correspondientes y que validan las funciones discriminantes.

Funciones Derivadas	Lambda de Wilks	Chi Cuadrada	GL	Valor-P	Prueba	Valor	F	Prob> F
1	0.134618	223.5929	24	0.0000	Lambda de Wilks	0.1711	12.519	<.0001
2	0.857973	17.0798	11	0.1055	Traza de Pillai	0.9426	7.9488	<.0001
					Hotelling-Lawley	4.1785	18.311	<.0001
					Raíz máxima de Roy	4.0129	35.781	<.0001

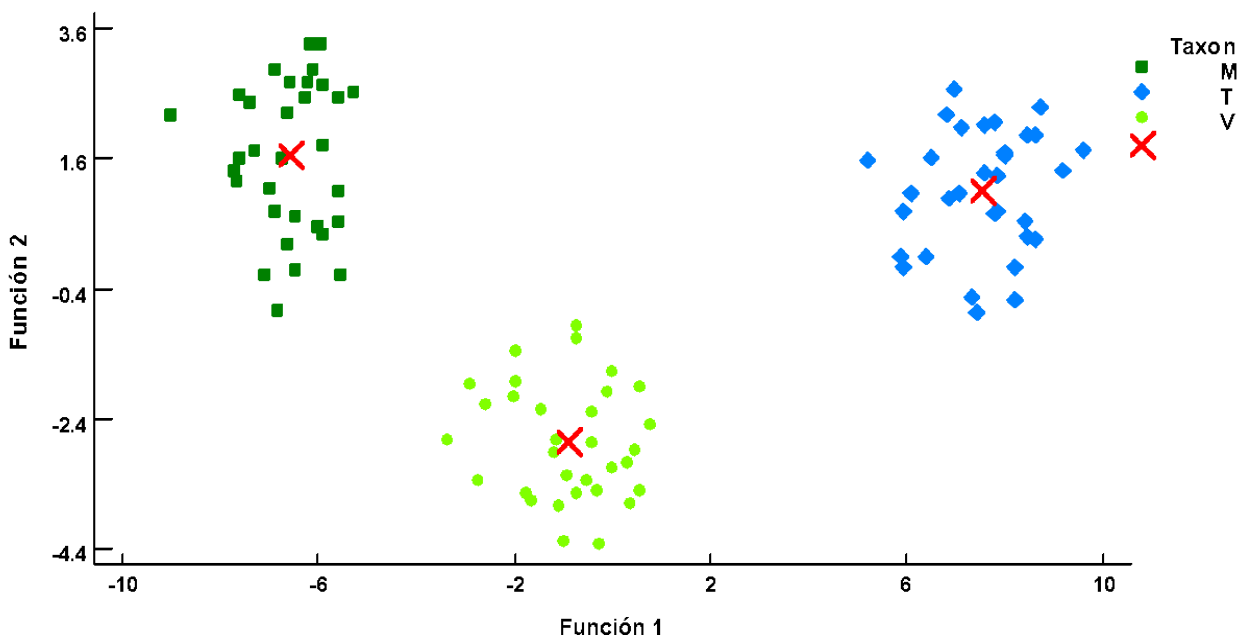


Figura 6. Agrupación de los caracteres por taxón, los puntos promedio por grupo (centroides), están representados por "X". M= Magüey Manso, V= Magüey Verde, T= Magüey Tepezorra

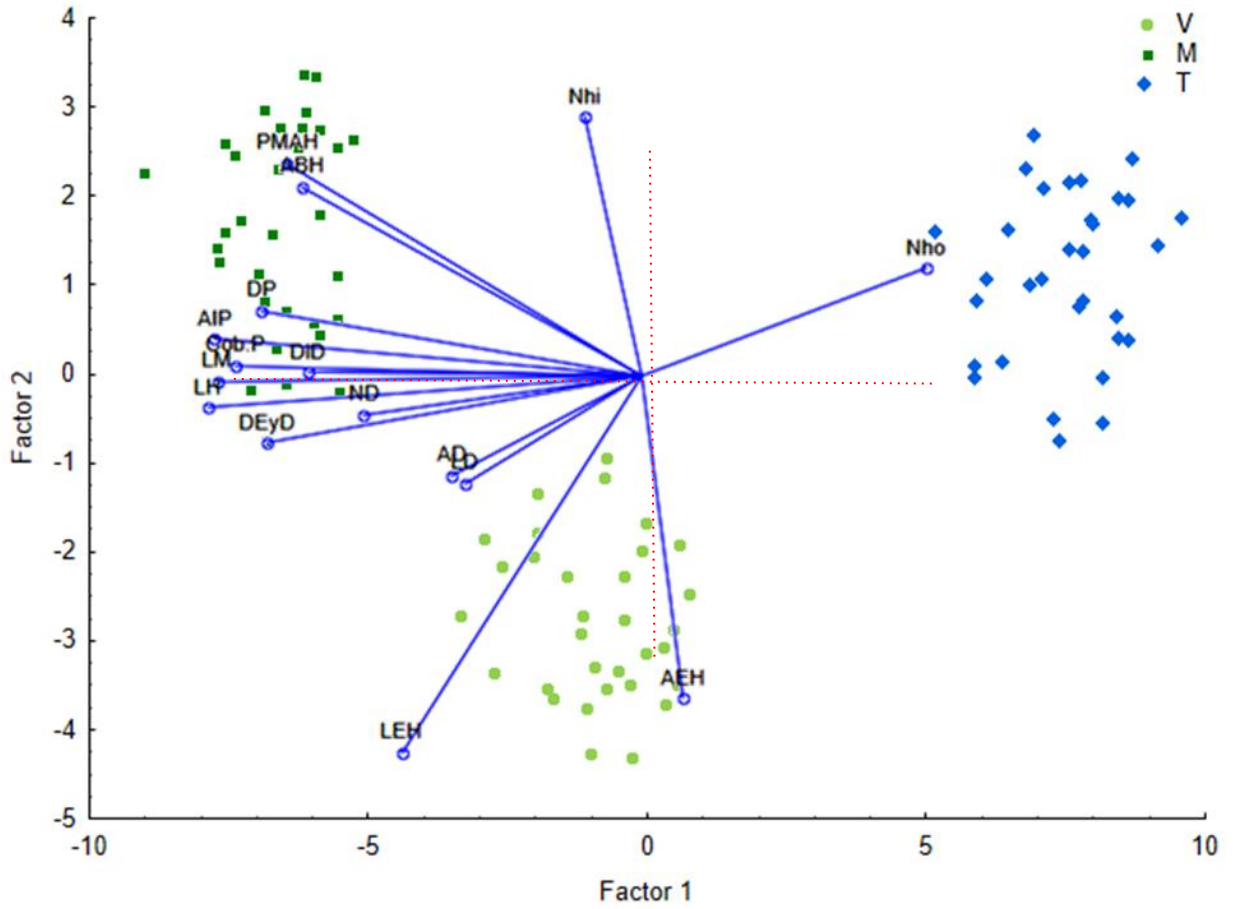


Figura 7. Influencia de los caracteres morfométricos en el análisis discriminante, y su agrupación por cada taxón. M= Maguey Manso, V= Maguey Verde, T= Maguey Tepezorra.

### Caracterización Genética con marcadores tipo SNPs

Un total de 96 muestras de ADN total de tres taxones de agave pulquero (32 individuos por cada taxón) fueron usadas para la construcción de librerías de RAD-seq y secuenciadas en una línea de una plataforma Illumina HiSeq. De la secuenciación se obtuvieron un total de 257,576,289 lecturas (*reads*), las cuales fueron filtradas de acuerdo a su calidad para obtener un total de 192,041,300 lecturas. Del ensamblado de lecturas por medio del protocolo implementado en Stacks con los parámetros -M4 -4m -N2 -n2 se obtuvieron 867,689 *stacks* con una profundidad promedio de 7 a 47x. Del llamado de SNPs se obtuvieron aproximadamente 250 mil sitios variables, de los cuales después de aplicarse filtros, se conservaron únicamente 5,006 SNPs en 83 individuos, ya que para 13 individuos no se obtuvieron lecturas suficientes.

Los parámetros de diversidad genética calculados para todas las entradas y categorías analizadas se detallan en el Cuadro 6. El promedio de alelos por locus fue de 1.528. La heterocigosis esperada promedio ( $H_e$ ) fue de  $0.201 \pm 0.002$  (media  $\pm$  error estándar). El valor del coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) que fue de -0.469, una  $F_{st}$  total de 0.192, que sugiere una  $Nm$  en el equilibrio de 11.811,  $F_{it}$  de -0.186 y el porcentaje de sitios polimórficos fue de 52.79%.

Cuadro 6. Estadísticos descriptivos de diversidad genética de los 5, 006 SNPs. Se muestran los valores por taxón de: **N**= Tamaño de muestra, **Na**= No. De alelos diferentes, **Nae**= No. De Alelos efectivos, No de Alelos privados, **I**= Índice de información de Shanon's, **Ho**= Heterocigosis observada, **He**= Heterocigosis esperada y el porcentaje de sitios polimórficos.

Taxon	N	Na	Nae	No. Alelos privados	I	Ho	He	F	% sitios polimórficos
Manso	30	7208	418	0.083	$0.278 \pm 0.005$	$0.332 \pm 0.006$	$0.196 \pm 0.003$	$-0.641 \pm 0.004$	43.99%
Verde	26	7221	380	0.076	$0.282 \pm 0.005$	$0.344 \pm 0.006$	$0.200 \pm 0.003$	$-0.677 \pm 0.004$	44.25%
Tepezorra	27	8517	1469	0.293	$0.317 \pm 0.004$	$0.266 \pm 0.004$	$0.206 \pm 0.003$	$-0.203 \pm 0.005$	70.14%

I, Ho, He y F= Media  $\pm$  Error estándar

Al evaluar mediante  $F_{st}$  el grado de diferenciación pareada entre los taxones, se encontró diferenciación genética significativa entre los tres, como se esperaba, la diferenciación más importante se encontró con respecto al maguey Tepezorra (Cuadro 7).

Cuadro 7. Estructuración poblacional mediante los valores de  $F_{st}$  pareados entre taxones.

	V	T	M
V	0.000	1.484	1.506
T	0.144	0.000	1.538
M	0.142	0.140	0.000

Valores  $Nm$ : Sobre de la diagonal

Valores  $F_{st}$ : Debajo de la diagonal.

### Diferenciación genética de los tres taxones

El análisis de componentes principales (ACP) muestra que los tres taxones analizados se encuentran bien diferenciados genéticamente (Fig. 8). De acuerdo con este análisis el 25.4% de la varianza es explicada por el CP1 y se atribuye a las diferencias entre la variante Tepezorra y los taxones verde y manso (Fig. 8). El componente principal 2 explica el 17.3% de la varianza y separa a los taxones con uso más intensivo (verde y manso) (Fig. 8). El tercer componente de la varianza (CP3; Fig. 8) muestra la variación al interior del taxón Tepezorra, el cual muestra mucho mayor variabilidad con una tendencia a formar dos grupos en este componente a diferencia de los taxones manso y verde.

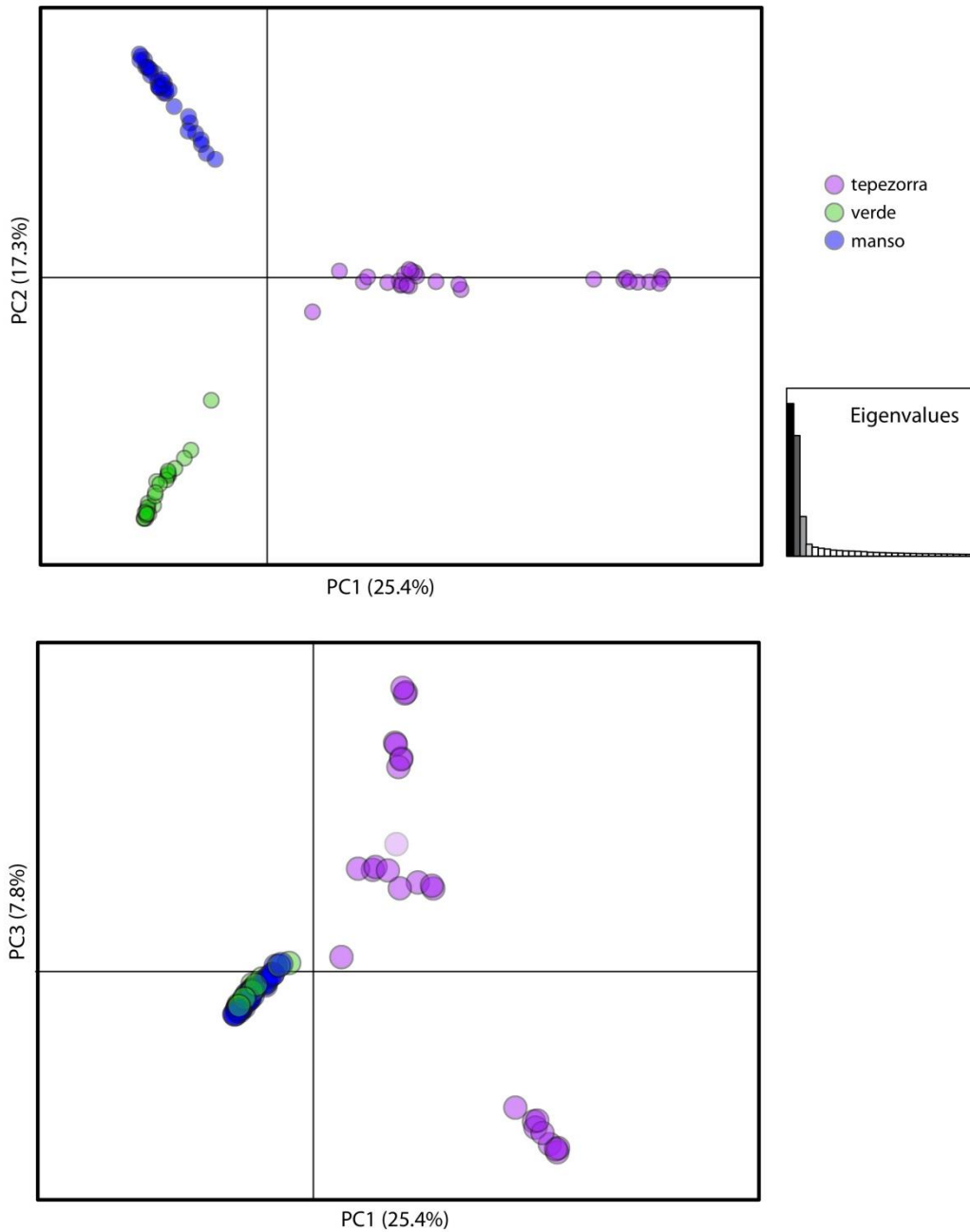


Figura 8. Distribución de la varianza genética en función de los 5006 SNP's. Se observan los tres taxones como grupos genéticos diferentes. Los dos primeros componentes principales (panel superior) explican cerca del 42 % de la variación genética total, teniendo los valores de eigenvalores más robustos en el modelo (diagrama de barras, recuadro superior derecha).

El árbol de distancia genética de Nei entre los tres taxones muestra mayor similitud entre las variedades Manso y Verde, mientras que el clado que agrupa a Tepezorra muestra mayor variación entre individuos y mayor estructuración del clado (Fig. 9).

La distribución de probabilidades posteriores obtenidas en STRUCTURE fue consistente con los resultados de componentes principales, al encontrar cada grupo resuelto y sin traslapes en función de los tres taxones. El número de agrupamientos más probable fue de  $K=3$  de acuerdo al criterio de Evanno implementado en el programa Harvester (Material Suplementario). En este nivel de agrupamiento se observa una estructuración clara entre los taxones y bajos niveles de admixtura entre la variedad silvestre (Tepezorra) y las variedades verde y manso. El siguiente nivel de agrupamiento ( $K=4$ ) revela un mayor nivel de mezcla entre los tres taxones analizados, en el cual se observan individuos de Tepezorra que comparten alelos con las otras dos variedades y algunos individuos sin ninguna admixtura (Fig. 10).

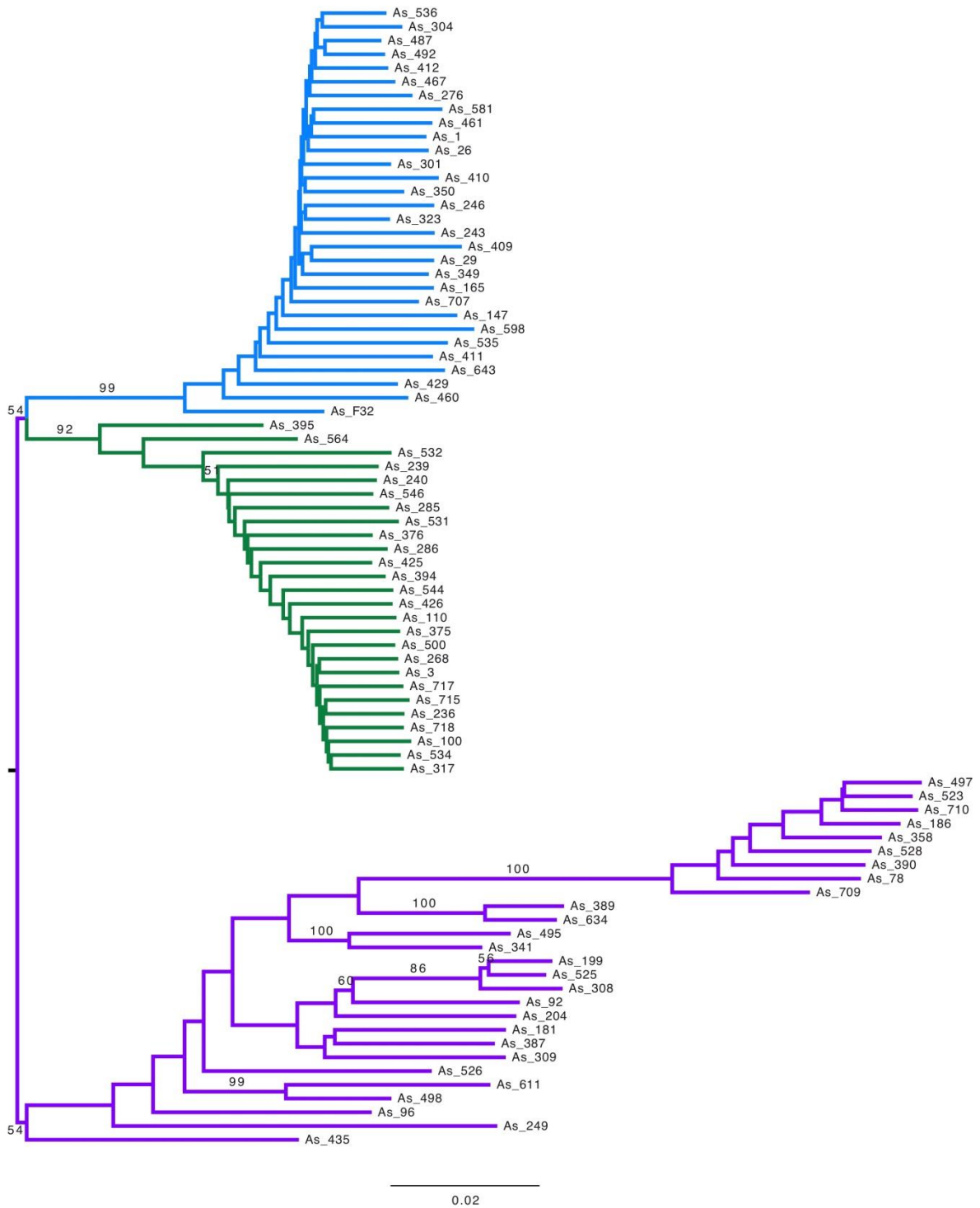


Figura 9. Análisis de distancia genética de Nei. El filograma muestra el agrupamiento monofilético de la tres variedades analizadas: Tepezorra (morado), Verde (verde) y Manso (azul).

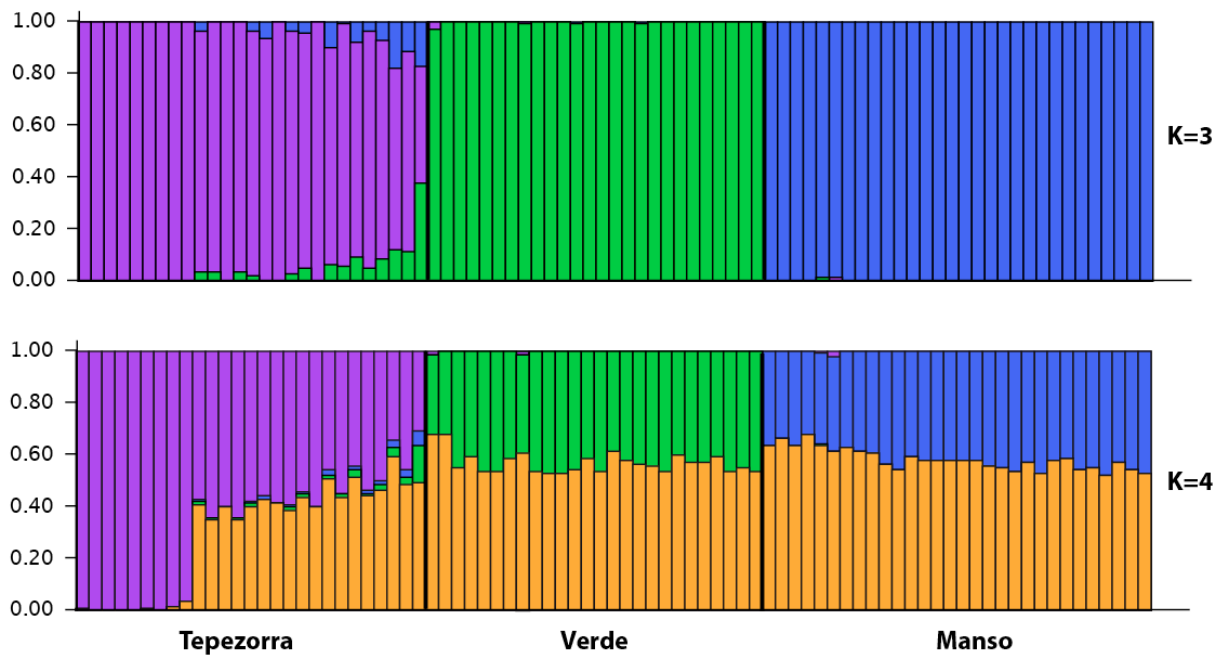


Figura 10. Análisis de estructura entre los tres taxones. Se muestran los resultados del análisis de STRUCTURE el agrupamiento más probable ( $K = 3$ ) y el siguiente nivel de agrupación ( $K = 4$ ).



## VI. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se caracterizó la variación fenotípica de caracteres morfo-anatómicos y la variación genotípica de los tres taxones que forman parte del complejo *Salmiana* en la Región Poblano-Veracruzana. De acuerdo a los resultados obtenidos, los tres taxones se encuentran diferenciados tanto en aspectos fenotípicos como en el nivel genético, mostrando que el uso y selección de caracteres ha influido en la diversificación de la especie. Los tres taxones muestran una varianza fenotípica similar, sin embargo los datos genéticos muestran que Tepezorra, el taxón silvestre, tiene una mayor diversidad génica e incluso es posible distinguir dos grupos genéticos al interior de ésta variedad (Figs. 8-9). Además, los análisis genéticos indican que los taxones Manso y Verde se encuentran menos diferenciados entre sí (Figs. 8-9) y lo cual podría indicar que dichas variedades fueron seleccionadas a partir del mismo ancestro común de poblaciones de Tepezorra con las cuales se comparten más alelos (Fig. 10). Aunque estos resultados brindan evidencia respecto al proceso de domesticación y diversificación, para inferir la historia completa de *A. salmiana* se requiere de colectas de ejemplares que permitan comparar y caracterizar la diversidad morfológica y genética de este taxón a lo largo de su distribución, ya que se reconocen hasta 47 variedades para la especie, de acuerdo a nombres comunes regionales con los que se conoce la planta (Mora-López et al. 2011).

Al comparar los resultados de los análisis multivariados de la morfología vegetativa, por ejemplo se observó que en el Análisis Discriminante se separan de manera clara los tres taxones estudiados utilizando solo dos funciones discriminantes. Una de las variables que mayor información aportaron a la discriminación de los grupos fueron: longitud de la hoja, que *A. salmiana* var. *ferox* (Tepezorra) tiende a tener hojas pequeñas y dientes o espinas laterales más grandes, mientras que *A. salmiana* ssp *salmiana* tiende a tener mayor número de dientes, pero son más pequeños y es debido a la longitud de la hoja. Asimismo se ha reportado en otros estudios donde también el largo de la hoja y el número de dientes tienen un alto peso en la discriminación de los grupos (Colunga-GarcíaMarín et al., 1996; Rivera-Lugo, 2014; Vázquez-Pérez, 2015).

En el ACP cuatro componentes explican el 75.04 % de la varianza, y el primer componente aporta el 45% del total de la varianza. De manera similar, en la mayoría de los estudios de agave se han requerido más de 3 componentes principales para explicar más del 70% de la varianza, incluyendo los taxones que comprenden la sección *Salmianae* de este género; también identificando que las variables mencionadas aportan información en los primeros componentes principales (Mora-López *et al.* 2011; Rivera-Lugo 2014; Vázquez-Pérez, 2015).

Sin embargo, ambas funciones discriminantes son estadísticamente significativas con un 95% de confianza, aunque la primera función es capaz de separar mejor los datos de acuerdo a los centroides de cada grupo (cuadro 4), y se comprueba la existencia de tres grupos separados (Figura 6), algo similar a lo reportado por Rojas y colaboradores (2007).

Al analizar la diversidad genética de los SNPs se encontraron valores de heterocigosidad observada y esperada bajos, pero congruentes con los reportados para otras especies de *Agave*.

## **ANÁLISIS FENOTÍPICOS**

Cabe señalar que muchos estudios en general de agave, han trabajado con variables relacionadas a las partes florales. Según Vázquez-Pérez (2015), se ha encontrado que la mayoría de los caracteres relacionados con la identificación taxonómica son florales, lo que nos sugiere que los caracteres florales nos pueden ayudar en la delimitación de taxones, lo cual nos sugiere considerar estas variables en un futuro estudio con *Agave salmiana*, ya que en el presente estudio no se pudieron analizar, porque se analizaron individuos pequeños colectados de una plantación experimental después de sólo cuatro años de ser establecida, además de que en la zona pocas veces se dejar llegar a las plantas a la fase reproductiva.

Es importante resaltar que se contó con un buen tamaño de muestra, una N= 32 tanto para los análisis fenotípicos y genéticos, un factor importante en la definición correcta de los grupos, a diferencia de otros estudios que por la escasez de ejemplares y poblaciones, lo cual se debe a la escasez de individuos y/o poblaciones por la

fragmentación en su distribución y la extracción para su aprovechamiento (Rivera Lugo 2014). Considerando lo anterior, es necesario continuar con estudios que permitan analizar más ejemplares dentro de toda el área de su distribución, con el objetivo de que se pueda tener representada la mayor variabilidad fenotípica y genética de los diferentes taxones y todas poblaciones y así poder definir cada taxón considerando las diferentes regiones en que se localizan.

De acuerdo con este estudio queda claro que *Agave salmiana* es un taxón con alta variabilidad fenotípica, definiéndose los tres grupos separados y dentro de los grupos *Agave salmiana* var. *ferox* es más variable respecto a los otros dos. Así también queda demostrado con los análisis moleculares que confirman la existencia de los tres grupos genéticos.

## **ANÁLISIS GENÉTICOS**

El número de hojas (NHo), fue uno de los caracteres diferentes entre los taxones y la altura de planta (Ap), resultado que se observa en las plantaciones comerciales. Las plantas que presentan mayor número de hojas son las de menor tamaño y pertenecen al taxón Tepezorra.

Otros caracteres de comportamiento similar son la altura de la planta (AIP), largo de hojas (LHo), largo del meristemo (LMA). Estos caracteres están relacionados con el tamaño de la planta y son importes a la hora de obtener la penca para barbacoa y el mixiote, ya que se requiere que la planta sea de hojas grandes, siendo así más productiva y probablemente también pueda influir en la producción de aguamiel.

Los análisis de varianza mostraron diferencias significativas ( $P \leq 0.01$ ) entre los taxones para altura de planta, número de hojas, largo de hojas, ancho de hojas, número de espinas laterales y longitud de espina principal. Las plantas más altas de maguey pulquero son las que presentan mayor tamaño de hojas y con más espinas laterales, pero estas de menor tamaño como es el caso del maguey Manso. También hubo diferencia estadística en el ancho de las pencas. El taxón Tepezorra fue el maguey más pequeño en altura y difiere estadísticamente en número, largo y ancho de hojas con los otros dos taxones (Manso y Verde).

Los resultados muestran la diferenciación de los tres taxones agrupándose por separado, sin embargo existe una mayor relación entre Manso y Verde, ya que Tepezorra es el que más se separa de estos grupos y este también muestra mayor variación. Genéticamente Tepezorra también muestra este comportamiento y pareciera haber tanta variación que incluso podría formar dos grupos genéticos. También se confirma este comportamiento para Manso y Verde con los análisis genéticos. Morfológicamente en campo, estos taxones (Manso y verde), pueden llegar a confundirse.

Aunque las plantas de *A. salmiana* ssp. *salmiana* y *A. salmiana* ssp. *crassispina*, son semejantes desde el punto de vista fenotípico y pueden llegar a traslaparse realmente si es posible la separación de los tres taxones, de acuerdo a los análisis realizados aunque fenotípicamente al menos dos taxones son parecidos, realmente es posible distinguir los taxones que también los productores manejan como diferentes comúnmente llamados Manso, Verde y Tepezorra.

Los resultados obtenidos mediante el análisis molecular, muestran la existencia de variabilidad genética entre los individuos evaluados, dentro y entre los taxones evaluados. El dendrograma de relaciones genéticas entre individuos de los taxones de maguey pulquero, muestra la formación de tres grupos correspondientes a los tres taxones bien definidos. Aunque dentro del taxón Tepezorra pareciera haber dos subgrupos; realmente no se respalda con el análisis fenotípico. Es decir, con ayuda del uso de marcadores SNP's mediante la técnica de RADseq, eficientemente se pudieron discriminar los individuos de cada taxón en grupos bien definidos. Es de resaltar que molecularmente esta clasificación genética de los taxones potentemente coincide con la realizada por los productores en campo.

Similarmente, respecto a lo fenotípico, Manso y Verde son los taxones que están más relacionados genéticamente, además de relacionarlos con características de calidad o con la cantidad de aguamiel, por parte de los productores. Estos grupos indican que los taxones de maguey pulquero analizados han sido influenciados cierta selección específica dentro del manejo de los productores con influencia en la obtención de los grupos genéticos bien definidos. Lo que posiblemente ha influenciado a la separación de los tres grupos, y que Manso y Verde sean parecidos a

diferencia de Tepezorra que cuenta con mayor variación.

Desde el punto de vista morfológico los tres taxones son diferentes y aunque este resultado se complementa genéticamente, al menos dos taxones (Manso y Verde) tienden a ser genéticamente semejantes, quizá debido a la selección ciertas características morfológicas.

### **Análisis poblacional de los taxones de maguey pulquero.**

El porcentaje de *loci* polimórficos (P) entre las poblaciones o variantes fue de  $52.8 \pm 8.8$  %. Dentro de la población por taxones para el maguey Manso se encontró un polimorfismo de 43.99 %, en el maguey Verde de 44.25 % y el mayor se presentó en Tepezorra con 70.14 %; valores que indican variabilidad genética, y pueden ser útiles en el planteamiento de estrategias de manejo y conservación. Son buenos valores de polimorfismo a pesar de la propagación vegetativa mediante hijuelos, además de la disminución del cultivo de maguey pulquero, la falta de mejoramiento genético, y la actual sobreexplotación y desconocimiento de la selección de los taxones por parte de los productores.

## VII. PERSPECTIVAS

Dada la importancia económica, ambiental y cultural que tiene *A. salmiana*, se hace fundamental complementar estos estudios, con trabajos relacionados con agroecología, y de esta manera proponer sistemas que conserven la diversidad genética para evitar caer en problemáticas como ocurrió con la variedad utilizada en la elaboración del tequila (Colunga-GarcíaMarín y Zizumbo- Villareal, 2006; Vargas-Ponce *et al.*, 2009; Trejo *et al.*, 2018), y algunas de mezcal.

En la región, el estudio permitió reconocer fenotípicamente la presencia de los tres taxones. Los análisis utilizados en la parte fenotípica resultaron una buena herramienta, y fueron complementados con los análisis genéticos, considerando lo anterior es recomendable sumar el conocimiento de los especialistas taxonómicos para este grupo.

Por otra parte, sería recomendable optimizar el tamaño muestral, para caracterizar de mejor manera la variación genómica del Maguey pulquero y de esta manera ser más representativo para determinar la asociación Fenotipo-Genotipo

También es recomendable estudiar con mayor detalle, si los grupos han divergido por el uso que se les ha dado, si existe un proceso de domesticación, por un lado para la obtención del pulque, y por el otro, los que tienen otro tipo de uso.

Prácticamente no existe estructuración genética entre los taxones, más bien parecen muy diferentes de acuerdo a los análisis mostrados probablemente debido al manejo que por separado se le ha dado al maguey pulquero; lo que refuerza la idea de hacer un estudio más profundo en este sentido.

Considerando que existen pocos estudios en agave que trabajen con marcadores SNP's y con técnicas de secuenciación genómica, se sugiere seguir trabajando, pues resulta una gran efectividad y resolución de los análisis genómicos, ya que se obtiene una gran cantidad de datos, para detectar niveles de estructuración y para la caracterización genética del Maguey Pulquero.

## VIII. CONCLUSIONES

- Existen caracteres fenotípicos que permiten realizar la delimitación morfológica de los taxones estudiados. Estos caracteres son: la altura de la planta (AIP), Diámetro de la planta (DP), Cobertura de la planta (CobP), largo del meristemo (LM), largo de hoja (LH), el número de hojas (NHo) y numero de dientes (ND).
- Dada la importancia económica y cultural por parte de los productores, lo anterior sugiere la utilidad inmediata de los caracteres morfológicos en la selección de material promisorio para uso como progenitores en programas de conservación y manejo del maguey pulquero, además de la necesidad de más estudios al respecto.
- Los tres Taxones son grupos diferentes; Tepezorra parece que se separa más de Manso y Verde, tanto fenotípica como genéticamente.
- En general, existe una gran diversidad genética, respaldada por la gran cantidad de datos obtenidos mediante la técnica utilizada y trabajando con marcadores SNP's. La baja variabilidad genética se presenta dentro del maguey Manso y Verde, comparado con Tepezorra. Esta baja diversidad genética podría estar relacionada con la forma de reproducción clonal.

## IX. LITERATURA

- Aguilar-Juarez B., Enríquez J. R., Rodríguez-Ortiz G., Granados D., Martínez B. 2014. El estado actual de *Agave salmiana* y *A. mapisaga* del valle de México. *Revista Mexicana de Agroecosistemas* 1(2):106-120.
- Aguirre R. J. R., Charcas S. H., Flores F. J. L. 2001. El maguey mezcalero potosino. Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología. Instituto de Investigaciones de Zonas Desérticas. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. México. 87 pp.
- Aguirre-Dugua, X., & González-Rodríguez, A. 2016. Phylogeographical approaches to the study of plant domestication, with special emphasis on perennial plants. In *Ethnobotany of Mexico* (pp. 319-366). Springer, New York, NY.
- Ajmone-Marsan, P., Negrini, R., Milanese, E., Bozzi, R., Nijman, I. J., Buntjer, J. B. & Lenstra, J. A. 2002. Genetic distances within and across cattle breeds as indicated by biallelic AFLP markers. *Animal Genetics*, 33(4), 280-286.
- Álvarez-Salazar J.L. 2004. Estudio genético de especies silvestres del género agave distribuidas en el volcán de Tequila, Jalisco. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Zapopan, Jalisco.
- Anderson, B. M., Thiele, K. R., Krauss, S. L., & Barrett, M. D. 2017. Genotyping-by-sequencing in a species complex of Australian hummock grasses (*Triodia*): Methodological insights and phylogenetic resolution. *PloS one*, 12(1).
- Andrews, K. R., Good, J. M., Miller, M. R., Luikart, G., & Hohenlohe, P. A. 2016. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17(2), 81.
- Arizaga S., Ezcurra E. 1995. Insurance against reproductive failure in a semelparous plant: bulbil formation in *Agave macroacantha* flowering stalks. *Oecologia* 101(3):329-334.
- Arizaga S., Ezcurra E. 2002. Propagation mechanisms in *Agave macroacantha* (Agavaceae), a tropical arid-land succulent rosette. *American Journal of Botany* 89 (4): 632–641.



- Aukar A.P.A, Lemos E.G.M., Oliveira J. C. 2002. Genetic variations among passion fruit species using RAPD markers. [Variação genética entre espécies de maracujá utilizando marcadores RAPD]. *Rev. Bras. Frutic.* 24: 738-740.
- Bachlava, E., Taylor, C. A., Tang, S., Bowers, J. E., Mandel, J. R., Burke, J. M., & Knapp, S. J. 2012. SNP discovery and development of a high-density genotyping array for sunflower. *PloS one*, 7(1).
- Barraza-Morales A.F., Saánchez-Teyer L., Robert M., Esqueda M., Gardea A. 2006. Genetic variability in *Agave angustifolia* Haw. at the Sonoran Sierra, México, as determined by AFLP markers. *Rev Fitotec Mex* 29(1):1-8.
- Barrientos F., Villegas A., Vázquez A. 1985. Métodos de propagación de Agaves. En Cruz C., del Castillo L., Robert M., Ondarza R. N. (Eds.), *Biología y aprovechamiento integral del henequén y otros Agaves* (pp 91-96). Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C. Mérida, Yucatán, México.
- Bogler D. J., Pires J. C., Francisco-Ortega J. 2005. Phylogeny of Agavaceae based on *ndhF*, *rbcl*, and its sequences: implications of molecular data for classification. *Aliso* 22(1): 313-326.
- Brandrud, M. K., Paun, O., Lorenzo, M. T., Nordal, I., & Brysting, A. K. (2017). RADseq provides evidence for parallel ecotypic divergence in the autotetraploid *Cochlearia officinalis* in Northern Norway. *Scientific reports*, 7(1), 1-13.
- Buntjer J. B., Otsen M., Nijman I. J., Kuiper M. T. R., Lenstra J. A. 2002. Phylogeny of bovine species based on AFLP fingerprinting. *Heredity*, 88(1), 46-51.
- Castro-Díaz A. S., Guerrero-Beltrán J. A. 2013. El agave y sus productos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 7(2):53-61.
- Cervantes-Dueñas A. 2016. Presencia de saponinas en *Agave* spp. de México. *BIOZ Revista de Divulgación UACB*, 1(1).
- Colunga-GarcíaMarín P., Zizumbo-Villarreal D. 2007. Tequila and other *Agave* spirits from west-central Mexico: current germplasm diversity, conservation and origin. *Plant Conservation and Biodiversity*, 79-93.
- CONABIO. 2005. Tríptico magueyes mezcaleros.
- Dahlgren R., 1984. The families of the monocotyledons : Structure, evolution and taxonomy, , Springer,Berlin, 520

- Deschamps S., Llaca V., May, G. D. 2012. Genotyping-by-sequencing in plants. *Biology*, 1(3), 460-483.
- Doyle J. 1991. DNA protocols for plants. In *Molecular techniques in taxonomy* (pp. 283-293). Springer Berlin Heidelberg.
- Dreisigacker, S. 2013. Sistemas de marcadores genéticos en el mejoramiento de trigo. *Fitomejoramiento fisiológico I: enfoques interdisciplinarios para mejorar la adaptación del cultivo. Centro Internacional de Maíz y Trigo (CIMMYT). El Batán, Estado de México*, 140-152.
- Eguiarte L.E., Souza V., Silva-Montellano A. 2000. Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 66:131-151.
- Eguiarte, L. E., & Souza, V. 2007. Historia natural del Agave y sus parientes: Evolución y Ecología. *En lo Ancestral hay Futuro: del Tequila, los Mezcales y otros Agaves*, 1, 3-22.
- Eguiarte, L., Aguirre-Planter, E., Scheinvar, E., González, A., & Souza, V. 2010. Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas. *Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México*, 1-30.
- Elshire R. J., Glaubitz J. C., Sun Q., Poland J. A., Kawamoto K., Buckler E. S., Mitchell S. E. 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PloS one*, 6(5), e19379.
- Enríquez, V. J. R. 2008. La Propagación y crecimiento de agaves. Fundación Produce Oaxaca A.C. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. México. 46 p.
- Enríquez del Valle, J. R., Vázquez, A., Enrique, S., Rodríguez Ortiz, G., Luna, M., Elisama, M., & Vázquez, C. M. (2016). Fertirriego en vivero a plantas de *Agave potatorum* Zucc micropropagadas-aclimatizadas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 7(5), 1167-1177.
- Espejo, S. 2012. El endemismo en las Liliopsida Mexicanas. *Acta Botánica Mexicana*. 100: 195-257.

- Esparza Ibarra, E. L., Violante González, J., Monks, S., Cadena Iñiguez, J., Araujo Andrade, C., & Rössel Kipping, E. D. 2015. Los agaves mezcaleros del altiplano Potosino y Zacatecano. *Estudios en Biodiversidad*. Paper 20. <http://digitalcommons.unl.edu/biodiversidad/20>
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47–50.
- Falush D., Stephens M, Pritchard J. K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164:1567–1587.
- Fish, S.K., P.R. Fish, C. Mlksicek, and J. Madsen. 1985. Prehistoric agave cultivation in southern Arizona. *Desert Plants* 7:107-112.
- Flannery, K. (Ed.), 1986. Guilá Naquitz. Academic Press. New York
- Futuyma D. J. 2009. *Evolution, Second Edition*. Sunderland, MA: Sinauer Associates. 633 pp. ISBN 978-0-87893-223-8
- García-Herrera E. J., Méndez-Gallegos S. J., Talavera-Magaña D. 2010. El género *Agave* spp. en México: principales usos de importancia socioeconómica y agroecología. *Revista Salud Pública y Nutrición* 5:109-129.
- García-Mendoza A. J. 1998. Con sabor a maguey. Guía de la Colección Nacional de Agavaceas y Nolinaceas del Jardín Botánico del Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. D. F, México. 114 pp.
- García-Mendoza, A. 2002. Distribution of the genus *Agave* (Agavaceae) and its endemic species in Mexico. *Cactus and Succulent Journal* 74: 177-187.
- García-Mendoza, A. J. 2007. Los Agaves de México. *Ciencias*. 87: 14-23.
- García-Mendoza A. 2010. Revisión taxonómica del complejo *Agave potatorum* Zucc. (Agavaceae): nuevos taxa y neotipificación. *Acta Bot Mex* 91:71–93
- García-Mendoza, A, J. 2011. Agavaceae. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Instituto de Biología, UNAM. D.F. México. 88:1-95.
- García Mendoza, A. 2012. México, país de magueyes. *La Jornada del Campo*. Núm 53. Suplemento. La Jornada. México.

- García-Mendoza, A. J. Cházaro Basañez, M.J., Nieto Sotelo, J., Sánchez Teyer, L.F., Tapia Campos, E., Gómez Leyva, J. F., Tamayo Ordóñez, M., Narváez Zapata, J.A., Rodríguez Garay, B., Palomino Hasbach, G.A., Martínez Ramón, J., Martínez Rodríguez, J.C., Quiñones Aguilar, EE., Rincón Enríquez, G., Beltrán García, MJ., Quí Zapata, J.A., Guzmán Mendoza, R., Mercado Flores, Y., Ragazzo Sánchez, J.A., Calderón Santoyo, M., Gutiérrez Mora, A., 2017. Agave. Capítulo 1. En AGARED (ed.). Panorama del aprovechamiento de los Agaves en México. Primera Edición Electrónica 2017. CONACYT, CIATEJ, AGARED, México. ISBN: 978-607-97548-5-3.
- Gentry S. H. 1982. Agaves of Continental North América. University of Arizona Press, Tucson, Arizona. 670p.
- Gil-Vega K. G., Chavira M. G., de la Vega O. M., Simpson J., Vandemark G. 2001. Analysis of genetic diversity in Agave tequilana var. Azul using RAPD markers. *Euphytica*, 119(3), 335-341.
- Godínez-Álvarez, H., Jiménez, M., Mendoza, M., Pérez, F., Roldán, P., Ríos-Casanova, Lira, R. 2008. Densidad, estructura poblacional, reproducción y supervivencia de cuatro especies de plantas útiles en el Valle de Tehuacán, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 79: 393.
- Golubov, J. Mandujano, M.C., Arizaga, S., Martínez-Palacios, A., Koleff, P. 2007. Inventarios y conservación de Agavaceae y Nolinaceae.
- Gómez-Aíza, L., & Zuria, I. 2010. Aves visitantes a las flores del maguey (Agave salmiana) en una zona urbana del centro de México. *Ornitología Neotropical*, 21, 17-30.
- Good-Avila S.V., V. Souza, B. S. Gaut and L. E. Eguiarte 2006. Timing and rate of speciation in Agave (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(24):9124-9129.
- Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. 2016. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333.
- Granados D. 1993. Los Agaves en México. Universidad Autónoma de Chapingo. México.
- José-Jacinto R, García-Moya E. 1995. Fijación de CO<sub>2</sub>, en Agave angustifolia Haw. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 57: 5-10.

- Lodé, J., & Pino, G. 2008. *Agave cordillerensis* J. Lodé & G. Pino. *Una nueva especie de América del Sur. CACTUS-AVENTURES International*, 6, 6-17.
- López De Heredia Larrea, U. 2016. Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica. *Munibe Ciencias Naturales*, 64, 7-31.
- Lorenzo Sacramento J. 2012. Éxito reproductivo y demografía de *Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck ssp. *crassispina* (Trel.) Gentry en San José Alchichica, Puebla. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana. Facultad de Biología. Xalapa-Enríquez, Ver.
- Macedo Enciso, M. 1950. Manual del magueyero (No. 633.5 M32).
- MacNeish, R. S. 1992. *The origins of agriculture and settled life*. Oklahoma University Press.
- Mandujano Bueno, A., Pons Hernández, J. L., Paredes Melesio, R., & García Meza, P. 2018. Diversidad genética de maguey (*Agave* spp.) en las sierras y llanuras del norte de Guanajuato. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9(3), 511-523.
- Martínez-Palacios A., Eguiarte E. L., Furnier R. G. 1999. Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert, *American Journal of Botany*. 86: 1093-1098.
- Metzker, M. L. 2010. Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics*, 11(1), 31-46.
- Mitton JB, Linhart YB, Sturgeon KB, Hamrick JL. 1979. Allozyme polymorphisms detected in mature needle tissue of ponderosa pine. *Journal of Heredity*. 70: 86 – 89.
- Mora-López, J. L., Reyes-Agüero, J. A., Flores-Flores, J. L. Peña-Valdivia, C. B., Aguirre-Rivera, J. R. 2011. Variación morfológica y humanización de la sección *salminae* del genero *Agave*. *Agrociencia*, 45,4.
- Narváez, S. A. U., Martínez, S. T., Jiménez, V. M. A. 2016. El cultivo de maguey pulquero: opción para el desarrollo de comunidades rurales del altiplano mexicano. *Revista de Geografía Agrícola*, 56: 33-44.
- Nava-Rodríguez, B. O. (2014). Diversidad genética de maguey pulquero (*Agave salmiana* y *A. mapisaga* Trel.) y uso de tecnologías agroecológicas.

- Negrini, S., Grivas, T. B., Kotwicki, T., Maruyama, T., Rigo, M., & Weiss, H. R. (2006). Why do we treat adolescent idiopathic scoliosis? What we want to obtain and to avoid for our patients. SOSORT 2005 Consensus paper. *Scoliosis*, 1(1), 4.
- Nobel, P. S. 1998. Los incomparables agaves y cactus. 1ra edición. Ed. Trillas. México.
- Nobel, P. S., Quero, E. y Linares, H. 1988. Differential growth responses of agaves to nitrogen, phosphorus, potassium, and boron applications. *Journal of Plant Nutrition*. 11: 1683-1700.
- NOM-070-SCFI-1994. *Norma Oficial Mexicana: Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones*. México DF: *Diario Oficial de la Federación*.(In spanish).
- Núñez-Farfán, J., Careaga, S. A., Fornoni, J., Ruiz-Montoya, L., & Valverde, P. L. 2003. La evolución de la plasticidad fenotípica. *Revista Especializada en Ciencias Químico Biológicas*, 6(1), 16-24.
- Ocampo, J.; Coppens D'Eeckenbrugge, G.; Olano, C.; Schnell, R. AFLP analysis for the study of genetic relationships among cultivated *Passiflora* species of the subgenera *Passiflora* and *Tacsonia*. *Proceedings of the Interamerican Society for Tropical Horticulture*, Miami, v.47, p.72-76, 2004.
- Ocaña-Nava, D., García-Mendoza, A., & Larson, J. 2007. Modelación supervisada de la distribución de magueyes mezcaleros en México y sus posibles aplicaciones. En: Colunga-García et al 2007 (ed). *En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves*, CICY, CONACYT, CONABIO, INE, México.
- Ortiz-Ceballos A. I. y Lara-González R. 2014. Diagnóstico del maguey Pulquero en la región Poblana-Veracruzana. En: Informe Técnico Final del proyecto E2011-15-174696 Estrategias biotecnológicas de rescate, conservación y reactivación del cultivo del agave pulquero en la región Poblano-Veracruzana para su uso integral en la producción industrial de biocombustibles y otros coproductos. Fondo Sectorial SAGARPA-CONACYT.
- Paredes, L. O., Guevara, L. F., Bello, P.L. 2012. Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas. 2da edición. Fondo de cultura económica. 162-170 pp.

- Parker KC, Hamrick JL, Hodgson WC, et al. 2007. Genetic consequences of pre-Columbian cultivation for *Agave murpheyi* and *A. delamateri* (Agavaceae). *American Journal of Botany* 94: 1479 – 1490.
- Parker K.C., Trapnell D.W., Hamrick J.L., Hodgson W.C., Parker A.J. 2010. Inferring ancient *Agave* cultivation practices from contemporary genetic patterns. *Molecular Ecology* 19: 1622 – 163.
- Parson, J. R., & Parsons, H. S. 1990. *Maguey utilization in highland central México*. University of Michigan.
- Payno, M. 1864. *Memoria sobre el maguey mexicano y sus diversos productos*. Imprenta de A. Boix, a cargo de Miguel Zornoza.
- Piñero, D., Caballero-Mellado, J., Cabrera-Toledo, D., Canteros, C. E., Casas, A., & Castañeda-Sortibrán, A. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. *Capital natural de México*, 1, 437-494.
- Poland, J. A., & Rife, T. W. 2012. Genotyping-by-sequencing for plant breeding and genetics. *The Plant Genome*, 5(3), 92-102.
- Pritchard, J. M., Stephens, M., Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.
- Ramírez Rodríguez, R. 2004. *El Maguey y el Pulque: Memoria y Tradición Convertidas en Historia, 1884-1993* (Doctoral dissertation, Dissertation/BSc thesis, Puebla (PUE), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla).
- Rendón G. R. 1990. *Dos haciendas pulqueras en Tlaxcala, 1857-1884*. Gobierno del Estado de Tlaxcala; Universidad Iberoamericana, Departamento de Historia. México.
- Reynoso-Santos, R., García-Mendoza, A. J., López-Báez, W., López-Luna, A., Iñiguez, P. C., Pérez-Farrera, M. A., & Gutiérrez, M. D. 2012. Identificación taxonomica de agaves (*Agave* spp.): utilizados para la elaboración del licor comiteco en Chiapas, Mexico. *Agroproductividad*, 5(4), 9-18.
- Rivera Lugo, M. 2014. *Variación morfológica y genética del complejo *Agave angustifolia* en el estado de Oaxaca*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas.

- Posgrado en ciencias biológicas, Instituto de Biología sistemática. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.
- Rocha, M.; Good-Ávila, S. V.; Molina-Freaner, F.; A., Hector T.; Castillo, A.; García-Mendoza, A.; Silva-Montellano, A.; Gaut, B. S.; Souza, V.; and Eguiarte, L. E. 2006. Pollination biology and adaptive radiation of Agavaceae, with special emphasis on the genus *Agave*. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany*, 22(1): 329-344.
- Rojas, G. A., Solano, J. P. L., & Pérez, J. E. R. 2007. Diversidad genética en poblaciones de agaves pulqueros (*Agave* spp.) del nororiente del Estado de México. *Revista Fitotecnía Mexicana*, 30(1), 1-12.
- Samo, L. A. J., Garmendia, S. A., Delgado, J. A. 2008. Introducción práctica a la Ecología. Pearson Educación. Madrid España.
- SanCristobal, M., Chevalet, C., Haley, C. S., Joosten, R., Rattink, A. P., Harlizius, B., & Law, A. (2006). Genetic diversity within and between European pig breeds using microsatellite markers. *Animal Genetics*, 37(3), 189-198.
- SAS User's Guide: Statistics, Version 8. Edition. 1999. SAS Inst., Inc., Cary, NC. USA
- Segura, J. C. 1901. El maguey: memoria sobre el cultivo y beneficio de sus productos. Impr. particular de la S. agrícola mexicana.
- Shendure, J., & Ji, H. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*, 26(10), 1135.
- Tello-Balderas J. J. 1988. Análisis gráfico-tabular de dos poblaciones silvestres de maguey mezcalero (*Agave salmiana* Otto ex Salm, ssp. *crassispina* (Trel.) Gentry) en el altiplano Potosino-zacatecano. Tesis de maestría. Colegio de Posgraduados, Chapingo, México.
- Van Tassell, C. P., Smith, T. P., Matukumalli, L. K., Taylor, J. F., Schnabel, R. D., Lawley, C. T., & Sonstegard, T. S. 2008. SNP discovery and allele frequency estimation by deep sequencing of reduced representation libraries. *Nature methods*, 5(3), 247.
- Vázquez Pérez, N. 2015. Variación morfológica y genética de *Agave karwinskii* (Agavaceae), en los estados de Oaxaca y Puebla. Tesis de Maestría en Ciencias



Biológicas. Posgrado en ciencias biológicas, Instituto de Biología Sistemática.  
Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.

- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. V. D., Hornes, M., & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, 23(21), 4407-4414.
- Yeh, E. T., Gong, L., & Kamitani, T. (2000). Ubiquitin-like proteins: new wines in new bottles. *Gene*, 248(1), 1-14.
- Yockteng, R., & Nadot, S. (2004). Phylogenetic relationships among *Passiflora* species based on the glutamine synthetase nuclear gene expressed in chloroplast (ncpGS). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31(1), 379-396.

## X. ANEXOS

### Anexo 1.

Distribución de los taxones en la parcela y las plantas seleccionadas al azar por cada taxón.

	V= Maguey Verde			M= Maguey Manso			T= Maguey Tepezorra												
	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	E
1	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	1
2	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	2
3	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	3
4	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	4
5	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	5
6	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	6
7	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	7
8	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	8
9	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	9
10	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	10
11	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	11
12	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	12
13	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	13
14	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	14
15	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	15
16	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	16
17	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	17
18	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	18
19	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	19
20	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	20
21	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	21
22	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	22
23	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	23
24	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	24
25	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	25
26	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	26
27	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	27
28	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	28
29	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	29
30	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	30
31	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	31
32	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	32
33	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	33
34	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	34
35	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	35
36	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	36
37	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	37
38	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	V	V	V	V	V	V	38
39	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	39
40	V	V	V	V	V	V	T	T	T	T	T	T	M	M	M	M	M	M	40
J	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	

## Anexo 2.

Extracción de ADN de Plantas “Mini-Prep”, Modificado de Vázquez-Lobo 1996 para NGS de plantas con polifenoles y polisacáridos.

### Reactivos

- CTAB2X (Tris-HCl 100mM ~pH8, NaCl 1.4M, EDTA 20mM, CTAB 2%, b-Mercaptoetanol 0.3%, RNasa 1ul x cada ml de buffer, 1% PVP40)
- RNasa 10mg/ml
- Cloroformo:octanol o Cloroformo:isoamílico 24:1
- Ethanol absoluto frío (2.5X volumen)
- AcNa 3M frío (1/10 volumen)
- Ethanol 70% frío
- ddH<sub>2</sub>O

### Procedimiento

1. Moler finamente las hojas en un mortero con 600ul de buffer de extracción CTAB2X, con el objeto de romper las paredes celulares y extraer el DNA. La cantidad puede variar de 0.1g a 1g dependiendo del tipo de planta.
2. La mezcla de CTAB2X y tejido se recupera en un tubo eppendorf de 1.5ml
3. Centrifugar a 10 000rpm durante 8 min a 4°C
4. Eliminar el sobrenadante y el pellet se resuspende en 600ul de buffer CTAB2x
5. Incubar a 65°C durante 15 minutos. Conservar en hielo de 10-15 minutos
6. Agregar 600ul de cloroformo:isoamílico 24:1 y agitar hasta homogeneizar
7. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos
8. Recuperar el sobrenadante en un tubo limpio y repetir el paso 7 hasta que el sobrenadante quede transparente
9. El sobrenadante se recupera (aproximadamente 600ul) y se traslada a un tubo nuevo con una pipeta de 200ul
10. 2.5X del volumen de etanol absoluto frío y 1/10 del volumen de AcNa frío. Incubar a 4°C toda la noche
11. Centrifugar a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C y eliminar el sobrenadante
12. Agregar al DNA al pellet 1ml de etanol 70% frío y centrifugar 13000 rpm durante 10 min a 4°C
13. Eliminar el sobrenadante sin perder de vista el pellet
14. Evaporar el etanol y re-suspender el pellet en agua en 100-200ul.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Mor. a 27 de enero del 2020

**Comisión de Seguimiento Académico  
Maestría en Biología Integrativa de la  
Biodiversidad y la Conservación  
Presente**

Como integrante del jurado y después de haber evaluado la tesis titulada "Caracterización genética y fenotípica de tres taxones de *Agave salmiana* (Asparagaceae) de la región Poblano-Veracruzana" del alumno Rogelio Lara González, con número de matrícula 10009415, aspirante al grado de Maestro en Biología Integrativa de la Biodiversidad y la Conservación, considero que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida en el examen de grado. Por lo tanto emito mi VOTO APROBATORIO.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente

**Dra. Alejandra Vázquez Lobo Yurén**  
Profesor Investigador de Tiempo Completo  
CIByC, UAEM



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN

"1919-2019: en memoria del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Morelos, 03 de diciembre de 2018

**Comisión de Seguimiento Académico  
Maestría en Biología Integrativa de la  
Biodiversidad y la Conservación  
Presente**

Como integrante del jurado y después de haber evaluado la tesis titulada "Caracterización genética y fenotípica de tres taxones de *Agave salmiana* (Asparagaceae) de la región Poblano-Veracruzana" del alumno Rogelio Lara González, con número de matrícula 10009415, aspirante al grado de Maestro en Biología Integrativa de la Biodiversidad y la Conservación, considero que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida en el examen de grado. Por lo tanto emito mi **VOTO APROBATORIO**.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

**Atentamente**  
*Por una humanidad culta  
Una universidad de excelencia*

Dr. José Juan Blancas Vázquez



Universidad Veracruzana

Posgrado del Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada

**Comisión de Seguimiento Académico  
Maestría en Biología Integrativa de la  
Biodiversidad y la Conservación  
Presente**

Como integrante del jurado y después de haber evaluado la tesis titulada “**Caracterización genética y fenotípica de tres taxones de *Agave salmiana* (Asparagaceae) de la región Poblano-Veracruzana**” del alumno Rogelio Lara González, con número de matrícula 10009415, aspirante al grado de Maestro en Biología Integrativa de la Biodiversidad y la Conservación, considero que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida en el examen de grado. Por lo tanto emito mi **VOTO APROBATORIO**.

Av. de las Culturas  
Veracruzanas No. 101  
Col. Emiliano Zapata  
C.P. 91090  
Xalapa  
Veracruz, México

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Teléfono**  
+52 (228) 8 42 17 00  
Ext. 10867

**Correo Electrónico**  
angortiz@uv.mx

A t e n t a m e n t e

Xalapa de Enríquez a 25 de noviembre de 2019  
“Lis de Veracruz: Arte, Ciencia, Luz”



  
**Dr. Ángel Isauro Ortiz Ceballos**



INSTITUTO  
DE ECOLOGIA  
UNAM

DEPARTAMENTO DE  
ECOLOGÍA EVOLUTIVA

11 de diciembre de 2019

**Comisión de Seguimiento Académico  
Maestría en Biología Integrativa de la  
Biodiversidad y la Conservación**

Presente

Como integrante del jurado y después de haber evaluado la tesis titulada "Caracterización genética y fenotípica de tres taxones de *Agave salmiana* (Asparagaceae) de la región Poblano-Veracruzana" del alumno Rogelio Lara González, con número de matrícula 10009415, aspirante al grado de Maestro en Biología Integrativa de la Biodiversidad y la Conservación, considero que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida en el examen de grado.

Por lo tanto emito mi VOTO APROBATORIO.

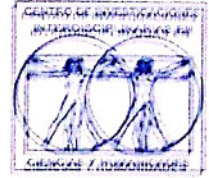
Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,

**Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns**  
Investigador Titular C de Tempo completo  
Departamento de Ecología Evolutiva  
Instituto de Ecología  
Universidad Nacional Autónoma de México



Universidad Nacional Autónoma de México  
Centro de Investigaciones Interdisciplinarias  
en Ciencias y Humanidades



Fecha: 11 de diciembre de 2019

Comisión de Seguimiento Académico  
Maestría en Biología Integrativa de la  
Biodiversidad y la Conservación  
Presente

Como integrante del jurado y después de haber evaluado la tesis titulada "Caracterización genética y fenotípica de tres taxones de *Agave salmiana* (Asparagaceae) de la región Poblano-Veracruzana" del alumno Rogelio Lara González, con número de matrícula 10009415, aspirante al grado de Maestro en Biología Integrativa de la Biodiversidad y la Conservación, considero que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida en el examen de grado. Por lo tanto emito mi VOTO APROBATORIO.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente

---

Dr. Lev Orlando Jardón Barbolla  
Investigador Titular A de TC, Definitivo  
CEIICH, UNAM.