

**UNIVERSIDAD DE
GUADALAJARA**
*CENTRO UNIVERSITARIO DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS*



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN
Y ASISTENCIA EN
TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL
ESTADO DE JALISCO A.C.**



**ESTUDIO GENÉTICO DE ESPECIES SILVESTRES
DEL GÉNERO AGAVE DISTRIBUIDAS EN EL
VOLCÁN DE TEQUILA, JALISCO**

**TESIS PROFESIONAL QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PRESENTA
JUAN LUIS ALVAREZ SALAZAR**

**DIRECTOR DE TESIS
DRA. ERICKA PATRICIA FLORES BERRIOS**

**ASESORES
DRA. ANNE M. SANTERRE LUCAS
M.C. MIGUEL DE JESÚS CHÁZARO BASÁÑEZ**

ZAPOPAN, JAL., junio 2004



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLÓGIA

COMITÉ DE TITULACIÓN

**C. JUAN LUIS ALVAREZ SALAZAR
P R E S E N T E .**

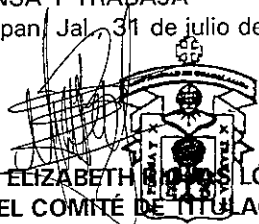
Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **Tesis** con el título: **"ESTUDIO GENÉTICO DE ESPECIES SILVESTRES DEL GÉNERO *Agave* DISTRIBUIDAS EN EL VOLCÁN DE TEQUILA, JALISCO"**, para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo el/la **DRA. ERICKA PATRICIA FLORES BERRIOS** y como Asesores el/la **DRA. ANNE SANTERRE LUCAS** y **M.C. MIGUEL DE JESÚS CHÁZARO BASAÑEZ**.

A T E N T A M E N T E

"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan Jalisco, 31 de julio del 2003



**DRA. MÓNICA ELIZABETH FLORES LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLÓGIA

Leticia Hernández López

**M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN**

- c.c.p. **DRA. ERICKA PATRICIA FLORES BERRIOS**.- Director del Trabajo
- c.c.p. **DRA. ANNE SANTERRE LUCAS**.- Asesor del Trabajo
- c.c.p. **M.C. MIGUEL DE JESÚS CHÁZARO BASAÑEZ**.- Asesor del Trabajo
- c.c.p. Expediente del alumno

MERL/LHL/mam

C. DR CARLOS ÁLVAREZ MOYA

Forma C

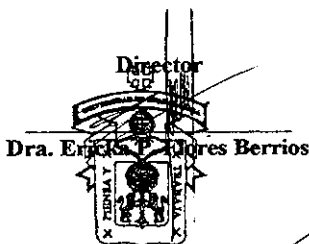
**PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN
DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E**

Por medio de la presente, nos permitimos informar a usted, que habiendo revisado el trabajo de titulación **TESIS E INFORMES** opción **Tesis** que realizó en pasante **Juan Luis Alvarez Salazar**, código **193003144** con el título: **“ESTUDIO GENÉTICO DE ESPECIES SILVESTRES DEL GÉNERO *Agave* DISTRIBUIDAS EN EL VOLCÁN DE TEQUILA, JALISCO”** consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y, en su caso, programación de fecha de examen respectivo.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Las Agujas, Zapopan, Jal., a 18 de marzo del 2004-03-18



Asesor

A. Santerre
Dra. Anne Santerre L.

Asesor

COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

M. Cházaro B.
M.C. Miguel de Jesús Cházaro B.

SINODALES

- 1.-Dr. Aarón Rodríguez Contreras *Aarón Rodríguez*
- 2.-Dra. Alma Rosa Villalobos Arámbula *Alma Rosa Villalobos*
- 3.- M.C. Alejandro Muños Urías *Alejandro Muños Urías*
- 4.- M.C. Patricia Castro Félix *Patricia Castro*

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología de Jalisco (COECYTJAL) por el financiamiento del presente trabajo.

Al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) por mi estancia en sus instalaciones para la realización de la etapa experimental.

A la Doctora Erica Flores Berrios por la dirección del presente trabajo.

Al Maestro Miguel Cházaro Basáñez por sus consejos y por la continua y desinteresada ayuda durante el trabajo de campo.

A mis Maestras Patricia Castro y Anne Santerre por sus atinados comentarios y por su continua ayuda.

A Manuel Rodríguez, Gerardo H. Vera y Don Jaime Luna por su gran ayuda durante las colectas de campo.

DEDICATORIA

RESUMEN

En el presente trabajo se propone el uso de marcadores RAPD's para el análisis de la variación genética en poblaciones de *Agave guadalajarana* y *A. inaequidens*, únicas especies silvestres distribuidas en el volcán de Tequila, Jalisco.

Se utilizaron cuatro cebadores, que generaron un total de 54 marcadores, de los cuales 45 (83%) fueron polimórficos. Los valores de distancias genéticas entre los genotipos colectados de las dos especies varían de 0.11 a 0.91, este amplio intervalo es alto y se encuentra dentro de lo esperado en especies de *Agave* silvestre. En el dendrograma derivado de las distancias genéticas, se observan dos grupos principales que contienen a la mayoría de los individuos estudiados y no se observa la existencia de genotipos híbridos entre *A. guadalajarana* y *A. inaequidens*.

Los resultados descritos anteriormente constituyen un aporte al conocimiento de la distribución geográfica y diversidad genética de las especies de *Agave* en el Volcán de Tequila, sirviendo de referencia para estudios taxonómicos y de conservación en el Estado de Jalisco.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES:	1
1.1 EL GÉNERO <i>Agave</i>	1
1.2 EL GÉNERO <i>Agave</i> EN EL ESTADO DE JALISCO	3
1.3 EL VOLCÁN DE TEQUILA	5
1.4 GENÉTICA DEL GÉNERO <i>Agave</i>	10
1.5 MARCADORES MOLECULARES	11
1.6 LA TÉCNICA DE RAPD'S	13
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. OBJETIVOS:	17
3.1 OBJETIVO GENERAL	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
4. HIPÓTESIS	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS:	18
5.1 COLECTA DE CAMPO	18
5.2 EXTRACCIÓN DE ADN	19
5.3 OBTENCION DE MARCADORES RAPD's	19
5.4 ANÁLISIS DE DATOS	20
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
6.1 COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL	21
6.2 EXTRACCIÓN DE ADN	25
6.3 MARCADORES RAPD's	26
6.4 DISTANCIAS GENÉTICAS	28
7. CONCLUSIONES	33
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

9. ANEXOS	39
ANEXO 1: PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN	39
ANEXO 2: PROTOCOLO PARA LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE ADN	40
ANEXO 3: PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN DE MARCADORES RAPD	41
ANEXO 4: PROTOCOLO DE ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	42

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies del género <i>Agave</i> distribuidas en Jalisco	4
Tabla 2. Especies representativas del Bosque tropical caducifolio en el volcán de Tequila.	6
Tabla 3. Especies representativas del Bosque de encino en el volcán de Tequila.	6
Tabla 4. Especies representativas del Bosque de <i>Pinus-Quercus</i> en el volcán de Tequila.	7
Tabla 5. Especies representativas del Bosque <i>Pinus-Quercus</i> en zonas húmedas del volcán de Tequila.	7
Tabla 6. Especies representativas del Bosque mesófilo de montaña en el volcán de Tequila.	8
Tabla 7. Características morfológicas comparativas de <i>A. guadalajarana</i> y <i>A. inaequidens</i> .	10
Tabla 8. Ubicación geográfica de las poblaciones de <i>Agave spp.</i> colectadas en el volcán de Tequila.	22
Tabla 9. Porcentajes de polimorfismos reportados para especies del género <i>Agave</i> .	26
Tabla 10. Matriz de distancias genéticas	28

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Inflorescencia de <i>Agave wentii</i> típica del subgénero <i>Littaea</i> (foto: Patricia Hernández R)	1
Fig. 2 Inflorescencia de <i>A. maximilliana</i> típica del subgénero <i>Agave</i> . (Foto: M. Cházaro B.)	2
Fig. 3 Distribución de <i>A. guadalajarana</i> y <i>A. inaequidens</i> en el estado de Jalisco reportados en la literatura (Arreola, 1990 con modificaciones)	9

Fig. 4 Hojas de <i>A. guadalajarana</i> y <i>A. inaequidens</i>	18
Fig. 5 Sitios de colecta en el volcán de Tequila de <i>A. guadalajarana</i> y <i>A. inaequidens</i> (INEGI, 2002).	22
Fig. 6 Población de <i>A. guadalajarana</i> , desarrollándose sobre un suelo cobrizo y consistencia arcillosa	24
Fig. 7 Poblaciones de <i>Agave inaequidens</i> desarrollándose al interior del cráter del volcán	25
Fig. 8 Calidad del ADN (a) extraído con el protocolo descrito en el kit Nucleon Phytopure, (b) extraído con el protocolo descrito en el kit Gen elute y evaluados por electroforesis en gel de agarosa.	26
Fig. 9 Perfiles moleculares obtenidos con cebadores del kit Ready-To Go RAPD Análisis Beads: (a) cebador no. 1, (b) cebador no. 2, (c) cebador no. 3, (d) cebador no. 5.	27
Fig. 10 Dendrograma de los genotipos colectados (<i>Agave guadalajara</i> y <i>A. inaequidens</i>)	32

INTRODUCCIÓN

Los agaves o magueyes, palabra de origen antillano o caribeño utilizada desde México hasta Venezuela para describir a individuos del género *Agave* (Aguirre et al., 2001), constituyen un grupo de plantas con hondas raíces históricas en Centroamérica, donde el aprovechamiento de algunas especies de éste género se remonta hasta las sociedades prehispánicas, en las cuales se utilizaba para la obtención de fibras, textiles y en la producción de bebidas fermentadas que, aún en nuestros días, han persistido. Si bien los métodos antiguos han sido, en la mayoría de los casos, modificados por las nuevas formas tecnológicas de producción, los agaves y los productos que de ellos se extraen siguen siendo parte importante de la identidad cultural de México (Ramírez, 1995).

En Jalisco, el cultivo y procesamiento de *Agave tequilana* Weber var. azul (única especie permitida para la elaboración del tequila) y de *Agave angustifolia* Haw. (utilizado en la elaboración del mezcal) son las actividades características de la región, lo que ha generado información respecto al cultivo, mejoramiento genético e identificación varietal a través de técnicas basadas en el ADN (Cuevas, 2001; Gil-Vega et al., 2001). Contrariamente, el conocimiento de especies de *Agave* silvestres distribuidas en el Estado se ha restringido a estudios taxonómicos tradicionales y etnobotánicos, existiendo profundos huecos en cuanto a estudios genéticos y ecológicos para la conservación de estas especies, particularmente en sitios que han sido perturbados como es el caso del Volcán de Tequila

En el contexto anterior, el objetivo del presente trabajo es analizar, mediante marcadores RAPD's, la variación genética de las dos especies de *Agave* silvestres distribuidas en el Volcán de Tequila y establecer sus relaciones genéticas.

1. ANTECEDENTES

1.1 EL GÉNERO *Agave*

El género *Agave*, establecido por Linneo (1753) (citado por Gentry, 1982), se ubica taxonómicamente en la clase Liliopsida, orden Liliales y familia Agavaceae (Cronquist, 1981). Se divide en dos subgéneros de acuerdo al tipo de inflorescencia que presentan y a su distribución geográfica:

Subgénero *Littaea*.- Con inflorescencia de apariencia espigada y flores en pares (Fig. 1), las especies de este subgénero se encuentran divididas en ocho grupos (*Amolae*, *Choritepalae*, *Filiferae*, *Marginae*, *Parviflorae*, *Polycephalae*, *Striatae*, *Urceolatae*) y se distribuyen desde Utah, Nevada y Arizona en los Estados Unidos hasta Guatemala (Gentry, 1982).



Fig. 1 Inflorescencia de *Agave wentii* típica del subgénero *Littaea* (foto: Patricia Hernández R.)

Subgénero *Agave*.- Las inflorescencias son paniculadas y las flores se encuentran en grandes agregados umbelados sobre pedúnculos laterales (Fig. 2), las especies de este subgénero se dividen en doce grupos (*Americanae*, *Campaniflorae*, *Crenatae*, *Deserticolae*, *Ditepalae*, *Hiemiflorae*, *Marmoratae*, *Parryanae*, *Rigidae*, *Salmianae*, *Sisilanae*, *Umbelliflorae*) y se distribuyen desde California a Texas y Sur de Florida en los Estados Unidos hasta Perú , Colombia y Venezuela, incluyendo las Antillas y Centroamérica (Op. Cit.).



Fig. 2 Inflorescencia de *A. maximilliana* típica del subgénero *Agave*. (Foto: M. Cházaro B.)

México es el centro de mayor diversificación del género *Agave* (García-Mendoza y Galvan R., 1995) y tiene representadas 150 especies (Eguiarte *et al.*, 2000) más 36 taxa infra-específicos, lo que representa un 75% del número total de especies conocidas en América (García-Mendoza, 2002).

El género *Agave* se distribuye en el continente americano entre los 40° de Latitud Norte y los 20° Latitud Sur (Alvarez de Zayas, 1989), en alturas que van desde 0 hasta 3400 metros sobre el nivel del mar (msnm), particularmente en el intervalo de 1000 a 2000 msnm (García-Mendoza, 2002). Los Bosques de *Pinus-Quercus* contienen el 30% de las especies de *Agave* del total reportadas para México y este tipo de vegetación es el segundo más frecuente después del chaparral y desierto (Op.Cit.).

Los agaves se desarrollan principalmente sobre suelos derivados de roca volcánica y de origen marino (García-Mendoza, 2002). Las adaptaciones que estas plantas han desarrollado para soportar periodos largos de sequia implican el control de la transpiración y de las reservas de agua de sus tejidos foliares, protegidas con una cutícula gruesa y fibras duras en el interior, además de un metabolismo tipo CAM (Granados, 1993; Nobel, 1998).

1.2 EL GÉNERO *Agave* EN EL ESTADO DE JALISCO

Gentry (1982) ofrece una revisión del género, que incluye varias regiones de México entre las que se encuentra el estado de Jalisco. Con base en características fenotípicas, citogenéticas y de hábitat, este autor aporta una descripción que incluye datos de distribución, ecológicos y etnobotánicos de 22 especies del género *Agave* (Tabla1) de la región denominada "Jaliscan Plateau." Sin embargo, no describe específicamente que regiones (además del estado de Jalisco) quedan incluidas en ese término.

Otros autores mencionan que del total de especies del género *Agave* para América, 18 se reportan para la Nueva Galicia (Jalisco, Nayarit, Colima), con algunas especies ampliamente distribuidas en el Estado de Jalisco (Tabla 1) (Mc Vaugh, 1989; Reyna, 1990; Cházaro y Lomelí, 1995).

Tabla 1. Especies del género *Agave* distribuidas en Jalisco

GRUPO ⁽¹⁾	ESPECIE	DATOS DE COLECTA ⁽²⁾	REFERENCIA
Amolae (L)	<i>A. attenuata</i> Salm-Dick	Sierra de Manantlan cerca del valle del Durazno, aprox. 2,200 m.s.n.m. (Kimmach & Boutin 3019).	(Gentry, 1982; McVaugh, 1989)
	<i>A. pedunculifera</i> Trel.	10-13 km. Al suroeste de el Chante, hacia rincón de Manantlán (Gentry 23507) (Ilitis et al 2552) WIS. 9.6 km. por el camino suroeste de chiquilistlan, 1800 m.n.m. (Gentry & Gentry 23503).	(Gentry, 1982; McVaugh, 1989)
	<i>A. vilmoriniana</i> Berger	6 km al noroeste de Guadalajara jal. 1200 m.s.n.m. (Gentry & Gilly 10893). Barranca de colimilla cerca de Guadalajara Jal. (Gentry & Gilly 10843).	(Gentry, 1982; McVaugh, 1989)
Filiferae (L)	<i>A. colimana</i> H.S. Gentry	Rancho el paraíso, sur de Chamela (Gentry 23540). Municipio la Huerta, bahía de Tenacatita (Ornelas U. Et al 148) IBUG.	(McVaugh, 1989)
	<i>A. schidigera</i> Lem.	32 km. al suroeste de Valparaíso sobre el camino a Huejuquilla 2000 m.s.n.m. (Gentry & Gentry 23457). Mpio. De Ojuelos, 10 km. Al suroeste de la Paz (Arreola & Cházaro 679) WIS.	(Gentry, 1982; McVaugh, 1989)
	<i>A. rzedowskiana</i> P. Carrillo, R. Vega & R. Delgad. Sp nov.	Tipo: Municipio de San Cristóbal de la barranca, mesa de los caballos 1680 m P. Carrillo & D. Cabrera, 1503) IBUG, GUAD. MEXU, NY.	(Carrillo-Reyes et al., 2003)
Americanae (A)	<i>Agave americana</i> L.	Cerca de Huejuquilla (Rose 3559).	(Gentry, 1982)
	<i>Agave americana</i> var. <i>expansa</i> (Jacobi) Gentry	La primavera al oeste de Guadalajara Jalisco (Gentry s.n.). La Barca Jal. (Trelease s.n.) MO.	(Gentry, 1982; McVaugh, 1989)
Crenatae (A)	<i>A. hookeri</i> Jacobi	Sierra del tigre, región de Mazamitla (Gentry s.n.) DES. Suroeste de Jiquilpan sobre la carretera a Colima, cultivado (Gentry s.n.) DES.	(Gentry 1982; McVaugh, 1989)
	<i>A. inaequidens</i> K.Koch.	17 Km. al Suroeste de Sayula camino a Venustiano Carranza (Ilitis & Guzmán 29011) WIS.	(McVaugh, 1989)
	<i>A. inaequidens</i> spp. <i>inaequidens</i> Koch	Amacueca sobre la carretera a Tapalpa (Gentry 23499) US, INIF, DES, MICH.	(Gentry, 1982)
	<i>A. maximiliana</i> Baker	Entre Mascota y San Sebastián (Nelson 4048) 3-10 km. sobre el camino a mina de cuale (McVaugh 26347) MICH.	(Gentry, 1982; McVaugh, 1989)
	<i>A. maximiliana</i> spp. <i>katharinae</i> (Berger) Gentry	14 km al oeste de Autlan 1300 m.s.n.m.. (Gentry 18309) US, DES, MEXU.	(Gentry, 1982)
Marmoratae (A)	<i>A. gypsophila</i> Gentry	Cerca de 40 km al Noroeste de la ciudad de Colima sobre el camino a Pihuamo (Gentry 23532) DES, MEXU, MICH.	(Gentry, 1982)

Parryanae (A)	<i>A. guadalajarana</i> Trel.	Camino nuevo a Colotlan 32 km al Norte de Guadalajara Jal. (Gentry 23498). 20 km al Norte del entronque sobre el nuevo camino a Colotlán (Gentry 23498) US, INIF, MICH, DES.	(Gentry, 1982; McVaugh, 1989)
Rigidae (A)	<i>A. angustifolia</i> Haw.	Tierra blanca entre villa corona y Tecolotlan (Gentry 10464) DES, MEXU, MICH, US.	(Gentry, 1982)
	<i>A. angustifolia</i> var. <i>angustifolia sensu</i> Gentry 1982	Tierra blanca, entre Villa corona y Tecolotlán (Gentry 10464). Suroeste de Valparaíso, 33 km. sobre el camino a Huejuquilla (Gentry 23458).	(McVaugh, 1989)
	<i>A. angustifolia</i> var. <i>rubescens</i> (Salm.) Gentry	33 km al suroeste de Valparaíso sobre el camino a Huejuquilla (Gentry & Gentry 23458) DES, MEXU, MICH, US.	(Gentry, 1982)
	<i>A. stringens</i> Trel.	Tipo: Rio blanco barranca cerca de Guadalajara Jal. (Trelease 1904) MO.	(Gentry, 1982; McVaugh 1989)
	<i>A. tequilana</i> Weber	Alrededores de Tequila, cultivado (Medrano 1487) 1560 m.s.n.m.	(Gentry, 1982)

⁽¹⁾ Subgéneros: L (*Littaea*), A (*Agave*). ⁽²⁾ Abreviación de herbarios: DES (Desert Botanical Garden, Phoenix, Arizona), GUADA (universidad Autónoma de Guadalajara), IBUG (Instituto de Botánica, U. d. G.), INIF (Institución Nacional de Investigaciones Forestales, México D.F.), MEXU (Instituto de Biología, UNAM), MICH (University of Michigan), MO (Missouri Botanical Garden, St. Louis, Missouri), NY (New York Botanical Garden, New York), US (National Herbarium, Natural History Museum, Washington D.C.), WIS (University of Wisconsin, Madison).

1.3 EL VOLCÁN DE TEQUILA

El volcán de Tequila forma parte del valle de Tequila y Amatitán en Jalisco. Esta elevación orográfica localizada en las coordenadas 20° 47' LN, 103° 51' LO y con una altura de 2940 msnm, pertenece al complejo montañoso denominado Eje Neovolcánico Transversal, exhibiendo varios tipos de vegetación en toda la pendiente que se describen a continuación (Rodríguez y Cházaro, 1987; Patiño, 1994; Cházaro, 1995):

Bosque Tropical Caducifolio (BTC):

Tipo de vegetación que se desarrolla en suelos someros y pedregosos. Una característica distintiva de este tipo de vegetación es que los arbustos y árboles pierden sus hojas durante el periodo de sequía. Algunos de los componentes florísticos más representativos son:

Tabla 2. Especies representativas del Bosque tropical caducifolio en el volcán de Tequila.

FAMILIA	NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE VULGAR
ANNONACEAE	<i>Anona longiflora</i> S. Watson	"anona"
BURSERACEAE	<i>Bursera bipinnata</i> (DC) Engler	"copal"
CONVOLVULACEAE	<i>Ipomea intrapilosa</i> Rose	"ozote"
LEGUMINOSAE	<i>Leucaena esculenta</i> (DC.) Benth	"huajillo"
MORACEAE	<i>Ficus cotinifolia</i> HBK	"amate"
	<i>Ficus petiolaris</i> HBK	"tezcalame"
PAPAVERACEAE	<i>Bocconia arborea</i> S. Watson	"llora sangre"
SAPOTACEAE	<i>Mastichodendron capiri</i> (A. DC) Cronq.	"tempisque"
APOCYNACEAE	<i>Stemmadenia palmeri</i>	"mancuernilla"

Bosque de Juniperus:

Se encuentra en ecotono entre el Encinar y el BTC y se desarrolla sobre suelos someros, la especie representativa es *Juniperus flaccida* var. *poblana* "cedro" o "enebro."

Bosque de encino (encinar):

Inicia entre las cotas 1360 a 1550 msnm y se extiende hacia la cima donde forma junto con *Pinus spp* otro tipo de vegetación (Bosque de *Pinus-Quercus*). Las especies características del encinar son:

Tabla 3. Especies representativas del Bosque de encino en el volcán de Tequila.

FAMILIA	NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE VULGAR
FAGACEAE	<i>Quercus gentryi</i> C. H. Muller	"encino"
	<i>Q. magnoliifolia</i> Née	"encino roble"
	<i>Q. resinosa</i> Liebm.	"encino rojo"
OPILIACEAE	<i>Agonandra racemosa</i> (DC.) Standl.	"suelda"
ROSACEAE	<i>Prunus ferruginea</i> Steud.	"cortapico"
CLETHRACEAE	<i>Clethra rosei</i> Britt.	"malvaste"

Bosque de Pinus- Quercus:

Está definido como tal aproximadamente a los 1700 msnm y se continua hacia la cima. Algunos de los elementos florísticos son:

Tabla 4. Especies representativas del Bosque de *Pinus-Quercus* en el volcán de Tequila.

FAMILIA	NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE VULGAR
PINACEAE	<i>Pinus oocarpa</i> Schiede ex Schlent	"pino"
	<i>P. michoacana</i> Martinez	
	<i>P. lumholtzii</i>	
FAGACEAE	<i>Quercus candicans</i> Née	"encino de asta"
	<i>Q. castanea</i> Née	"encino"
	<i>Q. obtusata</i> Humb. & Bonpl.	"encino rojo"

Aproximadamente desde la cota de 2,900 msnm y hacia la cima el incremento de la humedad en el Bosque de *Pinus-Quercus* permite el establecimiento de especies como:

Tabla 5. Especies representativas del Bosque *Pinus-Quercus* en zonas húmedas del volcán de Tequila.

FAMILIA	NOMBRE CIENTIFICO	NOMBRE VULGAR
FAGACEAE	<i>Quercus crassifolia</i> Humb. & Bonpl.	
	<i>Q. rugosa</i> Née	"avellana"
	<i>Q. laurina</i> Humb. & Bonpl.	"encino laurelillo"
ERICACEAE	<i>Arbutus xalapensis</i> H. B. K.	"madroño"
	<i>Arbutus glandulosa</i> Mart & Gal.	"madroño"

Bosque mesófilo de montaña:

Se encuentra restringido sólo a las cañadas donde el índice de humedad es más alto respecto a otras zonas del volcán. Las especies representativas son:

Tabla 6. Especies representativas del Bosque mesófilo de montaña en el volcán de Tequila.

FAMILIA	NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE VULGAR
SYMPLOCACEAE	<i>Symplococos prionophylla</i>	
THEACEAE	<i>Cleyera integrifolia</i> (Benth) Choisy	"capulín virgen"
	<i>Temstroemia lineata</i> DC.	"tila"
	<i>Alnus jorullensis</i> H. B. K.	"aile"
	<i>Clethra mexicana</i> Britt.	"malvaste"

Bosque de Cupressus:

Se encuentra sólo en el macizo rocoso conocido como "tetilla", tipificado por *Cupressus benthami* var. *lindleyi* ("ciprés") (Rodríguez y Cházaro, 1987; Cházaro, 1995).

De acuerdo con Rodríguez y Cházaro (1987) y Cházaro (1995) son dos las especies del género *Agave* que se desarrollan en el volcán de Tequila:

Agave guadalajarana Trelease ("maguey chato") Subgénero *Agave*, Grupo Parryanae. Esta especie se desarrolla sobre pendientes derivadas de roca volcánica (roca riolítica), en suelos someros y principalmente en bosque de *Quercus spp.*-*Pinus spp.* en un rango altitudinal de 1400 a 2000 msnm. Es conocida sólo en las regiones aledañas al Norte de Guadalajara (Cerro del Colli, Cerro del Tepopote, Sierra de Tesistan, Sierra de San Esteban, Sierra de la Primavera y el Volcán de Tequila) (Fig. 3) ocasionalmente la savia es usada como fuente de azúcar para la manufactura del mezcal (Gentry, 1982; Mc Vaugh, 1989;

Cházaro y Lomelí, 1995). La floración de la especie comienza durante los meses de abril a mayo y alcanza el desarrollo completo de junio a agosto (Mc Vaugh, 1989; Cházaro y Mostul, 2002).

Agave inaequidens K. Koch (“maguey bruto”) Subgénero *Agave*, Grupo *Crenatae*. Se desarrolla sobre laderas abiertas en Bosque de *Pinus spp.*-*Quercus spp.*, en un rango altitudinal de 1850 a 2480 msnm. Se distribuye sobre las montañas de Morelos hasta Michoacán y Colima; en Jalisco se conoce en el Volcán de Tequila, Cerro Viejo, Sierra de Tapalpa y Cerro de García (Fig. 3). Se utiliza para la obtención de pulque (Gentry, 1982; Cházaro, 1995; Galván y Zamora, 1995) y la floración sucede de noviembre a abril (Mc Vaugh, 1989). En la Tabla 7 se muestran los rasgos taxonómicos de *A. inaequidens* y *A. guadalajarana*.

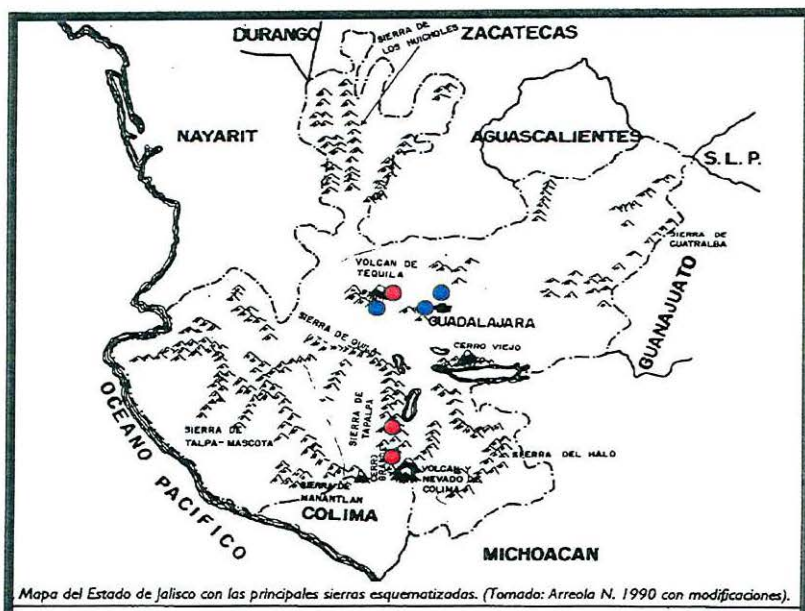


Fig 3. Distribución de *A. guadalajarana* (azul) y *A. inaequidens* (rojo) en el estado de Jalisco (Tomado de Arreola, 1990 con modificaciones).

Tabla 7. Características morfológicas comparativas de *A. guadalajarana* y *A. inaequidens* (Gentry, 1982; Irish e Irish, 2000).

Caracter taxonómico	<i>Agave guadalajarana</i> Trel.	<i>Agave inaequidens</i> Koch.
Tamaño y forma de la roseta	Pequeñas, compactas de 25 a 35 cm. de diámetro. "más anchas que altas."	De 85 a 220 cm de diámetro. "mas altas que anchas."
Color	Verde claro opaco a grisáceo	Verde claro a amarillento, raramente glauco
Forma de las hojas	Obadas a oblongas y con margen obtuso, 20-30 cm de largo x 12-18 cm de ancho	Anchas o angostas, lanceoladas a oblanceoladas, 75 x 150 cm de largo y 11 x 21 cm de ancho.
Margen dentado	Dientes de 8 a 10 mm de largo y se sobreponen en mamilas que son más prominentes hacia la punta de la hoja	Dientes dimórficos de 8 a 10 mm de largo. Más largos en las prominencias de las hojas, color castaño a café oscuro.
Espina terminal	De 2.5 cm de longitud, recta a sinuosa, color café-rojizo.	De 2.5 a 5.5 cm de largo, acanalada por el centro. De color café oscuro.
Paniculas	Escapo floral de 4 a 5 m de altura con 15 a 20 umbelas pequeñas insertadas a partir de la mitad superior del escapo	Escapo floral de 5-8 m de altura con 30 a 50 umbelas compactas.
Flores	Amarillas aproximadamente de 6 cm de largo	Amarillas de 60 a 90 mm de largo. Ovario 30 a 40 mm de largo.
Semillas	De forma lunada de 4 x 6 mm. Contenidas en frutos de 4.5 cm de largo x 1.8 cm de ancho con una protuberancia al lado contrario del pedúnculo.	Hemisféricas, negras de 6 a 7.5 x 4.5 a 5.5 mm.
Reproducción	Predominantemente sexual, sin embargo se ha observado la producción de bulbillos (hijuelos que se forman en la inflorescencia sin polinización).	Predominantemente sexual, sin embargo se ha observado la producción de bulbillos (hijuelos que se forman en la inflorescencia sin polinización).

1.4 GENÉTICA DEL GÉNERO *Agave*

La complejidad en la identificación del género *Agave* ha requerido el uso de metodologías como la citogenética y biología molecular para complementar los estudios basados en taxonomía tradicional (Granados, 1993). En el ámbito de la citogenética, Garnick (1944) a partir de 31 especies de *Agave* reporta un número cromosómico básico de $x=30$, divididos en cromosomas grandes, medianos y pequeños, con un patrón característico durante la metafase. El mismo autor concluye que el subgénero *Littaea* es predominantemente diploide y más primitivo que el subgénero *Agave* que son poliploides, asimismo pone de manifiesto la poliploidía en todo el género, formado por una serie de $2x$, $3x$, $4x$, $5x$ y $6x$, suponiendo que esto deriva de la propagación vegetativa.

Castorena-Sánchez *et al.* (1991) analizaron los cariotipos de *Agave fourcroydes*, *A. sisilana*, *A. angustifolia* var. *marginata* y *A. tequilana* confirmando que el número cromosómico básico es $x=30$, sin embargo, observaron una proporción cambiante de cromosomas medianos y cortos entre especies, que sirve como criterio de identificación. La estabilidad cariotípica encontrada en individuos que se originaron por reproducción asexual en estos taxa se contrapone a lo reportado por Sharma y Battachayya (1962) para especies cultivadas de *Agave*, en las cuales se presenta inestabilidad cariotípica durante la reproducción vegetativa, proponiendo este fenómeno como posible causa de especiación.

1.5 MARCADORES MOLECULARES

Recientemente, los avances de la biología molecular han proporcionado una serie de técnicas basadas en el análisis del ADN, entre las cuales se encuentran los marcadores moleculares. Estos se basan en la detección de polimorfismos que resultan de rearrreglos (mutaciones) entre los pares de bases, tales como: translocaciones, inversiones, inserciones o deleciones (Otero *et al.*, 1997; Valadez

y Kahl, 2000). Los polimorfismos han demostrado ser una fuente importante de información para complementar estudios taxonómicos, filogenéticos (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1997) y para el conocimiento de la distribución y extensión de la variación genética inter e intraespecífica en diversas especies (Hongtrakul *et al.*, 1997; Breyne *et al.*, 1999; Caicedo *et al.*, 1999; Nair *et al.*, 1999; Fischer *et al.*, 2000; Cuevas, 2001; Gil-Vega *et al.*, 2001; González, 2001). De esta manera, el estudio sobre la extensión y distribución de la diversidad genética por medio de marcadores moleculares, permite establecer la amplitud de la base genética de las poblaciones y aplicar este conocimiento en estudios filogenéticos y de mejoramiento genético (Otero *et al.*, 1997; Montero *et al.*, 1998).

Las isoenzimas fueron los primeros marcadores moleculares desarrollados utilizando las proteínas como unidad polimórfica y aplicados en estudios de diversidad genética. Colunga-García *et al.*, (1999) reportan altos valores de variación intraespecífica en *Agave angustifolia* y valores bajos en *A. fuercroydes* con base en estudios isoenzimáticos. Martínez-Palacios *et al.*, (1999) a partir de 10 loci isoenzimáticos desarrollados para *A. victoria-reginae* reportan altos índices de variación genética, al igual que Eguiarte *et al.* (2000) en poblaciones de *A. lechuguilla* mediante 13 loci. Las técnicas con isoenzimas son económicas y rápidas, sin embargo, muestras congeladas durante diferentes periodos y condiciones, en ocasiones presentan patrones de bandeo distintos, al igual que muestras colectadas en diferentes estaciones (Otero *et al.*, 1997). En este sentido, otros marcadores moleculares basados en el ADN ofrecen la ventaja de no estar sujetos a cambios ambientales donde se desarrollan los organismos en estudio y el número de polimorfismos obtenidos es mayor comparado con isoenzimas (Liu y Furnier, 1993; Valadez y Kahl, 2000).

Las técnicas para la obtención de marcadores moleculares de ADN se pueden agrupar en tres categorías: 1. Las basadas en hibridación tipo southern como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) y VNTR (Variable Number of Tandem Repeats); 2. Las basadas en la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y 3. las basadas en una combinación de la técnica de PCR y la hibridación southern como RAHM (Random Amplified Hybridization Microsatellites), llamada también RAMPO (Random Amplified Microsatellite Polymorphisms) (Karp y Edwards, 1997; Valadez y Kahl, 2000).

1.6 LA TÉCNICA DE RAPD's

Los RAPD's (Williams *et al.*, 1990) son marcadores moleculares obtenidos por amplificaciones de segmentos de ADN al azar, utilizando cebadores cortos (10 mers) de secuencia arbitraria, mediante la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) (Erlich y Arnheim, 1992; Saiki *et al.*, 1988; citados por Caetano-Anollés y Gresshof, 1997). Los cebadores se caracterizan por contener 50 a 80 % de G+C (Guanina + Citosina) y no son secuencias palindrómicas, es decir, que la secuencia no se "lee" igual de un sentido y del otro (Williams *et al.*, 1990). Los protocolos para la obtención de RAPD's describen reacciones estandarizadas que en general contienen: amortiguador de reacción, Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$), nucleótidos libres (dNTPs), cebador, ADN genómico y la enzima *Taq* polimerasa. La amplificación se realiza mediante ciclos de diferente temperatura y los segmentos de ADN amplificados se separan por medio de electroforesis en gel de agarosa, teñidos con Bromuro de Etidio y visualizados con luz ultravioleta (Williams *et al.*, 1990; Skroch y Nienhuis, 1995; Caetano-Anollés y Gresshof, 1997; Furman *et al.*, 1997).

Los polimorfismos obtenidos con la técnica de RAPD's son producidos por mutaciones que alteran el sitio de reconocimiento del cebador y que impide que el fragmento sea amplificado o altere su tamaño, asimismo, son marcadores dominantes, es decir que se produce la misma banda para el homólogo dominante y el heterólogo (Williams *et al.*, 1990; Otero *et al.*, 1997; Navarro, 1999).

Las ventajas que ofrece ésta técnica son: 1) que no se requiere de un conocimiento previo del genoma del organismo a estudiar, 2) el costo es reducido comparado con otras técnicas como los AFLP's (Gil-Vega *et al.*, 2001) y 3) proporcionan un mayor número de marcadores polimórficos que las enzimas (Liu y Furnier, 1993) Asimismo, son marcadores neutros que proporcionan un muestreo general del genoma de un organismo, tanto de genes como de secuencias espaciadoras, sitios de regulación y pseudogenes; lo que los hace más sensibles a los polimorfismos, que teóricamente deberían ocurrir frecuentemente en zonas no codificantes (Williams *et al.*, 1990; Skroch y Nienhuis, 1995).

La técnica de RAPD's ha sido utilizada en estudios con especies vegetales silvestres y cultivadas; por ejemplo Skroch y Nienhuis (1995) reportan la capacidad resolutoria de los RAPD's para la identificación varietal de 10 líneas genéticas de *Phaseolus vulgaris*. Por otra parte, Cuisset y Boursiquot (1997) utilizan marcadores RAPD's para la identificación de 30 cultivares de uva (*Vitis spp.*) y manifiestan la sensibilidad de la técnica, reportando que con sólo 3 cebadores es posible identificar y relacionar genéticamente los individuos estudiados. De esta manera se pone en evidencia la capacidad resolutoria de los marcadores RAPD's para estudios genéticos entre especies y variedades cultivadas.

En lo referente a especies silvestres, Fischer *et al.*, (2000) reportan distintos niveles de variación genética, de acuerdo al tamaño poblacional y un limitado flujo genético entre poblaciones de *Ranunculus reptans* (especie endémica de una región de Europa), poniendo de manifiesto que los marcadores moleculares

RAPD's aportan información sustancial para la formulación de programas de conservación de recursos genéticos. González (2001) pone en evidencia una estrecha relación genética entre poblaciones de *Agave deserti deserti* y *A. deserti pringlei* (Baja California) con *A. deserti simplex* (desierto de Sonora), concluyendo que mediante los RAPD's es posible inferir que todas las poblaciones en estudio corresponden sólo a la especie *A. deserti*. Las diferencias fenotípicas observadas son originadas por respuestas al ambiente, mostrando que la divergencia y la distancia geográfica no han sido suficientemente contundentes para generar subespeciación.

Los RAPD's, asimismo, se han utilizado en estudios filogenéticos como el reportado por Furman *et al.* (1997) quienes establecen las relaciones filogenéticas entre seis especies de pinos de México y América Central, mencionando que la información obtenida por esta técnica es útil en estudios de conservación *ex situ* que involucren especies de compleja identificación taxonómica.

Los trabajos descritos anteriormente muestran la aplicabilidad de la técnica de RAPD's en el análisis de la variación genética entre especies y variedades, sin embargo, algunos problemas asociados a las condiciones de reacción (temperaturas, polimerasa, cloruro de magnesio, calidad y cantidad de ADN, cebadores, etc.) pueden afectar la eficiencia de la técnica. Estas limitaciones pueden ser solucionadas con una óptima estandarización de los reactivos y las condiciones de reacción (Williams *et al.*, 1990; Rafalski, 1997) .

2. JUSTIFICACIÓN

La reproducción sexual, en la mayoría de las especies del género *Agave*, sucede una vez al final de su ciclo de vida y el tiempo que transcurre antes de ésta es de 8 a 25 años (según la especie) por lo que es difícil obtener elementos florales, indispensables en estudios taxonómicos. Por otra parte, existen procesos de hibridación y poliploidía que afectan la apariencia general de las plantas, originando incertidumbre en su identificación (Gentry, 1985).

En el volcán de Tequila, existen zonas en las que ocurre un acercamiento entre las poblaciones de *A. inaequidens* y *A. guadalajarana* (únicas especies del género *Agave* presentes en el área), este factor favorece la hibridación natural que por métodos de identificación tradicional es difícil precisar. Así, un estudio genético apoyado por técnicas moleculares aportará datos sobre la diversidad genética actual de estas poblaciones, estableciendo bases para el desarrollo de programas de conservación y aprovechamiento de estas dos especies en Jalisco, donde los agaves tienen gran importancia económica.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar el nivel de variación genética de *Agave inaequidens* y *A. guadalajarana* distribuidas en el Volcán de Tequila, por medio de marcadores RAPD's.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Optimizar el método de extracción de ADN empleando muestras de hojas de Agave.
2. Determinar las distancias genéticas entre las especies estudiadas a partir de los datos moleculares (RADP's).
3. Depositar en los herbarios IBUG y GUADA ejemplares de *Agave inaequidens* y *A. guadalajarana* colectados en el volcán de Tequila.

4. HIPÓTESIS

El análisis molecular con marcadores RADP's en poblaciones silvestres de *Agave guadalajarana* y *A. inaequidens* presentes en el volcán de Tequila permite inferir el estado de diversidad genética y posible hibridación entre estas especies.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 COLECTAS DE CAMPO

Se llevaron a cabo 4 colectas al Volcán de Tequila durante los meses de Noviembre y Diciembre del 2002, en los cuales se obtuvieron 50 muestras de agaves silvestres. Los recorridos iniciaron de las zonas bajas del volcán hacia la cima, de esta manera se logro un muestreo en gradiente altitudinal / las rutas de exploración se determinaron en un carta topográfica 1:50,000 (INEGI). Para cada individuo colectado se estimaron las coordenadas de ubicación por medio de un aparato de posicionamiento global (GPS, Maguellan 320), se fotografió el ejemplar y se tomó la altura y diámetro de la roseta.

Además, por cada individuo se cortaron 2 hojas de diferente edad y sin signos de daño físico, las cuales se fotografiaron en el laboratorio resaltando características como: espina terminal, margen de la hoja, color y forma de las espinas marginales, ancho y largo de cada hoja (Fig. 4). Paralelamente se llevo a cabo la identificación taxonómica de acuerdo a las claves dicotómicas de Gentry (1982) y McVaugh (1989). Posteriormente los ejemplares se secaron y etiquetaron.

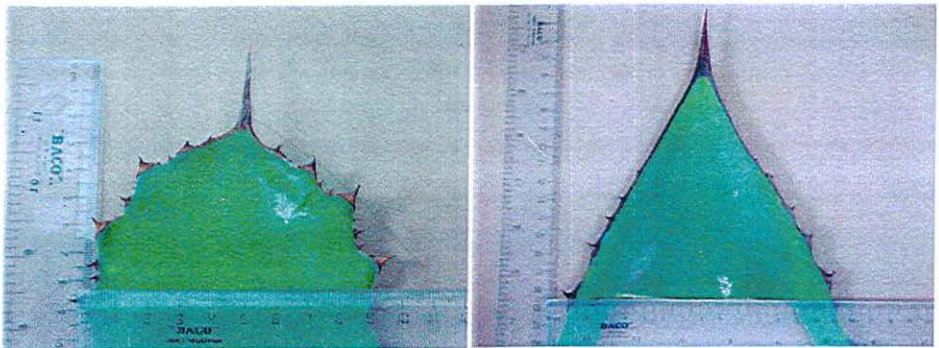


Fig. 4 Hojas de *A. guadalupensis* y *A. inaequidens*

5.2 EXTRACCIÓN DE ADN

Para la conservación del material vegetal destinado al análisis genético, se cortaron trozos de aproximadamente 5 cm³ de las hojas jóvenes y se almacenaron en congelación a -20 C.° Para la extracción del ADN se tomaron 0.2 g. de tejido foliar congelado y se macero con nitrógeno líquido hasta pulverizar. El ADN genómico total se extrajo de acuerdo al protocolo incluido en el kit de extracción Gen Elute plant genomic© (SIGMA) (Anexo 1). Mediante una serie de reacciones y la utilización de membranas de microcaptura se obtuvo el ADN en solución y se evaluó la calidad en un gel de agarosa al 1%, teñido con Bromuro de Etidio (Anexo 2). El ADN se mantuvo almacenado a -20C.°

5.3 OBTENCIÓN DE MARCADORES RAPD's.

Para la obtención de los perfiles genéticos se utilizó el kit Ready To Go RAPD Analysis Beads© (Amersham Biosciences), siguiendo las instrucciones del manual de procedimientos (Anexo 3). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador I-Cicler (BIO-RAD), con una etapa de pre-calentamiento a 95° C durante 5 min. y el siguiente programa:

NO. DE CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
45	95° C	1 min.
	36° C	1 min.
	72° C	2 min.

Posteriormente, los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% a 160 volts durante 2 horas (Anexo 4). Se incluyó un marcador de peso molecular (100 pb).

5.4 ANÁLISIS DE DATOS

El análisis de los perfiles obtenidos se realizó visualmente y por medio del software Cross Checker (Buntjer, 2001) para la obtención de una matriz de presencia (1) ausencia (0), la cual sirvió de base para el cálculo de los coeficientes de similitud mediante la fórmula:

$$\text{Jaccard}_{xy} = \frac{a}{(a + b + c)}$$

(Jaccard, 1908)

donde:

X y y- genotipos que serán comparados

a- número de marcadores presentes en **X** y **y**

b- número de marcadores presentes en **X** y ausentes en **y**

c- número de marcadores presentes en **y** y ausentes en **X**

Los coeficientes calculados permitieron la construcción de una matriz triangular de similitud que se convirtió a distancias genéticas mediante la fórmula:

$$\text{Distancia genética} = 1 - \text{Jaccard}_{xy}$$

Los resultados representados en la matriz de distancias genéticas sirvieron de base para la construcción del dendrograma, mediante el software Phylip© (Phylogeny Inference Package) empleando el método UPGMA (Unweighted Pair Group Arithmetic Averages) (Sneath y Sokal, 1973). Este método se basa en un algoritmo que identifica la distancia mínima entre dos taxones, combinándolo sucesivamente con los valores de similitud cercanos para obtener la distancia promedio, el procedimiento se repite con el resto de los individuos hasta finalizar el con último par de taxones (Valadez y Kahl, 2000).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 COLECTA DEL MATERIAL VEGETAL

La exploración en el volcán de Tequila se ha restringido a la cara Norte debido a la facilidad de llegar en auto hasta las torres de "microondas," que se encuentran en la parte alta de ésta montaña (Patiño, 1994 ; Cházaro, 1995). En el presente estudio se visitaron regiones inexploradas (sur, este y oeste) y exploradas (norte) (Fig. 5).

Durante las colectas se registraron individuos con características morfológicas no típicas de *A. guadalajara* o *A. inaequidens*, únicas especies presentes en el área de acuerdo a Rodríguez y Cházaro (1987) y Cházaro (1995). Esto implicó la posible existencia de una tercera especie (etiquetada inicialmente como *A. maximiliana*) o un híbrido natural entre las especies mencionadas. Sin embargo, en la identificación taxonómica de laboratorio se confirmó su pertenencia a alguna de las dos especies de acuerdo a estudios detallados de las características fenotípicas.

La colecta del material vegetal se realizó en 4 zonas del Volcán (norte, sur, este y oeste) (Fig. 5), muestreando ocho poblaciones, de las cuales cinco pertenecen a *Agave guadalajarana* y el resto a *Agave inaequidens* (Tabla 8). Las determinaciones taxonómicas preliminares se realizaron en campo con la ayuda del M. C. Miguel Cházaro Basáñez y corroboradas en laboratorio de acuerdo a las descripciones de Gentry (1982) y McVaugh (1989).

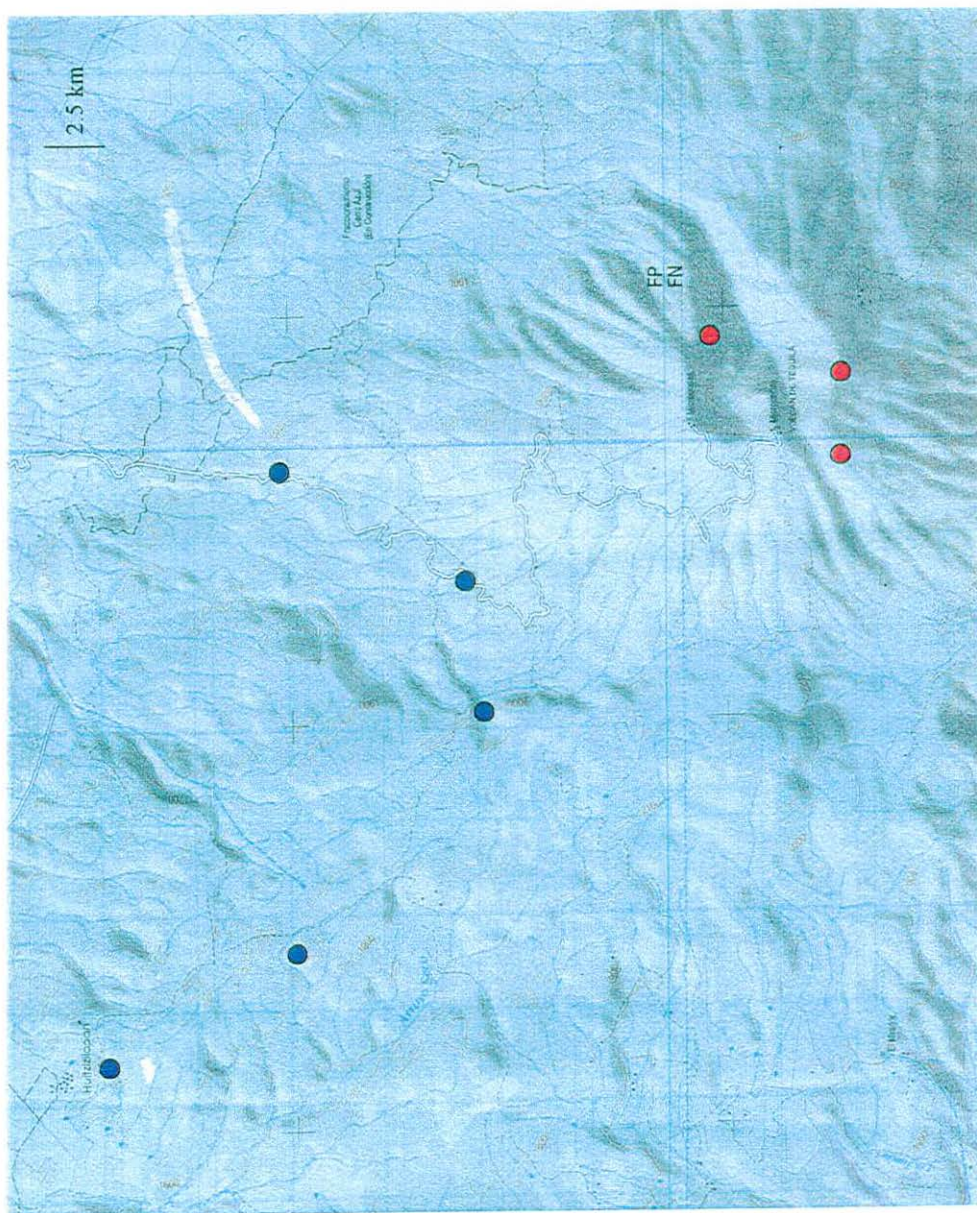


Fig. 5 Sitios de colecta en el volcán de Tequila de *A. guadalajarana* (azul) y *A. inaequidens* (rojo) (INEGI, 2002).

Tabla 8 Ubicación geográfica de las poblaciones de *Agave spp.* colectadas en el volcán de Tequila.

COORDENADAS	RANGO ALTITUDINAL	ESPECIE
20°50'722" LN 103°50'909" LW	1545- msnm	<i>Agave guadalajarana</i>
20°50'722" LN 103°50'901" LW	1554-1572 msnm	<i>A. guadalajarana</i>
20° 51'22" LN 103°54'75" LW	1619-1674 msnm	<i>A. guadalajarana</i>
20°51'13" LN 103°54'75" LW	1725-1761 msnm	<i>A. guadalajarana</i>
20°50'37" LN 103°53'92" LW	1920-2056 msnm	<i>A. guadalajarana</i>
20°46'793" LN 103°50'639" LW	2750-2900 msnm	<i>A. inaequidens</i>
20°47'166" LN 103°50'798" LW	2820-2854 msnm	<i>A. inaequidens</i>
20°47'757" LN 103°50'540" LW	2830-2870 msnm	<i>A. inaequidens</i>

Se observó que las poblaciones de *Agave guadalajarana* se encuentran alejadas entre si y el número de individuos es reducido, debido posiblemente a factores como la heterogeneidad en el tipo suelo. Granados (1993) señala que los agaves se desarrollan en suelos rocosos, someros y ricos en nutrientes (especialmente nitrógeno). En el presente estudio se observaron similitudes en el tipo de suelo donde se ubican las poblaciones más numerosas de *A. guadalajarana* (Fig. 6) por otra parte, se registraron algunos individuos aislados de tamaño pequeño en lugares rocosos y sombreados. *A. guadalajarana* no posee propagación por rizoma (hijuelos), lo que determina el bajo número de individuos dentro de las poblaciones. Reyes-Agüero *et al.* (2000) reportan que *A. lechuguilla* presenta un tipo de reproducción predominante asexual por hijuelos, esto facilita que las poblaciones de esta especie sean numerosas y densas.



Fig. 6. Población de *A. guadalajarana*, desarrollándose sobre un suelo cobrizo de consistencia arcillosa.

Contrariamente a *A. guadalajarana*, las poblaciones de *Agave inaequidens* son numerosas, la separación entre ellas es mínima y se desarrollan predominantemente hacia la parte este, sobre laderas con un ángulo de inclinación pronunciado (cráter del volcán) (Fig 7), donde los vientos fríos son constantes y ascienden desde las zonas bajas hacia la cima. En las laderas donde se desarrolla *A. inaequidens* el suelo es de origen volcánico, lo que favorece su establecimiento en esta zona y corresponde al tipo de hábitat señalado por Gentry (1982) para esta especie.



Fig. 7 Poblaciones de *Agave inaequidens* al interior del cráter del volcán.

6.2 EXTRACCIÓN DE ADN

En una etapa preliminar de este estudio se realizaron pruebas comparativas entre el kit de extracción de ADN Nucleon Phytopure© (Amersham Life Technologies) y el kit Gen Elute plant genomic© (SIGMA), obteniéndose calidades similares de ADN (Fig. 8)

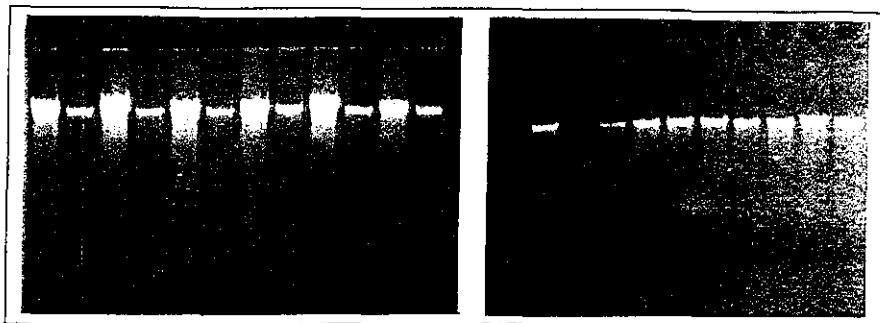


Fig. 8 Calidad del ADN (a) extraído con el protocolo descrito en el kit Gen elute (b) extraído con el protocolo descrito en el kit Nucleon Phytopure y evaluados por electroforesis en gel de agarosa.

En las sucesivas extracciones se optó por la utilización del Kit Gen Elute Plant Genomic© de SIGMA, debido a su fácil manejo y a que combina un complejo de Silica-base con un sistema de microcaptura con lo cual, se descarta la posibilidad de utilizar resina y compuestos orgánicos como fenol o cloroformo. Mediante el empleo de este kit se obtuvo una buena calidad de ADN y se evito el uso de ARNasa (Fig. 8).

6.3 MARCADORES RAPD´s

Los perfiles genéticos fueron desarrollados mediante el kit Ready-To Go RAPD Análisis Beads©, con cebadores de la serie 1-6 del mismo kit (Amersham Pharmacia Biotech.), que proporcionan una buena calidad en el patrón de bandeo y repetibilidad de los experimentos.

Se probaron seis cebadores, de los cuales se eligieron cuatro (1,2,3,5) que produjeron patrones de bandeo con mayor intensidad y polimorfismos (Fig. 9), estos generaron un total de 54 bandas de las cuales 45 (83%) fueron polimórficas entre las dos especies. El promedio de polimorfismos para cada cebador fue de 11, lo que muestra un número bajo de bandas polimórficas por cebador comparado con González (2001), que reporta 28 y 25 bandas polimórficas a partir de dos cebadores en cuatro especies de *Agave*. Por otra parte, Palacios y González-Candelas (1997), con el uso de un cebador obtuvieron 21 bandas polimórficas. El porcentaje de polimorfismos encontrado en el presente estudio se revela alto comparado con otras especies del género (Tabla 9).

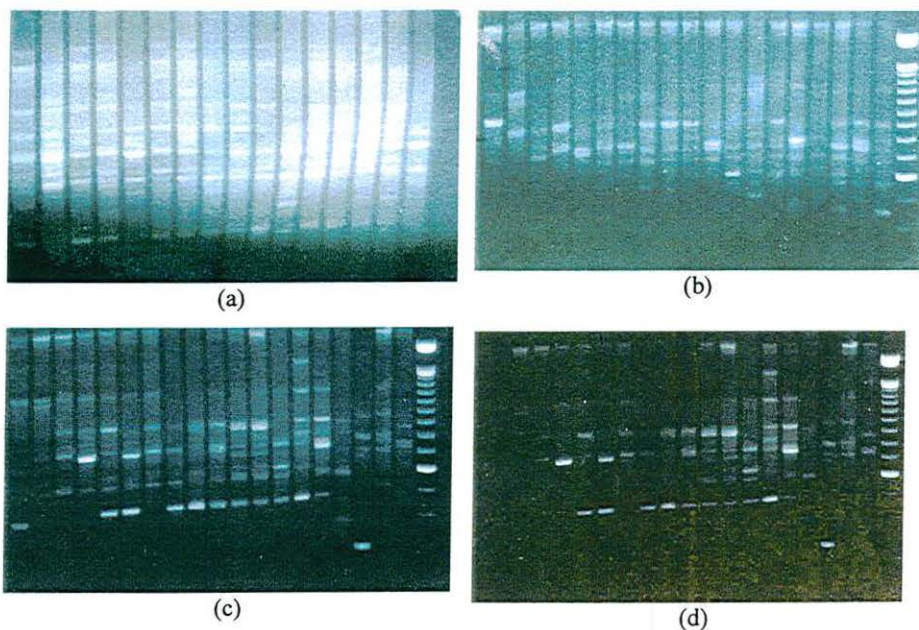


Fig. 9 Perfiles moleculares obtenidos con cebadores del kit Ready-To Go RAPD Análisis Beads: (a) cebador no. 1, (b) cebador no. 2, (c) cebador no. 3, (d) cebador no. 5.

Tabla 9. Porcentajes de polimorfismos reportados para especies del género *Agave*.

ESPECIE	PORCENTAJE DE POLIMORFISMOS INTRAESPECÍFICOS	REFERENCIA
<i>Agave subsimplex</i>	78.6%	Navarro, 1999
<i>A. cerulata</i>	77.6%	Navarro, 1999
<i>A. deserti</i>	71.7%,	González, 2001
<i>A. simplex</i>	60.3%,	González, 2001
<i>A. pringlei</i>	73.5%	González, 2001
<i>A. deserti</i>	68.2%	González, 2001
<i>A. inaequidens</i>	92%	Presente estudio
<i>A. guadalajarana</i>	90%	Presente estudio

Se encontraron patrones de bandeo específicos para *A. guadalajarana* y *A. inaequidens*, que clasifican a todos los genotipos colectados, lo que pone en evidencia que los genotipos estudiados efectivamente pertenecen a dos especies y no existen híbridos. Arnould *et al.* (1991) (citado por Hadrys *et al.*, 1992), a partir de cuatro marcadores moleculares RAPD's identificados en *Iris fulva* e *I. hexagona* encontraron poblaciones con individuos que presentaron frecuencias intermedias de esos marcadores, concluyendo que se trataba de híbridos naturales.

6.4 DISTANCIAS GENÉTICAS

Se han desarrollado múltiples métodos para la estimación de índices de similitud, tales como los coeficientes de Dice (1945), Nei & Li (1979) y Linch & Milligan (1994). En el presente trabajo, se selecciono el índice de similitud de Jaccard (1908) que asigna 1 al marcador presente y 0 a la ausencia del mismo. De acuerdo con Otero *et al.* (1997) el uso de coeficientes que omitan la consideración de datos negativos como Jaccard o Dice pueden ser los apropiados en el caso de altos porcentajes de polimorfismos o ante la presencia de datos nulos.

Las distancias genéticas calculadas presentan valores entre 0.11 (*inae 38* e *inae 39*) y 0.91 (*guada 19* e *inae f1*) con un promedio de 0.60 entre los 703 pares comparados (Tabla 5). Estos valores (0.11 a 0.91) corresponden a lo esperado en especies de *Agave* silvestre de acuerdo con Cuevas (2001) quien, utilizando marcadores AFLP's, reporta un rango de distancias genéticas de 0.41 a 0.61 con un promedio de 0.47 entre genotipos de *A. salmiana*, *A. potatorum*, *A. karwinskii* y *A. sisalana*.

En el caso particular de *A. guadalajarana*, las distancias varían de 0.20 (*guada 20* y *guada 23*) a 0.90 (*amaxim4* y *amaxim p5-1*) dando un promedio de 0.55 entre 190 pares comparados. De la misma forma, las distancias genéticas de *A. inaequidens* varían de 0.11 (*inae 38* y *39*) a 0.88 (*inae 25* y *29*) con una promedio de 0.62 entre 171 pares comparados. Colunga-García *et al.* (1999) y Eguiarte *et al.* (2000), mencionan que las poblaciones silvestres del género *Agave* presentan altos niveles de variación genética y diferenciación entre poblaciones, respecto a las especies cultivadas que presentan baja variabilidad debido a las prácticas de propagación vegetativa.

	A. guada 1	A. guada 2	A. guada x 3	A. maxim. x 4	A. maxim. x 5	A. maxim 6	A. maxim x 7	A. maxim x 8	A. maxim x 9	A. maxim x 10	sin ident. 11	A. guada 18	A. guada 19	A. guada 20	A. guada x 21	A. guada x 22	A. guada 23	A. guada x 24	A. inaequi 25	A. inaequi 26	A. inaequi 27	A. inaequi 28	A. inaequi 29	A. inaequi 30	A. inaequi 32	A. inaequi 33	A. inaequi 35	A. inaequi 36	A. inaequi 37	A. inaequi 38	A. inaequi 39	A. inaequi 40	A. inaequi 41	A. inaequi 42	A. inaequi 43	A. inaequi 44				
Agada1																																								
Agada2	061																																							
Agada3	057	046																																						
Anaem4	04	048	048																																					
Anaem5	065	048	046	063																																				
Anaem6	044	052	046	046	041																																			
Anaem7	065	042	033	035	048	042																																		
Anaem8	039	035	046	032	048	048	038																																	
Anaem9	0	065	063	036	059	041	053	065																																
Anaem10	05	057	042	046	052	042	044	046	031																															
sinidnt. 11	039	05	041	044	046	032	033	048	026	023																														
Agada18	065	067	059	067	066	057	039	061	044	055	05																													
Agada19	064	062	072	067	054	059	059	044	053	052	062	067																												
Agada20	053	052	046	052	048	046	048	05	041	026	024	054	052																											
Agada21	067	055	054	057	054	058	048	054	066	044	039	067	048	033																										
Agada22	057	052	054	059	046	046	046	044	041	03	026	061	052	039	046																									
Agada23	065	055	048	055	046	055	057	046	039	027	04	057	057	021	046	032																								
Agada24	071	073	065	048	075	075	069	073	036	036	064	052	079	065	079	062	062																							
Ainaqi25	076	054	07	062	064	073	063	054	053	062	064	071	059	014	064	056	033	064																						
Ainaqi26	071	06	073	057	069	065	059	067	067	063	059	008	061	055	055	036	036	079	065																					
Ainaqi27	077	066	069	07	068	068	063	072	067	074	067	061	072	068	068	067	066	073	071	074																				
Ainaqi28	072	066	065	069	065	067	066	066	065	063	066	066	075	067	066	066	064	077	075	043	025																			
Ainaqi29	0	076	074	082	075	073	079	081	074	076	081	079	083	078	077	082	076	088	079	059	064	046																		
Ainaqi30	081	072	075	077	018	08	076	069	079	078	076	067	08	073	076	0781	088	077	073	056	046	044	025																	
Ainaqi32	074	068	072	076	072	071	066	067	062	069	066	065	074	061	061	063	059	072	063	048	052	029	055	05																
Ainaqi33	075	072	077	066	077	079	067	057	081	073	075	074	083	076	076	075	075	081	072	064	067	046	057	05	041															
Ainaqi35	076	073	071	074	067	077	073	073	078	071	072	079	069	064	059	0767	069	073	077	063	067	071	036	066	057	056														
Ainaqi36	074	078	081	087	07	078	081	078	081	075	077	087	078	073	073	079	077	085	078	071	081	079	08	079	066	067	025													
Ainaqi37	081	067	074	074	074	077	073	069	078	063	088	078	073	06	065	036	066	081	069	061	07	055	038	052	055	046	059	028												
Ainaqi38	063	074	07	063	076	071	068	068	064	061	066	038	075	066	064	067	055	063	06	055	048	034	047	05	05	059	079	05												
Ainaqi39	072	071	073	066	079	071	07	067	07	067	069	066	081	07	071	025	067	072	071	083	038	052	052	041	036	046	038	073	055	012										
Ainaqi40	074	065	082	074	085	083	076	072	076	077	079	074	083	081	082	083	072	073	068	075	073	069	063	049	066	063	076	08	071	05	053									
Ainaqi41	065	084	079	077	086	084	076	076	065	049	075	063	091	071	083	075	063	065	076	074	07	076	078	066	049	073	079	081	069	025	062	052								
Ainaqi42	075	081	085	079	084	081	081	08	07	085	081	074	089	072	085	076	086	067	076	074	069	076	026	067	06	072	077	06	05	034	073	05	038							
Ainaqi44	026	08	075	066	087	081	081	08	075	074	08	074	091	077	083	08	071	064	071	083	076	073	079	067	071	062	081	086	067	061	063	057	048	065	057					
AgadaM	088	061	071	072	071	077	074	066	08	076	072	071	077	069	066	0	067	08	061	046	06	054	071	046	05	035	056	064	025	026	04	055	079	048	038	078				
Anaem251	081	079	088	09	078	089	085	085	067	085	085	082	071	076	076	086	076	088	079	075	079	072	076	079	062	077	059	07	07	073	076	069	073	076	075	079	077			

Tabla 10 Matriz de distancias genéticas

El dendrograma obtenido mediante la técnica UPGMA (Fig 10) muestra las relaciones genéticas entre los genotipos estudiados. Se observa un cluster que agrupa la mayoría de los genotipos de *A. inaequidens* y otro que incluye a los ejemplares de *A. guadalajarana*. Un tercer cluster está formado por *amaxp51*, *Ainae35*, *Ainae36* el cual puede ser resultado de problemas en la amplificación de los primers 1 y 3, que produce un sesgo que se manifiesta en la formación de este cluster; sin embargo, por los patrones electroforéticos y las descripciones fenotípicas de estas especies se consideran como *A. inaequidens* (*Ainae35* y *Ainae36*) y *A. guadalajarana* (*Amxp51*).

Los individuos caracterizados fenotípicamente como *A. inaequidens* (*Ainae25* y *Ainaef1*) se hayan cercanamente emparentados a genotipos de *A. guadalajarana* y de igual manera, genotipos de *A. guadalajarana* (*Amximx5* y *Aguadam1*) se agrupan cercanos a *A. inaequidens*. Estas transiciones pueden derivarse del muestreo insuficiente de las poblaciones que no permite definir patrones de diferenciación interpoblacional para corroborar el nivel de flujo genético (Slatkin, 1994).

Los intervalos de valores para distancias genéticas obtenidos en el presente estudio reflejan un alto índice de variación genética entre *A. inaequidens* y *A. guadalajarana* a este respecto González (2001) menciona que en la especie *A. deserti*, un alto índice de variación genética y una baja diferenciación entre poblaciones de la misma especie indican que se trata de poblaciones jóvenes y que mantienen un amplio flujo genético interpoblacional. Asimismo, Slatkin (1987) menciona que el flujo genético permite mantener la variación genética homogénea entre las poblaciones, promueve la dispersión de genes y recombinación genética en toda el área de distribución de la especie.

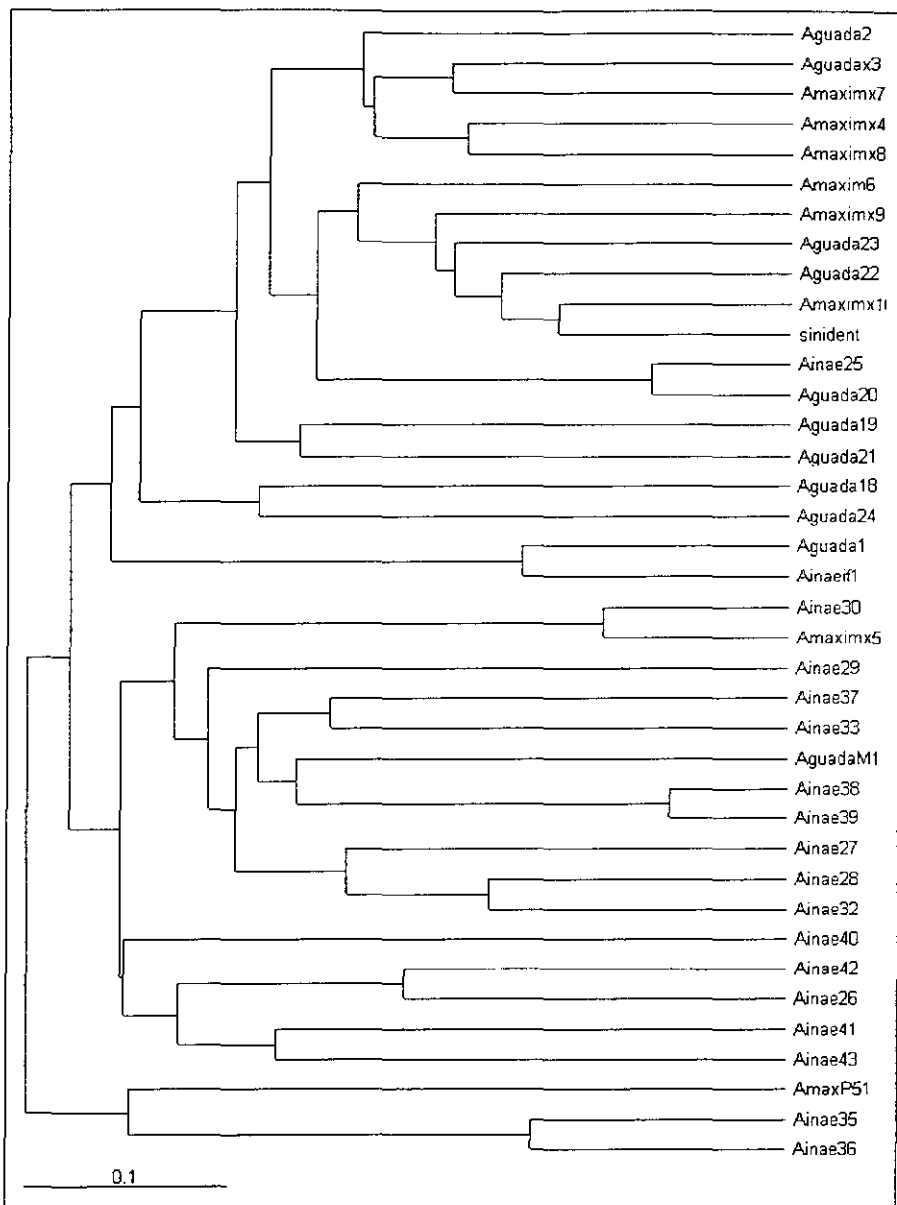


Fig. 10 Dendrograma de las especies de *Agave guadalajara* y *A. inaequidens*

7. CONCLUSIONES

- 1.- El kit de extracción Gen Elute plant genomic® de SIGMA es un método rápido y eficiente para la extracción y purificación de ADN de los genotipos de *Agave* estudiados.
- 2.- Las distancias genéticas entre *A. guadalajarana* y *A. inaequidens* corresponden a lo esperado en especies de *Agave* silvestre y de reproducción predominantemente sexual.
- 3.- Las colectas e identificaciones taxonómicas confirmaron la existencia de *Agave guadalajarana* y *A. inaequidens* como únicas especies de *Agave* silvestre que se desarrollan en el volcán de Tequila, Jalisco.
- 4.- Los marcadores RAPD's mostraron ser una herramienta aplicable a estudios de diversidad genética en especies de *Agave*.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez de Zayas A.** 1989. Distribución geográfica y posible origen de las Agavaceae. Revista del Jardín Botánico Nacional. Universidad de la Habana. 1:25-36.
- Aguirre R., J. R., H. Charcas S., J. L. Flores.** 2001. Identidad botánica del maguey mezcalero potosino. Consejo Potosino de Ciencia y Tecnología del Edo. De San Luis Potosí, México. 27-31 pp 87.
- Arreola N., H.** 1990. Inventario de las cactáceas de Jalisco y su distribución. Cactáceas y Suculentas Mexicanas. 35(1): 3-12
- Breyne P., D. Rombaut, A. Van Gysel, M. Van Montagu, T. Gerats.** 1999. AFLP analysis of genetic diversity within and between *Arabidopsis thaliana* ecotypes. Molecular Gen Genetic. 261: 627-634.
- Buntjer J.,** 2001. Crosschecker Fingerprint Analysis software, Wageninge University and Research Center, The Netherland.
- Caetano-Anollés G., P., M. Gresshoff.** 1997. DNA markers Protocols, Applications and Overviews. Wiley-Liss. New York 364 pp.
- Caicedo A. L., E. Gaitán, M. C. Duque, O. Toro Chica, D. G. Debouck, J. Tohme.** 1999. AFLP Fingerprinting of *Phaseolus lunatus* L. and Related Wild Species from South America, Crop Science. 39: 1497-1507.
- Carrillo-Reyes, R. Vega A., Ramírez-Delgadillo R.** 2003. *Agave rzedowskiana*, a new specie in subgenus *Littaea* (Agavaceae) from western México. Brittonia 55(2), 237-241 pp.
- Castorena I. S., R. M. Escobedo y A. Quiroz.** (1991). New cytotaxonomical determinants recognized in six taxa of *Agave* in the sections *Rigidae* and *Sisilanae*. Canadian Journal Botany: 1257-1264
- Cházaro B., M.** 1995. El Volcán de Tequila: un bosquejo botánico. En: Cházaro B., E. Lomelí M., R. Acevedo R., S. Ellerbracke R., (comps.) Antología Botánica del Estado de Jalisco. Univ. De Guadalajara. 59-61.
- Cházaro B., M. Y E., Lomelí M.** 1995. Las Agaváceas del Estado de Jalisco. En: Cházaro B., E. Lomelí M., R. Acevedo R., S. Ellerbracke R., (comps.) Antología Botánica del estado de Jalisco. Universidad de Guadalajara Jalisco, México. 87-90

Cházaro B., M. & B. L. Mostul. 2002. *Agave guadalajarana* Trel. (Agavaceae). En: Cházaro B. E. Lomeli M., M. Flores H., S. Ellerbracke R. Antología Botánica del Occidente de México. Universidad de Guadalajara Jalisco, México. 38-39

Colunga-García M. P., J. Coello-Coello, L. E. Eguiarte, D. Piñero. 1999. Isozymatic variation and phylogenetic relationships between henequen (*Agave fourcroydes*) and this wild ancestor *A. angustifolia* (Agavaceae). American Journal of Botany. 86(1): 115-123.

Cronquist, A., 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York.

Cuevas F., X. M. 2001. Análisis de la diversidad genética entre especies y variedades del género *Agave* basado en marcadores AFLP. Tesis de maestría. Universidad de Guadalajara. 70 pp.

Cuisset P. C., Boursiquot J. M. 1997. Development of stable RAPD markers for identification of grapevine rootscks and the analysis of genetic relationships. American Journal of enology and viticulture. 48 (4): 492-501.

Dice L., R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology 26:297-302.

Eguiarte L. E., V. Souza, A. Silva-Montellano. 2000. Evolución de la Familia Agavaceae: Filogenia, Biología reproductiva y Genética de poblaciones. Boletín de la Sociedad Botánica de México 66:131-150.

Fischer M., R. Husi., D. Prati., M. Peintinger., M. Van-Kleunen y B. Schmid. 2000. RAPD variation among and within small and large populations of the rare clonal plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae). American Journal of Botany 87 :1128-1137.

Furman B. J., D. Grattapaglia, W. S. Devorak, D. M. O'Malley. 1997. Analysis of genetic relationships of central American and Mexican pines using RAPD markers that distinguish species. Molecular Ecology 6:321-331

Galvan V. R. Y L. I. Zamora M. 1995. Registro de *Agave inaequidens* C. Koch (Agavaceae) en el estado de Hidalgo. Cactáceas y Suculentas Mexicanas.66-68 pp.

García-Mendoza y Galvan R. 1995. Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. Boletín de la Sociedad Botánica de México 56: 7-24.

García-Mendoza A. 2002. Distribution of *Agave* (Agavaceae) in México. Cactus and Succulent Journal 74:177-187.

Garnick B., E. 1944. A karyosystematic study of the genus *Agave*. American Journal of Botany 31:283-298.

Gentry H., S. 1982. Agaves of continental North America. Univ. of Arizona Press. Tucson, 670 pp.

Gentry H., S. 1985. "On the taxonomy of the Genus *Agave*", en: C. Cruz, L. del Castillo, M. Robert, y R. N. Ordoza (eds), *Biología y aprovechamiento integral del henequén y otros agaves*, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. Mérida, Yucatán.

Gil-Vega K., M. G. Chavira, O. Martínez, J. Simpson and G. Vandemark. 2001 Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. azul using RAPD markers. *Euphyca* 119: 335-341.

González C., R. 2001. Análisis de la variación genética de *Agave deserti* en el desierto sonorense por medio de marcadores moleculares (RAPD's) tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. 69 pp.

Granados S. D., 1993. Los Agaves en México, Universidad Autónoma de Chapingo, México, 252 pp.

Hadrys H., M. Balick, B. Schierwater. 1992. Applications of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*. 4:55-63.

Hongtrakul V., G. M. Huestis, S. J. Knapp, 1997. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sonflower germplasm: genetic diversity among inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics*. 95: 400-407.

Irish M., G. Irish. 2000. Agaves, Yuccas and related plants, a gardener's guide. Timber Press Portland Oregon. 312pp.

Jaccard P. 1908. Nouvelles recherches pour la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudense des Sciences Naturelles*. 44:223-270.

Karp A., K. J. Edwards. 1997. DNA markers: a global overview in DNA markers Protocols, Applications and Overviews. in: Caetano-Anollés G., P., M. Gresshoff (comps.). *DNA markers Protocols, Applications and Overviews* Wiley-Liss. New York 1-13.

Liu Z., G. R. Furnier. 1993. Comparison of allozyme, RFLP and RAPD markers for revealing genetic variation within and between aspen and bigtooth aspen. *Theoretical and Applied Genetics*. 87:97-105.

Lynch M., G. Milligan B. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3:91-99.

Mc Vaugh, R. 1989. Flora Novo-Galiciana (Bromeliaceae to Dioscoreaceae). University of Michigan Herbarium . Press. Ann. Arb. Vol. 15. pp. 398.

Matínez-Palacios A., L. E. Eguiarte y G. R. Furnier 1999. Genetic Diversity of the endangered endemic *Agave victoria reginae* (Agavaceae) en the Chihuahuan desert. American Journal of Botany 86: 1093-1098.

Montero V. T., M. L. Hernández, J.L. Morales G., H. S. Azpiroz R. 1998. Estimación de la variabilidad genética intrapoblacional mediante el uso de fragmentos de ADN amplificados al azar. Memorias del XVII Congreso de Fitogenética, Acapulco Gro.348p.

Navarro Q., A. R. 1999. Estructura genética y procesos de especiación de *Agave cerulata* (Trel.) y *Agave subsimplex* (Trel.) en el desierto sonorense a partir de RAPD's, Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. 96 pp.

Nair N. V., Nair S., Sreenivasan T. V., Mohan M. 1999. Analysis of genetic diversity and phylogeny in *Saccharum* and related using RAPD markers. Genetic Resources and Crop Evolution 46(1):73-79

Nei M., H. Li W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 76:5262-5273.

Nobel S., P. 1998: Los incomparables Agaves y Cactus. Edit. Trillas, México D.F. 199 pp.

Otero A., M. De la Cruz y K. Oyama. 1997. El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 60: 85-117.

Palacios C., F. González-Candelas. 1997. Lack of genetic variability in the rare and endangered *Limonium cavanillesii* (Plumbaginaceae) using RAPD markers. Molecular Ecology 6:671-675.

Patiño R., R. 1994: Estudio taxonómico de los muerdagos (Loranthaceae) del volcán de Tequila, Jalisco México. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara. 60 pp.

Rafalski J. A., 1997 Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. In: Caetano-Anollés G., P., M. Gresshoff (comps.) DNA markers Protocols, Applications and Overviews. Wiley-Liss. New York 75-83.

Ramírez J. 1995. Los magueyes, plantas de infinitos usos. Boletín bimestral de la Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad (CONABIO) 1:1-7

Reyes-Agüero J. A., J. R. Aguirre-Rivera, C. B. Peña-Valdivia. 2000. Biología y aprovechamiento de *Agave lechuguilla* Torrey. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 67:75-88.

Reyna B., O. F. 1990: Cactáceas y Agavaceas de las barrancas aledañas a Guadalajara Jalisco. Cactáceas y Suculentas Mexicanas 25:35-42.

Rodríguez C., A. M. Cházaro, B. 1987: Guía de la excursión Botánica al Volcán de Tequila *in* Guías de Excursiones Botánicas en México VIII. X Congreso Mexicano de Botánica. Universidad de Guadalajara. 76-100.

Rodríguez H., A. M. 2002: Utilización de marcadores AFLP para la caracterización molecular de variedades de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) cultivadas en México. Tesis de Maestría Universidad de Guadalajara. 62 pp.

Sharma, A. K. and C. V. Battachayya. 1962. A cytological study of the factors influencing evolution in *agave*, La Cellule 62: 259-279.

Skroch W.P., J. Nienhuis. 1995. Qualitative and quantitative characterization of RAPD variation among snap bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes. Theoretical and Applied Genetics. 91:1078-1085.

Slatkin M., 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science 263:787-792.

Slatkin M., 1994. Gene flow and population structure. Real. (L.) Ecological Genetics. Princenton University press. 3-17p.

Sneath P.H.A., R.R. Sokal. 1973. Numerical Taxonomy. W.H. Freeman and Co. San Francisco.

Valadez M. E., G., Kahl 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas: Teoría y protocolos de laboratorio. Mundi-Prensa, México. 147 pp.

Vigueras Guzmán, A. L., 1993, Inventario preliminar de los agaves en Jalisco y algunos datos sobre su distribución, Boletín Nakari, IV(3):49-54.

Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A. y Tingey S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18:6531-5535.

9 ANEXOS

ANEXO 1

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN

(Kit de extracción y purificación Gen elute de SIGMA)

1. Macerar las muestras de tejido foliar con nitrógeno líquido en morteros estériles hasta reducirlas a polvo.
2. Transferir 0.1 g a tubos de 2 ml.
3. Adicionar las soluciones de lisis: 350 μ l [parte A] y 50 μ l [parte B]. Homogeneizar la muestra en el vortex e incubar a 65° C por 10 minutos con inversiones ocasionales.
4. Adicionar 130 μ l de la solución de precipitación y mantener la muestra en hielo durante 5 minutos.
5. Centrifugar a máxima velocidad (13,200 rpm) de 10 a 15 min.
6. Transferir el sobrenadante a una columna de filtración (color azul) previamente insertada en un tubo de 2 ml. Centrifugar a máxima velocidad de 1 a 1.5 min.
7. Desechar la columna de filtración y adicionar 700 μ l de la "solución acopladora" (Binding solution) y mezclar ligeramente en el vortex.
8. Insertar en un nuevo tubo de 2 ml. la columna adherente (color rojo), pipetear sobre esta 500 μ l de la solución de preparación de la columna y centrifugar a 11,000 rpm por 1 minuto. Desechar la solución de preparación después de la centrifugación.
9. Adicionar 600 μ l de la mezcla obtenida en el paso 7 sobre la columna adherente y centrifugar a máxima velocidad por 1 min.
10. Desechar el líquido, regresar la columna adherente al tubo y pipetear la solución remanente del paso 7. Centrifugar a máxima velocidad por 1 min.
11. Colocar la columna adherente en un nuevo tubo de 2 ml. y agregar 500 μ l de la solución de lavado. Centrifugar a máxima velocidad por 1 min. Desechar el líquido.

12. Adicionar nuevamente 500 μ l de la solución de lavado a la columna adherente y centrifugar a máxima velocidad durante 3 min.
13. Transferir la columna adherente a un nuevo tubo de 2 ml.
14. Adicionar 100 μ l de la solución de elusión y centrifugar a máxima velocidad (primera elusión)
15. Transferir la columna adherente a un tubo de 1.5 ml y adicionar nuevamente 100 μ l de la solución de elusión (segunda elusión).
16. Desechar la columna. Mantener las eluciones a -20° C.

ANEXO 2

PROTOCOLO PARA LA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE ADN

1. Pesar 1 gr. de agarosa y disolverla en 100 ml de solución amortiguadora TAE 1x, utilizando calor, una vez disuelto adicionar 2 μ l de bromuro de etidio.
2. Vaciar a la charola del gel y dejar gelificar.
3. Llenar la cámara de electroforesis con solución amortiguadora TAE 1x y adicionar 4 μ l de Bromuro de Etidio.
4. Mezclar 10 μ l de ADN con 2 μ l de solución amortiguadora (colorante) y depositarlos en el gel de agarosa para su migración.
5. Migrar a 100 voltios durante 45 minutos.
6. Observar el gel a través de un transiluminador UV y tomar la impresión fotográfica.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Solución amortiguadora de migración: TAE 10X

TRIS	40 mM	4.89 g
EDTA	1 mM	0.38 g
Ácido Acético	20 mM	1.14 ml
Aforar a 1 L. pH 8		

Solución amortiguadora para depósito (colorante):

Azul de xilencianol	0.25%	0.025 g
Azul de bromofenol	0.25%	0.025 g
Glicerol	30%	3 ml
		Aforar a 10 ml

ANEXO 3

PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN DE MARCADORES RAPD

(kit Ready To Go RAPD Analysis Beads®, Amersham Biosciences)

1. Adicionar en un tubo de 0.2 ml lo siguiente:
 - 5 µl de primer (previamente resuspendido)
 - 2 µl de ADN [Primera elusión en 100 µl]
 - 18 µl de agua ultrapura
2. Homogeneizar la mezcla evitando la formación de burbujas
3. Colocar las muestras en el termociclador y programar:
 - 1 ciclo de 95° C durante 5 minutos
 - 45 ciclos a 95° C durante 1 minuto
 - 36° C durante 1 minuto
 - 72° C durante 2 minutos

Contenido de la perla (en un volumen de reacción de 25 µl) :

ADN polimerasa	Amplitaq®
dNTPs	0.4 mM
BSA	2.5 µl
Buffer	2mM (MgCl ₂), 30 mM (KCl), 10 mM (Tris), pH 8.3

ANEXO 4

PROTOCOLO PARA LA MIGRACIÓN DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

1. Pesar 2 grs. de agarosa y disolverla en 100 ml de TAE al 1x utilizando calor, una vez disuelto, adicionar .4 μ l de bromuro de etidio.
2. Vaciar a la charola del gel y dejar gelificar.
3. Llenar la cámara de electroforesis con solución amortiguadora TAE 1x y adicionar 4 μ l de bromuro de etidio.
4. Mezclar 10 μ l de la muestra con 2 μ l de solución amortiguadora para depósito (colorante) y depositarlos en el gel de agarosa para su migración.
5. Migrar a 160 voltios durante 2 horas.
6. observar el gel a través de un transiluminador UV y tomar la impresión fotográfica.