

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
COORDINACIÓN DE POSGRADO**



VARIABILIDAD INTRAESPECÍFICA EN *Agave tequilana* Weber var. Azul DETECTADA CON CARACTERES MORFOLÓGICOS Y MOLECULARES

SALVADOR ANTONIO HURTADO DE LA PEÑA

T E S I S

**Presentada como requisito parcial para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Agrícolas y Forestales**

ZAPOPAN, JALISCO. 31 DE JULIO DEL 2008

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
COORDINACIÓN DE POSGRADO



La tesis "**Variabilidad intraespecífica en *Agave tequilana* Weber var. *Azul* detectada con caracteres morfológicos y moleculares**" del M. en C. Salvador Antonio Hurtado de la Peña, se realizó bajo la dirección del Consejo Particular que se indica, fue aprobada por el mismo y se aceptó como requisito parcial para la obtención del grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGRÍCOLAS Y FORESTALES

Consejo Particular

Tutor: _____

Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba

Asesor: _____

Dr. José de Jesús Sánchez González

Asesor: _____

Dr. José Ron Palma

Asesor: _____

Dr. Gil Virgen Calleros

Asesor: _____

Dr. Eduardo Rodríguez Guzmán

Las Agujas, Zapopan, Jal., Julio de 2008

DEDICATORIAS

A Tere

A mis Hijos

A mis Hermanos y Sobrinos

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guadalajara

Al Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Al Sistema Nacional de Recursos Fitogenéticos (SINAREFI)

Al Consejo Regulador del Tequila (CRT)

Al Dr Fernando Santacruz Ruvalcaba

Al Dr José de Jesús Sánchez González

Al Dr José Ron Parra

Al Dr Gil Virgen Calleros

Al Dr Eduardo Rodríguez Guzmán

Al Dr Rogelio Lépiz Ildfonso

A MC Martha Isabel Torres Morán

Al Dr Salvador de la Paz Gutiérrez

MC Ismael Vicente Ramírez

MC Javier García Galindo

A la Ing. Ana Paulina Velasco

A todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron en la realización de este trabajo.

RESUMEN

El objeto de este trabajo fue establecer una metodología para detectar la presencia de variabilidad genética de 5 especies de *Agave* y las relaciones fenotípicas entre clones de *Agave tequilana* Weber var. Azul colectados en 40 localidades del estado de Jalisco. Se realizó análisis morfológico y molecular seleccionándose 100 individuos de *A. tequilana* de 14 localidades ubicadas dentro de la zona de denominación de origen. Como grupo de comparación, se utilizaron cuatro individuos de las especies *A. americana*, *A. maximiliana*, *A. salmiana*, y *A. angustifolia*. Entre las relaciones más cercanas con base en caracteres morfológicos destacaron las de *A. tequilana* y *A. angustifolia*, mientras que *A. maximiliana* se separa del resto de especies debido a sus características distintivas de altura de planta, número de hojas y número de espinas en diez cm. Los resultados obtenidos revelan una relación cercana entre plantas de *Agave tequilana* Weber var. Azul de diferentes regiones; lo que indicó el movimiento intenso de germoplasma en Jalisco a partir de ciertos orígenes comunes. Se utilizó un marcador ISTRs, los datos generados por el son consistentes y apropiados para la detección de diferencias a nivel molecular entre colectas de cinco especies de agave. El marcador molecular utilizado es capaz de detectar diferencias intra e interespecíficas, característica que lo valida como herramienta de caracterización y determinación de diferencias a nivel molecular en *Agave*. El análisis de agrupamiento se constituye como un auxiliar indispensable en trabajos de caracterización entre y dentro de especies de *Agave*. La caracterización morfológica y el uso de marcadores moleculares al determinar diferencias o interrelaciones se constituyen como herramientas auxiliares de valor en los programas de mejoramiento genético de *Agave tequilana* Weber var. Azul. La propuesta metodológica para el Mejoramiento Genético para *Agave tequilana* Weber var. Azul se basó en la selección de plantas madres e hijuelos por: vigor, adaptabilidad, resistencia a enfermedades y plagas insectiles; para luego incrementar hijuelos, evaluar las líneas clonales y por último la liberación de materiales.

ÍNDICE

RESUMEN	<i>i</i>
ÍNDICE	<i>ii</i>
LISTA DE FIGURAS	<i>iii</i>
LISTA DE CUADROS	<i>iv</i>
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivo general	3
1.1.1 Objetivos particulares	3
1.2 Hipótesis	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1 <i>Agave tequilana</i> Weber var. Azul	5
2.1.1 Descripción Botánica	5
2.2 Reproducción de <i>Agave tequilana</i> Weber Var. Azul	6
2.3 Clasificación taxonómica de <i>Agave tequilana</i> Weber var. Azul.	7
2.4 Variabilidad	7
2.5 Análisis de la diversidad	8
2.6 Caracterización morfológica	9
2.7 Caracterización molecular	10
2.8 Selección clonal	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 Colecta y manejo del material vegetal	15
3.2 Análisis morfológico	16
3.3 Análisis molecular	20
3.4 Protocolo de extracción de DNA en agavaceas	22
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1 Análisis morfológico	25
4.1.1 Diversidad entre especies	25
4.1.2 Variabilidad dentro de especies	29
4.2 Análisis molecular	31
4.3 Propuesta de metodología de mejoramiento genético para <i>Agave tequilana</i> Weber var. Azul	33
4.3.1 Selección de plantas madres	34
4.3.2 Obtención de datos	34
4.3.3 Selección de hijuelos	35
4.3.4 Plantación de hijuelos	35
4.3.5 Selección preliminar de plantas	35
4.3.6 Incremento <i>in vitro</i> de hijuelos de plantas seleccionadas	35
4.3.7 Adaptación de clones (SC) (Invernadero)	35
4.3.8 Pruebas fitopatológicas en los hijuelos	36
4.3.9 Evaluación de las líneas clonales	36
4.3.10 Incremento de clones <i>in vitro</i> (SC)	36
4.3.11 Liberación de materiales	36
V. CONCLUSIONES	37
5.1 Caracterización morfológica	37
5.2 Caracterización molecular	37
5.3 Mejoramiento genético	38
VI. BIBLIOGRAFIA	39

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Lugares de procedencia de los materiales de *A. tequilana* Weber var. Azul. 17
- Figura 2.** Análisis de componentes principales en cinco especies de *Agave*. **1:** *A. tequilana*, **2:** *A. salmiana*, **3:** *A. maximiliana*, **4:** *A. americana*, **5:** *A. angustifolia*, **C1:** Componente Principal 1, **C2:** Componente Principal 2, **AH:** Altura de hoja, **DT:** Diámetro del tallo, **NH:** Número de hojas, **AP:** Altura de planta, **LH:** Largo de hoja, **NE:** Número de espinas. 26
- Figura 3.** Agrupamiento de cinco especies de *Agave*. **G1:** Grupo 1, **G2:** Grupo 2, **SA:** Subgrupo A, **SB:** Subgrupo B, **SC:** Subgrupo C. 28
- Figura 4.** Dendrograma generado con la matriz desarrollada con la combinación F1/B6 de iniciadores de ISTR para 100 individuos de *A. tequilana* y grupos control de las especies *A. maximiliana*, *A. angustifolia*, *A. salmiana* y *A. americana*. 32

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación y procedencia de los materiales utilizados	18
Cuadro 2. Descripción de los materiales utilizados.	21
Cuadro 3. Vectores característicos (C) para especies de agave.	25
Cuadro 4. Estimaciones de varianzas mediante prueba de Bartlett de 6 variables en función de 5 especies de <i>Agave</i> .	30
Cuadro 5. Coeficientes de variación de 6 características en 5 especies de <i>Agave</i> .	30
Cuadro 6. Grupos formados en el análisis de agrupamiento UPGMA y localidades representadas en cada grupo de individuos.	33

I. INTRODUCCIÓN

Los recursos fitogenéticos juegan un papel de gran importancia en la agricultura y la alimentación desde los siguientes puntos de vista: la variabilidad genética es la base del desarrollo de variedades mejoradas que podrían asegurar cantidades estables y suficientes de alimentos y otros satisfactores; son fuentes de nuevas opciones de cultivos y de resistencia a factores adversos; ayudan a resolver problemas de rehabilitación de ecosistemas degradados con base en la selección o reintroducción de especies apropiadas; en ocasiones son la opción segura para ampliar la frontera agrícola; son un elemento estratégico en tratados de intercambio entre países; son un legado de seguridad para las generaciones futuras (Sánchez 2005).

Mesoamérica es una de las tres áreas de origen y diversidad de plantas cultivadas de mayor importancia en el mundo. En el caso de los agaves es aquí donde se observa la mayor riqueza en diversidad genética (Gentry 1982). El maguey sorprendió a los conquistadores españoles que llegaron a la nueva España ya que descubrieron una bebida fermentada llamada pulque que era producida por los náhuatl. Estos utilizaban el pulque en ceremonias religiosas y para propósitos medicinales (Mohr 1999). Los españoles traían consigo el conocimiento del proceso de destilación (que adquirieron de los moros) comprobaron que de varias especies del género *Agave* era posible producir una bebida alcohólica y transparente denominada mezcal, posteriormente encontraron que el *Agave tequilana* Weber var. Azul era el mejor maguey para elaborar el tequila (Pimienta *et al.* 2006).

El agave azul se ha utilizado en México, principalmente para la obtención de tequila, en la década de 1990 el *Agave tequilana* Weber var. Azul se convirtió en un cultivo importante en el estado de Jalisco, debido, en gran parte, a la creciente demanda del "tequila", vislumbrándose la posibilidad de uso en el campo industrial, para la obtención de inulina, así como para la elaboración de mieles.

En el año de 1997, se inició una etapa expansiva de la industria tequilera mexicana, debido al aumento acelerado en la demanda de esta bebida alcohólica, única en el mundo. Actualmente, se tienen registros del establecimiento de alrededor de 300 millones de plantas en 162 municipios de

los 180 incluidos en la Zona de Denominación de Origen (Pimienta *et al.* 2006), equivalentes aproximadamente a 100,000 hectáreas de agave (*Agave tequilana* Weber var. Azul), distribuidas principalmente de la siguiente forma: 84% en Jalisco, 8% en Nayarit, 5% en Michoacán y 1% en Guanajuato. En el Estado de Jalisco las principales zonas productoras se localizan en los municipios de; Tequila, Amatitán, Tepatitlán de Morelos, Atotonilco el Alto y Arandas, en donde se cuenta aproximadamente con 100 millones de plantas (Pimienta *et al.* 2006).

Hasta hace algunos años, las plantaciones de agave tequilero se realizaban con tecnologías tradicionales, buscando dar ocupación a terrenos con ciertos problemas como; baja fertilidad, pedregosidad y laderas pronunciadas. Las plagas no se consideraban peligrosas, así como la presencia de enfermedades, que prácticamente pasaban desapercibidas, es posible señalar una serie grande de características muy propias del antiguo sistema de cultivo del mezcal tequilero.

La planta, hijuelo o semilla se trataba de homogeneizar para su plantación, es decir, se utilizaban hijuelos de la misma medida (una o media vara), sin embargo; las plantas maduraban a partir de los seis años y terminaban a los 14 años, hecho que actualmente se manifiesta, desde luego que esta característica le resta eficiencia al sistema agrícola, ya que la parte proporcional del terreno deja de producir.

Desde el punto de vista técnico actualmente se presentan los siguientes problemas en el cultivo de *agave*:

- a). Ciclo vegetativo variable de 6 a 14 años.
- b). Falta de variedades certificadas; uniformes, productivas, con resistencia genética a las principales enfermedades y algunas otras características agronómicas importantes.

La variabilidad genética de *A. tequilana* Weber var. Azul se ha cuestionado debido a que es un cultivo que se propaga principalmente por vía asexual, utilizando los hijuelos de rizoma que la misma planta produce. De acuerdo con Arizaga (2008), aún los métodos biotecnológicos como la micropropagación, que se realizan para establecer hoy en día las plantaciones de las zonas catalogadas como denominaciones de origen, solo se dedican a producir miles de plantas teniendo como base un solo código genético, lo que produce plantaciones muy homogéneas que realmente representan un mismo

individuo genético pero reproducido cientos o miles de veces. Sin embargo, se ha reportado variabilidad en *A. tequilana* y en otras plantas del género *Agave*, a pesar de que se propague en forma asexual (Torres- Morán 2005; Torres-Morán *et al.* 2007).

Los métodos moleculares para la detección de dicha variabilidad han demostrado su utilidad en especies como las del género *Agave*, con largos ciclos de vida que presentan características semélparas (plantas que mueren una vez concluidos sus periodos de floración). Estas técnicas representan una herramienta valiosa para documentar la existencia de variabilidad genética, evaluarla y posteriormente implementar trabajos de mejoramiento genético que contribuyan a la conservación del recurso y al mejoramiento de la cadena productiva agave-tequila (Torres-Morán 2005; Torres-Morán *et al.* 2007). En la búsqueda de las similitudes y diversidad entre colectas, se han usado también técnicas de análisis multivariado, aplicadas a caracteres morfológicos (Goodman y Bird 1977; Cervantes *et al.* 1978; Sánchez y Goodman 1992).

1.1 Objetivo general

Estimar las relaciones fenotípicas entre cinco especies de agave colectadas en Jalisco, con base en caracteres morfológicos y marcadores moleculares que confirmen la presencia de variabilidad genética.

1.1.1 Objetivos particulares

1.1.1.1 Conocer las relaciones fenotípicas entre clones de *A. tequilana* Weber var. Azul colectados en 40 localidades del estado de Jalisco.

1.1.1.2 Evaluar la variabilidad existente entre cinco especies del género *Agave* empleando técnicas morfológicas y moleculares.

1.1.1.3 Generar un sistema de mejoramiento genético para el *Agave tequilana* Weber que permita, con la combinación de métodos tradicionales y técnicas biotecnológicas, formar una serie de variedades mejoradas alternativas.

1.2 Hipótesis

Utilizando los análisis morfológico y molecular, así como la herramienta del análisis multivariado es posible detectar la variabilidad existente en cinco especies de agave.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 *Agave tequilana* Weber var. Azul.

2.1.1 Descripción Botánica

El agave tequilero pertenece a la familia de las Agavaceae dicha familia es endémica de América, encontrándose en el sur de Canadá, México, Centroamérica, Norte de Sudamérica e Islas del Caribe (Valenzuela 1997). Gentry (1982), describe botánicamente esta planta de la siguiente forma: es una planta surculosa que se extiende radialmente, de 2.2 a 2.8 m de altura (incluyendo la inflorescencia). Su tallo es grueso y corto, de 30 a 50 cm de altura al madurar. Hojas lanceoladas, acuminadas y de fibras firmes rígidamente estiradas, cóncavas, de 90 a 120 cm, de color glauco de azulado a verde grisáceo. El margen de las hojas es de recto a ondulado o repando; los dientes son de tamaño regular, espaciados, de color café claro a oscuro, sus ápices son delgados, curvos o flexos con base piramidal. La espina generalmente es corta de uno a dos centímetros de largo, su base es ancha café obscura. La inflorescencia (hermafrodita) es una panícula densamente ramosa a lo largo de 20 a 25 umbelas de flores verdes y estambres rosados. Las flores son de 68 a 75 mm de largo con bractéolas sobre los pedicelos. Ovario cilíndrico con cuello corto, casi terminado en punta sobre la base de 32 a 38 mm de largo. Tubo floral de 10 mm. de ancho. Pétalos desiguales lineares erectos pero rápidamente flojos en la anthesis de 25 a 28 mm Los filamentos miden de 45 a 50 mm de largo doblados hacia adentro junto al pistilo, insertos cerca de la base del tubo de cinco a siete mm; las anteras son de 25 mm de largo. El fruto es una cápsula ovada a ligeramente cuspidada.

Gutiérrez (2002) indica que los agaves son monocárpicos, semélparos, esto es, que solo tienen una floración al cabo de la cual la planta muere. Aún cuando exista alta producción de semilla en la reproducción sexual, debido a su gran depredación y también a que las condiciones de germinación no son siempre muy adecuadas.

Como su nombre lo indica, el agave azul tiene una pigmentación azul; la piña o mezote es esférica y llega a pesar hasta 120 kg el índice de azúcar alcanza los 44 °Brix.

2.2 Reproducción de *Agave tequilana* Weber Var. Azul

La reproducción de la especie es principalmente asexual, existen dos vías naturales, una es por hijuelos o rizomas y por bulbillos (pequeños hijuelos) de la inflorescencia o quiote. Comúnmente se usan los hijuelos de rizoma para establecer nuevas plantaciones. Esta ha sido la única forma de propagación que se ha practicado por mucho tiempo (200 años o más). La ventaja de esta forma de propagación es la rapidez con que se obtienen plántulas de buen tamaño y la cantidad de estas producidas por planta (Gil-Vega 1997). Valenzuela (1997) reporta que de acuerdo a los agricultores, el tiempo transcurrido desde la emergencia del hijuelo hasta su tamaño para plantación comercial puede ser 2 años.

Los bulbillos brotan de yemas de crecimiento cercanas a los botones florales que caen al no ser fecundados. Para la propagación del material vegetativo en campo no se utilizan los bulbillos. Este tipo de propagación se utiliza en otras especies de agave (Gil-Vega 1997).

También se localizan individuos adultos con inflorescencias, en las cuales se pueden observar estructuras florales, frutos y semillas (Granados 1993). Las semillas del agave tequilero parecen tener un bajo porcentaje de germinación y un crecimiento lento que puede tardar casi tres años para llegar a ser una plántula de tamaño comercial, aunque cabe resaltar que no existe una investigación formal sobre este tipo de propagación (Valenzuela 1997). Con respecto a esto se observó que en una misma planta de *A. tequilana* puede presentarse el proceso de apomixis y el sexual, de tal manera que es posible observar un individuo con frutos y semillas así como propágulos apomícticos (Granados 1993).

Por otro lado existe la propagación del género *Agave* por cultivo de tejidos, la cual actualmente se está utilizando con éxito, por empresas tequileras.

2.3 Clasificación Taxonómica de *Agave tequilana* Weber var. Azul

Superorden:	Liliannae
Orden:	Aspargales
Familia:	Agavaceae
Subfamilia:	Agavoideae
Tribu:	Agaveae
Género:	<i>Agave</i>
Subgénero:	<i>Agave</i>
Especie:	<i>tequilana</i>

2.4 Variabilidad

De la Loma (1979) indica que la variación es la tendencia que se manifiesta en los individuos a diferenciarse unos de otros; es decir, el fenómeno mediante el cual los descendientes de un par de progenitores difieren no solo entre si, sino en relación con los individuos que les dieron origen. La variación es una tendencia opuesta a la herencia, que influye sobre los organismos para desviar sus características del tipo fijo e inmutable que ofrecerían si solo actuase sobre ellos el fenómeno hereditario.

Las variaciones que exhiben los seres vivos, sean animales o vegetales, pueden ser debidas a tres causas distintas:

- 1.-Influencia del medio
- 2.-Recombinaciones de factores hereditarios.
- 3.-Mutaciones

Poehlman (1981), agrega la poliploidía como una fuente importante de variación. La variación de la descendencia de un mismo par de progenitores se puede presentar de dos maneras: i) variaciones continuas (cuantitativas) y ii) variaciones discontinuas (cualitativas).

Gaméz (1989), detectó en *Agave tequilana* Weber var. Azul una gran variabilidad en los muestreos efectuados, principalmente en precocidad, tamaño aparente, peso y calidad industrial, lo cual marca claramente la posibilidad de éxito en programas de mejoramiento genético, principalmente al hablar de la metodología conocida como Selección Clonal.

Gil-Vega (1997) señala, al referirse al mejoramiento genético del agave azul, que la producción oportuna de genotipos mejorados dependerá en mucho del grado de variación genética presente en la población base a ser usada como material progenitor para las generaciones subsecuentes. También comenta que la mejor estimación de la diversidad genética puede ser evaluada usando métodos basados en marcadores moleculares. Ella utilizó un sistema de marcadores moleculares con AFLPs (Amplification Fragment Length Polymorphisms) y con RAPDs (Random Amplified Polimorphic DNA) para analizar la diversidad genética presente entre especies del género agave y entre poblaciones de *Agave tequilana* var. Azul. Concluye que a pesar de que sus resultados solo representan una muy pequeña submuestra de la población total de *A. tequilana* cultivado, reflejan exactamente la carencia de variación genética presente en ese cultivo tan importante. Agrega, que la carencia de variación genética parece ser una consecuencia de más de 200 años de propagación vegetativa del material de plantación.

2.5 Análisis de la diversidad

Recientemente, debido a la Denominación de Origen del Tequila en donde se permite solo emplear la variedad azul para la obtención de la bebida, se ha mostrado interés en desarrollar genotipos sobresalientes de la variedad. para lograr el éxito en la obtención de materiales mejorados es indispensable encontrar diversidad genética en la población base (Gil-Vega *et al.* 2001).

En la búsqueda de las similitudes y diversidad entre colectas, se han usado diferentes formas de análisis, al hablar de otros cultivos se ha investigado mediante técnicas multivariadas, aplicadas a caracteres morfológicos (Goodman y Bird 1977; Cervantes *et al.* 1978; Sánchez y Goodman 1992). Asimismo, para determinar las interrelaciones y grados de diversidad entre materiales se han usado diversos tipos de marcadores: isoenzimas (Doebley *et al.* 1984; Sánchez *et al.* 2000), nudos cromosómicos (Kato 1984), AFLP (Hernández *et al.* 2007), RAPD'S (Álvarez *et al.* 2007) y microsatélites (Provan *et al.* 1999; Matsuoka *et al.* 2002), entre otros.

Se han realizado estudios para verificar la variabilidad genética de las poblaciones de *A. tequilana*. Gil-Vega *et al.* (2001) emplearon la técnica molecular RAPD y encontraron bajos niveles de polimorfismo dentro de

poblaciones de *A. tequilana* Weber var. Azul y entre tres variedades de la misma especie. Sin embargo, se ha reportado variabilidad morfológica en la respuesta a la micropropagación en *A. tequilana* (Torres-Morán 2005); de la misma manera al emplear la técnica de marcadores moleculares ISTR en la especie, se ha encontrado polimorfismo, a pesar de que se propague en forma asexual por diferentes vías (Torres-Morán *et al.* 2006; Torres-Morán *et al.* 2007). Gil-Vega *et al.* (2006), reportaron que al emplear los marcadores moleculares AFLP se presentó un nivel significativo de diversidad genética en muestras obtenidas de la misma plantación y entre diferentes plantaciones.

Los conocimientos de mejoramiento genético vegetal pueden permitir la formación de una serie de variedades de *A. tequilana* Weber var. Azul, que sean uniformes en su ciclo vegetativo y que tengan otros atributos agronómicos que permitan ser comercialmente atractivas para los productores y empresas beneficiadoras.

Lo anterior debe de partir de selecciones realizadas, en primera instancia, de materiales que presenten suficiente variabilidad genética. Una forma de lograr esta información es basándonos en el principio que señala que las relaciones fenotípicas entre organismos reflejan en cierta forma, sus distancias genéticas (Goodman 1973). Dichas distancias genéticas son vitales ya que señalan, con mucho, la divergencia entre los alelos involucrados en la expresión de caracteres cuantitativos de importancia agronómica. En cultivos de reproducción asexual, como el *Agave*, sobresale la necesidad de conocer la divergencia entre genotipos para así identificar la posible generación de variedades, en primera instancia clonales.

2.6 Caracterización morfológica

Una de las herramientas de gran utilidad en la estimación de la variabilidad genética es sin lugar a dudas la caracterización morfológica y desde luego el análisis estadístico de los resultados, ya que de esa forma se facilita un mejor entendimiento de dicha variabilidad, aunque en la actualidad los avances de la biología molecular han proporcionado nuevas técnicas para la caracterización de germoplasma. En consecuencia, gracias a éstas herramientas modernas la caracterización esta tomando una nueva orientación hacia el análisis integrado que incluye varias disciplinas para una mejor comprensión de la variabilidad

genética. Morales *et al.*(2007), midió las relaciones fenotípicas y genéticas entre poblaciones de maíz adaptadas y exóticas para definir su mejor aprovechamiento genético, mediante técnicas de análisis multivariado (gráficas Biplot) y análisis de agrupamiento de materiales adaptados, exóticos y sus cruzas con caracteres agronómicos y componentes del rendimiento de mazorca. Las técnicas de agrupamiento separaron con claridad los materiales adaptados de los exóticos. Se comprobó la utilidad del análisis de componentes principales (ACP).

Cordeiro (2003) al realizar una caracterización morfológica, isoenzimática y molecular de variedades de cerezo (*Prunus avium* L.) y guindo (*Prunus cerasus* L.) encontró que el estudio morfológico además de facilitar una adecuada caracterización, permitió una distinción de variedades. Rodríguez (2000), con el propósito de analizar la diversidad fenotípica de la murta (*Ungi molinae* Turcz) colectada por el Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA Carillanca, Chile se evaluaron 19 características morfofisiológicas y agronómicas sobre 91 accesiones durante la temporada agrícola 1997-1998 a través de métodos estadísticos multivariados. Se realizó el análisis de componentes principales en donde detectaron que la variación estuvo dada principalmente por largo y diámetro del tallo principal, la altura de planta y el rendimiento. También se realizó un análisis de agrupamiento, la información combinada con el análisis de componentes principales permitió la caracterización de cada uno de los subgrupos, en general este análisis mantuvo el grado de importancia de las variables identificadas por la técnica de componentes principales.

2.7 Caracterización molecular

La exploración de filogenia y diversidad genética en agaves, utilizando herramientas moleculares, ha comenzado recientemente. Navarro-Quezada *et al.* (2003) realizaron un estudio de la variación genética y diferenciación genética en el complejo de *Agave deserti* en el desierto de Chihuahua, usando 41 *loci* de RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA), en donde encontraron un patrón de aislamiento por distancia, es decir, entre más lejanas estaban geográficamente las poblaciones que utilizaron en su estudio, eran más las diferencias genéticas entre ellas. Cabe mencionar que en poblaciones silvestres como las de *A. deserti* del anterior estudio, se encuentran individuos producidos tanto de manera asexual como provenientes de semilla y que el

flujo genético que existe entre las poblaciones es elevado, debido a los polinizadores naturales de estas plantas (murciélagos, esfíngidos y abejas).

Las formas de propagación de *A. tequilana* han sido predominantemente asexuales, ya que, como en otros casos, se utilizan los hijuelos de rizoma, los bulbillos que se producen en forma apomíctica en la inflorescencia y la reproducción por semilla, aunque ésta última muy poco. Sin embargo, existen antecedentes de que puede haber variación genética en las plantas producidas de esta manera y se ha documentado ese fenómeno en algunas especies del mismo género.

En *Agave fourcroydes* (henequén), se realizó un estudio comparativo de ADN de plantas de cinco plantaciones comerciales de diferentes regiones del norte de Yucatán. En este estudio se encontraron bandas polimórficas producidas con el marcador molecular AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphism) indicando diferencias a nivel molecular a pesar de la homogeneidad genética esperada por ser plantaciones producidas por propagación asexual. Este fenómeno se denominó variación genética asexual (Infante *et al.* 2003). En otro trabajo con la misma especie, se compararon las muestras de ADN de una planta madre con el de hijuelos de rizoma producidos por la misma y con el ADN de embriones somáticos producidos *in vitro* y nuevamente se reportaron diferencias genéticas, utilizando el mismo marcador molecular, destacando que las características genéticas se conservaron más fielmente en las plantas propagadas por embriogénesis somática (González *et al.* 2003).

En el agave endémico de Venezuela *A. cocui*, se reportó variabilidad genética encontrada en un estudio comparativo de la capacidad discriminatoria de los marcadores AFLP e ISTR (Inverse Sequence-Tagged Repeat) (Osorio *et al.* 2006), los cuales fueron usados para comparar las muestras de ADN de plantas madre con los bulbillos producidos por las mismas, ya que la propagación de estas plantas se lleva a cabo por medio de estas plántulas producidas en la inflorescencia de la especie *Agave cocui*. Los resultados de esta investigación, demostraron la aplicabilidad de estos marcadores en la detección de variabilidad genética. Se demostró que los marcadores ISTRs generan un mayor número de bandas polimórficas comparados con los AFLPs lo que los constituye una herramienta útil en la detección de diferencias a nivel

molecular entre individuos. Según Osorio *et al.*, (2006), a pesar de que la variabilidad genética ha sido considerada un producto exclusivo de la reproducción sexual, en el estudio con *A. cocui* se probó que esta variabilidad encontrada mediante ISTRs, es transmitida y generada a través de la propagación asexual de estas plantas y de este modo se mantienen las ventajas de las dos vías reproductivas.

En la especie *A. tequilana*, se han realizado trabajos tendientes a determinar su variabilidad genética. Puede mencionarse que los primeros estudios, reportaban una uniformidad genética en plantas obtenidas de plantaciones comerciales ubicadas dentro de la región con denominación de origen (Gil Vega *et al.* 2001). En el estudio anterior, fue utilizado el marcador RAPD y plantas de tres variedades, es decir *A. tequilana* var. Azul, *A. tequilana* var. Sigüin y *A. tequilana* var. Chato. Se reportó un bajo nivel de polimorfismo detectado con este marcador en 40 plantas y por lo tanto consideró que *A. tequilana* variedad Azul es homogénea genéticamente. Sin embargo, en otro trabajo publicado, utilizando los marcadores AFLPs, Gil-Vega *et al.* (2006) reportaron polimorfismo entre plantas de la misma especie y diferencias entre planta madre e hijuelo producidos.

La utilización de los ISTR como herramienta para la detección de variabilidad en *A. tequilana*, ha sido documentada en varios trabajos. Torres-Morán *et al.* (2005b) reportaron diferencias genéticas entre plantas micropropagadas e hijuelos de rizomas de esta especie, detectadas con este marcador. Por otra parte, fue identificado polimorfismo entre plantas de *A. tequilana* y de *A. cocui*, con cuatro diferentes combinaciones de iniciadores para ISTR, lo que indica la capacidad discriminatoria de estos marcadores y su utilidad para la identificación de diferencias a nivel molecular (Torres-Morán *et al.* 2006).

Los ISTRs son marcadores basados en secuencias *copia-like* de retrotransposones, que son elementos móviles dentro del genoma y que se transponen vía ARN, utilizando para ello la transcriptasa inversa (Rhode 1996). Esta técnica, basada en PCR (Polymerase Chain Reaction) ha sido utilizada para analizar genoma tanto vegetal como animal, lo que ha permitido reconocer la abundante presencia de estos elementos en prácticamente todos los organismos. La detección de polimorfismo asociado a la inserción de

retrotransposones en el genoma, crea conexiones nuevas entre el ADN genómico y las secuencias altamente específicas al final de esos elementos transponibles (Lightbourn y Veilleux 2003).

La interpretación de este tipo de marcadores se realiza con la lectura de geles donde las secuencias repetitivas idénticas con secuencias de anclaje diferente, proporcionan patrones diferentes. Se analizan como marcadores dominantes, lo que significa que son dialélicos, con bandas presentes o ausentes, las cuales se registran como dos alelos de un *locus* (Dávila *et al.* 2007). Para determinar los valores de similitud y las distancias genéticas utilizando patrones de bandas ISTR, es apropiado usar algoritmos que consideren las coincidencias de las bandas, como el coeficiente de Jaccard o Dice. Si una banda está presente, se puede asumir que los *loci* donde se alinea el iniciador está presente en ambos lados de la banda. Por otra parte, la ausencia de una banda podría significar la falta de sitios de alineación para el iniciador, la existencia de mutación en cualquiera de los sitios de alineación, re-arreglo estructural de los cromosomas en el momento de la meiosis o bien la ocurrencia de una inserción o deleción de tamaño suficiente para ser registrada como un *locus* diferente (Jhonson *et al.* 2004).

2.8 Selección clonal

La planta de agave azul tiene la particularidad de formar hijuelos, los cuales son utilizados para las nuevas plantaciones, siendo el método más usual la separación clonal, por ser práctico, de fácil manejo y sobre todo por observar los mejores resultados (Macedo 1950). Fue Herbert J. Webber, un fitomejorador del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, quien introdujo el término "clon" en 1903, aplicándolo a plantas cultivadas que se propagaban vegetativamente, este término viene del griego y significa rama o vástago, la palabra clon había sido sugerida por el botánico Orador F. Cook. Esta palabra presentaba una clara idea de señalar que "las plantas cultivadas de tales partes vegetativas no son individuos en el sentido común de la palabra, sino que simplemente son partes trasplantadas del mismo individuo; en términos de herencia, tales plantas son el mismo individuo (De la Loma 1979).

En 1912 el genetista George H. Shull recomendó que se ampliase el término para incluir a los animales que aumentan su número o se multiplican por

cualquier método asexual; y que, además se aplicase a todos los grupos de individuos genotípicamente idénticos que se originasen de la reproducción asexual de cualquier tipo, incluyendo la apogamia. Consideró necesario limitar el uso de la palabra "clon" a la designación de organismos genotípicamente idénticos, con el fin de evitar confusiones en el caso de que se presentasen mutaciones somáticas, por definición, concluía, la propagación de una yema vegetativa representaría el origen de un nuevo clon (De la Loma 1979).

Después de considerar problemas tales como el de saber si dos ramas del mismo árbol, utilizadas como estacas o acodos, tenían la misma constitución, y el de reconocer, en consecuencia, que no había certeza para afirmar que eran miembros del mismo clon, Shull cambió rápidamente su definición por esta; "Clon es un grupo de individuos que pueden ser rastreados mediante reproducciones asexuales hasta un solo cigoto ancestral o perpetuamente asexual".

Actualmente el código oficial de la nomenclatura de las plantas cultivadas define la palabra "clon" como; un conjunto genéticamente uniforme de individuos (que puede ser de naturaleza quimérica) originalmente derivados de un solo individuo mediante propagación asexual (De la Loma 1979).

De la Loma (1979), comenta que la propagación clonal conserva las características fenotípicas fielmente de sus progenitores, esto es aseverado por Brauer (1978); Hartmann y Kester (1985) indican que en un clon los individuos serán idénticos, puesto que pertenecen al mismo genotipo ya que los tejidos que lo constituyen han tenido su origen por reproducción mitótica de las células, en la cual hay una duplicación íntegra del sistema cromosómico y del citoplasma asociados de la célula progenitora para formar dos células hijas, por lo que los nuevos organismos contienen toda la información genética de la planta madre. Así pues, la multiplicación por este método no es, en realidad una reproducción sino una multiplicación, puesto que cada organismo no es otra cosa que un fragmento del organismo del que se procede, el cual ha sido capaz de regenerar los órganos necesarios para poder llevar una vida independiente.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Colecta y manejo del material vegetal

Durante los meses de abril y mayo de 2004 se realizaron recorridos de campo por la zona de Denominación de Origen del *Agave tequilana* Weber var. Azul con el objetivo de realizar una colecta hijuelos, para lo cual se realizaron los siguientes pasos:

- a) Definir las regiones de colecta por su importancia como productoras de la materia prima para la elaboración de tequila, se definieron cuarenta localidades del estado de Jalisco, que incluyen; La región de Tequila, así como las correspondientes de Tepatitlán-Arandas, Ocotlán-La Barca, Autlán-El Grullo como representativas del cultivo del agave tequilero.

- b) Se eligieron los predios de colecta, buscando representatividad de la localidad, por tipo de suelo, pendientes y formas de cultivo.

- c) Dentro de cada uno de los lotes se seleccionaron veinte plantas con buenas características agronómicas, es decir, plantas sanas, sin síntomas aparentes de enfermedades, se observó especial cuidado en que dichos materiales no presentaran ataque de insectos.

- d) Cada planta seleccionada se marcó y se eligieron dos hijuelos, que se etiquetaron y posteriormente fueron trasladados al Campo Experimental del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA).

- e) Los hijuelos se seleccionaron tomando como base sanidad, vigor, libres de plagas y con una piña de entre 10 y 13 cm.

- f) Cada colecta fue documentada, llenando un formato con los datos más importantes.

- g) En el campo los hijuelos fueron preparados para la plantación, es decir eliminando partes secas y tratando el hijuelo con un fungicida para protección.

h) Fueron plantados en hileras separadas a tres metros y un metro entre plantas en el *Agavetum* del CUCBA (superficie en la cual se cuenta con una colecta de diferentes especies de agavaceas para su estudio, conservación y observación).

i) El manejo agronómico se apoyó principalmente en la limpieza de maleza y en un tratamiento de fertilización anual de 80 – 50 – 50.

3.2 Análisis morfológico

Las plantas utilizadas para realizar el análisis morfológico son parte de la Colecta de Agaves (*Agavetum*) ubicada en el Campo Experimental del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara en las Agujas, Zapopan, Jalisco. Los agaves se plantaron en el año 2004 utilizando para ello hijuelos de rizoma.

Se seleccionaron del Campo Experimental 100 individuos de *A. tequilana* provenientes de 14 localidades ubicadas dentro de la Zona de Denominación de Origen del Tequila (Figura 1)

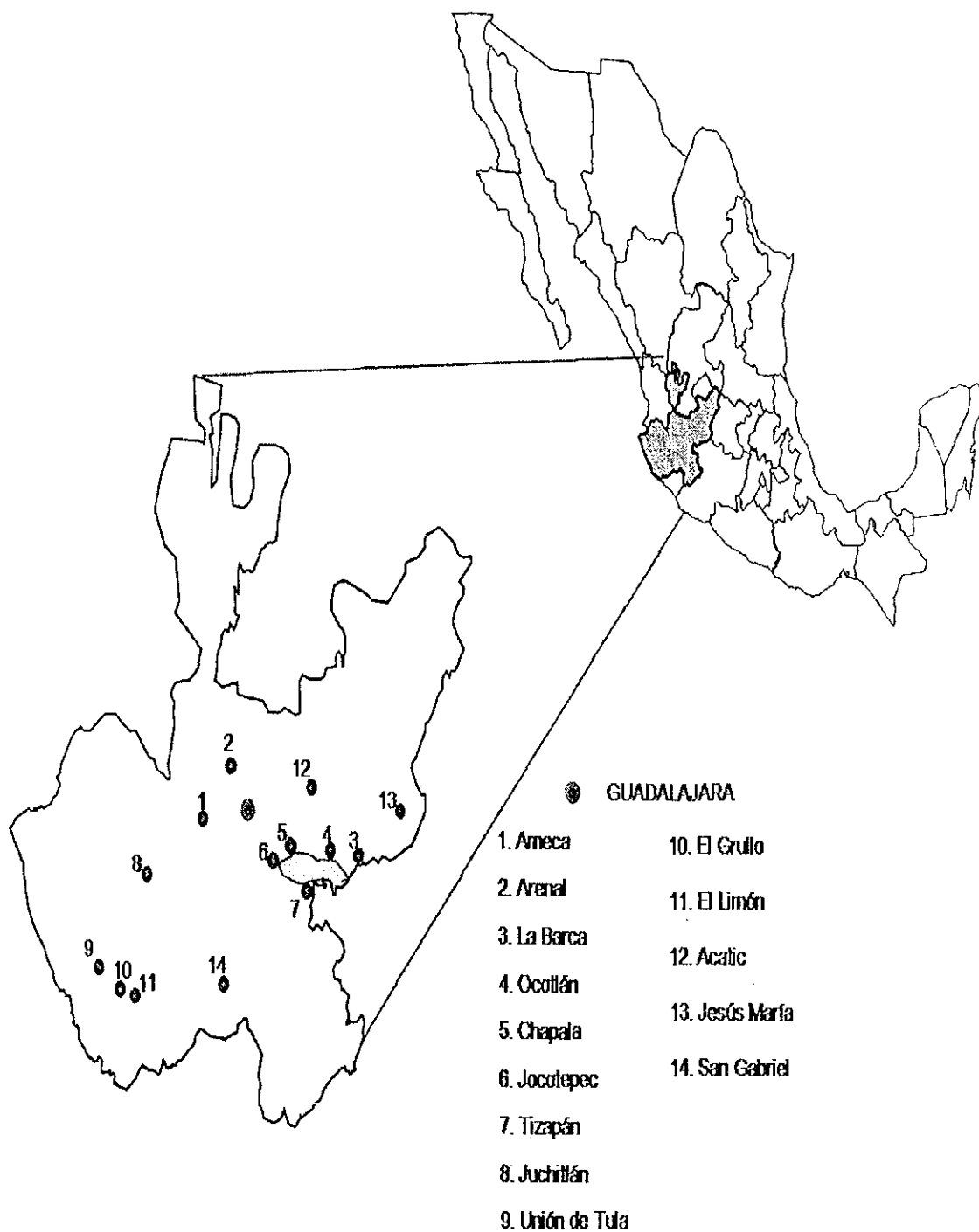


Figura 1. Lugares de procedencia de los materiales de *A. tequilana* Weber var. Azul.

Como grupo de comparación, se utilizaron diez individuos de cada una de las siguientes especies; *Agave americana* L, *Agave Maximiliana* Baker, *Agave salmiana* Otto, y cinco individuos de *Agave angustifolia* Haw, cuyo material se colectó del *Agavetum* ubicado en los campos experimentales del CUCBA, este material fue identificado por la Dra. Ana Lilia Viguera del Departamento de Botánica y Zoología del mismo Centro Universitario.

La identificación de los materiales se realizó utilizando una clave, la cual se presenta en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación y procedencia de los materiales utilizados.

MATERIAL	PROCEDENCIA	CLAVES
<i>Agave tequilana</i>	Ameca, Jal.	A_azul AM 1 a 12
<i>Agave tequilana</i>	Acatic, Jal.	A_azul AC 1 a 10
<i>Agave tequilana</i>	San Gabriel, Jal.	A_azul SG 1 a 3
<i>Agave tequilana</i>	Unión de Tula, Jal.	A_azul UT 1 a 5
<i>Agave tequilana</i>	Jesús María, Jal.	A_azul JM 1 a 3
<i>Agave tequilana</i>	Juchitlán, Jal.	A_azul JU 1 a 7
<i>Agave tequilana</i>	El Limón, Jal.	A_azul EL 1 a 10
<i>Agave tequilana</i>	Tizapán el Alto, Jal	A_azul TI 1 a 8
<i>Agave tequilana</i>	La Barca, Jal.	A_azul LB 1 a 7
<i>Agave tequilana</i>	El Grullo, Jal.	A_azul EG 1 a 10
<i>Agave tequilana</i>	Jocotepec, Jal.	A_azul JO 1 a 3
<i>Agave tequilana</i>	Arenal, Jal.	A_azul AR 1 a 6
<i>Agave tequilana</i>	Chapala, Jal.	A_azul CH 1 a 5
<i>Agave tequilana</i>	Ocotlán, Jal.	A_azul OC 1 a 7
<i>Agave maximiliana</i>	Mascota, Jal.	A_maxi MA 1 a 10
<i>Agave angustifolia</i>	Nextipac, Zap. Jal.	A_angu NE 1 a 5
<i>Agave salmiana</i>	Ahualulco, Jal.	A_salm AH 1 a 10
<i>Agave americana</i>	San José de Gracia, Mich.	A_amer SJ 1 a 10

Las variables morfológicas medidas fueron:

a).-Número de hojas (NH).

Se contó el número total de hojas de cada una de las plantas muestreadas.

b).-Altura de planta en cm (AP).

Se midió la altura de la base a la hoja superior del tallo.

c).-Diámetro de la piña en cm (DT).

Se estimó el diámetro midiendo aproximadamente en la mitad de la cabeza o piña.

d).-Longitud de hoja en cm (LH).

Se midió en hojas de la parte media de la planta con un flexómetro, incluyendo de la base a la punta de la misma.

e).-Ancho de hoja en cm (AH).

Se realizó en una hoja de la parte media de la planta, midiendo en la parte más ancha

f).-Número de espinas en 10 cm (NE).

De la parte media de la planta se seleccionó una hoja, en la parte central de la hoja se midieron 10 cm contándose las espinas presentes.

Las relaciones entre los materiales genéticos se establecieron con base en los análisis de agrupamiento y de componentes principales. Como medida de similitud entre plantas se usó el coeficiente de correlación:

$$r_{ij} = (\sum_k x_{ki} x_{kj}) / (\sum_k x_{ki}^2 \sum_k x_{kj}^2)^{1/2},$$

donde:

i, j correspondieron a las plantas *i* y *j*

k corresponde a la variable *k*-ésima

Los valores de r_{ij} se calcularon después de estandarizar las variables a media cero y varianza 1. Con los valores estandarizados de r_{ij} se llevó a cabo un análisis de agrupamiento con el método Promedio de Grupo (UPGMA) con el programa NTSYS 2.0 (Rohlf 1993). Los resultados de los agrupamientos se presentan en dendogramas y los de análisis de componentes principales en gráficas "Biplot", como lo describen Rawlings (1988) y Sánchez (1995).

Los elementos más importantes en la interpretación del "Biplot", son la dirección y longitud de los vectores-variable, el ángulo entre vectores y la proximidad espacial entre los genotipos. Los vectores más largos involucran

variables de mayor importancia en las primeras dos dimensiones, mientras que el ángulo entre vectores refleja correlación. Los valores relativos de las variables para un genotipo se pueden ver al proyectar el punto de dicho genotipo sobre el vector variable. Los puntos localizados en sentido opuesto a la dirección del vector tendrán los menores valores para esa variable.

Con el fin de evaluar la variabilidad dentro de cada especie, se realizó la prueba clásica de Bartlett empleando el programa BARTEST, escrito en código SAS por Hussein *et al.* (2001). La prueba de Bartlett se desarrollo a partir de las cinco especies involucradas así como las seis características incluidas. Adicionalmente, para estimar la variabilidad de todo el conjunto de variables, se llevó a cabo la prueba de homogeneidad de matrices de varianzas y covarianzas con base en el procedimiento PROC DISCRIM (SAS Institute 1994); en este caso se calcularon los valores de X^2_c y los logaritmos naturales del determinante de las matrices de varianzas y covarianzas para cada caso (Morrison 1978).

3.3 Análisis molecular

El trabajo fue realizado en el Laboratorio de Marcadores Moleculares del IMAREFI (Instituto de Manejo y Aprovechamiento de Recursos Fitogenéticos) del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA) de la Universidad de Guadalajara.

Se seleccionaron 100 individuos de *A. tequilana* de una plantación de 3 años iniciada con hijuelos provenientes de 14 localidades ubicadas dentro de la zona de denominación de origen (Figura 1). La descripción de los materiales se presenta en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Descripción de los materiales utilizados.

MATERIAL	PROCEDENCIA	CLAVES
<i>Agave tequilana</i>	Ameca, Jal.	H1 a H15
<i>Agave tequilana</i>	Acatic, Jal.	H16 a H25
<i>Agave tequilana</i>	San Gabriel, Jal.	H26 a H28
<i>Agave tequilana</i>	Unión de Tula, Jal.	H29 a H33
<i>Agave tequilana</i>	Jesús María, Jal.	H34 a H36
<i>Agave tequilana</i>	Juchitlán, Jal.	H37 a H43
<i>Agave tequilana</i>	El Limón, Jal.	H44 a H55
<i>Agave tequilana</i>	Tizapán, Jal.	H56 a H62
<i>Agave tequilana</i>	La Barca, Jal.	H63 a H69
<i>Agave tequilana</i>	El Grullo, Jal.	H70 a H78
<i>Agave tequilana</i>	Jocotepec, Jal.	H79 a H81
<i>Agave tequilana</i>	Arenal, Jal.	H82 a H88
<i>Agave tequilana</i>	Chapala, Jal.	H89 a H93
<i>Agave tequilana</i>	Ocotlán, Jal.	H94 a H100
<i>Agave maximiliana</i>	Arenal, Jal.	MA1 a MA4
<i>Agave angustifolia</i>	Arenal, Jal.	AN1 a AN4
<i>Agave salmiana</i>	Arenal, Jal.	SA1 a SA4
<i>Agave americana</i>	Arenal, Jal.	AM1 a AM4

Como grupo de comparación, se utilizaron cuatro individuos de las especies *A. americana*, *A. maximiliana*, *A. salmiana*, y *A. angustifolia*, cuyo material se colectó del *Agavetum* ubicado en los campos experimentales del CUCBA, este material fue identificado por la Dra. Ana Lilia Viguera del Departamento de Botánica y Zoología del mismo Centro Universitario.

Se obtuvo tejido foliar fresco de todas las plantas y se almacenó a -20°C hasta la obtención de ADN por el método reportado por Keb-Llanes *et al.* (2002), el cual parte de una cantidad de tejido de 0.35 g basado en CTAB (Mixed Alkyltri-metilammonium Bromide) para la lisis celular y en acetato de amonio para la precipitación de proteínas. La purificación del ADN se llevó a cabo mediante lavados con etanol 70%, el precipitado con Isopropanol y el almacenamiento en T.E. (Tris-EDTA). El protocolo completo de extracción de DNA se describe a continuación:

3.4 Protocolo de extracción de DNA en agavaceas (Keb-Llanes *et al.* 2002).

Reactivos y soluciones

a).- Preparación del Buffer A: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio al 2% (w/v), 100 mM de tris-HCL (pH 8) m 20 mM Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 1.4 M NaCl, 4% Polyvinylpyrrolidone (PVP-40) (PVP-10 se agregó el día de la extracción) (w/v), 0.1 % de ácido ascórbico (w/v) y 10 mM β -mercaptoetanol

b).- Preparación el Buffer B: 100 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM de EDTA, 100 mM NaCl y 10 mM de β -mercaptoetanol

c).- Buffer TE: 10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 8)d).-

d).- 20% Dodecil Sulfato de Sodio (SDS) (w/v) (no refrigerado)

e).- 5 M de acetato de potasio -20°C "buffer lisis" (60 mL 5M acetato de potasio 11.5 mL de ácido acético glacial y 28.5 de agua

f).- 3 M de acetato de sodio pH 5.2

g).- Alcohol al 70% a -20°C

h).- Isopropanol absoluto a -20°C

Extracción del DNA

1. Se trituraron 0.35 g de tejido vegetal obtenido de la penca del agave hasta pulverizarlo usando un mortero y nitrógeno líquido. El polvo vegetal que se obtuvo, se transfirió con una espátula a un tubo Eppendorf. Luego, se añadieron 300 μ L del Buffer A, también el PVP, ácido ascórbico y β -mercaptoetanol, 900 μ L del Buffer B, y 100 μ L del SDS, agitando después de cada aplicación.

2. El tubo Eppendorf con el material vegetal y las sustancias, se mezcló en un Vortex y se incubó en baño maría a 65° C por 10 minutos, se dejó enfriar y se agitó cada dos minutos.

3.- Se adicionaron 410 μ L de acetato de potasio (Buffer lisis), y se mezcló. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4° C., se transfirió el sobrenadante

4.- Se transfirió 1.5 mL del sobrenadante y se agregaron 540 μ L de isopropanol, se mezcló y se incubó a -20° C por 20 min.

5.- Se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min, se vierte con cuidado el sobrenadante. Se lava el pelet con 500 μ L de etanol al 70%, luego se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min y se virió luego se dejó secar y se cubrió con una gasa.

6.- Se resuspendió el pelet en 600 μ L en buffer TE (300 μ L en cada tubo se tomó una muestra, se centrifugó con un pulso de 30 s a 10,000 rpm y mezclar). Se adicionaron 60 μ L 3 M de acetato de sodio (pH 5.65) se mezcló y se adicionó 360 μ L de isopropanol y se mezcló, posteriormente se incubó a -20° C por 20 min.

7.- Se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min y se repitieron los pasos 5 a 7. Se lavó con 500 μ L de etanol al 70% y se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min, se virió y se secó.

8.- Se resuspendió el pelet en 100 μ L del buffer TE y se dejó en reposo por 12 horas antes de guardarlo a -20° C. Se verificó la calidad del ADN por medio de espectrofotometría a 260 nm.

9.- Se realizó una electroforesis en gel de agarosa para verificar la integridad del ADN como indica Sambrook *et al.* (1989).

Se calculó la concentración de ADN en las muestras para preparar las diluciones requeridas para la reacción de PCR, marcadas en el protocolo como 25 ng/ μ L. las muestras con amplificación indefinida fueron descartadas.

Se realizaron PCR para ISTR utilizando el iniciador F1/B6 (F para Forward y B para reverse) con secuencias d5'[GCA CTC CAC CAA GAA TAC C]3' y d5'[GGT TCC ACT TGG TCC TTA G]3', la amplificación se llevó a cabo en una reacción final de 20 μ L de acuerdo al protocolo descrito por Osorio *et al* (2006); utilizando 50 ng de ADN, 0.3 μ M de cada uno de los iniciadores, buffer PCR 1X, 3 mM de MgCl₂ y 0.025 U de Taq polimerasa. Los productos de amplificación fueron separados en geles de poliacrilamida al 6% y teñidos con sales de plata.

Se obtuvo una matriz de presencia/ausencia a partir de los geles, con la cual se calculó el coeficiente de similaridad de Jaccard y el análisis de agrupamiento por el método UPGMA contenidos en el programa NTSYS 2.11. Los resultados se muestran en un dendrograma.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis morfológico

4.1.1 Diversidad entre especies

Acorde con el análisis de componentes principales (ACP), donde se incluyen cinco especies de *Agave*; los dos primeros componentes representaron el 70.6% de la variabilidad en los datos originales; el componente 1 explicó el 45.3% de la variación total y fue definido principalmente por; Altura de planta (AP), Longitud de la hoja (LH) y Número de hojas (NH). El componente número 2 explicó el 25.3% de la variación total y se definió por las variables: Ancho de hoja (AH) y Diámetro de tallo (DT). El componente 3 explicó el 15.8% de la variación total y estuvo definido por las variables: Número de espinas en 10 cm (NE) y Número de hojas (Cuadro 3 y Figura 2).

Cuadro 3. Vectores característicos (C) para especies de agave.

VARIABLE	CLAVE	C1	C2	C3	C4	C5	C6
Número de Hojas	NH	0.36	0.14	0.64	-0.6	-0.15	0.17
Altura de Planta	AP	0.58	0.0065	0.035	0.092	0.36	-0.71
Diámetro de Tallo	DT	0.23	0.62	0.16	0.59	-0.4	0.07
Longitud de Hoja	LH	0.56	-0.17	-0.18	0.2	0.37	0.67
Anchura de Hoja	AH	-0.3	0.64	0.056	-0.11	0.68	0.1
Número de Espinas	NE	-0.25	-0.37	0.71	0.46	0.25	0.02
Variación %		0.4533	0.253	0.1577	0.0887	0.0393	0.008

C = componente principal; NH = número de hojas; AP = altura de planta; DT = diámetro de tallo; LH = longitud de hoja; AH = anchura de hoja; NE = número de espinas en 10 cm.

Es importante mencionar el agrupamiento existente en las especies del grupo *Rigidaceae*, como lo son *A. tequilana* y *A. angustifolia* las cuáles se ubican en el lado positivo eje del componente principal 1 y cuya variabilidad y ubicación espacial se encuentra definida por la longitud de hojas (LH) y número de espinas (NE).

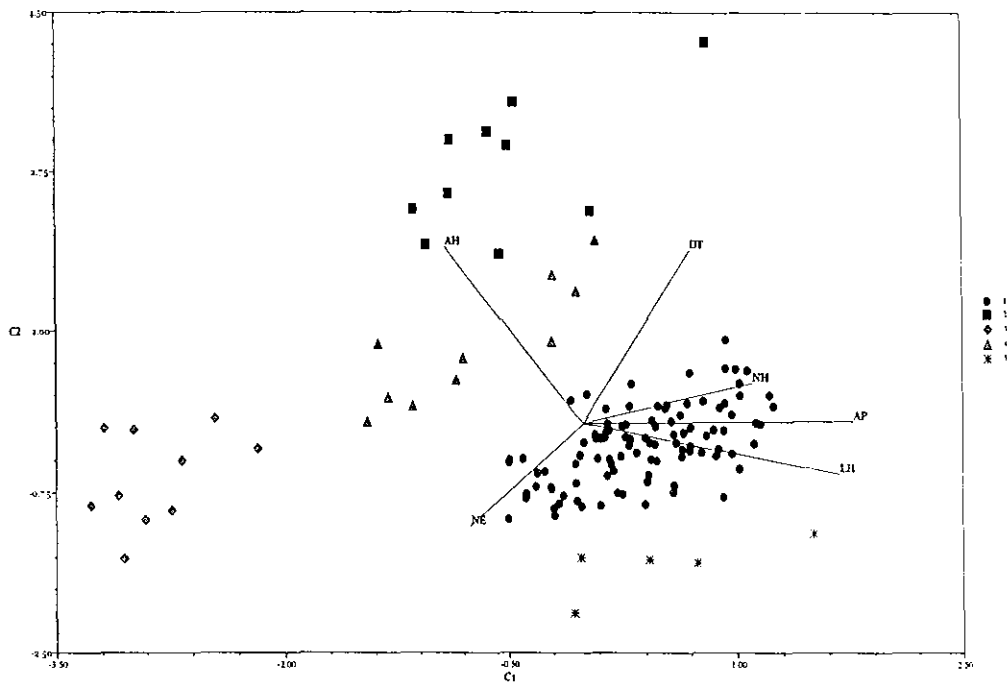


Figura 2. Análisis de componentes principales en cinco especies de *Agave*. 1: *A. tequilana*, 2: *A. salmiana*, 3: *A. maximiliana*, 4: *A. americana*, 5: *A. angustifolia*, C1: Componente Principal 1, C2: Componente Principal 2, AH: Altura de hoja, DT: Diámetro del tallo, NH: Número de hojas, AP: Altura de planta, LH: Largo de hoja, NE: Número de espinas.

El análisis de agrupamiento permitió definir dos grupos (Figura 3). El grupo 1 se conformó en tres sub-grupos con materiales, principalmente, de *Agave tequilana* Weber var. Azul, así como *A. angustifolia*. El subgrupo A se caracteriza por materiales colectados en cuatro regiones de Jalisco, principalmente de la Zona Sur, en donde se tiene representatividad por; San Gabriel, el Grullo, Juchitlán, Unión de Tula y el Limón. Para los subgrupos B y C se encuentran materiales de colectas de las diferentes zonas del estado de Jalisco. Es conveniente mencionar la uniformidad en los materiales de *A. tequilana* evaluados de Tizapán el Alto, San Gabriel y Juchitlán; localidades que no pertenecen a las dos grandes zonas tequileras de tradición (Región de Tequila y Región Altos de Jalisco); y en ellas podemos identificar el caso reportado por Gil-Vega *et al.* (2001) en el que menciona que en zonas de cultivo de la especie se ha conservado durante tiempos prolongados un solo genotipo principalmente por la exclusiva forma asexual de propagarlos.

En el grupo 1 *A. tequilana* se caracteriza por tener un promedio de 53 hojas, altura promedio de 136 cm., diámetro de tallo de 29 cm, longitud de hoja de 98 cm, anchura de hoja de 7.5 cm y 8.37 espinas en 10 cm de longitud. Se distingue *A. angustifolia* dentro del mismo grupo con los siguientes valores; 25.6 hojas, altura promedio de 131 cm, diámetro de tallo de 22.3 cm, longitud de hoja de 121 cm, anchura de hoja de 2.8 cm y 6.8 espinas en 10 cm de longitud. Puede observarse cierta similitud en algunos caracteres entre estas dos especies, lo cual se podría tomar como lógico ya que se estima que de *A. angustifolia* se generó en forma natural *A. tequilana* Weber var. Azul (Gentry, 1982; Vargas-Ponce *et al.*, 2007).

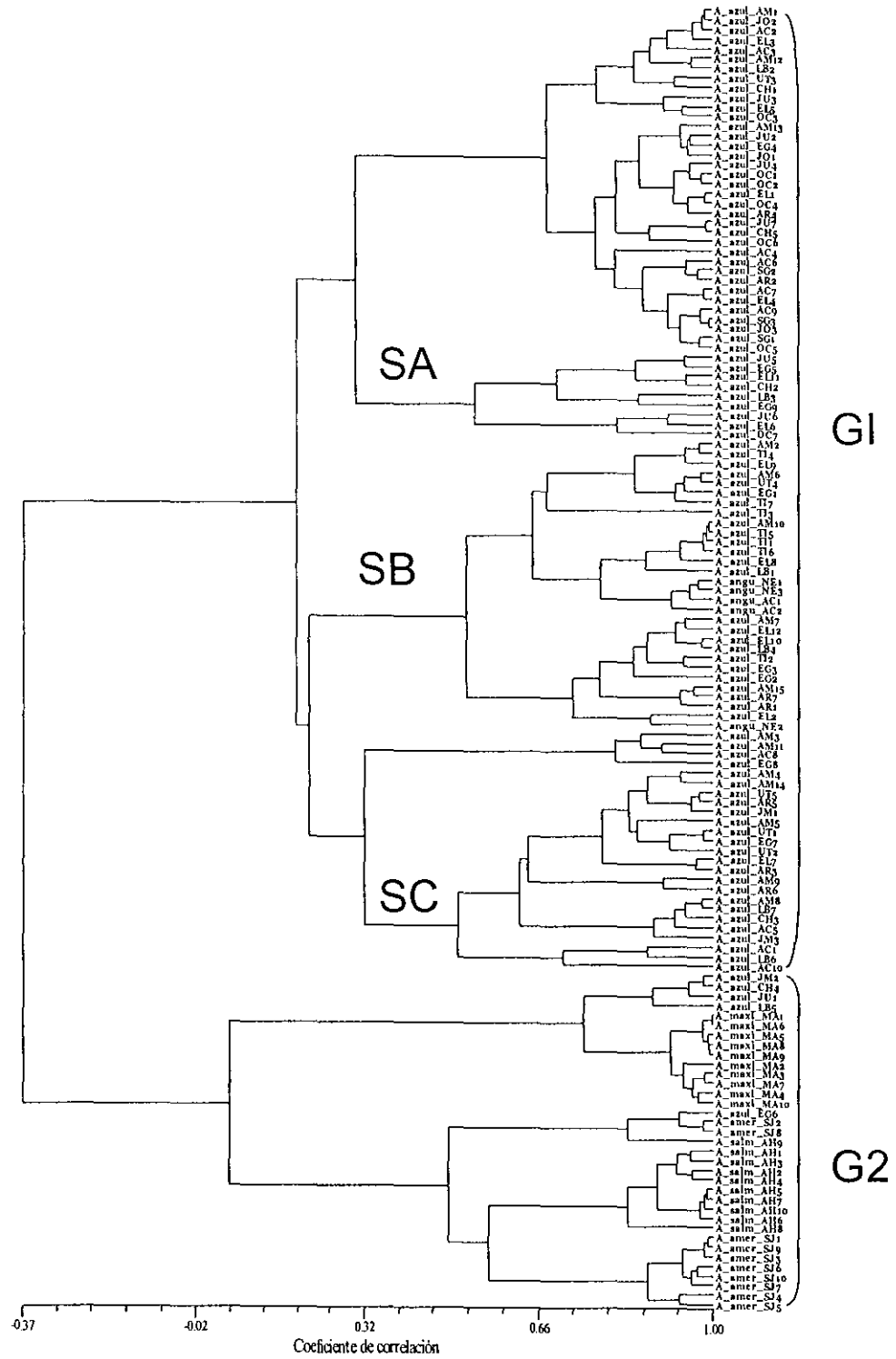


Figura 3. Agrupamiento de cinco especies de *Agave*. G1: Grupo 1, G2: Grupo 2, SA: Subgrupo A, SB: Subgrupo B, SC: Subgrupo C.

El grupo 2 contiene principalmente los materiales de las especies restantes, iniciando con, *A. maximiliana* que se distingue por presentar los valores medios menores en caracteres como; altura de planta (AP), diámetro de tallo (DT), longitud de hoja (LH) y ancho de hoja (AH) cuando se le compara con *A. salmiana* y *A. americana* y valores relativamente bajos de número de hojas (NH) y número de espinas en 10 cm. *A. salmiana* y *A. americana* se distinguen por ser los de promedio mayor en diámetro de tallo (DT) y ancho de hoja (AH), característica que agronómicamente los marca en el terreno de cultivo.

Es importante remarcar que estas metodologías de análisis de agrupamiento y componentes principales, como en otros casos (Morales *et al.* 2007; Vargas-Ponce *et al.*, 2007), han permitido identificar la variabilidad entre los materiales evaluados y en este caso diferenciar las cinco especies estudiadas a partir de caracteres morfológicos.

4.1.2 Variabilidad dentro de especies

En el Cuadro 4 se presentan las estimaciones de varianzas de las seis variables estudiadas en cada una de las especies. Los mayores valores numéricos de las varianzas fueron para: número de hojas (NH) y se presentaron en *A. tequilana* y *A. salmiana*, mientras que las mayores diferencias entre especies se presentaron para diámetro de tallo (DT) ancho de hoja (AH) y número de espinas (NE), en donde los valores de X^2_c fueron mayores de 20, altamente significativos. Por su parte la prueba de homogeneidad de matrices de varianzas y covarianzas resultó altamente significativa indicando diferencias entre la variabilidad conjunta de las variables; en dicha prueba, *A. salmiana* mostró los mayores valores del logaritmo del determinante.

TESIS/CUCBA

Cuadro 4. Estimaciones de varianzas mediante prueba de Bartlett de 6 variables en función de 5 especies de *Agave*.

ESPECIE	VNH	VAP	VDT	VLH	VAH	VNE	LogD
<i>Agave tequilana</i>	87.49	0.02	20.86	93.41	0.49	1.21	5.59
<i>Agave salmiana</i>	83.6	0.01	83.12	56.71	8.67	1.38	7.89
<i>Agave maximiliana</i>	22.22	0.01	7.39	46.49	3.11	9.43	3.96
<i>Agave americana</i>	18.89	0.03	59.79	131.9	5.38	<i>0.18</i>	3.21
<i>Agave angustifolia</i>	26.8	0.04	8.7	89.3	<i>0.2</i>	1.2	-31.01
X Cuadrada Probabilidad >Xc	12.5	7.03	21.28	3.09	87.13	41.39	267.19
	0.013	0.134	0.0002	0.543	0.00001	0.00001	0.00001

En **negritas**=mayor varianza; subrayada=menor varianza; VNH=varianza de número de hojas; VAP = varianza de altura de planta; VDT = varianza de diámetro de tallo; VLH = varianza de longitud de hoja; VAH = varianza de anchura de hoja; VNE = varianza de número de espinas en 10 cm; logD = logaritmo del determinante.

Por otra parte, la especie que mostró los más altos coeficientes de variación en las seis variables analizadas fue *A. americana* (Cuadro 5) y las características que presentan un mayor rango de variabilidad fueron diámetro de tallo (DT) y número de hojas (NH).

Cuadro 5. Coeficientes de variación de 6 características en 5 especies de *Agave*.

ESPECIE	NH	AP	DT	LH	AH	NE
<i>Agave tequilana</i>	17.8	9.4	16	9.8	9.4	13
<i>Agave salmiana</i>	16.5	10.3	22.4	11	16	18
<i>Agave Maximiliana</i>	18.1	12.1	12.6	16	15	23
<i>Agave americana</i>	20.7	15.2	27.3	13	18	8.8
<i>Agave angustifolia</i>	20.2	14.5	12.9	7.8	16	16

En **negritas** = coeficientes de variación más altos.

Como podrá notarse en los cuadros 3 y 4, no hay una especie que muestre consistentemente la mayor variación en las variables morfológicas, sin embargo, destaca *A. salmiana* en número de hojas (NH), diámetro de tallo (DT), longitud de hoja (LH), ancho de hoja (AH) y la prueba multivariada con log D. *Agave tequilana* únicamente mostró valores altos en número de hojas (NH) y longitud de hoja (LH); mostró el segundo valor en la prueba de la matriz de varianzas covarianzas y valores relativamente bajos en el resto de variables.

Las metodologías empleadas en este estudio, mostraron ser una herramienta sencilla para evaluar la variabilidad dentro y entre las poblaciones de *Agave tequilana*, y otras especies de *Agave*. Este tipo de resultados son de utilidad para elaborar programas de conservación de la diversidad del germoplasma que aún se presenta en la región occidente de México, de acuerdo a lo reportado en el presente trabajo y por otros autores con otras técnicas (Gil-Vega *et al.* 2006; Vargas-Ponce *et al.* 2007).

4.2 Análisis molecular

Los patrones de amplificación obtenidos en el presente estudio, muestran que los datos generados por ISTRs son consistentes y apropiados para la detección de diferencias a nivel molecular.

En el dendrograma de la Figura 4, se muestra la agrupación de los materiales, que hace evidente la separación de los individuos de *A. tequilana* y los grupos control de otras especies a un nivel de similaridad de 0.16, esto indica que, el marcador molecular utilizado, es capaz de detectar diferencias interespecíficas. Este resultado concuerda con la separación observada con este mismo marcador, entre *A. tequilana* y *A. cocui* en el trabajo reportado por Torres-Morán *et al.* 2006.

Los patrones de amplificación mostraron 22 bandas bien definidas, de las cuales 20 fueron polimórficas, lo cual representa el 90%. El número de bandas generadas con ISTR es menor que las reportadas con ALFPs (Gil-Vega *et al.* 2006), sin embargo, la detección de variabilidad inter e intraespecífica observada, los valida como herramienta de caracterización y determinación de diferencias a nivel molecular.

Los resultados de esta investigación indican que la aplicación de la tecnología de marcadores moleculares puede ser de gran utilidad en programas de mejoramiento genético, en el entendimiento de bases fisiológicas y genéticas del comportamiento de las variedades, también facilitan la identificación de factores genéticos útiles en fitomejoramiento, detectan la introgresión de factores genéticos deseados, nos ayudan a fortalecer los

programas de selección que se basan en respuestas fenotípicas, también dan

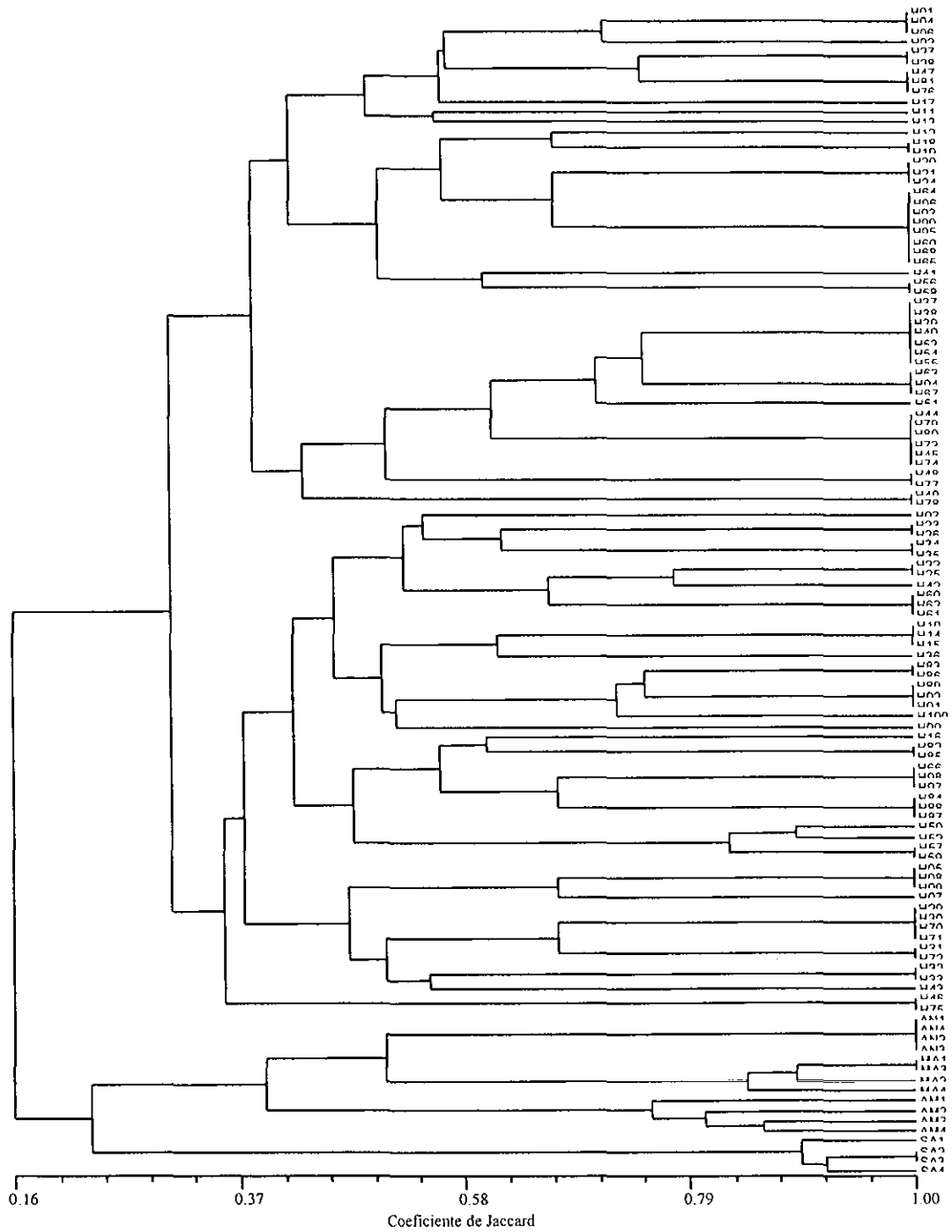


Figura 4. Dendrograma generado con la matriz desarrollada con la combinación F1/B6 de iniciadores de ISTR para 100 individuos de *A. tequilana* y grupos control de las especies *A. maximiliana*, *A. angustifolia*, *A. salmiana* y *A. americana*.

la oportunidad de entender las interacciones genotipo ambiente y monitoreo de la diversidad en los pooles genéticos, son un importante valuarte en la identificación de cultivares y germoplasma (Stuber *et al.* 1999; Sorrels 1998).

Dentro de los individuos de *A. tequilana*, se distinguen tres grupos, dos de ellos separados al nivel del coeficiente de similaridad 0.307 y el tercer grupo, formado a nivel 0.433. En el Cuadro 6, se marcan los materiales y las localidades de procedencia para cada grupo formado.

Cuadro 6. Grupos formados en el análisis de agrupamiento UPGMA y localidades representadas en cada grupo de individuos.

GRUPOS FORMADOS	LOCALIDAD DE PROCEDENCIA DE LOS MATERIALES DEL GRUPO	LOCALIDAD NO REPRESENTADA EN EL GRUPO
Grupo I	Ameca, San Gabriel, El limón, Jocotepec, El Grullo, Acatic, La Barca, Ocotlán, Chapala, Juchitlán, Tizapán y Jesús María	Unión de Tula y Arenal
Grupo II	Juchitlán, la Barca, El Limón, Ocotlán, Jocotepec, El Grullo.	Ameca, San Gabriel, Acatic, Chapala, Tizapán y Jesús María, Unión de Tula y Arenal
Grupo III	Juchitlán, la Barca, El Limón, Ocotlán, El Grullo, Ameca, San Gabriel, Acatic, Chapala, Tizapán y Jesús María, Unión de Tula y Arenal	Jocotepec

4.3 Propuesta de metodología de mejoramiento genético para *Agave tequilana* Weber var. Azul

Los conocimientos derivados de este trabajo de investigación, han dejado claro, primero; que la variabilidad genética es determinante para el éxito de un programa de fitomejoramiento de *Agave tequilana* Weber var. Azul y segundo que los marcadores moleculares representan una herramienta útil que permite un monitoreo certero para lograr un avance significativo en la formación

de variedades mejoradas del cultivo del agave tequilero. Lo indispensable es que se debe partir de una población con la suficiente variabilidad genética.

4.3.1 Selección de plantas madres

La selección de plantas madres deberá llevarse a cabo a partir de materiales que presenten suficiente variabilidad genética (40 localidades, 20 Plantas Madre por Localidad, 3 hijuelos por Planta Madre seleccionada). Cada una de las plantas seleccionadas se nombrarán PM (Planta Madre) más su genealogía; Ejemplo PM 15 3 (15=origen Yahualica, Planta Madre 3).

4.3.2 Obtención de datos

A cada una de estas plantas seleccionadas (PM) se le dará seguimiento hasta cosecha para poder obtener una serie de datos, entre los cuales se tendría:

- a) Ciclo vegetativo (a jima en maduréz)
- b) Fecha de floración y/o fecha de quietación
- c) Reacción natural a enfermedades. Calificar la presencia de enfermedades tratando de señalar observaciones importantes como; síntomas, grado de expresión de los síntomas. En cuantas plantas aparece, tiempo en que los síntomas han sido observados. Se anota información sobre: clima, fertilización. etc.
- d) Reacción a plagas insectiles. Anotaciones sobre la presencia de plagas insectiles, tratando de identificar los insectos que causan daño, anotando la reacción de la planta (Tolerante-Susceptible).
- e) Identificar aspectos morfológicos diferenciales. Se desean plantas vigorosas de color verde-azul tolerantes a problemas regionales tanto bióticos como abióticos, información que permitiría comparar y/o diferenciar de otros materiales (con fines de certificación).
- f) Peso de piña en kilogramos.
- g) Inmediatamente después de separar la piña pesarla y reportar diámetro y longitud de la cabeza.

- 4.3.8 Pr
F
Erwinia
efectua
adaptac
- h) Caracteres químicos: pH, azúcares, reductores totales, inulina. Una vez pesada la piña se deberán de tomar las muestras necesarias para obtener los datos químicos requeridos.
- i) Índice de eficiencia (Peso de la Piña en Kg./Nº de meses a jima). Con la información obtenida calcular el Índice de eficiencia (IEA)

- 4.3.9 E
En cam
Aplicac
- 4.3.3 Selección de hijuelos.
- Los hijuelos seleccionados se nombrarán SC más su genealogía; Ejemplo SC 15 3 1 (Selección Clonal, Localidad 15, Planta Madre 3, Hijuelo 1)

- 4.3.10 i
4.3.11 l
- 1) Tamaño toronja (10 A 13 cm.) de planta de dos a tres años.
 - 2). Sanidad total.
 - 3). Vigor de plantas de tres hijuelos uniformes. Ejemplo SC 15 3 1, SC 15 3 2, SC 15 3 3

4.3.4 Plantación de hijuelos

La plantación de hijuelos se realizará en tres localidades utilizando las densidades comerciales comunes. Las localidades deberán ser representativas de las zonas agaveras y contrastantes desde el punto de vista agronómico.

4.3.5 Selección preliminar de plantas

Se debe realizar una selección preliminar de las plantas en tres localidades, a partir del 2º año después de la plantación (presión de selección 20%).

- 1) Por vigor.
- 2) Por resistencia a enfermedades y plagas insectiles
- 3) Por adaptabilidad.
- 4) Aplicación de marcadores moleculares (plantas seleccionadas).

4.3.6 Incremento *in vitro* de hijuelos de plantas seleccionadas (de 30 a 50 por SC

El tamaño de muestra se incrementará dependiendo de lo requerido en el proceso de adaptación o frecuencias de resistencia a enfermedades)

4.3.7 Adaptación de clones (SC) (Invernadero).

V. CONCLUSIONES

5.1 Caracterización morfológica

1). El análisis de agrupamiento y de componentes principales permitieron estimar las relaciones entre las especies de *Agave* estudiadas con base en caracteres morfológicos fáciles de medir en campo; entre las relaciones más cercanas destacan las de *A. tequilana* y *A. angustifolia*, mientras que *A. maximiliana* se separa del resto de especies debido a sus características distintivas de altura de planta, número de hojas y número de espinas.

2). El análisis de agrupamiento, además de mostrar las interrelaciones entre las especies, revela relaciones cercanas entre plantas de diferentes regiones; esto último indica el movimiento intenso de germoplasma en Jalisco a partir de ciertos orígenes comunes.

3). *Agave salmiana* mostró los mayores niveles de variabilidad mientras que el resto de especies mostraron valores altos para unos caracteres y bajos para otros; lo más destacable es que con base en los caracteres estudiados, se detectó variabilidad fenotípica dentro y entre especies lo que ayudará a proponer esquemas de mejoramiento genético.

5.2 Caracterización molecular

1). Los datos generados por ISTRs son consistentes y apropiados para la detección de diferencias a nivel molecular entre colectas de cinco especies de agave.

2). El marcador molecular utilizado es capaz de detectar diferencias intra e interespecíficas, característica que lo valida como herramienta de caracterización y determinación de diferencias a nivel molecular en *Agave*.

3). El análisis de agrupamiento se constituye como un auxiliar indispensable en trabajos de caracterización entre y dentro de especies de *Agave*.

4.3.8 Pruebas fitopatológicas en los hijuelos

Pruebas fitopatológicas en los hijuelos *in vitro* (SC) a partir de; *Fusarium*, *Erwinia* y *Cercóspora*. Selección por resistencia a enfermedades que se efectuarían en el invernadero, una vez que las plantas se encuentren adaptadas, recurriendo a inoculaciones artificiales en diez plantas

4.3.9 Evaluación de las líneas clonales.

En campo y por lo menos en tres lugares

Aplicación de marcadores moleculares (líneas clonales).

4.3.10 incremento de clones *in vitro* (SC).

4.3.11 Liberación de materiales

5.3 Mejoramiento genético.

Tanto la caracterización morfológica como el uso de marcadores moleculares al determinar diferencias o interrelaciones se constituyen como herramientas auxiliares de valor en los programas de mejoramiento genético de *Agave tequilana* Weber var. Azul.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Alvarez, S. J. L., Flores-Berrios, A. Santerre L. y M. J. Cházaro B. (2007).** Estudio genético (RAPD's) de especies de *Agave* distribuidas en el Volcán de Tequila, Jalisco, México. *In: Vázquez-García, J. A. M. J. Cházaro B., G. Hernández V., E. P. Flores-Berrios y Y. L. Vargas-Rodríguez (Eds).* Agaves de occidente de México. Serie Fronteras de Biodiversidad. Universidad de Guadalajara, pp. 100-110.
- Arizaga, S. (2008).** En peligro el tequila mexicano. Lo que somos. Revista electrónica. <http://www.loquesomos.org/amasando/elbicho/tequila.htm>
- Brauer, O. (1978).** Fitogenética Aplicada, 3ª Edición. Editorial Limusa S. A. México, D. F. pp (347-601)
- Cervantes, S.T., M. M. Goodman y E. Casas D. (1978).** Efectos genéticos y de interacción genótipo medio ambiente en la clasificación de las razas mexicanas de maíz. *Agrociencia* 30:25-30
- Cordeiro, R L. (2003).** Caracterización morfológica, isoenzimática y molecular de variedades de cerezo (*Prunus avium* L.) y de guindo (*Prunus cerasus* L.) portuguesas. *Biología Vegetal/ ETSI. Agrónomos (UPM)*
- Dávila, M. M. A. Castillo, H. Laurentin (2007).** Uso de marcadores moleculares ISSR para inferir las relaciones genéticas y la variabilidad intraespecífico en *Agave*. *Rev. Fac. Agron. (Maracay)* 33:93-111.
- De la Loma, J.L. (1979).** Genética General y Aplicada Ed. UTEHA. pp 248-260
- Doebley, J. F., M. M. Goodman y C. W. Stuber. (1984).** Isozymatic variation in *Zea (Graminea)* *Sist. Bot.* 9:203-218
- Gámez, G. (1989).** Correlación de factores químicos y físico-químicos del *Agave tequilana* Weber con fines de selección. Tesis Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía. Universidad de Guadalajara.
- Gentry, H. S. (1982).** Agaves of Continental North America. The University of Arizona Press. Tucson, Arizona. 61, 382-586
- Gil-Vega, K. (1997).** Caracterización genética del *Agave* sp utilizando marcadores moleculares. Tesis de Maestría en Ciencias. CINVESTAV. pp 15

- Gil-Vega, K., M. González C., O. Martínez de la Vega, J. Simpson y G.Vandermark. (2001).** Análisis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. *Euphytica*. 119: 335-341.
- Gil-Vega, K., C. Díaz, A. Nava-Cedillo y J. Simpson. (2006).** AFLP análisis of *Agave tequilana* varieties. *Plant Sci*. 170:904-909.
- González, G., S. Alemán y D. Infante. (2003).** Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes* II: selection among individuals in clonally propagated population. *Plant Sci*. 165: 595-601.
- Goodman, M. M. (1973).** Genetic distances: Measuring dissimilarity among populations. *Yrbk. Phys. Anthropol*. 17:1-38.
- Goodman, M. M. y R. Mc Bird. (1977).** The races of maize IV: Tentative grouping of 219 Latin American Races. *Econ. Bot*. 31:204-221.
- Granados, D. (1993).** Los Agaves en México. Universidad Autónoma Chapingo. (ISBN 968-884-225-7). pp 99-114
- Gutiérrez, R M del S. (2002).** Los Agaves de Jalisco http://www.cucba.udg.mx/new/informacionacademica/coaxican/plts_mex/agave_jal.htm
- Hartmann, T y Kester D (1985).** Propagación de plantas, principios y prácticas, Editorial CECSA, S.A. pp (238-261).
- Hernández, V. G., E. P. Flores-Berrios y M. J. Cházaro B. (2007).** Los agaves de Jalisco, México: Análisis de relaciones genéticas mediante marcadores AFLP. *In*: Vázquez-García, J. A., M. J. Cházarp B., G. Hernandez V., E. P. Flores-Berrios y Y. L. Vargas-Rodríguez (Eds). *Agaves de occidente de México. Serie Fronteras de Biodiversidad. Universidad de Guadalajara.* pp. 92-99.
- Hussein, M. A., A. Bojorustad, A. H. Aastveit, T. Berg (2001).** BARTTEST. A SAS program for Bartlett test on equality of variances. Institutt for Plantefag, Agricultural University of Norway (en línea). Disponible en <http://www.nlh.no/ipf/publikasjoner/hussein/>(revisado el 15 de marzo del 2001).
- Infante, D., G. González, L. Peraza-Echeverría y M. Keb-Llanes. (2003).** Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes*. *Plant Sci*. 164: 223-230.

- Johnson, E., J. Romero-Severson, C. Astorga, F. Casanoves, S. Jackson, J.L. Ortiz, O. Quiroz y J. Stuart. (2004).** Applications of Molecular Tools in Agricultural and Forestry Sciences. Costa Rica. CATIE-Purdue University. 150 p.
- Kato, Y. A. (1984).** Chromosome morphology and the origin of maize and its races. In: Evolutionary Biology, Vol. 17. M.K Hecht. B. Wallace, G. T. Prance (eds). Plenum Pub. pp.: 219-253.
- Keb-Llanes, M., G González, B chi Manzanero, D Infante (2002)** A rapid and simple method for small-scale DNA extraction in *Agavaceae* and other tropical plants. Plant Mol. Biol. Rev. 20:229a-229e.
- Lightbourn, G. y R. Veilleux. (2003).** Retrotransposon based markers to characterize somatic hybrids and assess variation induced by protoplast fusión of monoploid potato. Act. Hort. 619.
- Macedo, E M (1950).** Manual del Magueyero 1ª Edición, Ediciones Agrícolas, México, D.F. pp (13-14).
- Matsuoka, Y., Y. Vigouroux, M., M. M. Goodman, J. Sánchez G., E. Bucker y J. Doebley. (2002).** A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 99: 6080-6084.
- Mohr, M. G. (1999).**"Blue Agave and its Importance in the Tequila Industry"*Etnobotanical Leaflets*.<http://www.siu.edu/eb/leaflets/agave.htm>
- Morales, R. M. M., J. Ron P., J. J. Sánchez G., J. L. Ramírez D., L. De la Cruz L., S. Mena M., S. Hurtado de la Peña y M. Chuela B. (2007).** Relaciones fenotípicas y heterosis entre híbridos comerciales y germoplasma exótico de maíz en Jalisco, México. Rev. Fitotec. Mex. 30(3): 285-294.
- Morrison, D. F. (1978).**Multivariate Statistical Methods. 2nd. Edition McGraw Hill. USA. 415 p.
- Navarro-Quezada, A., R. González-Chauvet, F. Molina-Freaner y L.E. Eguiarte. (2003).** Genetic Differentiation in the *Agave deserti* (*Agavaceae*) complex of the Sonoran desert. Heredity 90:220-227.

- Osorio, M., D. Infante y S. Molina. (2006).** Estudio de la variabilidad genética asexual en *Agave coui* Trelease, mediante el uso de marcadores moleculares. Bol. Nakari. 17(1) 1-7. Edición digital.
- Pimienta-Barrios, E., J. Zañudo H., J. García G., y P.S. Novel (2006).** Ecofisiología del Agave azul. Universidad de Guadalajara (ISBN 970-27-0909-1) pp17-19.
- Poehlman, J.M. (1981).** Mejoramiento Genético de las Cosechas. Editorial LIMUSA, México. pp 41- 43.
- Provan, J., P. Lawrence, G. Young, F. Wright, R. Bird, G. Paglia, F. Cattonaro, M. Morgante y W. Powel. (1999).** Analysis of the genus *Zea* (Poaceae) using polymorphic chloroplast simple sequence repeats. Plant Syst. Evol. 218: 245-256.
- Rawlings, J. O. (1988).** Applied Regression Analysis. Wadsworth & Brooks /Cole Advanced Books & software. Pacific grove, California. 553 p.
- Rhode, W. (1996).** Inverse sequence tagged repeat (ISTR) analysis, a novel and universal PCR based technique for genome analysis in plant and animal kingdom. Journal of Botany. 89:312-326.
- Rodríguez, B. M. M. (2007).** Análisis de la diversidad fenotípica de murta (*Ugni molinae* Tucz) a través de métodos multivariados. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Austral de Chile. Valdivia. 191 p.
- Rohlf, (1993).** NTSYS-PC. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter software, Inc.
- Ruvalcaba y A. Rodríguez-García. (2007).** Variabilidad de *Agave tequilana* Weber variedad azul encontrada en micropropagación y su exploración a nivel molecular. Bol. Nakari 18 (1): 3-5.
- Sambrook, J.; Fritsch, Ef and Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: a laboratory manual* . 2nd ed. NY, Frío Spring Harbor Laboratory, Frío Spring Harbor Laboratory Press,. 1659 p. ISBN 0-87969-309-6.
- Sánchez, G. J. J. y M. M. Goodman. (1992).** Relationships among the mexican races of maize. Econ. Bot. 46: 78-85.
- Sánchez, G. J. J., C. W. Stuber y M. M. Goodman. (2000).** Isozymatic diversity in races of maize of the Americas. Maydica 45: 185: 203.

- Sánchez, G. J. J (1995).** El análisis biplot en clasificación. *Rev. Fit. Mex.* 18:188-203.
- Sánchez, G. J. J (2005).** Manejo de Recursos Fitogenéticos. Inédito.
- SAS Institute (1994).** The SAS System for Windows. SAS Institute Inc. Cary, NC 27513, USA.
- Sorrells, M. E. (1998).** Marker Assisted Selection: Is it Practical?. In: Internacional Workshop on the Application of Biotechnologies to Wheat Breeding. Eds: Dr. Mohan Kolhi and INIA La Estanzuela.
- Stuber, C. W, M Polacco, and M.L. Senior. (1999).** Synergy of Empirical Breeding, Marker Assisted Selection, and Genomics to Increase Crop Yield Potencial. *Crop Sci.* 39: 1571.
- Torres-Morán, M. I. (2005).** Evaluación de diferentes fuentes y niveles de nitrógeno y calcio en plantas de *Agave tequilana* Weber variedad azul, *in vitro* y en invernadero. Tesis Maestría en Ciencias Agrícolas y Forestales. Universidad de Guadalajara. p. 66.
- Torres-Morán, M.I., D. Infante, J.J. Sánchez-González, M.M. Morales-Rivera y A. Santerre. (2005a).** Diversidad genética en *Agave tequilana* Weber var. Azul proveniente de micropropagación. *Bol. Nakari* 16. Edición digital.
- Torres-Morán, M. I., M. Morales-Rivera, L. De la Cruz Larios y A. Villalobos A. (2006).** Identificación de polimorfismo entre hijuelos y plantas micropropagadas de *Agave tequilana* y *Agave cocui* usando ISTRs. *Scientia-CUCBA* 8(2): 207-216.
- Torres-Morán, M. I., M. M. Morales-Rivera, R. Nuño-Romero, F. Santacruz-Ruvalcaba y A. Rodríguez-García. (2007).** Variabilidad de *Agave tequilana* Weber variedad azul encontrada en micropropagación y su exploración a nivel molecular. *Bol. Nakari* 18 (1): 3-5.
- Valenzuela, Z. A. G. (1992).** Fertilización en plantaciones jóvenes de *Agave Tequilero (Agave tequilana* Weber). Tesis de Maestría en Manejo de Áreas de Temporal. Escuela de Graduados. Universidad de Guadalajara.
- Valenzuela, Z. A. G. (1997).** El *Agave tequilero*: su cultivo e industria. 2nd. Ed. Monsanto Press, St Louis.

Vargas-Ponce, O., D. Zizumbo-Villareal y P. Colunga-García Marín. (2007). In situ Diversity and maintenance of traditional *Agave* landraces used in spirits production in West-Central México, *Econ. Bot.* 61:362-375.