

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL UNIDAD OAXACA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y
APROVECHAMIENTO DE LOS RECURSOS NATURALES**

(Patrones y Procesos para la Biodiversidad del Neotrópico)

**Variabilidad genética y cuantificación genómica en especies
del complejo *Agave potatorum* basado en marcadores
morfológicos y citométricos**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

Elí Secundino Porras Ramírez

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Aroldo Cisneros Peña

Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca.

Julio 2017



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca siendo las 14:00 horas del día 16 del mes de Junio del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR OAXACA para examinar la tesis titulada:

Variabilidad genética y cuantificación genómica en especies del complejo *Agave potatorum* basado en marcadores morfológicos y citométricos

Presentada por el alumno:

Porras Ramírez
 Apellido paterno Apellido materno
 Nombre(s) El Secundino

Con registro:

B	1	5	0	5	1	0
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de tesis

Dr. Aroldo Cisneros Aroldo

Dr. John Newhall Williams

Dr. Matthias Rös

Dra. Elvira Durán Medina

Dr. Gustavo Hinojosa Arango

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
 DE INVESTIGACIÓN PARA EL
 DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
 CIIDIR
 UNIDAD OAXACA
 IPN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 26 del mes de mayo del año 2017, el (la) que suscribe PORRAS RAMÍREZ ELI SECUNDINO alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES, con número de registro B150510, adscrito(a) al **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca**, manifiesto(a) que es el (la) autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del (de la, de los) **Dr. Aroldo Cisneros Peña** y cede los derechos del trabajo titulado Variabilidad genética y cuantificación genómica en especies del complejo *Agave potatorum* basado en marcadores morfológicos y citométricos, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del (de la) autor(a) y/o director(es) del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones posgradoox@hotmail.com ó elisekundino@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

PORRAS RAMÍREZ ELI SECUNDINO
Nombre y firma del alumno(a)



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
I.P.N.

AGRADECIMIENTOS

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico mediante la concesión de una beca para estudios de posgrado del programa de formación de profesionales altamente calificados del Programa Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC), y a la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) por el financiamiento parcial de esta investigación titulada “Variabilidad genética y cuantificación genómica en especies del complejo *Agave potatorum* basado en marcadores morfológicos y citométricos” derivado de proyecto SIP con clave “SIP-20150235”.*

Al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) IPN Unidad Oaxaca por brindarme las facilidades de realizar mis estudios de posgrado en el programa de Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales.

Al director de Tesis Dr. Aroldo Cisneros Peña, gracias por ofrecerme la investigación, por el apoyo y el tiempo brindado para la realización de la misma.

A los revisores de esta tesis quienes con sus observaciones objetivas hicieron de este trabajo un mejor aporte para la sociedad, quien es a la que le debemos

A cada uno de los profesores de la Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales, por sus enseñanzas durante mi formación como Maestro en Ciencias.

A las personas de las comunidades muestreadas que siempre tuvieron toda la disponibilidad para ayudarme en la realización de este trabajo.

A mis padres Jesús Porras Arango y Sabina Ramírez Pacheco quienes me apoyaron en cada momento de este camino con sus consejos de esfuerzo y superación

A mi novia Yazmín Sosa Marcos por su apoyo incondicional

A amigos y familiares (Miguel, Dulce, Iginio, José, Georgina, Alan, Klayber, Katia...) por su compañía en los recorridos de campo

Índice general

Índice general.....	I
Índice de Tablas.....	III
Índice de Figuras.....	IV
Resumen.....	1
Abstract.....	3
1. Introducción.....	5
2. Revisión de literatura.....	9
2.1 Clasificación taxonómica del género <i>Agave</i>	9
2.2 Complejo <i>Agave potatorum</i> (García-Mendoza).....	9
2.2.1 <i>Agave potatorum</i>	9
2.2.2 <i>Agave nussaviorum</i>	10
2.2.3 <i>Agave nussaviorum</i> subsp. <i>deltoidea</i>	11
2.2.4 <i>Agave seemanniana</i>	11
2.3 Grupo hermano del complejo: <i>Agave karwinskii</i>	12
2.4 Variabilidad fenotípica en agaves.....	13
2.4.1 Estomas en el género <i>Agave</i>	14
3. Hipótesis.....	18
4. Objetivos.....	19
4.1 Objetivo general.....	19
4.2 Objetivos específicos.....	19
5. Materiales y Métodos.....	20
5.1 Área de estudio.....	20
5.2 Colecta e identificación de los individuos.....	21
5.3 Número de muestras por especie.....	22
5.4 Trabajo de laboratorio.....	23
5.4.1 Análisis de citometría de flujo (FCM) y de la ploidía.....	23
5.5 Índice, densidad y tamaño estomático.....	24
5.6 Análisis de datos.....	25
5.6.1 Análisis e identificación de los individuos.....	25
6. Resultados.....	27
6.1 Identificación de individuos de las diferentes especies.....	27

6.2 Variables fenotípicas.....	29
6.3 Caracteres fenotípicos de mayor importancia.....	31
6.4 Relaciones filogenéticas inter e intraespecíficas.....	34
6.5 Relación entre variables y especies.....	36
6.6 Índice, tamaño y densidad estomática.....	37
6.7 Citometría de flujo y nivel de ploidía.....	38
7. Discusión.....	41
7.1 Identificación morfológica y de campo del complejo <i>A. potatorum</i>	41
7.2 Variación fenotípica.....	43
7.2.1 Caracteres fenotípicos de mayor importancia.....	46
7.2.2 Características fenotípicas de clasificación de las especies.....	47
7.3 Caracterización de la lámina foliar.....	48
7.4 Variación del tamaño del genoma y nivel de ploidia.....	48
8. Conclusiones.....	51
9. Revisión de literatura.....	53
10. Anexos.....	61

Índice de Tablas

	Título	Pág.
Tabla 1.	Variables fenotípicas evaluadas en las especies de <i>Agave</i>	26
Tabla 2.	Especies de <i>Agave</i> con nombres científicos y comunes con los que fueron identificados y evaluados a diferentes altitudes en Maguey Largo en el estado de Oaxaca, México (Porrás-Ramírez et al., 2016)	28
Tabla 3.	Varianza total explicada de cada valor propio (componentes).....	33
Tabla 4.	Valores propios de los tres componentes de las características cuantitativas evaluadas en las cuatro especies de <i>Agave</i> en la región de Maguey Largo Oaxaca, México.....	33
Tabla 5.	Matriz de correlación de trece características evaluadas en cuatro especies de <i>Agave</i> bajo condiciones silvestres en la región de Maguey Largo Oaxaca, México. En negritas se resaltan las correlaciones estadísticamente significativas.....	34
Tabla 6.	Cuantificación de estomas en las láminas foliares del complejo <i>Agave potatorum</i>	38
Tabla 7.	Contenido de ADN nuclear 2C, tamaño del genoma monoploide y estimación de la ploidía en especies de <i>Agave</i> bajo condiciones de cultivo silvestre y semi-silvestre en la región de Maguey Largo.....	39

Índice de Figuras

	Título	Pág.
Figura 1.	Distribución del complejo <i>Agave potatorum</i> (García-Mendoza, 2010).....	12
Figura 2.	Especies del complejo <i>Agave potatorum</i> en la Agencia de Maguey Largo. A) <i>Agave seemanniana</i> , B) <i>A. nussaviorum</i> y C) <i>Agave potatorum</i> y grupo hermano D) <i>A. karwinskii</i>	28
Figura 3.	Comparación del porte de las especies del complejo <i>Agave potatorum</i> en la Agencia de Maguey Largo y <i>A. karwinskii</i> como grupo hermano.....	29
Figura 4.	Variables características para diferenciar las tres especies del complejo <i>Agave potatorum</i>	30
Figura 5.	Gráfico del análisis de componentes principales (ACP) de las trece variables fenotípicas evaluadas en cuatro especies de <i>Agave</i> bajo condiciones silvestres en la región de Maguey Largo. El análisis de los factores de extracción del ACP se realizó por el método de Pearson (n).....	32
Figura 6.	Dendograma de las tres especies del complejo <i>A. potatorum</i> (<i>A. nussaviorum</i> , <i>A. potatorum</i> y <i>A. seemanniana</i>) y una especie como grupo hermano (<i>A. karwinskii</i>), construido con la Clusterización Aglomerativa Jerárquica (CAJ) de distancias genéticas basadas en el coeficiente de correlación de Pearson utilizando el método de aglomeración de promedio no ponderado par-grupo que muestra las relaciones entre ellas. Las distancias genéticas se basaron en las trece características fenotípicas evaluadas.....	35
Figura 7.	Análisis cluster de la variación intra e interespecífica de cuatro especies de <i>Agave</i> de la localidad de Maguey Largo. Apo(<i>A. potatorum</i>), Anu (<i>A. nussaviorum</i>), Asee (<i>A. seemanniana</i>) y Akar (<i>A. karwinskii</i>).....	36
Figura 8.	Análisis de agrupamiento jerárquico que muestra las relaciones y significación entre las especies de <i>Agave</i> y las características fenotípicas evaluadas en la región de Maguey Largo. Las características significan: AH (Ancho de la Hoja), LET (Longitud de la Espina Terminal), RLHAH (Relación entre la Longitud y Ancho de Hoja), LEL (Longitud de la Espina Lateral), DET (Diámetro de la Espina Terminal), EH (Espesor de la hoja "D"), EIE (Espacio Interespinas), RDPAP (Relación entre el Diámetro y Altura de la Planta), NH (Número de Hojas), LH (Longitud de la Hoja "D"), NE (Número de Espinas), AP (Altura de la Planta) y DP (Diámetro de la Planta).....	37
Figura 9.	Fluorescencia relativa de las especies de <i>Agave</i> pertenecientes al complejo "Tobala" y especie de comparación creciendo bajo condiciones silvestres (A) <i>Agave nussaviorum</i> subsp. <i>nussaviorum</i> (B) <i>A. potatorum</i> , (C) <i>A. seemanniana</i> y (D) <i>A. karwinskii</i>	39

Resumen

La caracterización morfológica y molecular de las especies silvestres es un paso inicial importante en la selección de rasgos para el aprovechamiento y domesticación agronómica, lo mismo ocurre con proyectos diseñados para la conservación. El objetivo de este trabajo fue determinar la diversidad genética intra e interespecífica del complejo *Agave potatorum* (García-Mendoza) con el empleo de marcadores morfológicos y citométricos, para lo cual fue necesario implementar la fenotipificación y la citometría de flujo, para la determinación del contenido de ADN nuclear y nivel de ploidía. Se evaluaron once características morfológicas distintivas reportadas en la literatura para los agaves. Para la caracterización fenotípica se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP), árboles filogenéticos y análisis de correlación utilizando como grupo hermano la especie de *Agave karwinskii*. Se midieron y cuantificaron los estomas de las láminas foliares de las cuatro especies (*Agave potatorum*, *A. seemanniana*, *A. nussaviorum* y *A. karwinskii*) por su parte abaxial y adaxial para obtener la densidad estomática, índice estomático y tamaño de estomas; se realizó un ANOVA para ver si existían diferencias significativas en estos valores entre especies y entre láminas foliares. Finalmente se realizó la cuantificación del contenido de ADN nuclear y la estimación del nivel de ploidía mediante la citometría de flujo con *Pisum sativum* como estándar externo. En el mismo sitio de estudio y en forma silvestre, se encontraron las especies de *A. karwinskii* y las tres especies del complejo: *Agave potatorum* Zucc., *A. seemanniana* García-Mend. y *A. nussaviorum* subsp. *nussaviorum* García-Mend., con la excepción de la subespecie *Agave nussaviorum* subsp. *deltoidea* que no se registró su presencia en el área de estudio. Los valores de los dos primeros componentes (F1= 46.13 y F2= 33.99) principales explicaron

más del 80% de la varianza morfológica total. El dendograma de agrupamiento aglomerativo jerárquico (CAJ) mostró similitud entre las especies del complejo, dividiéndolas en dos grupos hermanos: el primer grupo estuvo formado por *Agave nussaviorum* y *A. potatorum*, y el segundo fue por *A. seemanniana*. Mientras que, la especie *A. karwinskii* mostro distancia genética conforme a su función de especie alejada de la raíz o “outgroup”. El análisis de ANOVA no mostró diferencia significativa para ninguna de las variables estomáticas analizadas entre especies, lo mismo ocurrió entre las superficies de las láminas foliares. Las cuatro especies resultaron ser diploides, dentro del complejo la variación del contenido de ADN fue en un rango de 7.33 pg/2C en *A. nussaviorum* a 7.90 pg/2C en *A. seemanniana*. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren cierto grado de variabilidad genética expresada en las características morfológicas y citométricas de los agaves pertenecientes a este complejo en Oaxaca los cuales pueden ser utilizados en futuros estudios moleculares, domesticación y recuperación de poblaciones reducidas.

Palabras clave Fenotipo, ADN, Estomas

Abstract

Morphological and molecular characterization of wild species is an important initial step not only for the selection of traits for agronomic harvesting and domestication, but also for conservation projects. The objective of this work was to determine the intra and interspecific genetic diversity of the *Agave potatorum* complex (García-Mendoza) by using flow cytometry for the determination of nuclear DNA content and ploidy level and phenotyping. For the phenotypic characterization, we conducted a Principal Component Analysis (PCA), constructed phylogenetic trees and run correlation analyzes using as a sibling group *Agave karwinskii*. The stomata of the leaf blades of the four species (*Agave potatorum*, *A. seemanniana*, *A. nussaviorum* y *A. karwinskii*) were measured and quantified by their abaxial and adaxial part to obtain the stomatal density, stomatal index and stomatal size; an ANOVA was performed to see if there were significant differences in these values between species and between leaflets (abaxial and adaxial). Finally, flow cytometry was applied to know the level of ploidia and content of nuclear DNA. *A. karwinskii* and the three species (with the exception of the subspecies *Agave nussaviorum* subsp *deltoidea*) were found in the study area: *Agave potatorum* Zucc., *A. seemanniana* García-Mend. And *A. nussaviorum* subsp. *nussaviorum* García-Mend. The values of the first two main components (F1= 46.13 and F2= 33.99) accounted for more than 80% of the total morphological variance. The hierarchical agglomerative clustering dendrogram (CAJ) showed a high similarity between the species of the complex, dividing them into two groups: group one were conformed by *Agave nussaviorum* and *A. potatorum*, while group two one *A. seemanniana*. *A. karwinskii* formed third group or external group. In the ANOVA, no significant difference was found for any stomatal variables analyzed between

species, the same occurred between the leaf blade surfaces. The four species turned out to be diploid, within the complex the variation of the DNA content was in a range of 7.33 pg / 2C in *A. nussaviorum* at 7.90 pg / 2C in *A. seemanniana*. The results obtained in this work suggest a certain degree of genetic variability expressed in the morphological and cytometric characteristics of the agaves belonging to this complex in Oaxaca which can be used in future molecular studies, domestication and recovery of diminished populations.

1. Introducción

Los agaves se encuentran prácticamente en todo México, son endémicos del continente americano y se distribuyen desde la parte sur de los Estados Unidos de Norteamérica hasta Colombia y Venezuela, la mayor riqueza se encuentra en las zonas áridas, semiáridas y templadas, se pueden encontrar a altitudes que van desde el nivel del mar hasta un máximo de 3000 msnm (García-Mendoza, 2011). Por la gran diversidad de agaves que tiene, México es considerado centro de origen de este género ya que existe una gran variabilidad morfológica silvestre y de domesticación ligada a la variedad de climas, ambientes y mejoramiento tradicional, existen alrededor de 200 especies para este género (García-Mendoza, 2002), de las cuales un 75% se distribuye en este país. Para el caso específico de Oaxaca García *et al.* (2004; 2007) indican que existen 37 especies registradas para este estado, de estas, siete son endémicas, la zona con mayor número de especies es la provincia Tehuacán-Cuicatlán con 15 especies.

Eguiarte y Souza (2007) señalan que estas especies son las más representativas de la diversidad característica de México, cuentan con un alto nivel fitogenético en las zonas de menor diversidad y mayor pobreza económica. Tienen una gran importancia en el entorno ecológico ya que forman parte del alimento de algunos murciélagos, abejas y colibríes; de la misma manera forman parte de refugios para pequeños mamíferos, aves y reptiles. Dentro de las monocotiledóneas, son primordiales para evitar la erosión del suelo, además de contribuir en el aporte de materia orgánica, al mismo tiempo de contar con un muy bajo nivel de requerimientos hídricos. Esta diversidad de agaves es relativamente grande en comparación con los géneros de esta misma subfamilia (Agavoideae), y ha sido utilizada ampliamente en la producción de una gran cantidad de fibras, bebidas

alcohólicas, material para construcción, así como insumos para la cocina tradicional, resultando en un gran valor económico y cultural (Abraham *et al.*, 2009).

En Oaxaca se reconocía una sola especie de *Agave* hasta 2010, *Agave potatorum* (García-Mendoza, 2010). En este año García-Mendoza separa y reubica a este taxón en dos especies, además de describir a una nueva especie para la ciencia, la denomina *A. nussaviorum* (con dos subespecies, *A. nussaviorum* subsp. *nussaviorum* y *A. nussaviorum* subsp. *deltoidea*) y conserva el taxón con el nombre original, *Agave potatorum*. Para realizar lo anterior comparó esta diversidad de formas con *A. seemanniana* y conforma así el llamado complejo *A. potatorum*.

El conocimiento genético de la mayoría de las especies endémicas para México es escaso. Para determinar y cuantificar la variabilidad del complejo antes mencionado se utilizaron los marcadores morfológicos (utilizando dentro de estos caracteres de porte de la planta, hojas, espinas y estomas) y citométricos estableciendo con estos las relaciones genéticas que existen en una misma región geográfica. En Oaxaca se han realizado pocas investigaciones con ambos marcadores para el género *Agave*, por este motivo se pretende aportar conocimiento a estos campos de estudio dando a conocer así parte de la gran diversidad genética.

Los análisis moleculares para determinación e identificación de especies están desplazando a los marcadores morfológicos. Sin embargo, los análisis cuantitativos y

cualitativos con marcadores morfológicos han sido y siguen siendo de gran importancia para determinar variedades de especies cultivadas, coincidiendo la gran mayoría de estos estudios con el conocimiento ancestral de las comunidades, determinando así los diferentes fenotipos para una misma especie. Así mismo, estos marcadores morfológicos aún se continúan utilizando en estudios paleontológicos en la caracterización de especies animales y plantas que se han extinguido, obteniendo de fósiles caracteres a analizar y contribuyendo con esto principalmente a los campos de la cladística y evolución (Caracuel *et al.*, 2002; Menegaz *et al.*, 1889).

Los estudios de los estomas en las láminas foliares de las plantas han sido aplicados para el conocimiento de asimilación de clorofila, índice y densidad estomática que están estrechamente relacionados con las condiciones ambientales y nutricionales (Roth *et al.*, 1986). Es una premisa que todas las especies de *Agave* hasta ahora estudiadas son anfiestomáticas, lo que significa que tienen estomas en la parte adaxial (haz) y abaxial (envés), característica representativa en especies que se desarrollan en climas secos. La asimilación de la clorofila está estrechamente influenciada por la distribución y número de estomas en la lámina foliar, además de la ubicación de estos a lo largo de la hoja. La transpiración e intensidad de respiración se relacionan directamente con el número de estomas en apertura (Sosa del Castillo *et al.*, 2014; Arroyo *et al.*, 2008).

La citometría de flujo es una técnica analítica que permite visualizar las características físicas, así como químicas de células o moléculas suspendidas en un líquido, que al pasar de forma individual por un conducto e interferir en la trayectoria de

un haz de luz producen una difracción o señal de luz de forma individual, la cual es característica y cuantificable (Barrera et al., 2004). En botánica es poco utilizada a comparación de la medicina, sin embargo, esta herramienta es rápida y precisa para estudios de estimación, composición, diversidad genética intra e interpoblacional y poliploidia (Palomino et al., 2005).

El complejo *Agave potatorum* actualmente se encuentra en extracción desmedida de sus poblaciones silvestres en los estados de Puebla (Región Mixteca) y principalmente en Oaxaca (en la Región de los Valles Centrales) para la producción de mezcal debido a la alta demanda de este producto a nivel nacional e internacional. Es una planta que difícilmente produce bulbillos o hijuelos estoloníferos (a diferencia de otros agaves), restringiéndose su reproducción únicamente por medio de semillas, facilitando esto su rápida desaparición de los ecosistemas donde se encuentra presente (Aguirre-Dugua, 2012; Delgado-Lemus, 2014; García-Mendoza, 2010).

Hasta ahora hay pocos estudios de fenotipificación en Oaxaca, los referentes a la citometría de flujo son aún mucho menores, por lo cual esta tesis pretende utilizar nuevas tecnologías para aportar conocimiento de los caracteres morfológicos y citométricos de referencia para estas especies de gran valor ecológico, económico y cultural.

2. Revisión de literatura

2.1 Clasificación taxonómica del género *Agave*

El género *Agave* pertenece a la subfamilia Agavoide, la cual está integrada dentro de la familia Asparagaceae, esta ha sufrido algunas modificaciones en sus clasificaciones. De 1998 a 2009, de acuerdo a las clasificaciones de la APG I y II (Angiosperm Phylogeny Group) el género *Agave* fue considerado dentro de la familia Agavaceae (APG, 2002). En 2010, con la implementación de la clasificación APG III basada en secuencias moleculares de ADN la familia Agavaceae fue removida y desaparecida de la lista de familias, con esto el género *Agave* pasó a ser miembro de la familia Asparagaceae dentro de la subfamilia Agavoide (Chase et al., 2009). En la figura 1 se muestran las características generales de distribución de las especies de este complejo.

2.2 Complejo *Agave potatorum* (García-Mendoza)

El complejo fue descrito por García-Mendoza (2010) y se compone de tres especies, una de estas se divide en dos subespecies; *Agave potatorum*, *A. seemanniana*, *A. nussaviorum* subsp. *nussaviorum* y *A. nussaviorum* subsp. *deltoidea*.

2.2.1 *Agave potatorum*

Hábitat y distribución: Se desarrolla en lugares planos o pendientes poco pronunciadas, en suelos con arenas nacidas de roca caliza, entre los 1300 a 2400 msnm.

Se encuentra en el matorral Xerófilo con *Quercus* y selvas bajas caducifolias, además de climas áridos y semiáridos de los estados de Oaxaca y Puebla (García-Mendoza, 2010).

Se ha ocupado prácticamente para la producción de mezcal. Es particular su tamaño pequeño y compacto acompañado de un gran número de hojas, es de plasticidad marcada ya que tuvieron que pasar muchos años para definir y separar los taxones en un complejo en lugar de formar parte de una sola especie (García-Mendoza, 2010).

2.2.2 *Agave nussaviorum*

Hábitat y distribución: Se desarrolla en la Mixteca alta en el estado de Oaxaca, en clima templado, en lugares sin laderas o pendientes pronunciadas que están entre los 1700 y 2500 msnm. Se encuentra en el bosque de *Quercus-Pinus* a la vez con *Juniperus*.

Los usos conocidos hasta ahora son los reportados por García-Mendoza (2010) y López (2008), quienes mencionan usos derivados del conocimiento Mixteco, como alimento (las flores son utilizadas como forraje para animales o cocidas y mezcladas con el maíz para hacer tortillas, el quiote se consume como alimento humano y es considerado una delicia culinaria), medicina (el jugo de las hojas se emplea para coágulos sanguíneos y la diabetes; las hojas semi-horneadas directamente al fuego sirven para golpes o caídas de animales) y construcción (el quiote en las casas).

2.2.3 *Agave nussaviorum* subsp. *deltoidea*

Hábitat y distribución: Se desarrolla en lugares pedregosos de rocas ígneas, en altitudes que van de los 2400-2600 msnm; así mismo forma parte del matorral rosetófilo de la localidad tipo (Distrito de Teposcolula, municipio de San Pedro Nopala, en cerro La Peña del Tigre) y las circunvecinas a esta. Como el nombre de la subespecie lo indica se diferencia de la subespecie tipo por la forma de las hojas deltoides según García-Mendoza (2010),

2.2.4 *Agave seemanniana*

Hábitat y distribución: Se desarrolla en pendientes pronunciadas, entre los 700 y 1700 msnm, se localiza en la selva baja caducifolia, principalmente en el ecotono con el bosque de pino-encino (García-Mendoza, 2010). La característica principal que diferencia a esta especie en comparación con las dos antes mencionadas es que su roseta es grande, de alrededor de un metro de alto, es abierta y tiene pocas hojas en comparación con *Agave potatorum*.

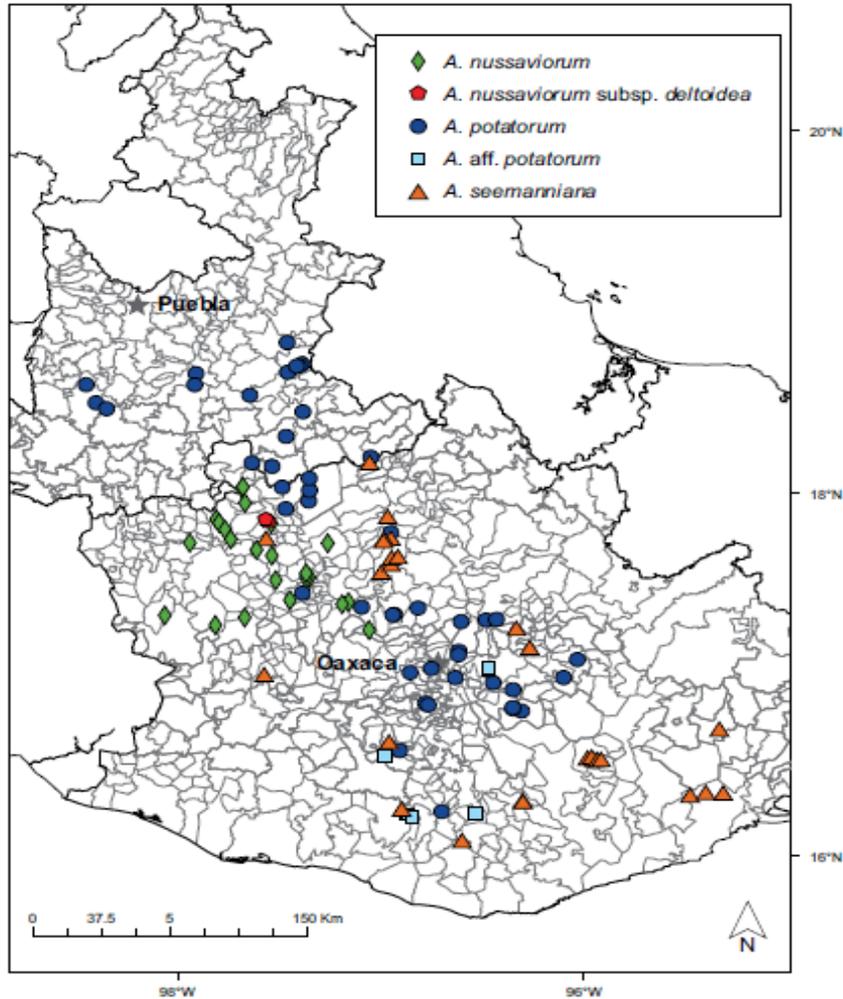


Figura 1. Distribución del complejo *Agave potatorum* (García-Mendoza, 2010)

2.3 Grupo hermano del complejo: *Agave karwinskii*

Hábitat y distribución: *Agave karwinskii* Zucc. se distribuye mayormente en las zonas cercanas al Valle de Tehuacán y la gran mayoría de las comunidades de la región de los Valles Centrales en Oaxaca, en suelos rocosos con selva baja caducifolia a altitudes que van desde los 1500 hasta los 2300 msnm. Sus principales usos son para la producción de mezcal, fibras o ixtle, además de ser plantas de gran altura ocupadas como ornamentos

en jardines y finalmente el quiote (escapo) es utilizado en la construcción de techados o dinteles de las casas (Gentry, 1982).

2.4 Variabilidad fenotípica en agaves

En el caso específico del género *Agave* Mora-López *et al.* (2011) estudiaron la variabilidad morfológica de 62 ejemplares de la sección *Salmaniae*, con el objetivo de identificar la humanización de estas. Con un análisis de componentes principales (ACP) encontraron las variables morfológicas que explicaban con mayor claridad las diferencias de humanización (altura y diámetro de la roseta, también la longitud, número y distancia entre dientes). Con esto identificaron cuatro especies, una subespecie y tres variedades.

Así mismo, las características fenotípicas han servido para correlacionar individuos con su cariotipo, ya que existe una estrecha relación. Flores-Maya *et al.* (2010) señalan que las características cariológicas de *Agave karwinskii* Zucc. y *Agave macroacantha* Zucc. están estrechamente relacionadas con su fenotipo.

Parker *et al.* 2014 realizaron un estudio de variables fenotípicas en seis poblaciones desconocidas de *Agave parryi* var. *huachaensis*, comparándolas con 17 poblaciones de *Agave parryi* previamente determinadas, para establecer si estos caracteres estaban influenciados por la forma de vida silvestre o cultivada de civilizaciones precolombinas. Encontraron que toda la morfología variaba en cierto grado, de manera más significativa en la variedad, además el carácter más explicativo para diferenciar las poblaciones silvestres de las manejadas fue el espacio inter-espinas con mayor variación inter-

poblacional. El único carácter que no cambió significativamente en todas las poblaciones fue el grosor de las hojas. Demostrando con esto que las poblaciones con menor variación de formas coinciden con puntos de humanización y establecimiento de comunidades precolombinas. Además, obtuvieron poblaciones poco diversificadas, catalogándolas como potenciales puntos de búsqueda arqueológica. Los cambios morfológicos fueron muy pronunciados en reducción o variación de formas en los valles o partes bajas de Arizona, lugares aptos para el establecimiento de poblaciones antropogénicas y con esto el manejo de especies de *Agave*.

León *et al.* 2013, en un estudio de diversidad determinaron la variación morfológica en cinco especies de *Agave* (dos variedades de *Agave karwinskii*, *A. potatorum*, *A. marmorata*, *A. americana* y *A. convallis*) en la comunidad de San Miguel Telquiapam, Ocotlán Oaxaca. En todos los casos las variables con mayor y menor variación fueron el largo de la hoja y el espacio inter-espigas, respectivamente.

2.4.1 Estomas en el género *Agave*

En los agaves se denomina complejo estomático a la conformación de cuatro células epidérmicas (dos células polares y dos laterales) en asociación con las células que conforman el ostiolo u oclusivas, a este arreglo celular se le denomina tetracítico (Gentry y Sauck, 1978).

Sosa del Castillo *et al.* (2014) estudiaron la lámina foliar de una variedad de *Agave fourcroydes* (Sac Ki o henequén blanco) de 5 diferentes orígenes: plantas *in vitro*, hijos de bulbillos en plantas *in vitro*, hijos de rizomas en plantas *in vitro*, hijos de bulbillos de plantas de campo e hijos de rizomas en plantas en campo. Realizaron dos evaluaciones, la primera a los siete meses y la segunda a los 15 meses. Obtuvieron que todas las plantas eran anfiestomáticas con aparato estomático tetracítico; en el primer muestreo (siete meses) observaron una diferencia significativa mayor en el índice estomático solo en las plantas provenientes de cultivo *in vitro* comparando ambas superficies de la hoja, en el segundo muestreo (15 meses) en ambas superficies se encontraron aumentos en los índices estomáticos para cuatro de los cinco orígenes de las plantas, excepto para las plantas de cultivo *in vitro* que fueron significativamente inferiores, relacionaron estos sucesos con los cambios de radiación entre muestreos. Con este trabajo comprobaron que el índice estomático estuvo influenciado por el origen del material, ya que las diferencias más marcadas fueron en el material *in vitro*.

Otro estudio realizado por Hernández (2005) seleccionó plantas jóvenes y adultas (1 y 5 años, respectivamente) de *Agave tequilana*, en cada una de estas dos categorías seleccionó a su vez cinco plantas que estuvieran sanas y cinco enfermas, de estas obtuvo muestras en la parte media de las hojas para el análisis de la lámina foliar. Encontró que los estomas se presentaron en ambas partes de las hojas con el característico arreglo tetracístico. Con el análisis estadístico demostró que la edad es altamente significativa para la densidad estomática, con 100 y 99 estomas por milímetro cuadrado en la parte adaxial en plantas adultas que estaban sanas y enfermas respectivamente; mientras que 95 y 91 estomas en la parte abaxial en plantas adultas, sanas y enfermas. Las

plantas jóvenes no presentaron diferencias en sus láminas foliares ni en su estado de salud. Con el índice estomático calcularon como media 6 estomas por cada 100 células epidérmicas, además que la edad resulto altamente significativa para esta variable, también la interacción de la edad-salud-superficie foliar.

Los estudios de citometría de flujo en agaves son relativamente pocos, la mayoría de ellos están enfocados en especies de importancia económica. Palomino *et al.* (2003) analizaron ocho variedades de *A. tequilana*, seis de ellas correspondieron a variedades diploides (lineño, azul listado, azul, moraleño, xiguin y pata de mula), las cuales mostraron un 2.5% de la variación en el contenido 2C-ADN, este fue en un rango de 8.304 pg (picogramos) en la variedad lineño a 8.517 pg en la variedad pata de mula. La variedad bermejo fue triploide con un contenido 2C-ADN de 12.513 pg. La variedad chato presentó tetraploidia y pentaploidia, con un contenido 2C-ADN de 16.01 y 20.11, respectivamente. Con análisis citológicos y cariológicos mencionan que existe una alta relación entre la ploidía y el contenido 2C-ADN de las ocho variedades.

En otro estudio, aplicando la citometría de flujo en *Agave angustifolia* Haw Palomino *et al.* (2005) encontraron un citotipo diploide y uno triploide. El contenido 2C-ADN para los diploides fue de 8.477 pg, para los triploides fue de 12.420 pg.

Moreno-Salazar *et al.* (2007) en un estudio del tamaño y cariotipo del genoma de *Agave angustifolia* y *Agave rodacantha* ratificaron el carácter bimodal de estas dos especies (5 pares de cromosomas largos y 25 pares de cromosomas cortos), además de su diploidía. El tamaño y cariotipo intra e interpoblacional dieron evidencia de especiación

por los re-arreglos existentes en el carácter bimodal de los cromosomas. El contenido nuclear en fase 2C-ADN de *Agave angustifolia* fue de 8.499 pg y de 8.415 pg en *A. rhodacantha*. Determinaron que la longitud total del genoma de *A. rhodacantha* es mayor que el de *A. angustifolia*. Además, obtuvieron que el porcentaje de simetría es más alto en *A. angustifolia*.

En el 2010 Palomino *et al.* realizaron un estudio con citometría de flujo en dos poblaciones de *Agave aktites* Gentry en el estado de Sonora, México (Las Bocas y San Carlos). En este caso estimaron la estructura del cariotipo, así como el tamaño y contenido genómico de la especie antes mencionada. En lo que respecta a contenido de ADN fue extraído de tejido foliar y prácticamente con diferencias observadas en un ANOVA poco significativas ($p= 0.3607$). Las muestras de la localidad de Las Bocas presentaron en promedio 8.408 pg y San Carlos una media de 8.400 indicando que se trata de organismos diploides.

3. Hipótesis

Especies de agave poseen desigual cantidad de ADN nuclear; siendo entonces el nivel de ploidía diferente y específico para cada especie. La similitud genética despliega diferentes asociaciones filogenéticas entre las especies de agave empleadas, permitiendo así el desarrollo de clústeres específicos.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar la diversidad genética y el contenido de ADN nuclear en fase 2C en el complejo *Agave potatorum* (García-Mendoza) mediante el empleo de caracteres fenotípicos y citométricos.

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar la variabilidad fenotípica de las especies del complejo presentes en la comunidad de Maguey Largo mediante clasificadores morfológicos y la caracterización de láminas foliares.
- Cuantificar el contenido de ADN nuclear en las especies de agave colectadas, mediante citometría de flujo para determinar los niveles de ploidia.
- Determinar las relaciones filogenéticas entre las especies de agave bajo estudio mediante los marcadores cito-morfogenéticos

5. Materiales y Métodos

5.1 Área de estudio

Agencia Municipal de “Maguey Largo”

Ubicación geográfica: El área objeto de estudio ocupa el cerro denominado por la comunidad como “Juan Cano” (20 hectáreas). Se encuentra en la Agencia Municipal de Maguey Largo perteneciente al Municipio de San José del Progreso distrito de Ocotlán de Morelos, Oaxaca, México. Forma parte de una porción de la Provincia Sierra Madre del Sur, se encuentra entre los paralelos 16° 41´ y 16° 39´ LN y los meridianos 96° 40´ y 96° 38´ LO; a una altitud entre los 1620 y 2900 msnm (INEGI, 2005).

Hidrología: Pertenece en un 100% a la Región Hidrológica “Costa Chica-Río Verde”, de igual forma a la cuenca Río Atoyac y Subcuenca Río Atoyac-Oaxaca de Juárez. La localidad cuenta con una corriente de agua intermitente del “Río La Garzona” (INEGI, 2005). Enumera en su territorio una presa denominada “El Cuajilote” y pequeños cuerpos y retenes de agua hechos por los lugareños.

Tipos de suelo: El municipio tiene tres tipos de suelos, el territorio de la localidad en estudio se encuentra inmerso en dos de estos, 90% es suelo de tipo lavado y acumulado en partes bajas (luvisol) y el 10% restante pertenece al tipo incipiente superficial o cambisol (INEGI, 2005).

Clima: Según el INEGI (2005) y climate-data.org (2016) el rango de temperatura se encuentra dentro de los 17.5 y 22.6 °C, con una precipitación de entre 2-149 mm, cuenta con dos tipos de clima, semiseco-semicálido (60.73%) y semicálido subhúmedo con lluvias en verano (34.31%). El 4.96% restante de clima perteneciente al municipio es templado subhúmedo con lluvias en verano, este en las partes más altas (>2000 msnm).

Uso de suelo y vegetación: En la comunidad el uso de suelo 21.39% es para la agricultura, el 2.50% es zona urbana; la vegetación en su mayor parte es pastizal inducido con un 41.20% y el área a evaluar está inmersa en lo que se le denomina como bosque, la cual forma el 34.91% del área total (INEGI, 2005).

5.2 Colecta e identificación de los individuos

Durante 2015 y 2016 se realizaron recorridos en puntos específicos y restringidos de la zona de estudio donde pudieran encontrarse las especies del complejo, ya que no se localizan en toda la comunidad, las coordenadas geográficas de cada planta evaluada se tomaron con el GPS integrado del celular *Moto X Play*, después se pasaron al navegador libre Google Earth (2015) para obtener la altura sobre el nivel del mar. Para determinar la variabilidad fenotípica se realizaron registros donde se encontraron los magueyes. Las variables o caracteres que se tomaron en cuenta para este estudio fueron 13, las cuales son: altura (AP) y diámetro de la planta (DP); largo (LH), ancho (AH), espesor de la hoja (EH) y número de hojas (NH); número (NE), longitud (LEL) y espacio inter-espinas (EIE) de las espinas laterales; diámetro (DET) y longitud de la espina terminal (LET); dos variables de relación: relación diámetro-altura de la planta (RDPAP) y relación largo-

ancho de hoja (RLHAH). Todas las variables fueron medidas cuando se consideró morfológicamente sana y madura la planta (antes de arrojar el escapo floral). Para el análisis de las hojas y espinas se tomó como referencia una sola hoja, la llamada hoja “D”, la cual se define como la más joven de las hojas viejas y la más vieja de las hojas jóvenes.

En el muestreo de campo se obtuvo la identificación botánica hasta el taxón especie de cada ejemplar. Las características morfológicas se midieron con un flexómetro y un vernier digital; mientras que los estomas se visualizaron en un microscopio óptico Zeiss y se midieron con el software integrado en este (AxioVision, 2011).

5.3 Número de muestras por especie

En el muestreo se evaluaron 25 plantas de *Agave potatorum*, 35 de *A. seemanniana* y 10 de *Agave nussaviorum* subsp. *nussaviorum*, esta especie fue la que presentó menor número de individuos por su restringida distribución altitudinal a comparación de las otras dos, además de 25 plantas de *Agave karwinskii* (especie utilizada como grupo externo), cabe mencionar que todas las plantas se midieron en estado adulto entre 9, 10 y 11 años de edad. Considerando según las personas de la comunidad que esta edad la alcanzan las tres especies del complejo cuando el ápice central donde nacen las hojas se encuentra a la misma altura de las hojas laterales. En *Agave karwinskii* se considera adulta cuando la espina central cambia de un color negro tenue o suave a un color negro intenso.

5.4 Trabajo de laboratorio

Los análisis citométricos, conteo y medición de estomas se llevaron a cabo en el área de virología y biología molecular del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Oaxaca (LESPO), en el Municipio de San Bartolo Coyotepec perteneciente a la Región de los Valles Centrales de Oaxaca.

5.4.1 Análisis de citometría de flujo (FCM) y de la ploidía

Para determinar el contenido de ADN y niveles de ploidía; se prepararon suspensiones nucleares, para ello se hicieron cortes de tejido de hojas de 60-100 mg y se colocaron en una placa de Petri a la que se añadió 1 ml del tampón de aislamiento de núcleos (NIB por sus siglas en inglés) previamente refrigerado a 4°C. Todos los pasos del aislamiento y preparación para la corrida de los núcleos fueron realizados en frío mediante el empleo de hielo frappe. La NIB fue preparado según lo descrito en Doležal *et al.* (1989), a la que se añadieron inmediatamente 1 µl/ml de β-mercaptoetanol antes del uso. Para obtener valores aceptables de coeficiente de variación, se utilizó 0.1% del detergente biológico Triton® X-100, y para reducir la adhesión de desechos celulares y la presencia de compuestos fenólicos se añadió 5% de polivinilpirrolidona (PVP-40). La ploidía de las especies se calculó comparando la fluorescencia relativa de sus posiciones en el pico M1 (G₀/G₁) con la posición relativa del patrón externo previamente normalizado de *Pisum sativum* con un contenido de DNA en la fase 2C igual a 9.09 pg. El contenido de ADN de las muestras (genotipos o especies) en fase 2C se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$2C \text{ ADN muestra (pg)} = \frac{\text{posición relativa pico M1 de la muestra}}{\text{posición relativa pico M1 del patrón}} * 9.09 \text{ pg}$$

5.5 Índice, densidad y tamaño estomático

La caracterización de los estomas en las láminas foliares fue por la parte abaxial y adaxial de las tres especies de agaves silvestres en plantas adultas sanas (9-11 años), mediante el empleo de la técnica del imprinting (Sinclair y Dunn, 1961) y directamente sobre la epidermis de las hojas, esto para calcular la densidad estomática, índice estomático y el tamaño de los estomas. Para obtener los datos referentes al índice y densidad estomática se contabilizaron todos los estomas y células que se observaron en el área que abarca la cámara del programa utilizado (55.93 μm X 41.8 μm), esto en cinco campos de la cámara en diez láminas (adaxial y abaxial) de diez plantas por especie. Para determinar el tamaño de los estomas se midieron 30 estomas de cada lámina (adaxial y abaxial) en diez plantas por especie (600 estomas por especie). Se realizaron hojas de cálculo con las medidas de cada variable. Se calculó la media como medida de tendencia central. Se realizó un ANOVA para ver si existían diferencias significativas entre las dos partes de las hojas y entre especies para cada variable.

El índice estomático se calculó con las formula de Salisbury propuesta por Wilkinson (1979):

$$\text{Índice estomático} = \left(\frac{NE}{NCE+NE} \right) \times 100$$

Donde:

NE: Número de estomas por campo de observación

NCE: Número de células epidérmicas

La densidad estomática se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad de estomática} = \frac{\text{Numero de estomas por campo}}{\text{Área del campo}}$$

5.6 Análisis de datos

5.6.1 Análisis e identificación de los individuos

Se realizaron bases de datos en Microsoft Excel (2016) para todas las variables evaluadas (Tabla 1). Se calculó la media a las trece variables como medida de tendencia central y desviación estándar como medida de dispersión, así mismo se calculó el coeficiente de variación expresado en porcentaje para observar la relación varianza-media. Además de un análisis de componentes principales (ACP) a la matriz obtenida (Anexo 1). Se realizó además una matriz de correlación entre caracteres, igualmente un dendograma con el índice de similitud de Pearson para las mismas (Clusterización Aglomerativa Jerárquica); finalmente se realizó un mapa de calor, el cual muestra las distancias Euclidianas de similitud agrupando especies y caracteres a la vez, se utilizó a *Agave karwinskii* como grupo hermano (outgroup). Los análisis se realizaron con los Software XLSTAT versión 2017.15.442 y R 3.3.3.

La identificación de las especies fue en campo con el catálogo “Mezcales y Diversidad” de la CONABIO (2006) y las claves dicotómicas echas por García-Mendoza (2010) para la identificación del complejo.

Tabla 1. Variables fenotípicas evaluadas en las especies de *Agave*

	Parámetros analizados
Porte de la planta (cm)	Altura de la planta (AP)
	Diámetro de la planta (DP)
Características de las espinas (cm)	Número de hojas (NH)
	Largo de la hoja (LH)
	Ancho de la hoja (AH)
	Espesor de la hoja (EH)
Características de las hojas (cm)	Número de espinas laterales (NEL)
	Espacios inter-espinas (EIE)
	Longitud de las espinas laterales (LEL)
	Longitud de la espina terminal (LET)
	Diámetro de la espina terminal (CET)
Características de relación	Relación entre el diámetro y la altura de la planta (RDPyAP)
	Relación entre largo y ancho de hoja (RLHyAH)

6. Resultados

6.1 Identificación de individuos de las diferentes especies

En los recorridos de campo se localizaron las tres especies. *Agave seemanniana* (Figura 2A) se encontró en la comunidad a altitudes que fueron desde los 1700 a 2400 msnm, en esta localidad tiene una estrecha relación con el bosque de Pino-Encino, con altas cantidades de hojarasca y siempre cubierto por la vegetación arbórea antes mencionada, se puede considerar que prácticamente esta especie se encontraba bajo sombra la mayor parte del día.

Agave nussaviorum subsp. *nussaviorum* (Figura 2B) se localizó en altitudes que van desde los 2200 a 2500 msnm, en suelos pedregosos con poca vegetación acompañante y bajas cantidades de hojarasca, el 100% de las plantas evaluadas estaban en lugares con incidencia solar todo el día.

Agave potatorum (Figura 2C) fue la especie con mayor distribución ya que se encuentra en toda la comunidad, desde las áreas de traspatio como en las zonas descubiertas, bosque de encino, pino-encino y bosque de pino. Se localizó a altitudes que van desde los 1690 a los 2350 msnm (Tabla 2).

De manera general la vegetación acompañante que predomina en las laderas de esta comunidad son los cactus, en su mayor parte de los géneros *Ferocactus*, *Mammillaria* y *Stenocereus*, así como huizaches del género *Acacia*, pastos y cultivos.

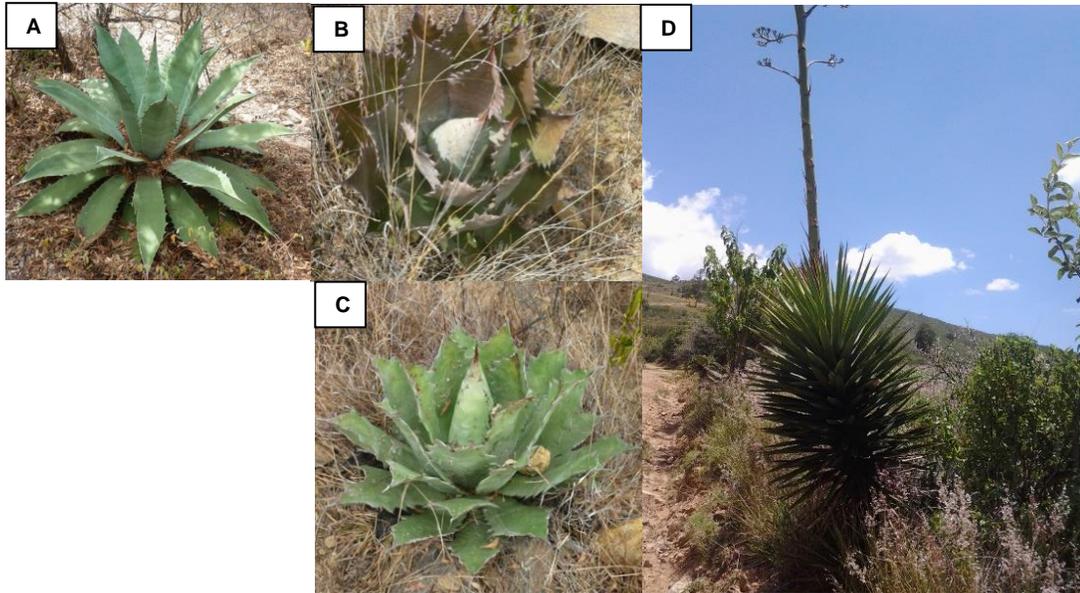


Figura 2. Especies del complejo *Agave potatorum* en la Agencia de Maguey Largo. A) *Agave seemanniana*, B) *A. nussaviorum*, C) *A. potatorum* y grupo hermano D) *A. karwinskii*

De acuerdo a las personas de esta comunidad las tres especies son conocidas como “Maguey Tobala” (Tabla 2). Anteriormente existió un palenque en la comunidad donde se producía mezcal con estas y otras especies, mencionan además que durante la década de los 80’s del siglo pasado fue cerrado debido a que no cumplió con los permisos establecidos por las leyes mexicanas, dejando con esto de lado la producción de mezcal de estas variedades (mezcal Tobala), lo mismo ocurrió en la producción de mezcal Tobasiche derivado de la especie *A. karwinskii*.

Tabla 2. Especies de *Agave* con nombres científicos y comunes con los que fueron identificados y evaluados a diferentes altitudes en Maguey Largo en el estado de Oaxaca, México (Porrás-Ramírez et al., 2016).

Nombre común	Nombre científico	Altitud (msnm)
Maguey Tobala	<i>Agave potatorum</i> Zucc.	1690-2350
Maguey Tobala	<i>Agave seemanniana</i> García-Mend.	1700-2400
Maguey Tobala	<i>Agave nussaviorum</i> García-Mend	2200-2500
Maguey Tabasiche, Maguey largo o Madrecuishe	<i>Agave karwinskii</i> Zucc.	1600-1900

6.2 Variables fenotípicas

Las primeras cuatro variables (AP, DP, LH, AH) muestran un patrón constante en sus medias (comparaciones dentro del complejo), donde los valores de *A. seemanniana* son los más grandes, seguido por *A. nussaviorum* y finalmente *A. potatorum* (Ver tabla en anexo 1). Estas cuatro variables están relacionadas con el tamaño o porte de los magueyes, se observa también en la Figura 2 y 3 un porte alto, mediano y chico.

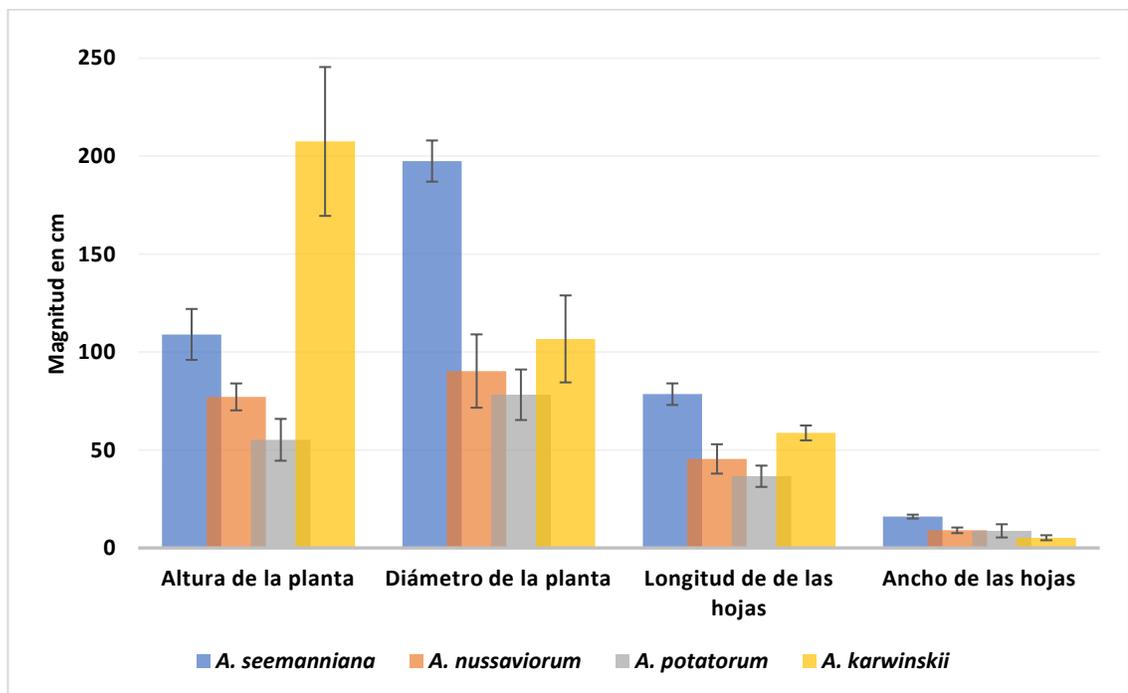


Figura 3. Comparación del porte de las especies del complejo *Agave potatorum* en la Agencia de Maguey Largo y *A. karwinskii* como grupo hermano.

El valor medio alto en el número de hojas y la longitud de la espina terminal (Figura 4) es característico de *A. potatorum* en relación con las otras dos especies (García-Mendoza, 2010).

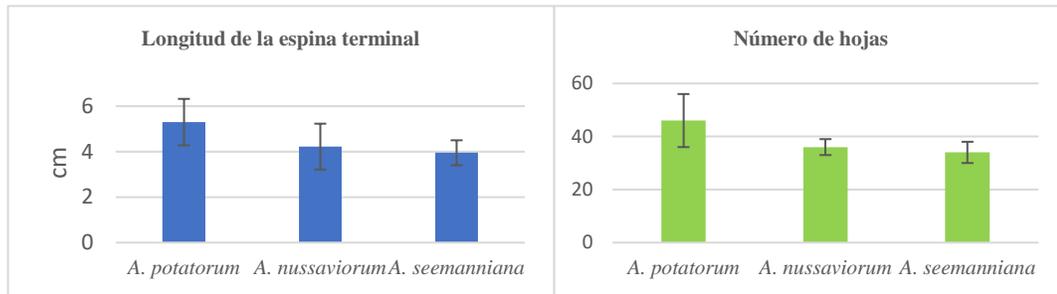


Figura 4. Variables características para diferenciar las tres especies del complejo *Agave potatorum*

El coeficiente de variación (CV%) es la relación que existe entre la desviación estándar y la media, para que sea expresado este valor en porcentaje únicamente se multiplica por 100, se interpreta que a mayor valor del CV existe una mayor variabilidad o diversidad fenotípica en dicho carácter. A continuación, se presentan variables con los datos más representativos del CV, la tabla con todos los valores se encuentra en el anexo 1.

Para el caso de *A. seemanniana* el valor más alto del CV lo presentó el espesor de la hoja (20), seguido por la longitud de las espinas laterales (18.18) y la longitud de la espina terminal (13.92). Es interesante observar que en esta especie el valor más bajo del coeficiente de variación lo presentó la relación que existe entre la longitud y ancho de las hojas (0.75%) lo cual indica que es una variable constante o de baja variación que pudiera ser utilizada para identificaciones en campo, el ancho de la hoja es cerca de cinco veces su largo; otros dos caracteres presentaron valores bajos, diámetro de la planta (DP) y el largo de la hoja (LH) con 5.31 y 7, respectivamente.

Las variables de mayor valor para *A. nussaviorum* fueron la longitud de las espinas laterales (LEL) con 44.67 y el espacio interespinas (EIE) con 32.38. Las características más constantes para esta especie fue el número de hojas (NH) con 8.33 y la relación que existe entre el diámetro y la altura de la planta (RDP/AP) con un valor de 10.88.

En *A. potatorum* se observó un valor de variación superior al 50%, este se presentó en la longitud de las espinas laterales (LEL) con un valor de 56.59, seguido por el número de espinas laterales (NEL) con un 44.56, el espacio inter-espinas (EIE) con 40.62 y el ancho de la hoja (AH) con 37.44. Los valores más bajos de variación los presentaron la longitud de las hojas (LH) con 11.94 y la altura de la planta con 13.85 (AP).

Los valores más altos en *A. karwinskii* fueron el espesor de la hoja con un valor de 53.66 y el espacio interespinas con 38.18; las variables de menor valor fueron el número de hojas con un valor de 5.74 y el largo de hoja con 6.47.

6.3 Caracteres fenotípicos de mayor importancia

Los dos primeros componentes explicaron 80.12% de la varianza total, los caracteres clasificaron y asociaron a las especies; el F1 ordena de izquierda a derecha (de menor a mayor) a las especies que están más correlacionadas con los valores positivos para este factor (ancho de la hoja “D” y la relación que existe entre el diámetro y la altura de la planta); de igual manera el F2 las clasifica de menor a mayor (en este caso de abajo hacia arriba) a las especies que están más correlacionadas con las variables con valores

positivos para este factor, principalmente por el espesor de la hoja “D” y la longitud de la espina terminal (ver los valores propios de la Tabla 4 y gráfico de la Figura 5).

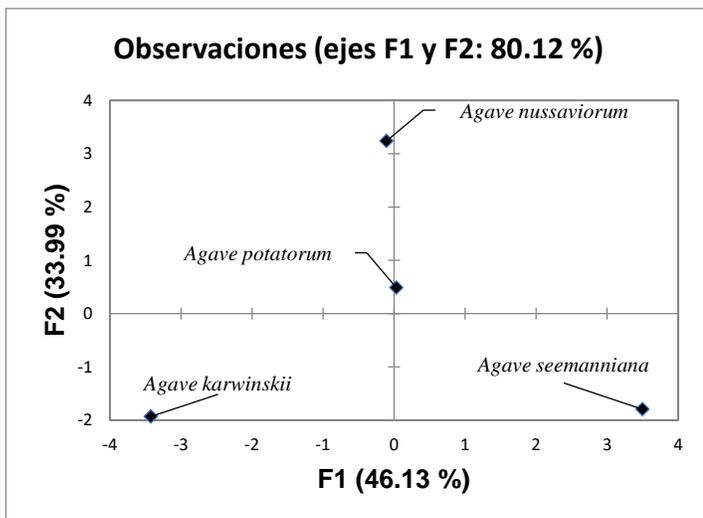


Figura 5. Gráfico del análisis de componentes principales (ACP) de las trece variables fenotípicas evaluadas en cuatro especies de *Agave* bajo condiciones silvestres en la región de Maguey Largo. El análisis de los factores de extracción del ACP se realizó por el método de Pearson (n).

La contribución del primer componente (F1) explicó el 46.13% de la varianza total (Tabla 4), el cual estuvo influenciado por el ancho de la hoja “D” (AH=0.399 de valor propio), relación que existe entre el diámetro y altura de la planta (RDPAP=0.399 de valor propio), longitud de las espinas laterales (LEL=0.374 de valor propio; Tabla 4) y el diámetro de la espina terminal (DET=0.342 de valor propio). El segundo componente (F2) explicó un 33.99% de la varianza total, este fue influenciado principalmente por el espesor de la hoja (EH=0.471 de valor propio) y la longitud de la espina terminal (LET=0.455 de valor propio). El tercer (F3) y último componente estuvo influenciado por la relación que existe entre la longitud de la hoja con su ancho (RLHAH=0.549 de valor propio).

Tabla 3. Varianza total explicada de cada valor propio (componentes)

Componente	Valores propios iniciales		
	Total	Variabilidad (%)	Acumulación (%)
1	4.613	46.13	46.13
2	3.399	33.99	80.12
3	1.988	19.88	100.00

Tabla 4. Valores propios de los tres componentes de las características cuantitativas evaluadas en las cuatro especies de *Agave* en la región de Maguey Largo Oaxaca, México.

Caracteres/Componentes	F1	F2	F3
Altura de la Planta (AP)	-0.240	-0.311	0.297
Diámetro de la Planta (DP)	0.283	-0.278	0.263
Ancho de la Hoja "D" (AH)	0.399	-0.078	0.084
Longitud de la Hoja "D" (LH)	0.185	-0.320	0.364
Número de Hojas (NH)	-0.342	-0.247	0.105
Espesor de la Hoja "D" (EH)	0.023	0.471	0.082
Número de Espinas Laterales (NE)	-0.323	0.206	0.267
Espacio Interespinas (EIE)	-0.136	-0.210	-0.519
Longitud de las Espinas Laterales (LEL)	0.374	0.172	-0.105
Longitud de la Espina Terminal (LET)	0.109	0.455	0.078
Diámetro de la Espina Terminal (DET)	0.342	-0.248	0.100
Relación entre diámetro y altura de la planta (RDPAP)	0.399	0.026	-0.130
Relación entre longitud y ancho de hoja (RLHAH)	-0.010	0.223	0.549

El ACP mostró los coeficientes de correlación entre variables (Tabla 5), se observa una alta variación fenotípica con relativamente pocas interacciones estadísticas entre ellas; solo se tiene un valor negativo que está representado por la correlación entre la longitud de la espina lateral (LEL) y el número de hojas (NH). La correlación más alta en los valores positivos la obtuvieron la longitud de la espina terminal (LET) y el espesor de la hoja (EH), seguido por la longitud de la hoja (LH) y el diámetro de la planta (DP); en este último ejemplo *A. potatorum* tuvo el valor más bajo en la longitud de las hojas (LH=36.60 cm) por consiguiente el valor más bajo en su diámetro (DP=78.20), a diferencia de *A. seemanniana* con los valores más altos en ambas variables (LH=78.50 cm y DP=197.50 cm).

Tabla 5. Matriz de correlación de trece características evaluadas en cuatro especies de *Agave* bajo condiciones silvestres en la región de Maguey Largo Oaxaca, México. En negritas se resaltan las correlaciones estadísticamente significativas.

Variables	AP	DP	AH	LH	NH	EH	NE	EIE	LEL	LET	DET	RDPAP	RLHAH
AP	1												
DP	0.175	1											
AH	-0.404	0.830	1										
LH	0.452	0.954	0.631	1									
NH	0.912	-0.207	-0.711	0.069	1								
EH	-0.617	-0.483	-0.088	-0.564	-0.540	1							
NE	0.387	-0.621	-0.787	-0.400	0.510	0.441	1						
EIE	0.085	-0.326	-0.366	-0.341	0.367	-0.564	-0.286	1					
LEL	-0.856	0.353	0.814	0.073	-0.984	0.388	-0.641	-0.324	1				
LET	-0.721	-0.320	0.121	-0.450	-0.698	0.977	0.258	-0.614	0.569	1			
DET	-0.075	0.953	0.925	0.824	-0.403	-0.448	-0.821	-0.182	0.552	-0.256	1		
RDPAP	-0.709	0.557	0.917	0.283	-0.881	0.082	-0.839	-0.175	0.950	0.286	0.756	1	
RLHAH	0.130	0.082	0.019	0.189	-0.074	0.578	0.602	-0.935	-0.002	0.552	-0.124	-0.183	1

AP – Altura de la Planta, DP – Diámetro de la Planta, AH - Ancho de la Hoja “D”, LH - Longitud de la Hoja “D”, NH - Número de Hojas, EH - Espesor de la Hoja “D”, NEL - Número de Espinas Laterales, EIE - Espacio Interespinas, LEL - Longitud de las Espinas Laterales, LET - Longitud de la Espina Terminal y DET - Diámetro de la Espina Terminal

6.4 Relaciones filogenéticas inter e intraespecíficas

Las especies dentro del complejo con el valor más alto de similitud lo registraron *A. potatorum* y *A. nussaviorum* (0.974); por el contrario, *A. seemanniana* y *A. nussaviorum* presentaron el valor más bajo (0.897); la especie utilizada como grupo hermano (*A. karwinskii*) se aleja del complejo con un valor de 0.688 compartido con *A. seemanniana*. Las tres especies del complejo son las que cuentan con mayor valor de similitud, se aprecia una representación de la variabilidad de formas (Figura 6).

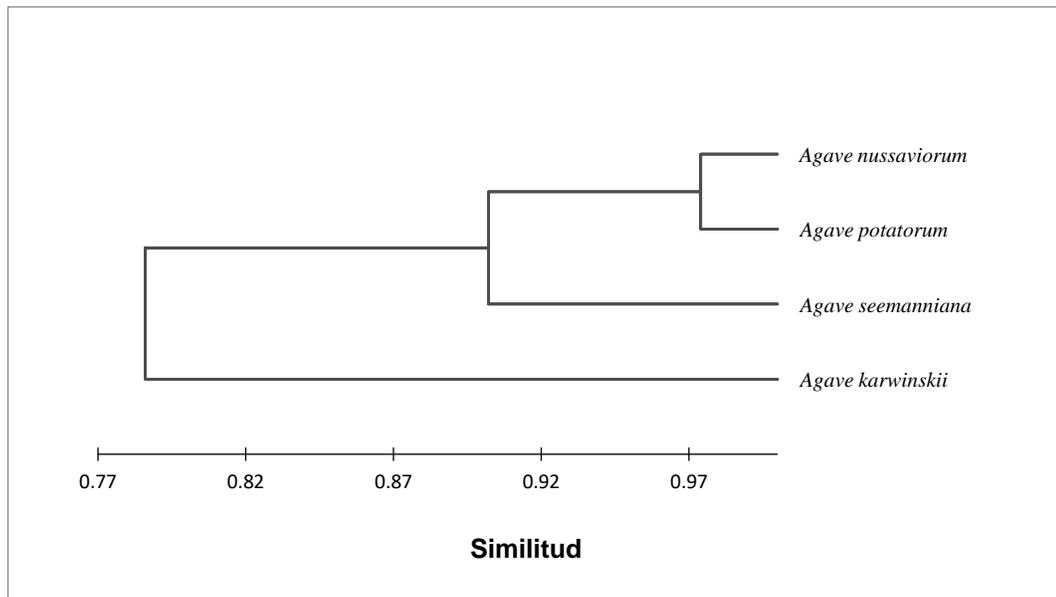


Figura 6. Dendrograma de las tres especies del complejo *Agave potatorum* (*A. nussaviorum*, *A. potatorum* y *A. seemanniana*) y una especie como grupo hermano (*A. karwinskii*), construido con la Clusterización Aglomerativa Jerárquica (CAJ) de distancias genéticas basadas en el coeficiente de correlación de Pearson utilizando el método de aglomeración de promedio no ponderado par-grupo que muestra las relaciones entre ellas. Las distancias genéticas se basaron en las trece características fenotípicas evaluadas.

El dendrograma basado en el coeficiente de correlación Pearson (Figura 7) generó tres grupos. Se distingue el primer grupo conformado por las especies *A. potatorum* y *A. nussaviorum*, ya que son semejantes desde el punto de vista fenotípico, por este motivo no es posible una separación, dado que estos dos taxones son los más emparentados desde el punto de vista taxonómico. Sin embargo, si fue posible separarlos con los marcadores citométricos. El grupo dos y tres están integrados por *A. seemanniana* y *A. karwinskii*, respectivamente, estas especies no demuestran duda en su separación. *A. karwinskii* es el grupo hermano, a pesar de pertenecer al mismo género es notable su alejamiento; *A. seemanniana* pertenece al complejo en estudio, en consecuencia, es la especie que se acerca más al cluster formado por *A. potatorum* y *A. seemanniana*.

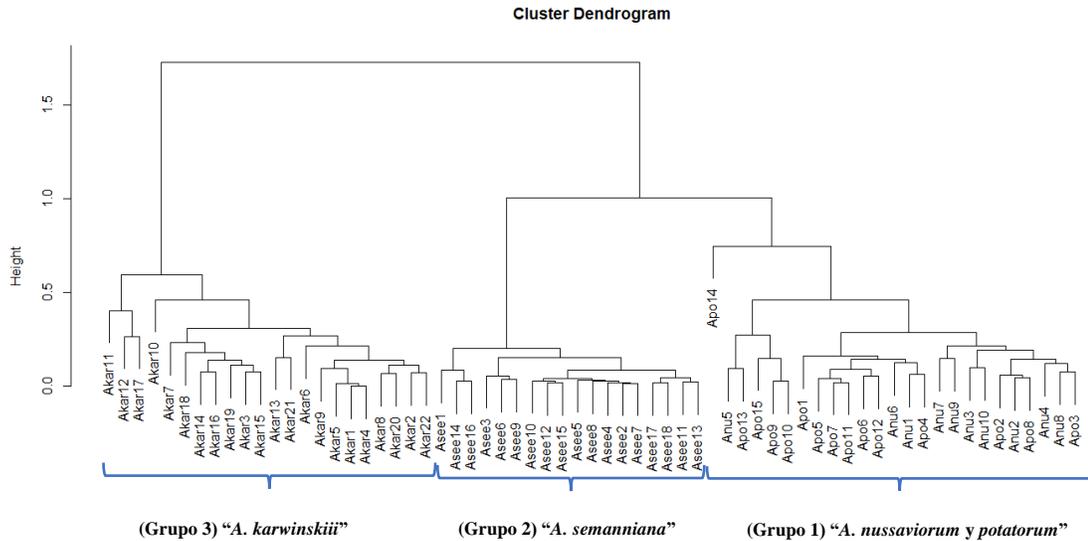


Figura 7. Análisis cluster de la variación intra e interespecífica de cuatro especies de *Agave* de la localidad de Maguey Largo. Apo (*A. potatorum*), Anu (*A. nussaviorum*), Asee (*A. semanniana*) y Akar (*A. karwinskii*).

6.5 Relación entre variables y especies

En la figura 8 se resume un mapa de calor que agrupa los caracteres y especies basado en distancias euclidianas. En las columnas se forman tres grupos, la gráfica de colores va del rojo al verde pasando por el negro, la información va de menos a más respectivamente, las variables en color verde sugieren una mayor información sobre el fenotipo, mientras que en la parte roja están las que tienen menor representación e influencia entre ellas. El número de hojas (NH), largo de hoja (LH), número de espigas (NE), altura y diámetro de la planta (AP y DP, respectivamente) son las variables que proporcionan más información sobre el fenotipo de los agaves. El único clado que se forma en la zona roja es información fenotípica que se dispersa con menor o nula incidencia en estas cuatro especies. Este análisis y la Clusterización Aglomerativa Jerárquica (Figura 6) clasifican de manera similar a las especies.

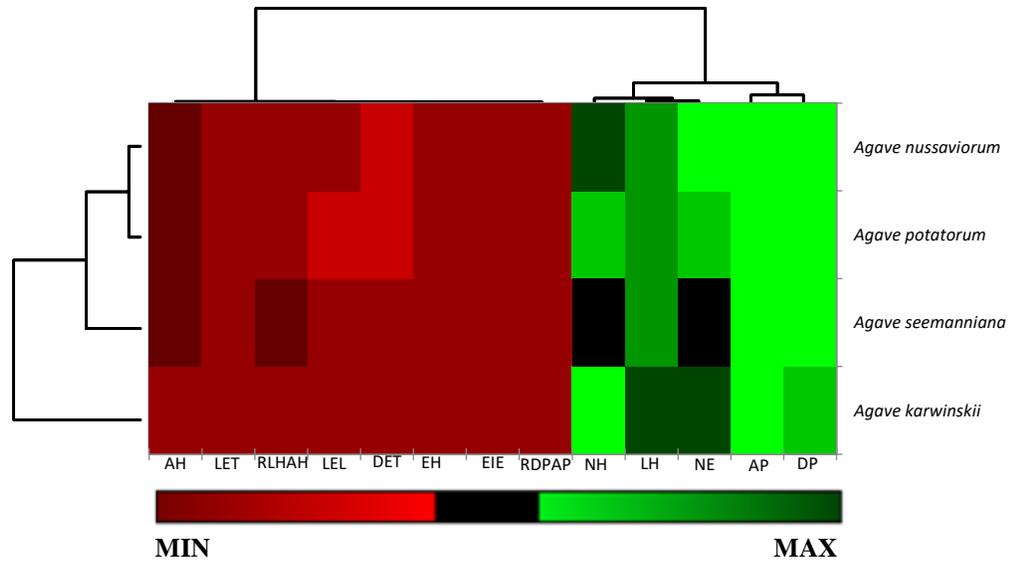


Figura 8. Análisis de agrupamiento jerárquico que muestra las relaciones y significancia entre las especies de *Agave* y las características fenotípicas evaluadas en la región de Magüey Largo. Las características significan: AH (Ancho de la Hoja), LET (Longitud de la Espina Terminal), RLHAH (Relación entre la Longitud y Ancho de Hoja), LEL (Longitud de la Espina Lateral), DET (Diámetro de la Espina Terminal), EH (Espesor de la hoja “D”), EIE (Espacio Interespinas), RDPAP (Relación entre el Diámetro y Altura de la Planta), NH (Número de Hojas), LH (Longitud de la Hoja “D”), NE (Número de Espinas), AP (Altura de la Planta) y DP (Diámetro de la Planta).

6.6 Índice, tamaño y densidad estomática

Se encontró la característica forma tetracística del complejo estomático rodeando las dos células oclusivas, se encontraron estomas en el haz y en el envés considerado este carácter de plantas que se desarrollan en zonas secas (Roth, 1992).

En la tabla 6 se observa la media obtenida en cada una de las variables y para cada una de las tres especies. El análisis estadístico (ANOVA) indicó que no existe diferencia significativa entre la parte adaxial y abaxial de las hojas; lo mismo ocurrió con el análisis interespecies.

Tabla 6. Cuantificación de estomas en las láminas foliares del complejo *Agave potatorum*

Variable	<i>Agave seemanniana</i>	<i>Agave potatorum</i>	<i>Agave nussaviorum</i>	<i>Agave karwinskii</i>
Índice de estomas en el haz	7.16±0.67	7.47±0.52	10.24±0.56	8.24±0.98
Índice de estomas en el envés	11.17±1.18	9.43±0.82	10.55±0.70	8.62±1.4
Tamaño de los estomas en el haz (µm)	10.79±1.73	8.37±1.25	8.40±1.21	13.61±1.33
Tamaño de los estomas en el envés (µm)	8.90±2.08	7.80±1.81	7.45±1.30	15.88±1.52
Densidad de estomas en el haz (Estomas/ mm ²)	7469.27±1.73	7550.55±1.25	9287.40±1.20	5488.59±1.42
Densidad de estomas en el envés (Estomas/ mm ²)	9488.46±2.08	8756±1.81	8247.85±1.30	6271.45±2.21

Promedio de las variables descritas ± Desviación Estándar

Se aprecia que el índice estomático en el haz es ligeramente mayor en *A. nussaviorum* (10.24), mientras que *A. potatorum* y *A. seemanniana* conservan valores menores muy similares (7.47 y 7.16, respectivamente). En el envés *A. nussaviorum* conserva un valor relativamente igual al del haz (10.55).

6.7 Citometría de flujo y nivel de ploidía

En la tabla 7 se muestran los resultados del tamaño del genoma en la fase 2C-DNA en pg/2C; así como el contenido monoploíde del genoma en millones de pares de bases y el nivel de ploidía estimado; así como, sus diferentes genotipos en estudio, se observó baja variabilidad en el contenido de ADN, siendo del rango de 7.33 pg/2C en *A. nussaviorum* a 7.90 pg/2C en *A. seemanniana*; con un nivel de ploidía diploide en las tres especies.

En la figura 9, se muestran los resultados de la lectura del flujocitómetro para las tres especies que representan al complejo *Agave potatorum* “Tobala” y que fueron encontradas bajo estado silvestre en diferentes altitudes, donde se puede observar una fluorescencia relativa muy cercana entre sí, pero con cierta diferencia lo cual distingue a cada una de las especies dando como resultado la estimación de una composición diploide del genoma.

Tabla 7. Contenido de ADN nuclear 2C, tamaño del genoma monoploide y estimación de la ploidía en especies de *Agave* bajo condiciones de cultivo silvestre y semi-silvestre en la región de Maguey Largo

Complejo o especie	Genotipo o especie	Contenido de ADN nuclear pg/ 2C	1Cx Tamaño del genoma (pg)*	Tamaño del genoma monoploide 1C (Mbp)	Estimación de la ploidía
Complejo <i>Agave potatorum</i> “Tobalá”	<i>A. seemanniana</i>	7.90	3.95	3863	2x
	<i>A. potatorum</i> Zucc.	7.40	3.70	3619	2x
	<i>A. nussaviorum</i>	7.33	3.66	3587	2x
<i>Agave karwinskii</i>	Forma Amatengo	9.08	4.54	4441	2x

* 1Cx = El valor representa el contenido de ADN de un genoma monoploide con el número cromosómico x (Greilhuber *et al.* 2005)

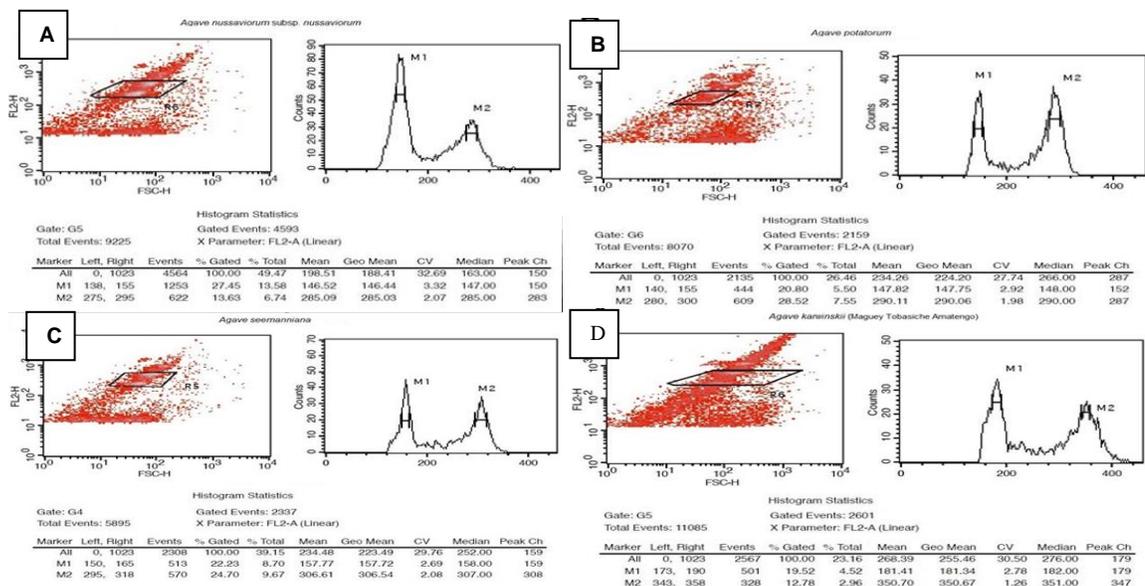


Figura 9. Fluorescencia relativa de las especies de *Agave* pertenecientes al complejo “Tobala” y especie de comparación, creciendo bajo condiciones silvestres (A) *Agave nussaviorum* subsp. *nussaviorum* (B) *A.*

potatorum, (C) *A. seemanniana* y (D) *A. karwinskii*. El cuadro en negro indica la densidad de núcleos analizados.

Agave karwinskii a pesar de ser determinada como una especie diploide tiene una clara diferencia en el contenido de ADN nuclear, lo cual lo hace totalmente desigual a las tres especies que pertenecen al complejo.

7. Discusión

En muchas partes del mundo, los científicos han estudiado la morfología a la par con estudios genéticos en especies de importancia económica para el mejoramiento agronómico, identificando caracteres de importancia.

Hajibarat *et al.* (2014), en un estudio sobre la caracterización de la diversidad genética por microsatélites y caracterización fenotípica por siete variables cuantitativas de una variedad local de garbanzo en Irán, encontró que la variabilidad morfológica era muy alta en una variedad local, lo cual fue útil para mejorar y desarrollar la diversidad fenotípica de la especie. El presente trabajo muestra que la variabilidad fenotípica del complejo *A. potatorum* es baja, principalmente en entre *A. nussaviorum* y *A. potatorum* quienes se agrupan en clados similares. Sin embargo, la variabilidad fenotípica proporciona diferentes relaciones entre sus variantes (Figura 6), siendo los caracteres fenotípicos los que clasificaron a las especies *A. seemanniana* y *A. karwinskii* en un mismo clado a un nivel intra específico y diferente a nivel interespecífico. Un estudio similar fue realizado por Rana *et al.* (2015) donde observaron que la relación de longitud y diámetro de los frutos de peras, resistencia de cáliz en frutos maduros, superficie de frutos y textura de la pulpa fueron importantes para detectar las variaciones morfológicas.

7.1 Identificación morfológica y de campo del complejo *A. potatorum*

La identificación se realizó en campo y laboratorio, para *Agave potatorum* los rangos fenotípicos y altitudinales que manejan otros autores (Aguirre-Dugua y Eguiarte,

2013; García-Mendoza, 2010; Vásquez, 2006) se encuentran dentro de los obtenidos en este estudio. Además, mencionan la convivencia de esta especie con el género *Quercus* y selva baja caducifolia.

Las características morfológicas resultantes para *Agave nussaviorum* se encuentran dentro de los rangos máximos reportados por García-Mendoza (2010; 2011). Esta es la especie de mayor distribución altitudinal dentro del complejo, se localizó en un rango que va desde los 2200 msnm a 2500 msnm, los valores reportados por García-Mendoza (2010; 2011) van de 1700 msnm a 2500 msnm.

Al igual que las dos especies antes descritas *A. seemanniana* se encuentra dentro de los rangos reportados por García-Mendoza (2010; 2011), a excepción de la longitud de las hojas donde este autor reporta un rango de 40-55 cm, en esta tesis se obtuvo un valor medio de 78.50 cm. Algo similar ocurre en su distribución ya que según lo revisado en la bibliografía y los datos obtenidos en esta tesis existe discrepancia altitudinal. García-Mendoza (2010; 2011) señala que esta especie se distribuye de 700 a 1700 msnm, en este estudio dicha especie se localizó a una altitud que va entre los 1700 msnm a 2400 msnm.

Las diferencias claras reportadas entre el complejo son el alto valor en longitud de la espina terminal y una mayor densidad de hojas en *A. potatorum*; *A. seemanniana* en estado adulto es más alta en relación con las otras dos; *A. nussaviorum* tiene un alto parecido a *A. potatorum*, lo que la diferencia de esta es un menor número de hojas y una espina terminal más pequeña, es una característica general que tenga las mamilas más pronunciadas que *A. potatorum* raramente se observan dientecillos intersticiales (García-

Mendoza 2010; 2011). La subespecie de este mismo complejo *Agave nussaviorum* subsp. *deltoidea* no se localizó en el área muestreada porque es de restricción altitudinal marcada, característica de la región Mixteca (Figura 1).

7.2 Variación fenotípica

En la mayoría de los estudios realizados en el fenotipo de los agaves se ha detectado que el carácter con mayor variación es la longitud de las espinas laterales (Mora-López *et al.*, 2011; Parker *et al.*, 2014; Alfaro *et al.*, 2007), esta característica está estrechamente relacionada con el estado silvestre o de domesticación, es común encontrar en zonas con historia de cultivo de agaves valores bajos de variación en sus espinas laterales (LEL). Para el presente estudio se obtuvo en dos de los tres taxones los valores más altos de coeficiente de variación (CV%; Tala 2) en la LEL (*Agave nussaviorum* y *A. potatorum*), para *A. seemanniana* fue la segunda variable con mayor variación solo después del espesor de la hoja, lo cual indica el estado silvestre de estas tres especies en la población objeto de estudio (García-Mendoza, 2010), esto debido al poco manejo que se les ha dado a las tres especies según datos proporcionados por las personas de la localidad.

León *et al.* (2013) analizaron la caracterización fenotípica de especies de *Agave* en el municipio de San Miguel Tilquiapam en el estado de Oaxaca, reportaron la presencia de cinco especies: *Agave karwinskii* (forma: Miahuatlán y Amatengo), *A. marmorata* (Maguey Becuela), *A. convallis* (Maguey Jabalí), *A. americana* (Maguey Coyote) *A. potatorum* (Maguey Tobala); la primera y la última similares a las encontradas y evaluadas

en este estudio en la región de Maguey Largo. Las principales diferencias de *A. potatorum* reportada en este trabajo y la de León *et al.* (2013) fue el número de espinas, la reportada NE = 12 vs nuestra NE = 65.3, las hojas reportadas son chicas y anchas a comparación de las de este trabajo que son más largas y menos anchas; son notables las diferencias en estas características fenotípicas, pudiendo tratarse esta diferencia a la altitud, adaptación ecológica y a la plasticidad fenotípica y genética intrínseca de este especie ya que el ancho de la hoja “D”, el espacio interespinas y el número de espinas laterales siguieron un patrón similar al nuestro y el mencionado por León *et al.* (2013), los datos descritos para *A. nussaviorum* son escasos ya que es una especie de reciente descripción.

Es este trabajo se obtuvo un alto valor en la longitud de la espina terminal en *A. potatorum* y *A. seemanniana* característica importante en la protección mecánica contra depredadores rumiantes, carácter que puede estar influenciado por la presión del alto grado de pastoreo de ganado vacuno y caprino que se ha dado desde la formación de esta y otras comunidades (alrededor de 100 y 120 años) aledañas que pastoreaban en la misma zona, según las personas es el ganado caprino el que tiende a dañar este tipo de plantas, principalmente cuando se encuentran en estado de plántula o juvenil.

En lo que se refiere a *Agave karwinskii* el presente trabajo presento valores superiores en cinco de las seis variables reportadas por León *et al.* (2013), a excepción del diámetro de la espina terminal que fue ligeramente mayor (reportada= 0.5 cm vs nuestra= 0.45 cm), de manera general se puede decir que esta especie en San Miguel Tilquiapam

sus hojas y espinas son más pequeñas a pesar de ser la misma variedad (Miahuatlán), sería importante conocer los datos sobre el porte (altura y diámetro) para determinar de manera más precisa si se trata de una planta más pequeña o grande y con esto comprobar como varía la plasticidad fenotípica en una misma región (Valles Centrales de Oaxaca) ya que las altitudes sobre el nivel del mar no varían de manera significativa [rango altitudinal en esta tesis= 1600-1900 msnm vs León *et al* (2013) =1600-2035 msnm]. Flores-Maya *et al.* (2010) en un análisis de correlación cariológica y morfológica analiza siete variables fenotípicas de 30 plantas adultas de *A. karwinskii*; las siete son inferiores a las aquí presentadas (ej. Altura= 74.3 cm vs 207.5 cm; Diámetro= 66.6 cm vs 106.7 cm). Los rangos altitudinales presentados por este autor van de 1454 a 1555 msnm. De acuerdo a los parámetros de los dos autores antes mencionados podemos decir que en la Agencia de Maguey Largo existe un ecotipo de *A. karwinskii* potencial para la producción de mezcal Tobasiche, ya que son plantas grandes y vigorosas de las cuales se pudiera tener mayor eficiencia de materia prima para la producción de esta variante de mezcal, esto aunado a un proyecto de recuperación de la población total, dando cierto énfasis en las plantas con atributos deseables de producción como lo es la altura y diámetro del tallo, características importantes para los productores al momento de seleccionar la cosecha.

Muñoz *et al.* (2014) llevaron a cabo un estudio en el estado de Guerrero para la producción de rodales semilleros de *Agave cupreata* Trel et Berg., seleccionaron las mejores plantas madre, las características fenotípicas seleccionadas fueron que la planta tuviera buena altura (>1.20 m) y diámetro de copa (>1.85 m), plantas sanas (vigorosas, sin daños en hojas y de buen color) y en estado adulto (edades entre 8, 9 y 10 años). Los resultados de las estimaciones preliminares de estos autores siguieron que de 296 plantas

madre que cumplen los requisitos fenotípicos establecidos se obtendrán unas 17 760 000 semillas saludables para la producción de plántulas. Este tipo de trabajos se pudieran aplicar en la zona prospecta ya que las cuatro especies cumplen con los requisitos (valores similares o superiores a las medias señaladas por otros autores) para establecer plantaciones, conservando en estos ecosistemas el complejo *Agave potatorum* que se agota rápidamente por la extracción desmedida de sus poblaciones, beneficiando de manera directa y a largo plazo a la comunidad.

7.2.1 Caracteres fenotípicos de mayor importancia

Morales *et al.* (2008) realizaron un análisis de componentes principales (ACP) en dos poblaciones de *Agave tequilana* var. Azul, reportan el primer y segundo componente para ambas poblaciones, concluyendo que hubo diferencias intra e interpoblacionales en el área foliar, longitud de las hojas, altura de la planta y número de hojas fueron los caracteres con valores más altos de descripción para ambas poblaciones. Estos valores están relacionados con la domesticación de esta especie ya que los factores muestran información sobre el porte como la altura, las cual es determinante para el establecimiento de cultivos de alta producción. Mientras que en el presente estudio las variables que proporcionaron los valores más altos descriptivos fueron el ancho de la hoja, longitud de las espinas laterales, diámetro de la espina terminal y la relación que existe entre el diámetro y la altura de la planta (Tabla 4 y 5), caracteres más relacionados con el estado silvestre como lo son las espinas laterales y la terminal.

Para tener una visión general de las diferencias entre especies de plantas a través de tratamientos, Kazachkova *et al.* (2013), aplicaron un análisis de componentes principales (ACP) que mostró los dos primeros componentes representando el 78.5% de la varianza total, estos permitieron la clasificación de las muestras por especies. El ACP aquí descrito mostró que las variables fenotípicas fueron el factor predominante que explica las diferencias entre especies con un 80.12% de la varianza total explicada (Figura 5).

7.2.2 Características fenotípicas de clasificación de las especies

Los efectos generales de las características fenotípicas en las especies de agave se clasificaron por la Clusterización Aglomerativa Jerárquica (Figura 6), las especies se agruparon según el rasgo fenotípico principal. Sin embargo, el Análisis de Componentes Principales demostró que las especies se podían separar en base a las características fenotípicas evaluadas (Figura 5), ya que todas las especies se encontraron bajo la misma condición silvestre, se evaluaron al mismo tiempo y a una edad similar. En *Arabidopsis thaliana*, Kazachkova *et al.* (2013) estudio diferentes tratamientos y plataformas de crecimiento, determinando que las muestras eran claramente agrupadas en primer lugar según la especie, así mismo observaron subclados claramente separados por la plataforma de crecimiento. Resultados similares fueron reportados en *Eutrema salsugineum* por Guevara *et al.* (2012).

7.3 Caracterización de la lámina foliar

Schoch *et al.* (1980) mencionan que el índice estomático está en función de la radiación solar recibida durante los días precedentes a la diferenciación de los estomas en las hojas, en esta tesis no se encontraron diferencias significativas entre especies ni entre posición de las láminas foliares, al igual que las que se encontraron en sombra *vs* con radiación solar constante. Sin embargo, *A. nussaviorum* obtuvo el valor medio más alto en el índice estomático (10.4), esta especie en condiciones de campo fue la que recibía mayor cantidad de radiación solar; la mayoría de los individuos de *A. seemanniana* muestreados se encontraron dentro del bosque de encino con abundante sombra a lo largo del día, por ende, recibían poca radiación solar obteniendo un valor de 9.16 para el índice estomático. Por otra parte, Nobel (1988) menciona que la densidad estomática es mayor en la superficie adaxial en comparación con la abaxial, esto se cumplió únicamente para *A. nussaviorum*.

7.4 Variación del tamaño del genoma y nivel de ploidia

Los resultados muestran una gran cercanía genética basada en el contenido de ADN nuclear y el nivel de ploidia estimada dentro del complejo y una pequeña pero significativa diferencia entre *A. karwinskii* y el complejo mencionado, lo mismo ocurre en el análisis de la fenotipificación. Esto demuestra la importancia de correlacionar datos morfológicos, citométricos y marcadores moleculares.

Se confirma el contenido de ADN nuclear en fase 2C cercano a los 8 pg para las especies diploides de este género (Zonneveld, 2003; Moreno-Salazar *et al.*, 2007; Palomino *et al.*, 2003).

La estimación del nivel de ploidía ha sido posible debido a que las especies evaluadas han mostrado diferentes contenidos de ADN nuclear lo que posibilita la asignación de ploidía por contenido de ADN (Tabla 7), pero a futuro se debe confirmar mediante el conteo del número de cromosomas; *Agave potatorum* es la especie que muestra divergencia con lo reportado en Zonneveld (2003), donde esta especie es considerada como hexaploide ($2n=6x=180$) con un contenido de ADN de 24 pg en fase 2C. Algunas teorías sugieren que las adaptaciones a climas secos provocan el aumento del contenido de ADN y por ende el nivel de ploidía (Palomino *et al.*, 2003; Zonneveld *et al.*, 2001). Zonneveld *et al.* (2003) encontraron en *Agave victoria-reginae* organismos diploides y hexaploides; en *A. parryi* diploides, tetraploides y hexaploides. Otro estudio referente al nivel de ploidía fue realizado por Palomino *et al.* (2003) en *Agave tequilana*, encontraron que los valores 2C-ADN tienen una relación entre el nivel de ploidía y el contenido de ADN de ocho variedades de esta especie; seis fueron diploides, una triploide y la variedad chato fue tetraploide y pentaploide. Con este trabajo Palomino *et al.* (2003) conformaron la utilidad de la citometría de flujo para diferenciar variedades de una misma especie con el número cromosómico.

Las diferencias fenotípicas reflejadas en las relaciones filogenéticas de los dendogramas (Figura 6 y 7) son provocadas por las variaciones del contenido de ADN

nuclear el cual expresa diferencias fenotípicas en dos formas: porte (tamaño, forma y volumen) y la expresión de su contenido genético (Bennett y Leitch, 1995; Arumuganathan *et al.*, 1999; Bonos *et al.*, 2002).

De acuerdo a lo antes discutido se recomienda realizar muestreos poblacionales del complejo *A. potatozum* aquí estudiado aplicando la citometría de flujo ya que con el conocimiento del nivel de ploidia y caritipo se pudieran diferenciar especies, sub-especies y variedades (citotipos numéricos) involucradas en su gradiente de distribución (Palomino *et al.*, 2003; Zonneveld, 2003), ya que se tienen antecedentes que este complejo presenta plasticidad fenotípica (García-Mendoza, 2010; Gentry, 1982) aún no explicada al 100%.

8. Conclusiones

De acuerdo a las variables evaluadas la longitud de la espina terminal, ancho y espesor de la hoja clasificaron a las especies. Otros atributos relacionados con la clasificación y coeficientes de variación más altos fueron el espacio interespinas, longitud y diámetro de la espina terminal, características relacionadas con el estado silvestre de estas especies.

Se estableció una técnica de extracción de núcleos para la cuantificación del contenido de ADN y la estimación de los niveles de ploidia mediante la flujocitometría, técnica rápida y precisa para la estimación de estos parámetros.

El conocimiento producido en este trabajo es básico y puede ser útil para aclarar la taxonomía del complejo *A. potatorum*, además puede ser aplicado en el manejo, uso y conservación de estas especies creando proyectos de sustentabilidad, reproducción, reforestación y conservación de hábitat. Así mismo, en el mejoramiento tradicional y genético seleccionando características productivas deseables de esta materia prima. De igual forma este estudio puede funcionar como complemento de marcadores moleculares en este complejo en el estado con la producción más alta de mezcal en el país.

Por último, esta investigación constituye un paso de avance importante dentro del programa de mejoramiento genético del agave que se lleva a cabo dentro del Instituto Politécnico Nacional y en especial en el CIIDIR Unidad Oaxaca, y una contribución

significativa para el uso y conocimiento de la especie dentro de la comunidad de productores y científica.

9. Revisión de literatura

- Abraham, M., Ramírez-Malagón, F., Gil-Vega, K del C. y Simpson, J. 2009. AFLP analysis of genetic variability in three reproductive forms of *Agave tequilana*. Revista Fitotecnica Mexicana. 32(3):171-175.
- Aguirre-Dugua, X. and Eguiarte, L.E. 2012. Genetic Diversity, Conservation and Sustainable Use of Wild *Agave cupreata* and *Agave potatorum* Extractec for Mezcal Production in Mexico. Jouernal of Arid Enviroments. 90: 96-94
- Alfaro., R. G., Legaria, S. J. P. y Rodríguez, P. J. E. 2007. Diversidad genética en poblaciones de agaves pulqueros (*Agave* spp.) del nororiente del estado de México. Rev. Fitotec. Mex. 30 (1):1-12
- Arroyo, J., Matías, F., Espinosa, S., Espinosa, H. y Peña, A. 2008. Estudio comparativo de las microestructuras foliares en Agaves de importancia económica.
- Arumuganathan, K., Tallury, S. P., Fraser, M. L., Bruneau, A. H. and Qu, R. 1999. Nuclear DNA content of thirteen turfgrass species by flow citometry. Crop Sci. 39: 1518-1521
- Azofeifa-Delgado, Á. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. Agronomía Mesoamericana. 17 (2): 221-242
- Barrera, L., Drago, M., Pérez, J., Zamora, A., Gómez, F., Sainz, T del R. y Mendoza, F. 2004. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex. 17 (1): 42-55

- Bennett, M. D. and Leitch, I. J. 1995. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Ann. Bot.* 76: 113-176
- Bonos, S. A., Plumely, K. A. and Meyer, W. A. 2002. Ploidy determination in *Agrostis* using flow cytometry and morphological traits. *Crop Sci.* 42: 192-196
- Caracuel, J. E., Cardenal, J. y Delgado, J. 2002. Aplicaciones Fotogramétricas Digitales en el Análisis Morfométrico de Fósiles. *Boletín Geológico y Minero.* 113 (1): 85-95
- Chase, M. W., Reveal, J. L. and Fay, M. F. 2009. A Subfamilial Classification for the Expanded Asparagalean Families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society.* 161: 132-136
- Climate data. 2016. Recuperado 10 de noviembre del 2016. De: <https://es.climate-data.org/>
- Conabio. 2006. Mezcales y diversidad. 2ª ed. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Delgado-Lemus, A., Torres, I., Blancas, J. and Casas, A. 2014. Vulnerability and risk management of *Agave* species in the Tehuacán Valley, México. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine.* 10: 2-15
- Doležal, J., Binarova, P. and Lucretti, S. 1989. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by Flow cytometry. *Biologia Plantarum, Praha.* 2 (31): 113-120
- Eguiarte, L. y Souza, V. 2007. Historia natural del Agave y sus parientes: evolución y ecología. In Colunga-García, P., Larqué, A., Eguiarte, L. y Zizumbo-Villareal, D.

Eds. En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. UNAM.
pp 3-21

Flores-Maya, S., Moreno-Ramírez, J., Romero-Rangel, S. y Rojas-Zenteno, C. 2010. Análisis morfológico y cariológico de *Agave karwinskii* Zucc. y *Agave macroacantha* Zucc. en el Municipio de Zapotitlán Salinas, Puebla. BIOCYT. 3 (11): 181-196.

García-Mendoza A. 2002. Distribution of Agave (Agavaceae) in Mexico. Cactus Succul J 74:177–186

García, A. 2007. Los agaves de México. Jardín Botánico, Instituto de Biología. UNAM. 1: 14-23

García-Mendoza, A., 2004. Agaváceas. In García-Mendoza, A., Ordoñez, M de J. y Briones-Salas, M. Eds. Biodiversidad de Oaxaca. México. UNAM. pp 161.

García-Mendoza, A. J. 2010. Revisión taxonómica del complejo *Agave potatorum* Zucc. (Agavaceae): nuevos taxa y neotipificación. Acata Botánica Mexicana. 91: 71-93

García-Mendoza, A. 2011. Fascículo 88: Agavaceae. In Inst. Bio. UNAM. Ed. Flora del Valle Tehuacán-Cuicatlán. pp 1-95

Gentry, H. S. 1982. Agaves of Continental North America. The University of Arizona Press, Tucson.

Gentry, H. S. and Sauck, J. R. 1978. The stomatal complex in *Agave*: groups *Deserticolae*, *Campaniflorae*, *Umbelliflorae*. Proc. California Acad. Sci. 41: 371-387

Google. 2015. Google Earth, versión 7. 1.5. 1557. Recuperado 10 de noviembre del 2015.
De: <https://www.google.es/earth/download/ge/agree.htm>

- Greilhuber, J., Dolezel, J., Lysak, M. and Bennett, M. D. 2005. The origin, evolution and proposed stabilization of the therms genome size and C-value to describe nuclear DNA contents. *Ann. Bot.* 95(1): 255-260
- Guevara, D. R., Champigny, M. J., Tattersall, A., Dedrick, J., Wong, C. E., Li, Y.,...Weretilnyk, E. A. 2012. Transcriptomic and metabolomics analysis of Yukon *Thellungiella* plants grown in cabinets and their natural hábitat show phenotypic plasticity. *BMC Plant Biology.* 12:175.
- Hajibarat, Z., Saidi, A., Hajibarat., Z. and Talebi., R. 2014. Genetic diversity and population structure analysis of landrace and improved chickpea (*Cicer arietinum*) genotypes using morphological and microsatellite markers. *Enviromental and Experimental Biology.* 12:161-166
- Hernández, V. R. M. 2005. Micromorfología de la epidermis foliar de plantas sanas y enfermas de *Agave tequilana* Weber. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Tesis Doctoral.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEGI). 2005. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. San José del Progreso, Oaxaca. Clave geoestadística 20072. Recuperado el 10 de noviembre del 2015. <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/datos-geograficos/20/20072.pdf>
- Kazachkova., Y. Batushansky, A., Cisneros, A., Tel-Zur, N. Fait, A., and Barak, S. 2013. Growth platform-dependent and independt phenotypic and metabolic responses of *Arabidopsis* and its halophytic relative, *Eutrema salsugineum*, to salt stress. *Plant Physiology* 162: 1583-1598
- León, V. N. I., Campos, A. G. V., Enríquez-del Valle, J. R., Velasco, V. V. A., Marini, Z. F. y Rodríguez, O. G. 2013. Diversidad de agaves en San Miguel Tilquiapam, Ocotlán, Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas.* 6: 1185-1195

- López, M. J. 2008. Estudio Etnobotánico en el Municipio de Santo Domingo Yodohino, Distrito de Huajuapán de León, Oaxaca. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México. 220 pp.
- Menegaz, A. N., Goin, F. J. y Ortiz, J. E. 1989. Análisis Morfológico y Morfométrico Multivariado de los Representantes Fósiles y Vivientes del Género *Lama* (Artiodactyla, Camelidae). Sus Implicancias Sistemáticas, Biogeográficas, Ecológicas y Biocronológicas. AMEGHINIANA. 26 (3-4): 153-172
- Microsoft Corporation. Microsoft office powerpovot for Excel 2016.
- Mora-López, J., Reyes-Agüero, J., Flores-Flores, J., Peña-Valdivia, C. y Aguirre-Rivera, J. 2011. Variación morfológica y humanización de la sección *Salmaniae* del género *Agave*. Agrocienca. 45: 465-477.
- Moreno-Salazar, S., Esqueda, M., Martínez, J. y Palomino, G. 2007. Tamaño del genoma y cariotipo en *Agave angustifolia* y *A. rhodacantha* de Sonora, México. Rev. Fitotec. Mex. 30 (1): 13-23
- Muñoz F. H., García M. J., Coria A. V. M., Hernández A. H. y Hernández R. J. 2014. Selección de plantas madre de *Agave cupreata* Tre et Berg. en Axaxacualco, Guerrero, Mexico. Foresta Veracruzana. 16 (1): 1-8
- Nobel, P. S. 1988. Environmental biology of agaves and cacti. Cambridge University Press. 270 pp.
- Parker, K. C., Trapnell, D. W., Hamrick, J. L. y Jodgson, W. C. 2014. Genetic and morphological contrast between wild and anthropogenic populations of *Agave parryi* var. *huachucensis* in south-eastern Arizona. Annals of botany. 113: 939-952

- Palomino, G., Dolezel, J., Méndez, I. and Rubluo, A. 2003. Nuclear Genome Size Analysis of *Agave tequilana* Weber. *Caryologia*. 1 (56): 37-46
- Palomino, G., Martínez, J. y Méndez, I. 2005. Citotipos en *Agave angustifolia* Haw. Determinados por Citometría de Flujo y Análisis de sus Cariotipos. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 21 (1): 49-54
- Palomino, G., Martínez, J. y Méndez, I. 2010. Análisis del Tamaño del Genoma y Cariotipo de *Agave aktites* Gentry (Agavaceae) de Sonora, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 81: 655-662
- Porras-Ramírez, E. S., Sosa-Marcos, Y., Palma-Cruz, F. and Cisneros, A. 2016. Phenotyping the genetic diversity of wild *Agave* species that coexist in the same spatial region. *Not Bot Horti Agrobi.* 44(2): 640-648
- Rana, J. C., Rakesh, K., Sharma, V., Rana, M., Verma, N. and Sharma, T. R. 2015. Genetic diversity and structure of *Pyrus* accessions of Indian Himalayan region based on morphological and SSR markers. *Tree Genetics and Genomes*. 11 (821): 2-14
- Roth I, H. Lindorf. 1986. Morfología y anatomía foliar de plantas de la Selva Nublada de Rancho Grande. Parque Nacional Henry Pittier. El ambiente físico, ecología general y anatomía vegetal. Fondo editorial Act. Cient. Venezolana. Caracas.
- Roth, I. 1992. Leaf structure: coastal vegetation and mangroves of Venezuela. Gebruder Borntraeger, Berlin
- Schoch, P. C. and Zinsou, M. S. 1980. Dependence of the stomatal index on environmental factors during stomatal differentiation in leaves of *Vigna sinensis* L. *Jour Exp. Bot.* 31 (124): 1211-1216.

- Sinclair, C. B. and Dunn, D. B. 1961. Surface printing of plant leaves for phylogenetics studies. *Stain Techn.* 16: 299-304
- Sosa del Castillo, M., Alemán, G. S., Pérez, H. Y., Abreu, C. E., Sosa del Castillo, D. y González, O. G. 2014. Caracterización de la lámina foliar de *Agave fourcroydes* Lem. obtenidas por propagación asexual. *Biotecnología Vegetal.* 14 (1): 37-44
- The Angiosperm Phylogeny Group. 2002. An Update of the Angiosperm Phylogeny Group Classifications for the Orders and Families of Flowering Plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society.* 141: 399-436
- Vásquez, G. 2006. Aprovechamiento integral del maguey pulquero (*Agave salmiana*) en Santa María Tlahuitoltepec Mixe Oaxaca. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo
- Wilkinson, H. 1979. The plant surface (mainly leaf). En: C. Metcalfe, L. Chalk (Eds). *Anatomy of the dicotyledons*, pp. 97-165. Vol. 1. 2^{da} ed. Clarendon Press, Oxford
- XLSTAT. 2015. XLSTAT Software. Version 2017.15.442, Copyright Addinsoft 1995-2015. Recuperado 26 de abril de 2017 de: <https://www.xlstat.com/es/>
- Zonneveld, B. J. M. 2003. The systematic value of nuclear DNA content in *Agave* L. and some related genera of Agavaceae. *Bradleya.* 21: 121-125

Zonneveld, B. J. M. and Van Iren, F. 2001. Genome size and pollen viability as taxonomic criteria: application to the genus *Hosta*. Plant Biol. 3: 176-185

10. Anexos

Anexo 1. Estadísticos de variables fenotípicas del complejo *A. potatorum*

Variable	Especie	Media	DEVEST	CV%	Variable	Especie	Media	DEVEST	CV%
Altura de la planta (cm)	Aseem	109.00	13	11.92	Diámetro de la espina terminal (cm)	Aseem	0.95	0.1	10.52
	Apota	55.20	10.68	13.85		Apota	0.50	0.141	32.56
	Anuss	77.11	6.87	12.44		Anuss	0.43	0.141	28.2
	Akarwins	207.5	38	18.31		Akarwins	0.45	0.11	25.99
Diámetro de la planta (cm)	Aseem	197.50	10.5	5.31	Relación diámetro/Alto de la planta	Aseem	1.85	0.14	7.82
	Apota	78.20	12.9	14.38		Apota	1.18	0.10	09.19
	Anuss	90.30	18.72	23.91		Anuss	1.39	0.18	12.93
	Akarwins	106.7	22.2	20.8		Akarwins	0.51	0.84	14.20
Largo de la hoja (cm)	Aseem	78.50	5.50	7	Relación largo de hoja/Ancho de hoja	Aseem	4.95	0.87	17.57
	Apota	36.60	5.43	11.94		Apota	5.30	1.62	30.69
	Anuss	45.44	7.50	20.49		Anuss	4.27	0.78	18.30
	Akarwins	58.72	3.8	6.47		Akarwins	4.90	0.78	19.50
Ancho de la hoja (cm)	Aseem	16.00	1	6.25					
	Apota	8.72	3.37	37.44					
	Anuss	9.00	1.43	16.39					
	Akarwins	5.20	1.28	24.61					
Número de hojas	Aseem	34.00	4	11.76					
	Apota	46.00	10	21.73					
	Anuss	36.00	3	8.33					
	Akarwins	148	8.5	5.74					
Espesor de la hoja (cm)	Aseem	1.00	0.2	20					
	Apota	1.28	0.496	25.80					
	Anuss	1.92	0.277	21.64					
	Akarwins	0.91	0.49	53.66					
Número de espinas laterales	Aseem	35.50	2.5	7.04					
	Apota	43.80	29.1	44.56					
	Anuss	65.30	11.71	23.73					
	Akarwins	63.5	15.2	23.93					
Espacio inter-espinas (cm)	Aseem	1.65	0.15	9.09					
	Apota	1.76	0.65	40.62					
	Anuss	1.60	0.57	32.38					
	Akarwins	1.71	0.67	38.18					
Longitud de las espinas laterales (cm)	Aseem	0.70	0.2	18.18					
	Apota	0.62	0.352	56.59					
	Anuss	0.62	0.277	44.67					
	Akarwins	0.31	0.083	26.51					
Longitud de la espina terminal (cm)	Aseem	3.95	0.55	13.92					
	Apota	5.30	1.02	19.24					
	Anuss	4.22	1.01	23.93					
	Akarwins	3.38	0.68	20.11					

Agave seemanniana (Asee); *A. potatorum* (Apota); *A. nussaviorum* (Anuss); *Agave karwinskii* (Akarwins); Desviación Estándar (DEVEST) y Coeficiente de Variación (CV)