



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

DIVISIÓN DE BIOLOGÍA MOLECULAR

**“Obtención de la huella genética de agaves mezcaleros de San
Luis Potosí por RAPD y AFLP”**

Tesis que presenta

Q.F.B. José Pablo Lara Ávila

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de Tesis:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

San Luis Potosí, S.L.P., 16 de Diciembre de 2005

La tesis "**Obtención de la huella genética de agaves mezcaleros de San Luis Potosí por marcadores moleculares RAPD y AFLP**" presentada para obtener el Grado de de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **José Pablo Lara Ávila** y aprobada el **16 de Diciembre de 2005** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís



Dr. Octavio Martínez de la Vega



Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís. Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (no. de registro 185750)



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

COPIA CERTIFICADA

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 018 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 16 días del mes de diciembre del año 2005, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Presidente	IPICYT
Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Secretario	IPICYT
Dr. Octavio Martínez de la Vega	Sinodal externo	CINVESTAV-IPN Irapuato

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

José Pablo Lara Ávila

sobre la Tesis intitulada:

Obtención de la huella genética de agaves mezcaleros de San Luis Potosí por marcadores moleculares RAPD y AFLP

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 20:48 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 16 días del mes diciembre de 2005.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico




Mtra. Ma. Elisa Lucio Aguilar
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

ÍNDICE GENERAL

Índice general.....	I
Dedicatoria.....	III
Agradecimientos.....	IV
Índice de tablas.....	V
Índice de figuras.....	VI
Resumen.....	1
Summary.....	3
1. Introducción.....	5
2. Revisión de literatura.....	7
2.1. El género <i>Agave</i>	7
2.1.1. <i>Agave salmiana</i>	8
2.2. Cultivo de tejidos vegetales.....	10
2.2.1. Reguladores de crecimiento.....	12
2.2.1.1 Auxinas.....	12
2.2.1.2. Citocininas.....	13
2.2.1.3. Giberelinas.....	13
2.2.1.4. Ácido abscísico.....	13
2.2.2. Cultivo de tejidos vegetales en <i>Agave</i>	14
2.3. Diversidad genética.....	15
2.3.1. Elementos de transposición y evolución molecular.....	16
2.3.2. Marcadores y taxonomía.....	18
2.3.2.1. Marcadores morfológicos: observación fenotípica.....	18
2.3.2.2. Marcadores bioquímicos: isoenzimas.....	19
2.4. Marcadores moleculares.....	20
2.4.1. Polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLP).....	23
2.4.2. Marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	25
2.4.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	25
2.4.2.2. Microsatélites (SSR).....	26
2.4.2.3. Fragmentos polimórficos de DNA amplificados al azar (RAPD).....	26
2.4.2.4. Polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP).....	27
2.5. Análisis estadístico aplicado a marcadores moleculares.....	32
2.5.1. Distancias genéticas.....	33
2.5.2. Análisis de cluster.....	35
2.5.3. Técnicas de remuestreo.....	36
2.5.4. Correspondencia entre matrices: Prueba de Mantel.....	38
2.5.5. Estructura genética.....	40
2.6. Estudios de marcadores moleculares en <i>Agave</i>	46
3. Objetivo general.....	49
3.1. Objetivos específicos.....	49

3.2. Estrategia experimental.....	49
4. Materiales y métodos.....	50
4.1. Colectas de hijuelos de <i>A. salmiana</i> en San Luis Potosí.....	50
4.2. Identificación taxonómica.....	51
4.3. Micropropagación.....	51
4.4. Extracción de DNA.....	52
4.5. Marcadores RAPD.....	54
4.6. Marcadores AFLP.....	55
4.7. Análisis estadístico.....	58
5. Resultados.....	60
5.1. Micropropagación.....	60
5.2. Extracción DNA.....	62
5.3. Selección de oligonucleótidos.....	63
5.3.1. RAPD.....	63
5.3.2. AFLP.....	63
5.4. Análisis de marcadores RAPD.....	67
5.5. Análisis de marcadores AFLP.....	71
5.6. Análisis estadístico.....	74
5.6.1. Estimación de la matriz de disimilaridad.....	74
5.6.2. Análisis filogenético.....	76
5.6.3. Análisis molecular de varianza.....	80
5.6.4. Prueba de Mantel: comparación de marcadores moleculares.....	81
6. Discusión de resultados.....	83
6.1. Cultivo de tejidos vegetales.....	83
6.2. Análisis estadístico.....	84
6.3. Origen de la variabilidad genética en <i>A. salmiana</i>	86
6.4. Comparación de marcadores moleculares.....	89
7. Conclusiones.....	91
8. Perspectivas.....	93
9. Referencias.....	94
Apéndice.....	101

DEDICATORIA.

A la memoria de mi papá.

A mi familia:

Mamá

Mis hermanas

Y

A los niños:

Daniel
Emiliano
José María
Santiago.

Agradecimientos

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C. por ser una institución dedicada al desarrollo de la investigación y permitió que realizara una formación de posgrado de alta calidad.

A CONACYT por la beca otorgada.

Al Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís por la confianza depositada en mí para la realización de este trabajo y por la motivación para una constante superación.

Al Dr. Gerardo Argüello Astorga por sus enseñanzas y compañerismo.

Al Dr. Octavio Martínez de la Vega por sus valiosas sugerencias y colaboración en este trabajo.

A todos mis compañeros de Laboratorio 1 por su apoyo en los momentos mas difíciles.

Índice de tablas.

Tabla 1. Características de cinco métodos de marcadores moleculares.....	22
Tabla 2. Cálculo de la media de la suma de desviaciones cuadradas.....	44
Tabla 3. Secuencia de oligos +1 utilizados para AFLP.....	56
Tabla 4. Secuencia de oligos+3 utilizados para AFLP.....	57
Tabla 5. Medios para cultivo de tejidos vegetales seleccionados para la regeneración de brotes.....	61
Tabla 6. Promedios de GD_{SM} dentro de cada población en cada sistema de marcador.....	76
Tabla 7. Porcentajes de variación encontrados en cada nivel jerárquico, para cada marcador en cada condición.....	80
Tabla 8. Porcentajes de variación encontrados en cada nivel jerárquico, para cada marcador.....	81
Tabla 9. Coeficientes de correlación entre marcadores para cada condición.	82

Índice de figuras.

Fig.1. <i>Agave salmiana</i> en la localidad de Ipiña, Ahualulco, S.L.P.....	9
Fig.2. Fotografía microscópica de tejido meristemático.....	11
Fig. 3. Representación de la técnica de RAPD.....	28
Fig.4. Representación de la técnica de AFLP.....	31
Fig. 5. Desarrollo de brotes en diversos agaves.....	62
Fig. 6. Gel de calidad. DNA extraído de plantas <i>in vitro</i>	62
Fig. 7. Gel de calidad. DNA extraído de hojas de hijuelo.....	63
Fig. 8. Patrones de RAPD generados con los oligos OPA16, OPA19, OPE7, OPF1 y OPF9 en <i>A. salmiana</i>	64
Fig. 9. Dendrogramas de RAPD generados por los oligos OPA19, OPE7, OPF1, OPF9 y OPA16 para muestras de <i>A. salmiana</i> de El Cuervo, Ipiña, Aquiles Serdán y <i>A. scabra</i>	65
Fig.10. Gel de AFLP teñido con nitrato de plata, que incluye muestras de <i>A. salmiana</i> de las tres regiones y <i>A. potatorum</i> , con las cuatro combinaciones de oligos +3.....	66
Fig. 11. Dendrograma de AFLP generado por la combinación E-aca + M-ctg de muestras de <i>A. salmiana</i> de diferente región y <i>A. potatorum</i>	66
Fig.12. Perfil de RAPD de DNA extraído de plantas <i>in vitro</i> procedentes de Aquiles Serdán, Ipiña y <i>A. scabra</i>	67
Fig. 13. Perfil de RAPD de DNA extraído de plantas <i>in vitro</i> procedentes del I.C.A.....	68
Fig. 14. Perfil de RAPD de DNA extraído de plantas <i>in vitro</i> procedentes de El Cuervo.....	68
Fig. 15. Perfil de RAPD de DNA extraído de hoja de hijuelo de plantas procedentes de El Cuervo e Ipiña.....	69
Fig. 16. Perfil de RAPD de DNA extraído de hoja de hijuelos procedentes de Aquiles Serdán	69

Fig. 17. Perfil de RAPD de DNA extraído de hoja de hijuelos procedentes del I.C.A.....	70
Fig. 18. Fotografía de la penca de un agave en la localidad de Aquiles Serdán, Charcas.....	70
Fig. 19. Fragmento del gel de AFLP para reproducibilidad.....	71
Fig. 20. Muestras de geles de AFLP de DNA de plantas <i>in vitro</i> de las tres localidades.....	72
Fig. 21. Muestras de geles de AFLP de DNA de hoja de las tres localidades.....	73
Fig. 22. Dendrograma generado para RAPD, bajo la condición <i>in vitro</i> que incluye las tres regiones y las muestras de referencia.....	77
Fig. 23. Dendrograma generado para RAPD, bajo la condición de hoja, que incluye solo dos regiones: Ipiña y El Cuervo y las muestras de referencia.....	77
Fig. 24. Dendrograma generado para AFLP, bajo la condición <i>in vitro</i> , que incluye las tres regiones: Ipiña, Aquiles Serdán, El Cuervo y las muestras de referencia.	78
Fig. 25. Dendrograma generado para AFLP, bajo la condición hoja, que incluye las tres regiones: Ipiña, Aquiles Serdán, El Cuervo y las muestras de referencia.	79

Resumen general.

En el Altiplano Potosino, la especie vegetal utilizada para la producción de mezcal es *Agave salmiana*. La industria mezcalera, que carece de sistemas de explotación basados en el conocimiento biológico de la especie que utiliza como materia prima, puede causar estragos tanto demográficos como en la diversidad genética de *A. salmiana*. Los marcadores moleculares RAPD y AFLP basados en PCR, son ampliamente utilizados para el análisis de diversidad genética ya que su principal ventaja es que no requieren un conocimiento previo de la especie bajo estudio.

En el presente trabajo, los resultados del análisis de la diversidad genética de tres poblaciones de *A. salmiana* (Ipiña, Aquiles Serdán y El Cuervo) utilizando extractos de DNA total de hoja y del meristemo central de los especímenes colectados, mostraron que la diversidad genética dentro de cada población es mayor que la variabilidad interpoblacional. La diversidad interpoblacional se puede observar en los dendrogramas, donde existe una tendencia a la formación de grupos de acuerdo al origen geográfico.

El método de AFLP mostró ser más robusto que el de RAPD al aplicarse a *A. salmiana*, en base a los valores de “bootstrap” de los dendrogramas generados; en tanto que la prueba de Mantel mostró que al menos en dos poblaciones, El Cuervo e Ipiña; AFLP y RAPD no son métodos correlacionados.

Se sugiere que el origen de la variabilidad genética de las poblaciones analizadas se debe a que las plantas madre de los diferentes hijuelos colectados son producto de polinizaciones cruzadas que tuvieron lugar anteriormente en esas localidades. Sin embargo, en *A. fourcroydes* se ha reportado variabilidad genética

asexual al comparar los patrones de bandeo de AFLP de una planta madre con el de sus hijuelos, y se ha sugerido que la planta progenitora acumula mutaciones somáticas que se heredan a los descendientes.

En *A. tequilana* se han encontrado secuencias terminales de retrotransposones Ty-copia, que podrían utilizarse para inferir relaciones filogenéticas con otras especies de Agave.

Con estos antecedentes podemos sugerir que parte de la variabilidad genética encontrada en *A. salmiana* puede deberse a la actividad de elementos de transposición, por lo que es necesario realizar estudios pareados hoja-meristemo (*in vitro*), con el fin de determinar si existen diferencias en el patrón de bandeo de un tejido a otro en el mismo individuo, y demostrar la presencia de estos elementos.

Este es el primer trabajo de marcadores moleculares en *A. salmiana* de San Luis Potosí y la diversidad genética encontrada es importante desde el punto de vista ecológico, sin embargo el uso irracional de las magueyeras pudiera afectar esta diversidad en un futuro cercano si no se implementan programas de conservación de germoplasma *in situ e in vitro*.

SUMMARY.

In the “Altiplano Potosino”, the plant species used for “mezcal” production (a Mexican spirit) is *Agave salmiana*. The industry of mezcal production lacks a sustainable exploitation system that is based on the biological knowledge of the species used as a carbohydrates source and this may reduce dramatically the population and genetic diversity of *A. salmiana*.

The molecular markers based on polymerase chain reaction (PCR), such as RADP and AFLP, are widely used for genetic diversity assays; applying these markers has the great advantage that no additional genetic or molecular information (e.g. specific DNA sequences) of *A. salmiana* is necessary.

In this work, the analyses of genetic diversity of three populations of *A. salmiana* (located at Ipiña, Aquiles Serdán and El Cuervo in San Luis Potosí), using total DNA extracts from leaves and plants propagated from central meristematic tissues, showed that the genetic diversity within populations is higher than that among populations, however a population cluster group trend was observed in the dendrograms produced.

The AFLP method was more robust than the RAPD method based on the bootstrap values obtained from the dendrograms; on the other hand, the Mantel test showed that at least in two populations (El Cuervo and Ipiña) AFLP and RAPD were not correlated.

We propose that the source of genetic variability of the populations analyzed, originates from cross pollination of the progenitor plants of the samples collected. However, in previous studies, it has been reported that *A. fourcroydes* showed genetic diversity in plants that were asexually produced when AFLP fingerprints of mother plants and daughter ramets (hijuelos) were compared. It has been suggested that the mother plant accumulates somatic mutations which can be inherited to the daughter ramets when a rhizome is produced.

In *A. tequilana*, terminal sequences of retrotransposons (Ty-copia) have been found and these elements can be used to track phylogenetic relations with other *Agave* species.

Based on this information, we suggest that part of the genetic variability found in *A. salmiana* is due to the transposition elements, however it is necessary to perform additional experiments with paired analysis [plants propagated from central meristem (*in vitro*) – leaf] to determine if differences in AFLP fingerprints are present in mother plants and daughter ramets of the same plant and also if retrotransposon sequences are present.

This is the first work using molecular markers in *A. salmiana* from San Luis Potosí and the genetic diversity found is important from an ecological point of view. However, the uncontrolled use of *Agave* plants by mezcal producers could affect this diversity in a near future, therefore an *in vitro* and *in situ* germplasm conservation program and rational use of this species is required.

1.0. Introducción

La comprensión de las relaciones genéticas entre especies y dentro de éstas, es útil para una precisa identificación con respecto a la protección varietal de especies con un interés económico, y es también el primer paso para asegurar la calidad de productos derivados. La Unión Europea ha establecido como un requisito para asegurar la calidad de productos o subproductos de importación de especies animales o vegetales, el análisis de su huella genética. De manera adicional, los datos generados por los estudios de genética de poblaciones permiten estimar parámetros críticos para conocer la situación actual de las especies, así como los procesos evolutivos que están operando en ellas.

Por otra parte, el contar con un banco de germoplasma *in vitro* asegura la conservación de las especies en estudio. En este contexto el uso de cultivo de tejidos y marcadores moleculares garantiza la identificación de la especie con mayor certeza que los métodos de taxonómicos tradicionales.

En la elaboración del mezcal se utilizan varias especies de agaves, de acuerdo a la NOM-070-SCFI-1994. En la mayoría de los casos, como en el del Altiplano Potosino, la explotación se realiza única y exclusivamente sobre poblaciones silvestres. Esta práctica tiene un fuerte impacto en esas poblaciones tanto en aspectos demográficos como genéticos.

Esta situación de riesgo se da, cuando como es común, no se planea estratégicamente el aprovechamiento sustentable de las especies involucradas y/o se siguen esquemas basados en el monocultivo y en la clase de explotación que ha ocasionado el llamado “Boom del Tequila”. A esto se agrega, la carencia de un

sistema de calidad durante el proceso industrial de producción del mezcal, donde cada fase sigue dependiendo del criterio del operador.

El manejo integral de los agaves silvestres debe incluir programas que permitan conservar la base genética de la especie, así como la protección de las otras especies animales con las cuales interactúan. El aprovechamiento del agave o maguey debe ser de acuerdo a las condiciones naturales y culturales de cada región, y debe aprovecharse también su potencial en la restauración de ecosistemas.

Alrededor de los agaves de México existe una vasta riqueza reconocida desde tiempos prehispánicos, y son un patrimonio vivo cuya conservación y aprovechamiento es tarea de todos.

2.0. Revisión de literatura.

2.1. El género Agave

La República Mexicana cuenta con el mayor número de especies endémicas de los géneros de la familia *Agavaceae*. Se estima en más de 200 el número de especies, de las cuales un buen número de ellas tienen alguna utilidad desde el punto de vista económico o antropocéntrico (www.semarnat.gob).

Agave (del griego “admirable”) es el nombre dado por Carlos von Linneo en 1753 a este grupo de plantas. A inicios del siglo XX llegaron a describirse 310 especies, pero Gentry (1982) la redujo a 132.

La riqueza del género *Agave* en México, se debe a que hace 8 millones de años surgió en lo que hoy es el Altiplano Mexicano, y de aquí sus especies se diversificaron y ampliaron su distribución gracias al desarrollo de un metabolismo especial, el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), que les permite resistir sequías al utilizar con mayor eficiencia el agua; además de acumular azúcares y fibras en lugares donde la escasa humedad y las pocas precipitaciones son el principal obstáculo para el desarrollo vegetal (SEMARNAT, 2005).

Quizás lo más importante de estas plantas, es su aspecto ambiental o su valor agroecológico, por su presencia en los parajes semidesérticos y desérticos que crecen cada vez más en México, y donde desempeñan un papel ecológico clave al acumular agua en sus rosetas, evitar la erosión del suelo y proporcionar un hábitat a varias especies de animales (SEMARNAT, 2005).

No obstante la riqueza mencionada, la mayoría de las especies de ésta familia están amenazadas por diversas causas generadas en su mayoría por la actividad

humana. En particular, últimamente se ha puesto en riesgo el recurso genético de las *Agavaceas*, con la puesta en boga de las cadenas productivas de destilados algunas ahora con denominación de origen, como el mezcal y el tequila, en varias regiones del país (www.redagaves.com).

2.1.1. *Agave salmiana*.

Tradicionalmente, la especie utilizada para la elaboración del mezcal en el Altiplano Potosino-Zacatecano es el maguey Verde o Mezcalero (*A. salmiana* var. *Crassipina* Trel.). Este agave tiene una distribución geográfica que comprende los estados de Durango, Zacatecas y San Luis Potosí (Aguirre-Rivera y col., 2001).

La morfología de los agaves es muy similar a simple vista, con algunas diferencias como el desarrollo de un tallo o tronco evidente, la tonalidad de sus hojas que van desde el azul-verdoso hasta el verde, el tamaño que adquieren, la presencia o ausencia de espinas laterales, etc. Pero el maguey mezcalero potosino (*A. salmiana* var. *Crassipina*) tiene varias peculiaridades según las observaciones de Antonio Ramírez Laguna y Howard Scott Gentry (Aguirre-Rivera y col., 2001).

Es una planta en forma de roseta vigorosa (Fig. 1), compuesta por un tallo grueso y corto sobre el que se insertan en espiral las hojas (pencas) ya desplegadas. Las hojas sin desplegar conforman un cono central apretado llamado cogollo. Las hojas jóvenes son rectas, las adultas se separan del eje en ángulos cada vez mayores y las seniles están casi extendidas horizontalmente y luego se encorvan hacia abajo (Aguirre-Rivera y col., 2001).

Sus hojas son de color mate, de verde grisáceo o verde a verde blanquecino. La hoja termina en una espina recta rígida. Sus espinas laterales son de color castaño oscuro a castaño grisáceo y miden de 3 a 20 mm, son triangulares aplanadas y generalmente con puntas recurvadas (Aguirre-Rivera y col., 2001).



Fig.1. Agave salmiana en la localidad de Ipiña, Mpio. de Ahualulco, S.L.P.

Características morfológicas:

- Roseta: 2 m de ancho y 1.5 m de alto.
- Hojas: lanceoladas y gruesas con espinas grandes y anchas; verde a verde oscuro.
- Inflorescencia: hasta 8 m de alto, flores amarillo-verdosas
- Reproducción: La forma más común de reproducción del maguey mezcalero es a partir de un rizoma (hijuelo), que emerge a cierta distancia de la base de la planta, el cual dará lugar a otro individuo, desde su primer año la planta genera de 8 a 15 hijuelos, por lo cual es importante mantener el terreno libre de maleza. Los hijuelos de 3 a 4 años de edad, luego son transplantados al lugar definitivo donde alcanzaran el tamaño necesario para cosecharlos (tardan alrededor de 7 años mas en llegar al estado adulto) (Aguirre-Rivera y col., 2001).

2.2. Cultivo de tejidos vegetales.

Las técnicas de propagación por cultivo de tejidos o micropropagación, representan una nueva forma de propagación vegetativa que ofrece ventajas sobre los métodos tradicionales. Por ejemplo, permite la multiplicación clonal de plantas libres de enfermedades en un ambiente controlado evitando así las variaciones esencialmente impredecibles de las condiciones medioambientales en ecosistemas naturales (Abdelnour, 1999; Poulsen, 1988).

El material vegetal con el que se inicia un cultivo de tejidos puede ser cualquier célula, tejido u órgano de la planta. Se puede partir de fragmentos de tallo, raíz, hoja, meristemo, embriones, es decir de tejidos somáticos; pero también se puede iniciar a partir de células o tejidos no somáticos: anteras, polen, microesporas, óvulos, etc. Según sea el explante utilizado se hablará de cultivo de hoja, de meristemo, de polen, de embriones, etc.

Las condiciones de cultivo pueden favorecer la proliferación desorganizada de las células del explante hasta dar lugar a un callo, el cual puede ser friable, o incluso a un cultivo de células cuando se separan éstas del callo. En otros casos se puede pretender la regeneración de la planta completa (morfogénesis) mediante la formación de raíces (rizogénesis) y/o de tallos. La morfogénesis se produce a partir del explante inicial mediante la formación de raíces y/o tallos (brotes adventicios) (Pierik, 1990a).

La organogénesis directa consiste en la generación de plantas sin raíces directamente del explante. En la embriogénesis directa se forman embriones, al igual que en la semilla, que llegarán a ser plantas completas. En la organogénesis indirecta y en la embriogénesis indirecta, el explante forma

un tejido amorfo llamado callo, de donde posteriormente se formaran los brotes (plántulas) o los embriones, en función de la especie y los reguladores de crecimiento utilizados.

El cultivo de meristemo es un método efectivo para la eliminación de infecciones virales y es el material preferido para la conservación de germoplasma (Abdelnour, 1999; Morel y Martin, 1952; Poulsen, 1988; Pierik, 1990a).

El meristemo (Fig. 2) es un tejido vegetal caracterizado por tener una alta división celular, produciendo células que llegaran a diferenciarse en tejidos especializados (Poulsen, 1988). La razón principal por la cual las células meristemáticas son indemnes a los virus es que el meristemo carece de tejidos vasculares, que es por donde se propagan los virus que van contaminando a la planta.

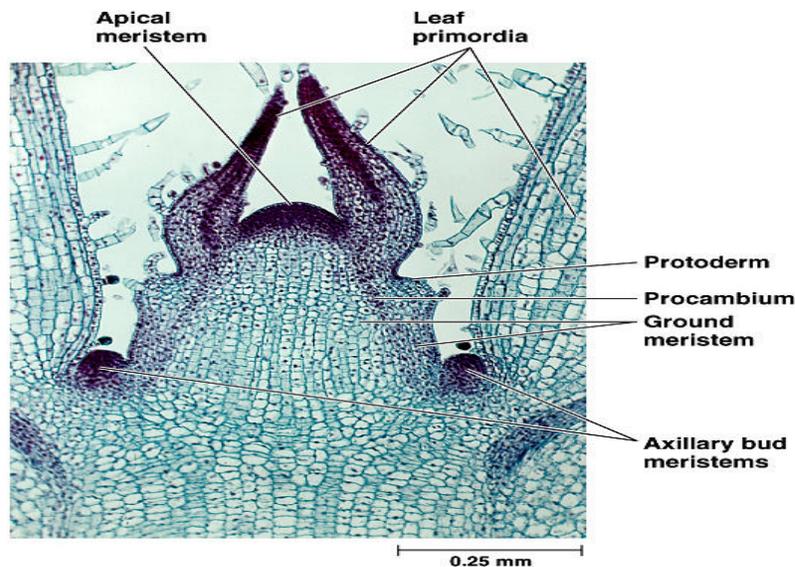


Fig.2. Fotografía microscópica de tejido meristemático.

Cuando las colecciones de germoplasma se mantienen *in vitro*, es importante monitorear la estabilidad genética de los materiales, debido a que en el cultivo puede presentarse variación somaclonal. La variación somaclonal es más común en tejidos desorganizados como callos y suspensiones celulares y menos frecuentes en tejidos organizados como meristemo, y es por esto que se recomienda su utilización para el establecimiento de colecciones de germoplasma (Pierik, 1990b).

2.2.1. Reguladores de crecimiento.

Para el desarrollo óptimo del cultivo *in vitro* de tejidos y órganos es necesario que, en adición a los nutrientes, se incluya en el medio de crecimiento una o más sustancias reguladoras como auxinas y/o citocininas, y en algunos casos también giberelinas o ácido abscísico. Por otro lado, los requerimientos de estas sustancias varían considerablemente con los tipos de tejidos y los niveles endógenos de estos reguladores, así como con la finalidad del cultivo *in vitro*.

2.2.1.1. Auxinas

Se relacionan con la elongación, tropismo, dominancia apical, abscisión, enraizamiento y otros. En cultivo *in vitro* las auxinas son utilizadas principalmente para la diferenciación de raíces y la inducción de callo. Las auxinas más utilizadas son: IBA (ácido indol-3-butírico), NAA (ácido naftalenacético), IAA (ácido indolacético) y 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético). El IBA y el NAA son usados frecuentemente para enraizamiento. El 2,4-D es muy efectivo para la inducción de callos.

2.2.1.2. Citocininas

Están implicadas en la división celular, modificación de la dominancia apical, diferenciación de tallos y otros. En los medios para cultivo *in vitro* se incorporan citocininas para promover la división celular y la inducción de yemas adventicias en callos y órganos. Además se usan estos compuestos para la proliferación de tallos axilares por la ruptura de la dominancia apical. Las citocininas más usadas son: BAP (bencilamino purina), cinetina y 2-iP (isopentenil-adenina).

2.2.1.3. Giberelinas

Existen multitud de giberelinas conocidas. La de mayor uso es el GA3, pero debe tenerse en cuenta que es muy sensible al calor. Comparado con las auxinas y citocininas, las giberelinas se utilizan raramente. La mayoría de los explantes sintetizan cantidades suficientes de este grupo de hormonas. Cuando se aportan giberelinas al medio de cultivo, su función principal es el alargamiento de las regiones subapicales.

2.2.1.4. Ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA) en la mayor parte de los casos produce un efecto negativo en los cultivos *in vitro*, pero en determinados casos promueve la maduración de embriones, y en cultivos de células en suspensión facilita la sincronización de la división celular.

2.2.2. Cultivo de tejidos en *Agave*.

En el género *Agave*, se ha reportado la embriogénesis somática para *A. victoria-reginae* (Rodríguez-Garay y col., 1996) partiendo de explantes de hoja, en un periodo de 2 a 6 semanas de cultivo en medio MS adicionado con un grupo de vitaminas denominado L2 y 0.3 mg/L de 2,4-D; con la germinación de embriones somáticos en medio MS de fuerza media en un lapso de 8 semanas y en medio SH de fuerza media en un lapso de 4 semanas, ambos careciendo de reguladores de crecimiento.

Para *A. tequilana* Webber var. Azul se ha reportado embriogénesis somática indirecta, siendo los mejores explantes para la formación de callos y la posterior producción de embriones somáticos, explantes de hoja de plántulas mantenidas *in vitro* (Rodríguez-Garay y col., 1996).

Para *A. cocui* Trelease, un agave de Venezuela, se estableció un protocolo para su propagación masiva mediante organogénesis indirecta a partir de hojas de plántulas mantenidas *in vitro*, obtenidas éstas, a su vez por medio de organogénesis directa; en medio MS adicionado con 2 mg/L de Benzilaminopurina (BA) y 0.1 mg/L de ácido naftalen acético (ANA) (www.funflc.org.ve/webfunda/programas/agave/croi4)

Para *A. parrasana* Berger, un agave utilizado como planta ornamental nativo del estado de Coahuila, México, se reporta un método eficiente para su propagación *in vitro*. Se logró la obtención de brotes de buena calidad en medio MS adicionado

con L2 vitaminas y con una concentración de Benziladenina de 13.3 μ M. (Santacruz-Ruvalcaba y col., 1999)

No se encontraron reportes previos en revistas arbitradas de métodos de propagación *in vitro* de *A. salmiana*.

2.3. Diversidad genética

La diversidad biológica o biodiversidad es la colección de especies de plantas, animales, bacterias, etc. –todos los organismos vivientes- que habitan en un ecosistema en particular. Un ambiente consiste del ciclo de intercambio entre el material orgánico no vivo (mineral, nutriente) y la biodiversidad viviente.

La diversidad genética se refiere a la variación al nivel de “genes individuales” (polimorfismo) que provee de un mecanismo a las poblaciones para adaptarse a los cambios de su medio ambiente. La mayor variación y/o el mejor de los cambios que al menos alguno de los individuos tenga en su variantes alélicas, producido por el nuevo ambiente, dará lugar a descendientes con la variante que continuará en la población en las generaciones subsecuentes (www.genetics.nbi.gov/GeneticDiversity).

Hay una delicada interdependencia entre diversidad biológica y genética, cambios en el ambiente resultan en cambios en la biodiversidad, requiriendo adaptación de las especies que permanecen. Cambios en la diversidad genética, particularmente la disminución de la diversidad a través de la pérdida de especies, resulta en la reducción de la diversidad biológica (www.genetics.nbi.gov/GeneticDiversity).

Los análisis de diversidad genética permiten caracterizar y conservar la base genética de una especie cultivada o natural, introducir factores de variación genética en un grupo de genotipos y estudiar factores que controlen características agronómicas de interés, además que, es una medida relativa, resultado de comparar un individuo o población con otros individuos o poblaciones (Ramírez-Ramírez, 2003).

Conocer la similitud entre los individuos y las poblaciones es de gran utilidad en los programas de mejoramiento genético, pues permite, además de la organización del material, la selección adecuada de los genotipos superiores y la complementación con datos fenotípicos y agronómicos para el desarrollo de una población mejorada (Ramírez-Ramírez, 2003). Además, es fundamental para proponer estrategias de manejo racional (Eguiarte-Frums, 2003).

2.3.1. Elementos de transposición y evolución molecular

En 1951 Barbara McClintock describió una nueva clase de elementos genéticos controladores en *Zea mays*, ahora llamados elementos transponibles (TE). Ella propuso que su papel en la evolución era servir como fuente de hipermutagenicidad que conduce, eventualmente, a la generación de individuos en una población mejor adaptados a un estrés severo, cercano al punto de aniquilación (Bennetzen, 2000; Fedoroff, 2000).

Los elementos transponibles, son constituyentes normales del genoma de todos los organismos estudiados, incluyendo plantas. En especies vegetales con genomas grandes y complejos, los TE pueden constituir más del 50% del DNA nuclear y ser responsables de variación genética (Bennetzen, 2000; Fedoroff,

2000). Tienen dos propiedades básicas. La primera es que pueden migrar a través del genoma y por lo tanto pueden causar rearrreglos en la arquitectura del genoma así como alteraciones en la regulación de genes. La segunda es su habilidad para incrementar su número de copias en el genoma a través del proceso de su transposición, por lo que estos elementos pueden ser considerados como herramientas moleculares naturales involucradas en la formación, organización, estructura y función de los genes y genomas eucariotes.

Los TE han sido clasificados de acuerdo al modo de transposición: (i) transposones, que utilizan un mecanismo DNA-DNA y (ii) elementos retrotransponibles, que utilizan un intermediario RNA. Estos últimos son muy abundantes en plantas, debido precisamente a esa abundancia es que se considera que poseen un gran potencial para alterar el orden del genoma al azar; mas aun, diferentes regiones del genoma pueden experimentar diferentes arreglos.

Sin embargo, estudios de secuencias que flanquean transposones, han indicado preferencias para la inserción y/o retención en regiones no metiladas y activas genéticamente; muy probablemente en regiones de eucromatina del genoma de plantas. Un comportamiento similar tienen los retrotransposones LTR (Bennetzen, 2000; Fedoroff, 2000).

Como todas las secuencias expresadas de eucariotes, los elementos trasponibles son diferencialmente activos en tejidos distintos y/o bajo diferentes regimenes de inducción. Algunos retrotransposones LTR, pueden ser activados por la infección de algún patógeno o al herir algún tejido de la planta (Bennetzen, 2000).

El grado en que los elementos transponibles son responsables de la estructura del genoma y su evolución dependerá del número y el tipo predominante de elementos que están presentes. De aquí, los diferentes resultados en cuanto a la cantidad, arreglos y contribuciones genéticas de estos elementos. Esta variabilidad es exactamente la que se observa aún entre especies de plantas muy cercanas (Bennetzen, 2000; Fedoroff, 2000).

En algunos genomas de plantas, mucha de la variación en la estructura del genoma se debe a los elementos transponibles. En otras especies, estos elementos son pocos, defectivos o eficientemente regulados. En estos casos la variación en la estructura del genoma puede ser debida a otros factores intrínsecos o extrínsecos (Bennetzen, 2000).

2.3.2. Marcadores y taxonomía.

2.3.2.1. Marcadores morfológicos: observación fenotípica.

La taxonomía siempre ha estudiado características morfológicas, lo cual requiere observaciones muy exhaustivas de los organismos en diferentes estadios de desarrollo. Los criterios utilizados carecen muy a menudo de definición y objetividad y, en cualquier caso, son marcadores ambiguos debido a las influencias ambientales y al criterio del observador. (Becerra y Paredes, 2000; Becerra y col., 2001).

En plantas como los agaves, donde la mayoría de las especies tienen un ciclo de vida muy largo y florecen una sola vez cerca del final de su vida, la clasificación en base a sus características morfológicas se complica en el campo, dado que la flor es una clave muy importante para la clasificación taxonómica.

2.3.2.2. Marcadores bioquímicos: isoenzimas.

Los primeros marcadores desarrollados a finales de los 70's se basaron en la identificación de proteínas e isoenzimas por electroforesis en geles de poliacrilamida. Con ellos se abrió el conocimiento de la estructura y heterogeneidad genética entre diferentes especies de organismos, variedades y poblaciones de distinto origen geográfico.

Las isoenzimas son formas moleculares estructuralmente diferentes de un sistema enzimático con la misma función catalítica. Las isoenzimas se originan por alteraciones en su secuencia de aminoácidos que causan cambios en la carga neta o en su conformación, y por lo tanto en su movilidad electroforética (Stark-Muller, 1998).

Tales alteraciones de aminoácidos proveen una manera de monitorear cambios en la secuencia de nucleótidos del respectivo gen codificante. Como consecuencia, las isoenzimas pueden marcar la variación alélica del loci de un gen estructural, ya que tales alelos son representados por isoenzimas con diferente movilidad electroforética. Las isoenzimas que se ha probado que están codificadas por diferentes alelos del mismo gen son designadas como alozimas o aloenzimas (Stark-Muller, 1998).

Las ventajas que ofrece las aloenzimas como marcadores son: La especificidad del sustrato permite el análisis de un gen específico. Las aloenzimas son usualmente expresadas codominantemente por lo que los genotipos homo y heterocigotos pueden ser diferenciados. El análisis es rápido y se puede realizar en animales y plantas (Stark-Muller, 1998)

Por otro lado, las limitaciones que tienen estos marcadores es que los genes codificantes representan una muestra no al azar, pues solo las sustituciones de nucleótidos que producen cambios en la movilidad electroforética de la proteína codificada son evidentes, y no se puede excluir que una misma banda represente dos alelos con la misma movilidad. Pero la principal limitante es que no es capaz de detectar suficiente polimorfismo entre variedades o especies próximas debido a que las proteínas son el resultado de la expresión génica, que además puede ser distinta de unos tejidos a otros, de una etapa de desarrollo a otra, y puede ser influida por el medio ambiente y variar de una época del año a otra (Becerra y Paredes, 2000; Becerra y col., 2001).

2.4. Marcadores moleculares

El análisis de la variabilidad del DNA permite determinar puntos de referencia en los cromosomas conocidos como marcadores moleculares; los cuales se definen como cualquier fenotipo molecular proveniente de segmentos específicos de DNA que representan regiones del genoma que pueden o no ser expresadas (Tonon y col., 2002).

Las técnicas para el estudio de la variabilidad del DNA, se basan en que cada organismo posee una secuencia característica de nucleótidos que componen su DNA, y la detección de estas diferencias por medio de marcadores moleculares revela una “huella digital genética” (Genetic Fingerprinting) que permite identificar individuos (Tonon y col., 2002).

Los marcadores basados en DNA permiten estudiar el genoma con una amplia cobertura al incluir secuencias codificadoras y no-codificadoras del DNA (exones e

intrones). Esto permite detectar con mayor eficiencia cambios genéticos puntuales, comparado con el análisis de las proteínas. Las principales ventajas radican en la presencia de un número ilimitado de ellos, que no son afectados por el medio ambiente, no presentan efectos pleiotrópicos y que pueden ser evaluados en cualquier etapa de desarrollo de la planta (Becerra y Paredes, 2000).

Algunas de estas regiones no codificantes, parecen estar involucradas en mantener la estructura del cromosoma, recombinación y/o control regulatorio. Estas regiones no codificantes, pueden acumular mutaciones más rápidamente que las codificantes, donde las mutaciones pueden afectar la supervivencia del organismo, y por lo tanto tienden a no ser transmitidas a la siguiente generación. Como estas mutaciones ocurren al azar, cada individuo lleva un set único de estas secuencias repetitivas (Tonon y col., 2002).

El uso de los marcadores de DNA puede proporcionar información que permita una clasificación y ayuda en casos donde hay duda o donde los datos morfológicos no son claros. Es imprescindible que exista una correlación entre la clasificación morfológica y la basada en marcadores moleculares.

También permiten el análisis de variación a nivel genómico y permite la detección de variación genética a nivel molecular, como en el caso de la variación somaclonal (Osipova y col., 2003).

Las aplicaciones de los marcadores moleculares de DNA son muy diversas y es de esperar que cada vez se les encuentren nuevos usos. Por ahora se vienen empleando en la diferenciación de individuos (Dangi y col., 2004), discriminación entre clones (Osipova y col., 2003), análisis filogenéticos y taxonómicos (Ma y col., 2004), mapeo de genomas (Friesen y Faris, 2004), cuantificación de variabilidad

génica intra e ínter específica en poblaciones micropropagadas o naturales (Abbot, 2003), mejoramiento genético, detección de infecciones o propensión a sufrirlas (Liu y col., 2004), localización de resistencia a enfermedades (Farinho y col., 2004;) y dispersión de especies (Baydar y col., 2004).

Una serie de técnicas y marcadores han sido desarrollados para estimar la diversidad genética, pero ninguna es universalmente ideal; cada técnica tiene sus ventajas y desventajas. Por lo tanto, la elección de la técnica depende del investigador y de la resolución genética necesitada, así como también del presupuesto con que se cuenta y la experiencia técnica disponible (Tabla 1) (Mueller y Wolfenbarger, 1999).

Tabla 1. Características de cinco métodos de marcadores moleculares (Tomado de Mueller y Wolfenbarger, 1999).

CRITERIO	AFLP	RAPD	SSR	RFLP	ALOENZIMAS
Cantidad de Información	Alto	Alto	Alto	Bajo	Bajo
Reproducibilidad	Alto	Variable	Alto	Alto	Alto
Resolución	Alto	Moderado	Alto	Alto	Moderado
Facilidad de uso	Moderado	Fácil	Difícil	Difícil	Fácil
Tiempo	Corto	Corto	Largo	Largo	Corto

Con el desarrollo de las tecnologías basadas en DNA, se han incorporado marcadores para detectar cambios en el genotipo de los individuos, aquellos basados en Fragmentos de Restricción Polimórficos (RFLP) y en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Esta última ha derivado en múltiples técnicas, dentro de las cuales las más utilizadas son RAPD y AFLP.

2.4.1. Polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP).

En la década de los años 70's y 80's se identificaron las enzimas de restricción, que permiten cortar el DNA en lugares específicos y detectar los denominados polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Esta técnica está basada en la digestión del DNA total de un individuo con diferentes enzimas de restricción. Las enzimas tipo II son capaces de reducir la complejidad del DNA, como el de plantas, a una población de fragmentos de diferente tamaño (Becerra y Paredes, 2000).

Los fragmentos resultantes son separados por electroforesis en geles de agarosa y transferidos por capilaridad a una membrana de nylon (Southern Blot). Esta membrana se hibrida con una sonda (radioactiva o no). El producto de la hibridación es visualizado por medio de una autorradiografía de rayos-X, de acuerdo al peso molecular de la banda.

Básicamente, los RFLPs son causados por rearrreglos del DNA, tales como pérdidas, inserciones o sustituciones de secuencias o nucleótidos únicos, lo que significa la ganancia o pérdida de sitios de restricción. Esto es detectado a través de diferencias en el peso molecular de los fragmentos homólogos de restricción del DNA genómico al hibridar con la sonda seleccionada (Becerra y Paredes, 2000).

Cuando los patrones de RFLP de DNA nuclear son examinados en poblaciones segregantes se comportan como marcadores codominantes y pueden ser utilizados para crear mapas de ligamiento. Los primeros mapas genómicos basados en la distribución física de los genes en vez de la frecuencia de

entrecruzamiento se hicieron utilizando esta técnica (Botstein, 1980; Brettschneider, 1998; Becerra y Paredes, 2000).

Las sondas de DNA para esta técnica suelen corresponder a genes previamente conocidos, aunque a veces se usan DNA preparados a partir de amplificaciones inespecíficas. Aunque RFLP evalúa sólo un tipo de polimorfismo, es decir un sitio de restricción si se utiliza una solo enzima, el resultado es muy preciso.

Ya que los RFLPs se heredan en forma Mendeliana simple, si la sonda empleada representa una copia única, ella es considerada como un locus y las variaciones en patrones son analizados como alelos (bialélicos o multialélicos). El nivel de polimorfismo que esta técnica puede detectar depende en gran medida de la naturaleza de las sondas empleadas, enzimas de restricción utilizadas y de la complejidad en cuanto al tamaño del genoma de la especie en estudio (Brettschneider, 1998).

Dentro de las principales desventajas de los RFLP están la clonación de las sondas y el uso de radioactividad; que son tareas lentas y caras. Aunque últimamente, el desarrollo de la técnica no-radioactiva ha simplificado esta metodología (Becerra y Paredes, 2000).

La aplicación de esta técnica ha sido de gran utilidad en estudios filogenéticos, diversidad genética (Singla y col., 2004) e identificación de cultivares con propósitos de protección varietal (Lombard y col., 2000). En la década de los 80s la forma principal de estudiar la variación genética era por medio de RFLP, pero todo eso ha cambiado con el desarrollo de la PCR.

2.4.2. Marcadores moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

2.4.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue concebida por Kary Mullis a mediados de los 80. El método imita el mismo proceso que las células utilizan para duplicar su DNA durante la división celular.

La reacción básica de la PCR comienza con la desnaturalización del DNA molde para separar las cadenas, continúa con el alineamiento de un par de oligonucleótidos con su DNA molde, y termina con la polimerización para sintetizar un nuevo DNA entre los dos oligonucleótidos que flanquean la secuencia de interés. De aquí se vuelve a la desnaturalización para comenzar un nuevo ciclo. Hoy en día todo el proceso está completamente automatizado en un aparato llamado termociclador, y existe una batería de enzimas y condiciones que permiten polimerizar hasta 35 kb sin errores, aunque las condiciones normales amplifican sin problemas fragmentos de 3 a 6 kb de longitud.

Los métodos de “huella genética” basados en PCR identifican perfiles únicos de fragmentos de DNA al variar la naturaleza del oligo iniciador de PCR y las condiciones de su alineamiento. Un perfil que muestra bandas de diferente tamaño refleja varios loci encontrados por el oligo. Los métodos basados en PCR son utilizados para sondear en genomas enteros, produciendo un buen número de bandas (www.genetics.nbi.gov/GeneticDiversity). Dentro de estos métodos se encuentran RAPD y AFLP, que son los más ampliamente utilizados.

2.4.2.2. Microsatélites (SSR).

Consisten en secuencias de dos a seis nucleótidos que son repetidas varias veces en tandem y que muestran una alta variación en el número de repeticiones entre individuos. Con el desarrollo de oligos de PCR para las regiones que flanquean a los microsatélites, se puede medir la diversidad entre genotipos al detectar las variaciones alélicas de los microsatélites en este sitio. Los microsatélites son muy atractivos para los genetistas pues combinan varias ventajas como son su codominancia, multiallelismo y su alta heterocigosidad.

Una de las desventajas de los microsatélites es el tiempo y costo involucrado en el proceso del diseño de cada oligo. Además, es raro que oligos desarrollados para una especie puedan funcionar en especies relacionadas, prácticamente, los oligos deben ser desarrollados para cada especie (Becerra y Paredes, 2000).

2.4.2.3. Fragmentos polimórficos de DNA amplificados al azar (RAPD)

En esta técnica se utilizan decanucleótidos de secuencia al azar, para amplificar por PCR áreas específicas distribuidas al azar en el genoma (Fig. 3). Su pequeñez y la baja temperatura de alineamiento (36° C) aseguran que se unan a un gran número de secuencias en el genoma para conseguir amplificar muchos fragmentos de DNA. Estos fragmentos se pueden separar en geles de agarosa para obtener perfiles electroforéticos que variarán según el polimorfismo de los distintos individuos o grupos de individuos, y proporcionarán una huella genética característica (Williams y col., 1990).

Para que ocurra la amplificación, los oligos deben alinearse en secuencias repetidas en cadenas opuestas (Fig. 3). Debe hacerse énfasis que los productos de la amplificación no son el resultado del perfecto apareamiento entre el oligo y el DNA molde. Incluso, cabe mencionar, que el cambio de una sola base resulta en un cambio en el patrón de bandeo (Williams y col., 1990).

Los productos de la reacción dependerán del genoma en estudio, del oligo y de las condiciones de la reacción. Es conveniente, rápida, requiere poco DNA y su principal ventaja es que no presupone conocimientos previos sobre la secuencia de DNA del organismo en estudio. Su inconveniente es la baja reproducibilidad de los datos, diferentes condiciones de laboratorios con pequeñas alteraciones en los parámetros de amplificación pueden dar origen a resultados diferentes (Jones y col., 1997).

Esta técnica ha sido utilizada para el desarrollo de sondas específicas para la identificación de *Streptomyces* (Roberts y Crawford, 2000); para determinar la estabilidad genética de plantas micropropagadas de jengibre (Rout y col., 1997); en análisis de diversidad genética en la bacteria *Xantomonas cynarae* (Trébaol y col., 2001), en mora (Awasthi y col., 2004), en vainilla (Besse y col., 2004); así como en la búsqueda de marcadores RAPD asociados con la tolerancia a sal en el género *Acacia* (Nguyen y col., 2004).

2.4.2.4. Polimorfismo de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP).

AFLP es la más reciente clase de marcadores moleculares basados en PCR (Fig. 4). La información es generada al combinar la digestión del DNA con enzimas de

restricción, con amplificación por PCR. Con esta técnica se pueden generar un gran número de marcadores mediante la amplificación por PCR.

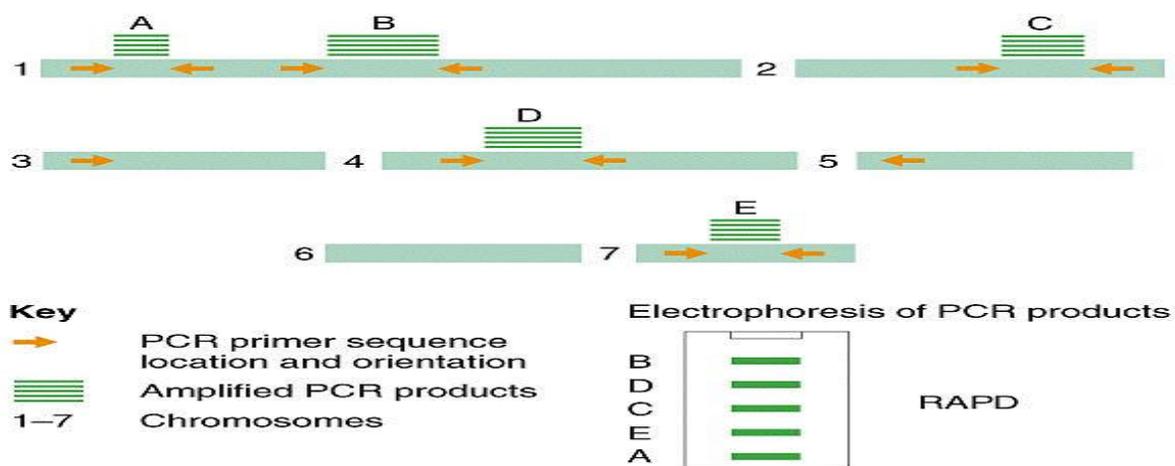


Fig. 3. Representación de la técnica de RAPD

La técnica de AFLP está basada en la amplificación de un subset de fragmentos genómicos de restricción mediante PCR. Como primer paso, el DNA es cortado con dos enzimas de restricción: una es una enzima con una frecuencia baja de corte (como Eco RI) y la otra es con una de frecuencia alta de corte (como Mse I); después se ligan adaptadores de doble cadena a cada extremo de los fragmentos producidos, para generar un DNA molde para amplificación. La secuencia de estos adaptadores actúa como sitio de unión para los oligos de PCR, que tienen una extensión de uno y tres nucleótidos selectivos (oligos+1 y +3). La primera amplificación de PCR se realiza con los oligos+1 y la segunda con los oligos+3 (Fig. 4). La extensión de un nucleótido selectivo amplifica 1 de 4 fragmentos ligados reduciendo el número de fragmentos generados por la digestión con las enzimas de restricción, mientras que la extensión de tres nucleótidos selectivos

amplifica 1 de 4096 fragmentos, que reduce aun más el número de fragmentos de la primera amplificación (Vos y col., 1995).

La adición de los nucleótidos selectivos resulta en un patrón que es un subgrupo de bandas del patrón original. Esto indica que los nucleótidos selectivos son una forma eficiente y exacta de seleccionar un set específico de fragmentos de restricción para amplificaciones posteriores (Vos y col., 1995).

Después de realizar la electroforesis en gel de poliacrilamida de la última amplificación de PCR, se pueden visualizar entre 40 y 200 bandas, mediante marcaje radioactivo de oligos o con la tinción con nitrato de plata (Vos y col., 1995). Un gran avance desde su aparición, es la sustitución del marcaje con radiactividad por fluorescencia para la detección de los fragmentos en un secuenciador automático y el posterior análisis de la imagen digitalizada con software especializado (Desai y col., 1998; Savelkoul y col., 1999).

Los patrones que se obtienen de diferentes especies son polimórficos debido a mutaciones en los sitios de restricción, mutaciones en las secuencias adyacentes a los sitios de restricción e inserciones o deleciones en los fragmentos amplificados.

Dentro de sus ventajas más importantes se puede mencionar su alta reproducibilidad. Ya que la detección de los fragmentos en AFLP no depende de hibridación y es independiente a las cantidades de DNA utilizadas, se ha reportado patrones de AFLP de esporas del hongo micorriza (Mueller y Wolfenbarger, 1999); se pueden evitar las fuentes de irreproducibilidad, como lo son la digestión incompleta con enzimas de restricción o la obtención de patrones de bandeo

débiles, que son fuentes de irreproducibilidad en RFLP (Mueller y Wolfenbarger, 1999).

Además, la alta astringencia en las temperaturas de alineamiento de PCR y alta especificidad de secuencias blanco, le da una mayor reproducibilidad y robustez, ya que elimina la variación por artefactos que se puede observar con RAPD. Por lo tanto, la cantidad de bandas detectadas depende del nivel de detección del método empleado para este fin (marcaje radioactivo, fluorescente o tinción con nitrato de plata), y de la cantidad de DNA cargado en el gel.

La reproducibilidad es alta si se compara patrones de aislados de DNA previos o posteriores, y aun entre patrones obtenidos por diferentes laboratorios (Jones y col., 1997).

Otra de sus ventajas es su capacidad de resolución. Los métodos de genotipificación difieren en su poder de discriminación, dependiendo del nivel taxonómico y categoría. En el caso de plantas, se ha encontrado que AFLP es más informativo que RAPD, SSR y RFLP, debido principalmente a la cantidad de información obtenida. Para la genotipificación es importante obtener un alto número de bandas polimórficas reproducibles, que ayudan a establecer con certeza identidades, parentesco, etc. Esto es un punto crucial, por ejemplo, para la identificación de individuos clonalmente idénticos, donde un número insuficiente de fragmentos puede cubrir las diferencias genéticas existentes y dar lugar a una conclusión incorrecta (Mueller y Wolfenbarger, 1999; Savelkoul y col., 1999).

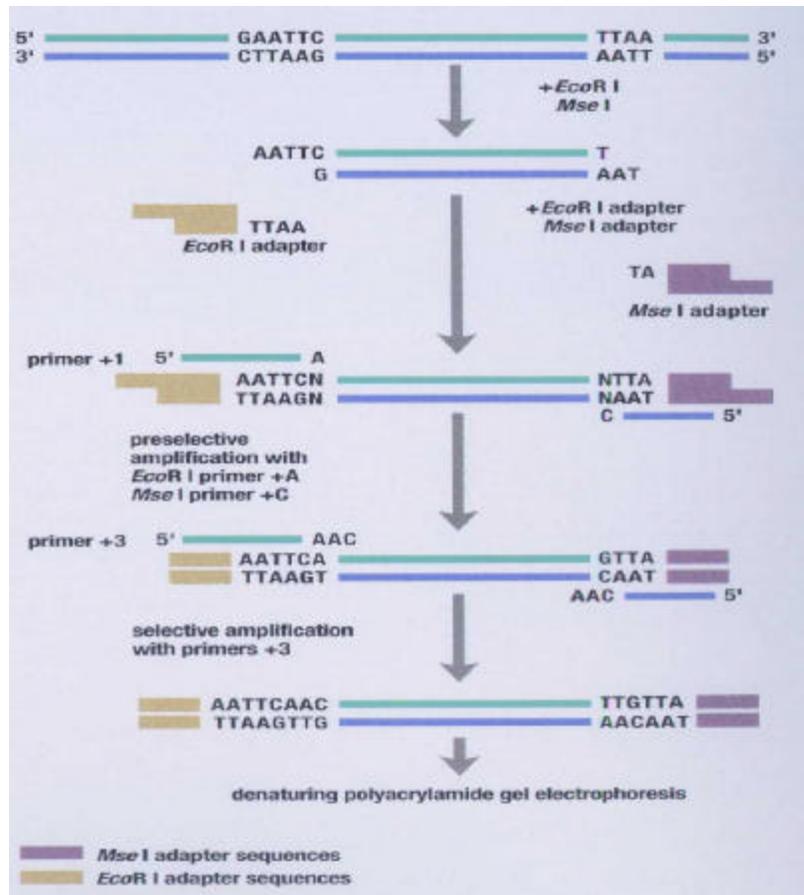


Fig.4. Representación de la técnica de AFLP.

La característica principal, es que el análisis de AFLP puede ser adaptado a cualquier organismo sin que exista un conocimiento previo del organismo; teniendo como única limitación que el DNA a utilizar sea doble cadena y aislado totalmente de cualquier otro DNA contaminante (Mueller y Wolfenbarger, 1999; Savelkoul y col., 1999; Vos y col., 1995).

La principal desventaja del AFLP es la dificultad para identificar estados alélicos en un organismo, ya que los marcadores AFLP son dominantes un individuo heterocigoto no podría ser distinguido del homocigoto dominante (Mueller y Wolfenbarger, 1999).

La técnica de AFLP ha sido empleada en estudios de diversidad genética en soya de diferentes países (Ude y col., 2003), en *Mycoplasma* (Kokotovic y col., 1999), en micorrizas (Koch y col., 2004); en el desarrollo de mapas de ligamiento (QTL) en *Brassica juncea* (Lionneton y col., 2002), para medir diversidad genética en arroz (Federici y col., 2000), así como en el análisis de la variación somaclonal en plantas micropropagadas de *Arabidopsis* (Polanco y Ruiz, 2002) y en el mejoramiento genético de especies (Becerra y col., 2001) y más recientemente para ver expresión génica diferencial, al utilizar cDNA y no DNA genómico (Ditt y col., 2001).

Otros factores para elegir el DNA para análisis son la disponibilidad de material hereditario, así como también, su alta naturaleza polimórfica, estabilidad relativa a las enzimas y la habilidad para amplificar por PCR segmentos cuando una mínima cantidad de tejido es disponible y/o cuando el DNA se encuentra degradado moderadamente (Vos y col., 1995; Savelkoul y col., 1999; Korzun, 2002).

2.5. Análisis estadístico aplicado a marcadores moleculares.

Existen múltiples paquetes de software para el análisis de la diversidad genética, que varían en el tipo de datos a analizar y también en los parámetros que ofrecen. Su facilidad de acceso, su compatibilidad con sistemas de operación como Linux, Windows, Macintosh y DOS, la implementación de técnicas estadísticas sofisticadas y la relativa sencillez para introducir datos los hacen una alternativa atractiva para el desarrollo de cálculos complejos de genética de poblaciones (Labate, 2000).

Paquetes de software como NTSYS (Rohlf, 1993), PHYLIP (Felsenstein, 2000), Arlequín (Schneider y col., 1997), TPGA (Millar, 1997), GenePop (Raymond y Rousset, 1995); han sido herramientas utilizadas en el análisis de diversas especies animales y vegetales (Labate, 2000); y constantemente se están actualizando y desarrollando nuevos paquetes de acuerdo a las necesidades actuales.

Muchos de los paquetes actuales incluyen un amplio rango de opciones de análisis, como nivel de polimorfismo, frecuencias alélicas, homocigocidad y heterocigocidad, prueba de Mantel, distancias genéticas de Nei, heterogeneidad, técnicas de remuestreo como Jackknife y Bootstrap, métodos de Clustering como UPGMA o Neighbor-Joining (Labate, 2000), y algunos ofrecen Análisis Molecular de Varianza, AMOVA (Excoffier y col., 1992). Aunque hay mucho que se sobrelapa entre ellos, cada programa tiene características propias que ofrecen un potencial propio (Labate, 2000).

2.5.1. Distancias genéticas.

La distancia genética (GD) es la diferencia entre dos entidades que puede ser descrita por la variación del contenido alélico. Una definición mas comprensiva y actual es “cualquier medida cuantitativa de diferencia genética, ya sea al nivel de secuencia o en la frecuencia alélica, que puede ser calculada entre dos individuos, poblaciones o especies” (Mohammadi y Prasanna, 2003).

La medida de distancia Euclideana es el estadístico mas utilizado para estimar la distancia genética entre dos individuos (genotipos o poblaciones) por datos morfológicos. La distancia Euclideana entre dos individuos i y j , teniendo

observaciones en caracteres morfológicos (p) denotados como x_1, x_2, \dots, x_p y y_1, y_2, \dots, y_p para i y j respectivamente, puede ser calculada con la siguiente formula:

$$d_{(i,j)} = [(x_1 - y_1)^2 + (x_2 - y_2)^2 + \dots + (x_p - y_p)^2]^{0.5}$$

Varias medidas de distancias genéticas han sido propuestas para datos derivados de marcadores moleculares con el propósito del análisis de la diversidad genética (Mohammadi y Prasanna, 2003).

Las medidas mas comúnmente utilizadas para la obtención de distancias genéticas utilizando datos binarios procedentes de marcadores moleculares como AFLP y RAPD, son: (i) coeficiente de Nei y Li (GD_{NL}); (ii) coeficiente de Jaccard (GD_J); (iii) Simple Matching Coefficient (GD_{SM}), (iv) distancia modificada de Rogers (GD_{RM}). Las fórmulas son las siguientes:

$$GD_{NL} = 1 - [2N_{11}/(2N_{11} + N_{10} + N_{01})]$$

$$GD_J = 1 - [N_{11}/(N_{11} + N_{10} + N_{01})]$$

$$GD_{SM} = 1 - [(N_{11} + N_{00})/(N_{11} + N_{10} + N_{01} + N_{00})]$$

$$GD_{MR} = [(N_{01} + N_{10})/2N]^{0.5}$$

Donde N_{11} es el número de bandas-alelos presentes en ambos individuos, N_{00} es el número de bandas-alelos ausentes en ambos individuos, N_{10} es el número de bandas-alelos presentes solo en el individuo i , N_{01} es el número de bandas presentes solo en el individuo j , y N representa el número total de bandas-alelos (Mohammadi y Prasanna, 2003).

GD_J toma en consideración solo los ajustes entre bandas-alelos que están presentes y ignora pares en los que una banda-alelo esta ausente en ambos individuos. GD_{NL} mide la proporción de bandas-alelos compartidas como resultado de la herencia de un ancestro común. GD_{SM} , una medida Euclideana, toma en

consideración los ajustes y desajustes y le da el mismo valor a ambos al estimar la distancia genética. GD_{MR} , otra distancia Euclídeana, considera cada locus anotado como una dimensión ortogonal (Mohammadi y Prasanna, 2003).

Las distancias Euclídeanas, como GD_{SM} y GD_{MR} , pueden ser modeladas como variables binomiales con propiedades estadísticas conocidas, en contraste con GD_J y GD_{NL} ; cuando el genoma es muestreado al azar.

GD_{SM} tiene propiedades métricas Euclídeanas que permiten su uso en estrategias jerárquicas de clustering y en el análisis molecular de varianza, AMOVA ((Excoffier y col., 1992)), que permite la estimación de los componentes de varianza entre grupos y dentro de ellos (Mohammadi y Prasanna, 2003).

2.5.2. Análisis de cluster.

El análisis de cluster se refiere al conjunto de técnicas estadísticas cuyo propósito es agrupar individuos u objetos en base a sus propias características, de tal manera que los individuos con descripciones similares queden dentro del mismo grupo o cluster. Los clusters resultantes exhibirán una máxima homogeneidad interna (dentro del cluster) y una máxima heterogeneidad externa (entre clusters) (Mohammadi y Prasanna, 2003).

Los métodos de clustering basados en distancias pueden ser divididos en: jerárquicos y no jerárquicos. Los métodos jerárquicos son los más empleados en estudios de diversidad genética, estos métodos reconstruyen la jerarquía completa de los objetos analizados (el llamado "árbol o dendrograma"), sea en orden ascendente que en orden descendente. Los métodos no jerárquicos prevén que el

usuario haya definido previamente el número de grupos en los cuales se dividen los objetos analizados.

Entre los métodos jerárquicos, UPGMA (Unweighted Paired Group Method Arithmetic averages) es el más utilizado seguido del método de varianza mínima de Ward.

Sea cual sea el método de cluster utilizado para la generación de dendrogramas, resulta conveniente y útil el aplicar técnicas de remuestreo como bootstrapping, para conocer la confiabilidad de los nodos del dendrograma (Mohammadi y Prasanna, 2003).

2.5.3. Técnicas de remuestreo.

Las técnicas de remuestreo como “Bootstrap” y “Jackknife” están siendo aplicadas en marcadores moleculares para encontrar el grupo más pequeño de marcadores que pueden proporcionar las relaciones genéticas más exactas entre un grupo de genotipos o poblaciones.

La técnica de bootstrap es un procedimiento general para estimar la distribución de un estadístico en la base de observaciones independientes. La técnica remuestra los datos actuales para revelar algún sub-patrón. La noción básica es que los datos por sí mismos, vistos como una distribución de frecuencias, representan la mejor imagen disponible de la que proceden. Dicho en otras palabras, la metáfora del Bootstrap se refiere “a sentir” si los datos por sí mismos son efectivamente utilizados para probar su propia utilidad en el análisis estadístico (Mohammadi y Prasanna, 2003).

Los métodos de Bootstrap se han utilizado para estimar error estándar, intervalos de confianza y otros parámetros estadísticos exactos, que son difíciles de calcular o no hay métodos analíticos disponibles.

En cuanto a marcadores moleculares, es claro que el uso de un número elevado de marcadores distribuidos al azar a lo largo del genoma, proporcionará un estimado más exacto de las relaciones genéticas y reducirá la estimación de la varianza debido a un alto o a un bajo muestreo de ciertas regiones del genoma. Ya que ensayar con un gran número de marcadores resultaría en un costo elevado, es deseable estimar las relaciones genéticas con el grupo más pequeño de marcadores polimórficos con la mínima varianza posible (Mohammadi y Prasanna, 2003).

Los análisis de Bootstrap pueden ser aplicados para determinar el número efectivo de marcadores moleculares en análisis de diversidad genética a través de la estimación de la varianza de muestreo de las distancias genéticas o similitud calculada de diferentes grupos de datos. El número efectivo de marcadores es aquel donde la desviación estándar de los estimados no se ve afectada al incrementar o disminuir el número de bandas-alelos (Mohammadi y Prasanna, 2003).

El Bootstrap puede ser utilizado para estimar el soporte estadístico de las ramas internas de un árbol. Si un patrón de ramas es observado en el 80% de los cálculos, se dice que ese patrón tiene un 80% de soporte de Bootstrap.

En muchos casos, la estructura total del árbol provee mejor información que una rama en particular (Mohammadi y Prasanna, 2003).

El Jackknife es otra técnica donde el remuestreo se realiza sin reemplazo, por lo que proporciona poca información de la distribución de los estimados.

2.5.4. Correspondencia entre matrices: Prueba de Mantel.

Diversos métodos de análisis de datos están basados en matrices de distancia. En algunos casos, es útil el poder comparar una matriz con otra, con el propósito de probar la hipótesis nula concerniente a una posible relación entre dos matrices. Normalmente, los valores dentro de estas matrices están correlacionados de alguna manera, y por lo tanto la independencia entre objetos dentro de la matriz es inexistente (Mohammadi y Prasanna, 2003).

El método mas utilizado para medir la correlación de distancias es conocido como prueba de Mantel. La prueba simple de Mantel considera dos matrices mientras que la prueba parcial considera tres.

Ya que la prueba de Mantel procede de matrices distancias (disimilaridad), puede ser aplicada a varios tipos de variables (ejemplo: categóricas, intervalos, etc.). Ya que la disimilaridad (D) es el equivalente inverso de la similaridad (S) ($D = 1 - S$), al utilizar similaridad en ves de disimilaridad no hay un efecto cualitativo en los análisis y solo el signo cambiará (Bonnet y Van De Peer, 2000).

La prueba de Mantel, en resumen, prueba la hipótesis que el proceso que ha generado los datos de una matriz es o no el mismo que generó los datos de la otra matriz (Bonnet y Van De Peer, 2000).

El estadístico utilizado para la medida de la correlación entre las matrices es el clásico coeficiente de correlación de Pearson:

$$r = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \left[\frac{(A_{ij} - \bar{A})}{s_A} \right] \left[\frac{(B_{ij} - \bar{B})}{s_B} \right]$$

Donde N es el número de elementos de la parte superior o inferior de la matriz triangular, \bar{A} es la media de los elementos de la matriz A y s_A es la desviación estándar de los elementos de la matriz A.

Ahora, si las matrices A y B son normalizadas, esto implica que:

$$\bar{A} = 0; \bar{B} = 0; s_A = 1; s_B = 1$$

Por lo tanto, tenemos que la ecuación se simplifica así:

$$r = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N a_{ij} b_{ij}$$

Donde a_{ij} y b_{ij} son los elementos de la diagonal de las matrices A y B respectivamente. Esta ecuación normalizada permite considerar variables de unidades de medida diferentes en el mismo análisis, colocando un intervalo de coeficiente de correlación convencional limitado por -1 a 1. Ya que los elementos en una matriz no son independientes, la prueba de Mantel se evalúa por medio de un número de miles de permutaciones (Schneider y col., 1997).

La prueba de Mantel ha sido utilizada en análisis de diversidad genética, particularmente en ver la correspondencia de matrices derivadas de diferentes sistemas de marcadores moleculares sobre el mismo grupo de genotipos (Bohn y col., 1999; González y col., 1997). Puede aplicarse en este estudio para comparar la información obtenida por dos sistemas de marcadores sobre el mismo grupo de genotipos (Lombard y col., 2000).

2.5.5. Estructura genética.

La estructura genética de las poblaciones subdivididas se ha venido estudiando en términos de los estadísticos F desde que Wright propusiera medir la desviación de las frecuencias genotípicas mediante los parámetros F_{ST} , F_{SC} y F_{CT} , que permiten estimar la varianza entre subpoblaciones con relación al total de la varianza (F_{ST}), la varianza entre subpoblaciones dentro de grupos (F_{SC}) y la varianza entre grupos con relación al total de la varianza (F_{CT}).

Actualmente, la estimación de parámetros puede realizarse haciendo uso de la información molecular presente en las poblaciones que forman la muestra. El método conocido como “Análisis de Varianza Molecular” (AMOVA) (Excoffier y col., 1992), utiliza el hecho de que una suma de cuadrados convencional (SS) puede escribirse como la suma de las diferencias al cuadrado entre todos los pares de haplotipos. Por ello, es posible construir un análisis jerárquico de la varianza (molecular) directamente de la matriz de distancias cuadradas entre todos los pares de haplotipos.

El Análisis Molecular de Varianza es un método para estimar la diferenciación de poblaciones directamente de datos moleculares y permite evaluar la hipótesis acerca de tal diferenciación (Schmidt y Jensen, 2000; Martínez y col., 2003; O’neill y col., 1997)

El análisis comienza con la consideración de los datos moleculares como un vector Booleano \mathbf{p}' , que es una matriz de $1 \times n$, cuyos elementos son 1s y 0s; que indica la presencia o ausencia de un marcador. Un marcador puede ser un sitio de restricción, una secuencia o un evento de mutación (Excoffier y col., 1992).

$$\mathbf{p}' = [p_1 p_2 p_3 p_4 \dots p_s]$$

La diferencia entre los pares de vectores es definida como: $(\mathbf{p}_j - \mathbf{p}_k)$

$$(\mathbf{p}_j - \mathbf{p}_k)' = [(p_{1j} - p_{1k})(p_{2j} - p_{2k}) \dots (p_{sj} - p_{sk})]$$

Por lo tanto, la diferencia o distancia Euclidiana (δ_{jk}^2) entre dos haplotipos h_i y h_j está definida por:

$$\delta_{jk}^2 = (\mathbf{p}_j - \mathbf{p}_k)' \mathbf{W} (\mathbf{p}_j - \mathbf{p}_k)$$

Donde \mathbf{W} es la matriz de peso y equivale a la matriz identidad \mathbf{I} , si todos los sitios son asumidos independientes e igualmente uniformes. Además, la distancia métrica es igual al número de diferencias en sitios de restricción. Esta métrica Euclidiana es comúnmente utilizada para diferencias de población, pero puede ser fácilmente utilizada para diferencias entre haplotipos (Excoffier y col., 1992).

El cuadrado de la distancias Euclidianas es calculado para cada par de vectores Boléanos, y luego colocadas en una matriz, que es dividida en submatrices correspondiendo a la subdivisión dentro de la población.

$$\mathbf{D}^2 = \begin{bmatrix} [\mathbf{D}_{11}^2] & [\mathbf{D}_{12}^2] & \dots & [\mathbf{D}_{1l}^2] \\ [\mathbf{D}_{21}^2] & [\mathbf{D}_{22}^2] & \dots & [\mathbf{D}_{2l}^2] \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ [\mathbf{D}_{l1}^2] & \dots & \dots & [\mathbf{D}_{ll}^2] \end{bmatrix}$$

En la diagonal principal de cada submatriz se encuentra la distancia de pares de individuos dentro de la misma población, mientras que en la diagonal principal de la matriz se encuentra la distancia de pares de individuos de diferente población.

Los individuos pueden ser agrupados de acuerdo con un criterio no genético, por ejemplo de acuerdo al origen geográfico, lenguaje o ambiente ecológico, etc (Excoffier y col., 1992).

La suma de los elementos de las diagonales en la matriz y submatrices da lugar a la suma de los cuadrados de cada nivel jerárquico en la población.

Estas sumas de cuadrados pueden ser analizadas en un marco anidado de varianza. En el AMOVA, los datos son agrupados de acuerdo a un nivel jerárquico, lo que permite obtener la media de los cuadrados en cada nivel. Con esto es posible probar la hipótesis de diferencias entre grupos y dentro de los grupos (Excoffier y col., 1992).

La suma total de cuadrados (SS_{Total}) de las distancias entre todos los haplotipos es equivalente a la suma convencional de las desviaciones (SSD) de vectores multidimensionales, del centroide de un espacio multidimensional.

$$\begin{aligned}
 SSD_{total} &= \sum_{j=1}^N (x_j - \bar{x})' W (x_j - \bar{x}) \\
 &= \frac{1}{N} \sum_{j=1}^{N-1} \sum_{k>j}^N (x_j - x_k)' W (x_j - x_k) \\
 &= \frac{1}{2N} \sum_{j=1}^N \sum_{k=1}^N (x_j - x_k)' W (x_j - x_k) \\
 &= \frac{1}{2N} \sum_{j=1}^N \sum_{k=1}^N \delta_{jk}^2
 \end{aligned}$$

La partición de la varianza se realiza según el modelo lineal:

$$p_{jig} = \mu + a_g + b_{ig} + c_{jig}$$

Donde \mathbf{p}_{jig} indica el j -ésimo individuo ($j = 1, \dots, N_{ig}$), en la i -ésimo población ($i = 1, \dots, I_g$) en el g -ésimo grupo ($g = 1, \dots, G$); \mathbf{p} es el esperado desconocido de \mathbf{p}_{jig} ; promediado del estudio completo. Los efectos son \mathbf{a} para grupo, \mathbf{b} para población y \mathbf{c} para individuos dentro de cada población. Se asume que los efectos son aditivos, al azar, no correlacionados y tienen componentes de varianza asociados (desviaciones esperadas al cuadrado), s^2_a , s^2_b y s^2_c respectivamente.

La suma total de los cuadrados de las desviaciones (SSD_{total}) se divide en sus componentes para variación dentro de las poblaciones, $SSD(WP)$, variación entre poblaciones dentro de grupos regionales, $SSD(AP/WG)$ y variación entre grupos regionales $SSD(AG)$.

$$SSD(WP) = \sum_{g=1}^G \sum_{i=1}^{I_g} \frac{\sum_{j=1}^{N_{ig}} \sum_{k=1}^{N_{ig}} \delta_{jk}^2}{2N_{ig}}$$

$$SSD(AP/WG) = \sum_{g=1}^G \left(\frac{\sum_{i=1}^{I_g} \sum_{j=1}^{N_{ig}} \sum_{i'=1}^{I_g} \sum_{k=1}^{N_{i'g}} \delta_{jk}^2}{\sum_{I=1}^{I_g} 2N_{i'g}} - \sum_{i=1}^{I_g} \frac{\sum_{j=1}^{N_{ig}} \sum_{k=1}^{N_{ig}} \delta_{jk}^2}{2N_{ig}} \right)$$

$$SSD(AG) = \left(\frac{\sum_{i=1}^N \sum_{k=1}^{N_{ig}} \delta_{jk}^2}{2N} - \sum_{g=1}^G \frac{\sum_{i=1}^{I_g} \sum_{j=1}^{N_{ig}} \sum_{i'=1}^{I_g} \sum_{k=1}^{N_{i'g}} \delta_{jk}^2}{\sum_{I=1}^{I_g} 2N_{i'g}} \right)$$

La media correspondiente de cada suma de desviaciones cuadradas (MSD), se obtiene al dividir cada SSD por el número apropiado de grados de libertad (d.f.), como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Cálculo de la media de la suma de desviaciones cuadradas.

Source	d.f.	MSD	Expected MSD
Among Regions	G-1	MSD(AG)	$\sigma_c^2 + n' \sigma_b^2 + n'' \sigma_a^2$
Among populations within regions	$\sum_{g=1}^G I_g - G$	MSD(AP/WG)	$\sigma_c^2 + n \sigma_b^2$
Among individuals within populations	$N - \sum_{g=1}^G I_g$	MSD(WP)	σ_c^2
Total	N-1		

Los coeficientes n , en la Tabla 2 representa el tamaño promedio de muestra para cada nivel jerárquico, permitiendo tamaños desiguales:

$$n = \frac{\sum_{g=1}^G \sum_{i=1}^{I_g} N_{ig} - \sum_{g=1}^G \left(\frac{\sum_{i=1}^{I_g} N_{ig}^2}{\sum_{i=1}^{I_g} N_{ig}} \right)}{\sum_{g=1}^G I_g}$$

$$n' = \frac{\sum_{g=1}^G \left(\frac{\sum_{i=1}^{I_g} N_{ig}^2}{\sum_{i=1}^{I_g} N_{ig}} \right) - \frac{\sum_{g=1}^G \sum_{i=1}^{I_g} N_{ig}^2}{\sum_{g=1}^G \sum_{i=1}^{I_g} N_{ig}}}{G-1}$$

$$n'' = \frac{\sum_{g=1}^G \sum_{i=1}^{I_g} N_{ig} - \frac{\sum_{g=1}^G \left(\sum_{i=1}^{I_g} N_{ig} \right)^2}{\sum_{g=1}^G \sum_{i=1}^{I_g} N_{ig}}}{G-1}$$

Los componentes de varianza (s^2 's) de cada nivel, son extraídos al igualar las medias de los cuadrados calculados (MSD) con sus esperados. Los componentes de varianza pueden ser utilizados para calcular un grupo de estadísticos llamados phi (ϕ) que resumen el grado de diferenciación entre las divisiones de la población y son análogos a los estadísticos F (Excoffier y col., 1992).

$$\Phi_{ST} = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}{\sigma^2}, \quad \Phi_{CT} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma^2}, \quad \Phi_{SC} = \frac{\sigma_b^2}{\sigma_b^2 + \sigma_c^2}.$$

Donde f_{ST} es la correlación entre individuos dentro de todas las poblaciones; f_{CT} es la correlación de individuos dentro de un grupo de poblaciones; f_{SC} es la correlación de individuos dentro de las poblaciones (Excoffier y col., 1992).

Los estadísticos f pueden ser considerados como hipótesis de diferenciación a los niveles jerárquicos establecidos. Estas hipótesis son probadas utilizando una distribución nula de los componentes de varianza; si la varianza de las subpoblaciones no difiere significativamente de la distribución nula, la hipótesis de que las subpoblaciones son diferenciadas de la población mas grande puede ser refutada.

Ya que las distancias Euclidianas son derivadas de vectores Booléanos, es poco probable que los datos sigan una distribución normal. Una distribución nula es obtenida al remuestrear los datos. En cada permutación, cada individuo es asignado a una población elegida al azar mientras se mantiene el tamaño constante. Estas permutaciones son repetidas muchas veces, eventualmente

construyendo una distribución nula y probando la significancia de f_{ST} y s^2_c (Excoffier y col., 1992).

Para el análisis se asume que los individuos muestreados fueron elegidos al azar e independientemente. Ya que la distribución nula es obtenida por procedimientos de permutación, las distancias Euclidianas no necesitan ser distribuidas normalmente o tener una homogeneidad de varianza.

Ciertos supuestos son hechos acerca de la naturaleza de la población, por ejemplo el acoplamiento que ocurre enteramente al azar y no hay autogamia. Los efectos de selección no son encontrados en su totalidad con este modelo. Hay presiones selectivas que pueden diferir entre subpoblaciones, que pueden tener efectos diferentes en alelos diferentes y en combinaciones diferentes de alelos. Sin embargo, la selección actuando en diferentes alelos es no al azar, de ahí que cualquier diferencia dada entre poblaciones en la frecuencia de alelos dados, es potencialmente no representativo de la variación de frecuencias de alelos en conjunto.

2.6. Marcadores moleculares en *Agave*

Se ha reportado la diversidad genética en *A. tequilana* Webber var. Azul, por medio de RAPD; encontrando bajos niveles de polimorfismo en virtud de la promoción de un solo genotipo, debido a la preferente propagación vegetativa que ha tenido esta especie por su importancia económica (Gil-Vega y col., 2001).

En el desierto de Chihuahua se evaluó la diversidad genética de *A. victoria-reginae*, una especie en peligro de extinción por su valor como ornamental,

mediante el sistema de isoenzimas. Encontrando niveles de variación genética ($H_e = 0.335$) y diferenciación (mean $F_{st} = 0.236$) altos, y los métodos de clustering sugirieron al menos la existencia de tres grupos diferentes de poblaciones (Martinez-Palacios, 1999).

Para diversas poblaciones de *A. lechuguilla* en el desierto de Chihuahua, se encontró por medio de isoenzimas que la variabilidad genética total es alta ($H_e = 0.394$). Pero este valor no fue homogéneo, sino que tuvo una variación de acuerdo a un patrón geográfico, las poblaciones del sur tuvieron un exceso de heterocigotos, mientras que las ubicadas más al norte tuvieron una deficiencia de heterocigosidad; en relación al equilibrio de Hardy-Weinberg. La diferenciación total entre todas las poblaciones fue baja ($\Theta = 0.083$), pero existe una fuerte diferenciación genética entre las poblaciones del sur con las del norte. Las poblaciones sureñas son más similares genéticamente entre sí, las del centro son más diferenciadas mientras que las norteñas fueron altamente diferenciadas. Este fenómeno se explica por las diferencias en la abundancia de polinizadores y las tasas de cruzamiento de la especie (Silva-Montellano y Eguiarte, 2003).

Dentro del complejo *A. deserti*, que comprende *A. deserti*, *A. cerulata* y *A. subsimplex*, la variabilidad genética fue determinada por RAPD. Las distancias genéticas de Nei entre las tres especies fueron bajas comparadas con los valores obtenidos de otras *Agavaceae*, y no hubo una correlación clara con las divisiones taxonómicas (Navarro-Quezada y col., 2003).

Mediante AFLP se ha reportado variabilidad asexual en *A. fourcroydes*, el henequén, especie utilizada para la obtención de fibra. Para esta variación existen

dos posibilidades: que la acumulación de mutaciones somáticas a lo largo del ciclo de vida de la planta, la convierten en un mosaico; y durante la reproducción asexual estas mutaciones son fijadas y transmitidas a los descendientes. La otra posibilidad es que los altos niveles de ploidía del henequén ayudan a acumular mutaciones por recombinación entre cromosomas, cuya expresión es enmascarada por las múltiples copias de los genes afectados (Infante y col., 2003).

3.0. Objetivo general.

La tipificación genética de *Agave salmiana*, especie productora de mezcal en el Altiplano Potosino, por medio de marcadores moleculares RAPD y AFLP.

3.1. Objetivos específicos.

- Comparar parámetros de diversidad genética dentro de poblaciones definidas de *A. salmiana*, obtenidos a partir de la huella genética generada por RAPD.
- Llevar a cabo una evaluación preliminar de la diversidad de población específicas de *A. salmiana* sobre la base de la huella genética generada por AFLP.
- Establecer, en base a criterios rigurosos, cual de los dos tipos de marcadores moleculares resulta más apropiado para estudios de diversidad genética de esta especie de agave.

3.2. Estrategia experimental

- Colectar hijuelos de *A. salmiana* en regiones mezcaleras de San Luis Potosí y guardar una hoja central para extracción de DNA.
- Obtener brotes adventicios a partir del meristemo central de los hijuelos colectados, para extracción de DNA.
- Comparar parámetros de diversidad genética obtenidos a partir de DNA de plantas micropropagadas y de hoja, dentro de cada población de *A. salmiana* a partir de la huella genética generada por RAPD.
- Comparar parámetros de diversidad genética obtenidos a partir de DNA de plantas micropropagadas y de hoja, dentro de cada población de *A. salmiana* a partir de la huella genética generada por AFLP.
- Comparar los resultados obtenidos en plantas micropropagadas y en hoja, con cada sistema de marcador.
- Comparar los dos métodos de marcadores moleculares utilizados.

4. Materiales y Métodos.

4.1. Colecta de hijuelos de *A. salmiana* en diferentes regiones mezcateras de San Luis Potosí.

Las colectas fueron realizadas en 3 localidades: en el ejido Ipiña, perteneciente al municipio de Aqualulco, San Luis Potosí; donde los ejidatarios identificaban cuatro tipos de *A. salmiana*: el chino, liso, blanco y amarillo. Se colectaron en total 14 plantas del tipo liso (Código IP- L), 16 del chino (Código IP- Ch), 5 del amarillo (Código IP- A) y 5 del blanco (Código IP- B), pues eran muy poco frecuentes estas últimos dos tipos. La característica de la variante conocida como chino es que su espina lateral esta curvada en forma de garra, la espina de la variante liso no tiene una curva pronunciada y tiene una forma más similar a un triángulo. La variante blanco tenía un color verde pálido mientras que en la variante amarillo su color era un verde claro.

En Charcas en los ejidos El Cuervo y Aquiles Serdán donde se encontró solo el tipo conocido como chino, se colectaron en total 33 muestras de El Cuervo (Código EC-) y 25 de Aquiles Serdán (Código AqS-).

Se realizaron otras colectas de agaves de diferentes especies: en el Centro de Propagación del Agave perteneciente al Instituto de Ciencias Agrícolas (I.C.A.), en Irapuato, Guanajuato, se colectaron 2 plantas de las especies *A. scabra*, *A americana americana*, *A mapisaga*, *A. salmiana*, *A. angustifolia* y *A. americana manzo*. No se pudieron colectar más individuos de estas especies por falta de hijuelos en el lugar. En el Huizache, Matehuala, S.L.P: se colectaron 5 plantas de *A. scabra* (Código AS-).

4.2. Identificación taxonómica.

Se enviaron muestras de hoja de los hijuelos colectados y fotografías de campo de las colectas en Aqualulco y Charcas al Dr. Abisai García Mendoza (Instituto de Biología, UNAM) para confirmar la identidad de *A. salmiana*.

La identidad de los hijuelos colectados en el I.C.A. fue proporcionada por el Dr. José Luis Parra, encargado de dicho centro.

Mientras que la ubicación de *A. scabra* en El Huizache, S.L.P., fue proporcionada por el Dr. José Luis Flores, División de Ingeniería Ambiental, IPICYT.

4.3. Micropropagación.

Para la micropropagación de las plantas colectadas, el explante inicial fue el meristemo central. Después de la eliminación de hojas, tallo y raíces, la parte central conteniendo el meristemo y los primeros primordios foliares (piña), fue desinfectada con una solución conteniendo Carbendecil (2.5g/L), Estreptomicina/Terramicina (2.5g/L) Extrán (70%) y Captán (30g/L) (el cual fue sustituido por Terrazole (2g/L) posteriormente), dejándola toda la noche con agitación constante a temperatura ambiente.

De cada hijuelo colectado se guardó una de las hojas mas centrales y se desinfectó con Etanol 70% y Extrán 10%, después una sección de la hoja fue cortada en cubos y estos se molieron en mortero con nitrógeno líquido y el polvo fino se almacenó a -70° C.

La disección de las piñas para la obtención del meristemo central se realizó en campana. Posteriormente, los meristemas fueron cultivados en medio MS

(Murashige and Skoog) + PPM 5mL/L (Phytotechnology) por una semana, para asegurar la esterilidad superficial del brote.

Para inducir la formación de brotes múltiples, se probaron varios medios de cultivo adicionados con reguladores de crecimiento:

MS + BA (10mg/L) + 2,4-D (0.025mg/L)

MS + BA (3mg/L) + IAA (0.5mg/L)

MS + K (3mg/L) + IAA (0.5mg/L)

Estas combinaciones fueron sugeridas por M.C. Silvia Flores Benítez, en base a trabajos previos realizados por ella en el laboratorio.

Durante los subcultivos a medios con reguladores, hubo problemas de contaminación bacteriana, por lo que los explantes o brotes, fueron desinfectados con etanol 70% e hipoclorito 10%. Las plantas procedentes de Aquiles Serdán fueron las que tuvieron mayores problemas por contaminación, puesto que las magueyeras en el ejido lucían afectados por enfermedad.

4.4. Extracción de DNA.

Para la extracción de DNA se probaron varios protocolos, seleccionando el protocolo basado en CTAB 0.8% (Hexadecyltrimethylammonium bromide) y LS 1% (n-Lauril Sarcosina). Se partió de muestras congeladas de hoja de hijuelo y de hoja de plantas micropropagadas.

Se molieron en mortero y el polvo obtenido se colocó en tubos Eppendorf de 2 mL que contenía 200 µL de amortiguador de extracción (0.14 M d-Sorbitol, 0.22 M Tris HCl pH 8, 0.022 M EDTA pH 8, 0.8 M NaCl, 0.8% CTAB, 1% n-Lauril

Sarcosina), se mezclaron en vortex y se incubaron a 65° C durante 30 min con agitación cada 10 min.

Posteriormente a cada tubo se le adicionó un volumen igual de Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamílico (25:24:1), se mezcló en vortex y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min. Transcurrido el tiempo de centrifugación, la fase acuosa fue separada con pipeta y transferida a un tubo nuevo Eppendorf. Se repitió por segunda vez la fase del lavado con Fenol/Cloroformo/Isoamílico (25:24:1).

Después, a la fase acuosa se le adicionó 2 µL de RNAsa (2 mg/mL) y se incubó a 37° C por 45 min. A continuación se realizó una precipitación con un volumen igual de Isopropanol frío, mezclando suavemente y verificando la formación de una madeja de DNA. Para favorecer la precipitación las muestras se dejaron en hielo por 5 min.

Después se centrifugaron por 7 min a 12,000 rpm y el sobrenadante se eliminó por decantación. Las muestras fueron lavadas con 200 µL de Etanol 70%, invirtiendo los tubos suavemente; después se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 min. El sobrenadante fue eliminado con pipeta. Esta fase de lavado con Etanol 70% se realizó por segunda vez.

Por último, las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente y luego se resuspendieron en 100 µL de amortiguador TE (Tris Base, EDTA) y se almacenaron a -20° C.

Para estimar la concentración final de DNA, se realizó una dilución 1:100 en agua milli Q y se leyó en un espectrofotómetro UV-Vis DU 530 (Beckman, E.U.A.), a una longitud de onda de 260 nm.

La calidad del DNA extraído fue verificada por electroforesis en geles de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X (Tris base 40 mM, acetato de sodio 5 mM, EDTA 1 mM, pH 8), a 75 V durante 60 min. La tinción se realizó con bromuro de etidio (2 µg/mL) durante 15 min y visualizado en el Sistema Documentador de Geles Chemi doc (UVP Bioimaging Systems, E.U.A.).

4.5. Marcadores moleculares: RAPD.

Para los análisis de RAPD se siguió el protocolo descrito por Williams y col. (1990) con algunas modificaciones. Se probaron 40 oligos de Operon Technologies (Ver apéndice I). Para la amplificación por PCR, las concentraciones de los componentes fueron: Taq polimerasa 1 U (Roche, Alemania), MgCl₂ 1.5 mM (Roche, Alemania), dNTP's 100 uM (Roche, Alemania), oligo 0.5 uM (Operon Technologies) y 100 ng de DNA vegetal. El volumen final de la mezcla de reacción fue 25 µL. Cada una de las amplificaciones se realizó por duplicado para evaluar la reproducibilidad.

Las condiciones del termociclador (TECHNE TC 412, Inglaterra) fueron: 2.5 min. de desnaturalización inicial a 93° C, seguido de 45 ciclos de 30 s a 93° C, 45 s a 35° C y 90 s a 72° C, con una extensión final a 72° C por 5 min.

Los productos de PCR fueron separados en gel de agarosa al 1.8% en amortiguador TAE 1X (Tris base 40 mM, acetato de sodio 5 mM, EDTA 1 mM, pH

8), a 75 V durante 90 min. Se utilizó un marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen, E.U.A.) para ubicar los tamaños de los productos de PCR. La tinción se realizó con bromuro de etidio (2 µg/mL) durante 15 min y los geles fueron visualizados en el Sistema Documentador de Geles (UVP Bioimaging Systems, E.U.A.).

4.6. Marcadores moleculares: AFLP

Para los análisis de AFLP, se siguió el protocolo descrito por Vos y col. (1995) con algunas modificaciones.

Digestión del DNA.

Se utilizaron 250 ng de DNA genómico y se colocaron en un tubo con 20 U de *EcoRI* (Roche, Alemania) y 20 U de *MseI* (Roche, Alemania), y 2.5 µL de amortiguador RL 1X (Tris-HCl 10 mM, Mg 10 mM, K 50 mM, DTT 5mM, pH 5.7), en un volumen final de 25 µL. La mezcla se incubó a 37° C por 3 h. Transcurrido el tiempo, las enzimas se inactivaron por incubación a 70° C por 15 min. y luego las muestras se colocaron inmediatamente en hielo.

Ligación de adaptadores.

El alineamiento de adaptadores se describe en Apéndice II. A cada muestra, se le agregó la mezcla de ligación que contenía el adaptador doble cadena *EcoRI* 5 pmol; adaptador *MseI* 50 pmol; ATP 10 mM pH 7.5; amortiguador RL 1x; T4 DNA ligasa 1 U (Roche, Alemania) y agua milli Q estéril. Para llegar a un volumen de 35 µL. Se incubaron las muestras a 16° C durante toda la noche.

Pre-amplificación selectiva.

Para la pre-amplificación se utilizaron 5 μ L de DNA molde proveniente de la ligación, y se le agregaron 25 μ L de la mezcla de reacción 1 que contenía: oligo Eco RI+1 50 ng/ μ L; oligo MseI+1 50 ng/ μ L; dNTP, 10 mM; y agua milli Q estéril. También se le agregaron 20 μ L de la mezcla de reacción 2 que contenía: Taq polimerasa, 1U (Roche, Alemania); PCR-Buffer 1X (Roche, Alemania) y agua milli Q estéril. En un volumen total de 50 μ L. Las condiciones del termociclador (TECHNE TC 412, Inglaterra) fueron: 5 min. para la desnaturalización inicial a 94° C seguido de 20 ciclos a 94° C por 30 s 56° C por 60 s 72° C por 60 s con 7 min. a 72° C de extensión final.

Tabla 3. Secuencia de oligos +1 utilizados para AFLP.

NOMBRE	SECUENCIA
MSE I + C	5'-GAC GAT TCC TGA GTA AC-3'
ECO RI + A	5'-AGA CTG CGT ACC AAT TCA-3'

Amplificación selectiva.

Se probaron 4 combinaciones de oligos+3, para la amplificación selectiva; se realizó una dilución 1:20 de la preamplificación, se tomaron 5 μ L de esta dilución y se le agregaron 5 μ L de la mezcla de reacción 1 que contenía: oligo Eco RI+3 50 ng/uL; oligo MseI+3 50 ng/uL; dNTP 10 mM; y agua milli Q estéril. Y posteriormente se le agregaron 10 μ L de la mezcla de reacción 2 que contenía: Taq Polimerasa, 1 U (Roche, Alemania); PCR-Buffer 1X (Roche, Alemania); y agua milli Q estéril. En un volumen total de 20 μ L. Las condiciones del

termociclador (TECHNE TC 412, Inglaterra), fueron: 5 min para la desnaturalización inicial a 94° C; 6 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 65° C, 60 s a 72° C; 6 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 60° C, 60 s a 72° C; 23 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 56° C, 60 s a 72° C; y 5 min a 72° C para la extensión final.

Tabla 4. Secuencia de oligos+3 utilizados para AFLP.

NOMBRE	SECUENCIA
MSE 1 + CAA	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA ACA A-3'
ECO R1 + ACC	5'-AGA CTG CGT ACC AAT TCA CC-3'
MSE 1 + CTC	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA ACT C-3'
MSE 1 + CTT	5'-GAC GAT GAG TCC TGA ATA ACT T-3'
MSE 1 + CAC	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA ACA C
MSE 1 + CTG	5'-GAC GAT GAG TCC TGA GTA ACT G-3'
ECO R1 + AAG	5'-AGA CTG CGT ACC AAT TCA AG-3'
ECO R1 + ACT	5'- AGA CTG CGT ACC AAT TCA CT-3'
ECO R1 + ACA	5'-AGA CTG CGT ACC AAT TCA CA-3'
ECO R1 + AAC	5'- AGA CTG CGT ACC AAT TCA AC-3'

Un aspecto importante es seleccionar la combinación de oligos +3 que den el mayor número de bandas polimórficas, en esta etapa se utilizaron geles de poliacrilamida (PAGE) para secuenciación. Los productos de amplificación fueron corridos en cámara de secuenciación (BioRad, E.U.A.). Se agregó a los productos de amplificación selectiva, 10 µL de amortiguador de carga (Formamida 98%, Azul de bromofenol 0.05%, Xilen cianol 0.05%, EDTA 10 mM), las muestras fueron desnaturalizadas durante 5 min. a 95° C y luego colocadas en hielo. Se cargaron en el gel de poliacrilamida al 6% con condiciones desnaturalizantes (urea 8 M, ver apéndice III), 6 µL de cada muestra y 4 µL del marcador de peso molecular de 25 pb (Invitrogen, E.U.A.), y se corrieron en amortiguador TBE 1x (Tris-Base 0.9 M, ácido bórico 0.9 M, EDTA 25 mM) a 90 Watts constantes por aproximadamente 3

horas. Para la detección de las bandas se utilizó la tinción de nitrato de plata (Ver apéndice IV).

Análisis de AFLP con oligos +3 seleccionados.

La separación de los productos de la amplificación selectiva con los oligos +3 seleccionados, se realizó en geles de 25 cm. de poliacrilamida al 6.5% en el secuenciador automático de LiCor 4200L del INIFAP de Celaya; utilizando el oligo Eco RI+3 seleccionado marcado con fluorescencia (IRDye). La electroforesis se llevó a cabo con TBE 0.8%, 1200 V, 40 W y 3 horas de corrida.

4.7. Análisis estadístico.

Se generaron matrices binarias partiendo de la observación de los polimorfismos en las fotografías de los geles de RAPD y AFLP, en los cuales cada individuo tiene un patrón de bandeo específico. Las bandas con el mismo peso molecular en distintos individuos pueden ser asumidas como idénticas. La presencia/ausencia de una banda fue representada con 1 o 0 respectivamente (matriz binaria) y para este fin se utilizó el programa CrossChecker 2.9 (<http://www.dpw.wau.nl/pv/pub/CrossCheck/index.html>).

Además de seleccionar la combinación de oligos+3 de AFLP y oligos para RAPD en base al mayor número de bandas generadas, se analizaron los dendrogramas generados por cada combinación de oligos+3 y por cada uno de los oligos probados para RAPD, en muestras de *Agave salmiana* y de referencia. Con este fin, se utilizó la opción Clustal Analysis de STATISTICAL .

Con las matrices binarias generadas por los oligos seleccionados para cada sistema de marcador, se calcularon las matrices de disimilitud utilizando la

distancia genética Simple Matching Coefficient (SMC), con el programa S-Plus 6.0 para Windows, ya que hasta este momento se contó con este programa que es mas robusto y que contiene el algoritmo para el cálculo de SMC.

A su vez, las matrices disimilaridad fueron utilizadas por el mismo programa, para la generación de dendrogramas por el método UPGMA con 1000 permutaciones de Bootstrapp.

Para la evaluación de la estructura genética de *A. salmiana*, las matrices disimilaridad SMC fueron introducidas en el programa Arlequín 2.00, para realizar el análisis AMOVA. Se probó una estructura formada por un solo grupo: que contenía las tres poblaciones de *A. salmiana*; Ipiña, Aquiles Serdán y El Cuervo. Esta estructura se utilizó en ambos sistemas de marcadores, RAPD y AFLP; y en ambas condiciones, *in vitro* y hoja.

Se probó una segunda estructura formada por dos grupos: el primero contenía las tres poblaciones de *A. salmiana* en la condición *in vitro* y el segundo contenía las tres poblaciones de *A. salmiana* en la condición hoja. Esta estructura se utilizó en ambos sistemas de marcadores, RAPD y AFLP. La matriz de distancia (pairwise difference) utilizada en esta estructura fue calculada por Arlequín 2.00 (Schneider y col., 1997).

Para comparar los métodos de marcadores moleculares, se calculó el coeficiente de correlación de la prueba de Mantel, entre las matrices disimilaridad de AFLP y RAPD, para cada condición y para cada población. Para este fin se utilizó el programa Arlequín 2.00 (Schneider y col., 1997), con 1000 permutaciones para probar la significancia de la prueba.

5. Resultados.

5.1. Micropropagación.

El tejido meristemático fue elegido para el establecimiento de los cultivos *in vitro*, de *A. salmiana* y de las otras especies, ya que se ha visto que es un tejido que mantiene la fidelidad genética de las plantas micropropagadas y por ser un tejido no vascularizado permite la obtención de plantas libres de microorganismos patógenos.

Se seleccionó el medio MS + BA (3 mg/L) + IAA (0.5 mg/L) para *A. salmiana* de las tres regiones por ser el que indujo la formación de brotes adventicios múltiples en menor tiempo (de 2 a 3 meses de cultivo, el desarrollo de hojas ya era evidente). Mientras que para *A. scabra* de El Huizache se seleccionó MS + BA (10 mg/L) + 2,4-D (0.025 mg/L) por ser el que indujo brotes en menor tiempo. Para las muestras del I.C.A. sólo se regeneraron las plantas en los medios con reguladores y comenzaron a desarrollar raíz en MS + PPM (5 mL/L).

Los problemas de contaminación reportados en algunos individuos, sobre todo en los procedentes del ejido Aquiles Serdán, Charcas; pudieron solucionarse al utilizar el agroquímico Terrazole (etridiazole) en la solución de desinfección en sustitución del antifúngico Captán, que se utilizaba anteriormente; esto, porque el Terrazol es un agroquímico del tipo preventivo y curativo.

De las muestras procedentes de Ipiña, Ahualulco; ningún explante de la variante Blanco sobrevivió a la micropropagación, por lo cual no se reporta ningún resultado de esta variante. Las plantas procedentes de Aquiles Serdán, Charcas; mostraron serios problemas de contaminación y solo algunos explantes lograron sobrevivir.

Tabla 5. Medios para cultivo de tejidos vegetales seleccionados para la regeneración de brotes. MS: medio Murashige-Skoog; BA: Benziladenina; IAA: Ácido Indolacético; 2,4-D: Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético; PPM: agente biocida

Origen	Nombre	Medio	Resultado
Ipiña (Ahuatlulco)	<i>A. salmiana</i> Chino <i>A. salmiana</i> Liso <i>A. salmiana</i> Amarillo	MS + BA + IAA	Regeneración de la planta a 2 meses de cultivo y desarrollo de brotes adventicios a 5 meses de cultivo.
El Cuervo (Charcas)	<i>A. salmiana</i> Chino	MS + BA + IAA	Regeneración de la planta a 2 meses de cultivo. Desarrollo de brotes a 6 meses de cultivo
Aquiles Serdan (Charcas)	<i>A. salmiana</i> Chino	MS + BA + IAA	Desarrollo de raíz en MS + PPM. Desarrollo de brotes a 5 meses de cultivo con reguladores.
I.C.A.	<i>A. mapisaga</i> <i>A. angustifolia</i> <i>A. scabra</i> <i>A. americana americana</i> <i>A. americana americana manzo</i> <i>A. salmiana</i>	MS + PPM MS + PPM MS + BA + 2,4-D MS + PPM MS + PPM MS + BA + IAA	<ul style="list-style-type: none"> ■ No hubo desarrollo de brotes. ■ Regeneración y desarrollo de raíz. ■ Regeneración de la planta a 2 meses de cultivo. ■ Desarrollo muy lento de hoja. ■ Regeneración y desarrollo de raíz. ■ Regeneración de la planta a 2 meses de cultivo y desarrollo de brotes a 6 meses de cultivo.
El Huizache	<i>A. scabra</i>	MS + 2,4-D + BA	Desarrollo de brotes adventicios a 4.5 meses de cultivo

En la Tabla 5 se resumen los medios seleccionados y los resultados obtenidos en la micropropagación de los agaves colectados. En la Figura 5 se muestran fotografías de diferentes agaves en medios de cultivo.

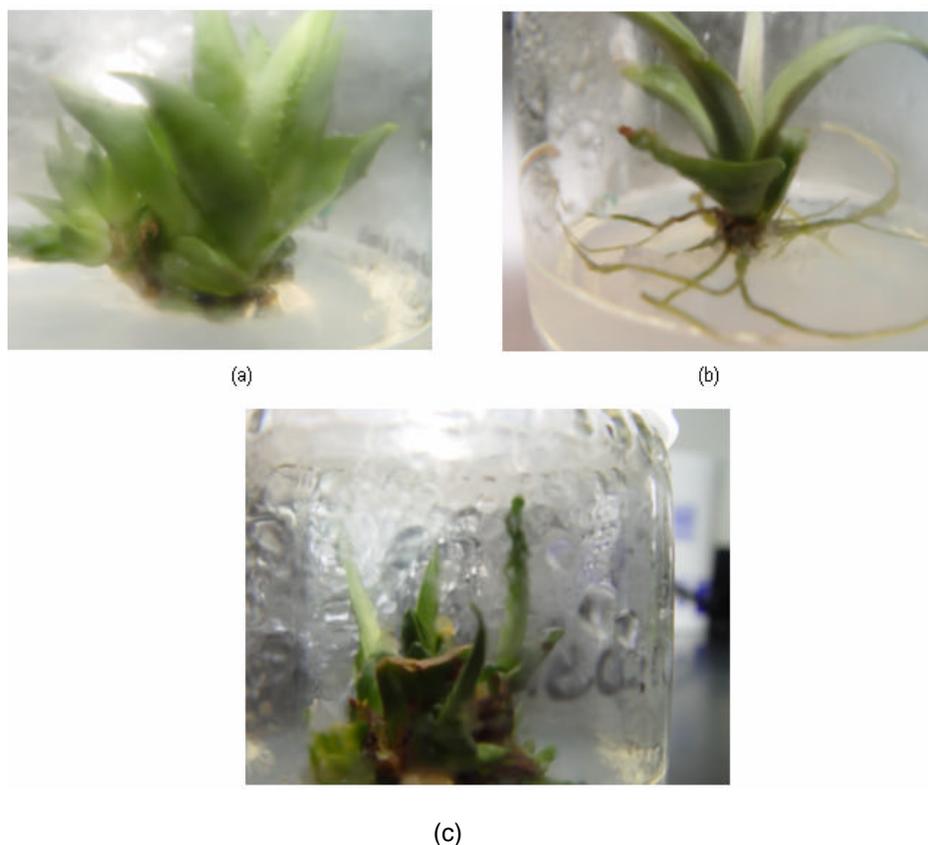


Fig. 5. Desarrollo de brotes en diversos agaves. (a) Brotes adventicios múltiples en *A. salmiana* Chino en medio MS + BA + IAA (b); regeneración y desarrollo de raíz en *A. americana americana* manzo en medio MS + PPM; (c) desarrollo de brotes adventicios en *A. scabra* en medio MS + BA + 2,4-D.

5.2. Extracción de DNA

El protocolo basado en CTAB 0.8% y LS 1% dio una mayor cantidad de DNA extraído al ser cuantificado en el espectrofotómetro UV-Vis (Beckman, E.U.A.) obteniendo concentraciones de aproximadamente 100 ng/μL. En el gel de calidad, el DNA extraído de cultivos *in vitro*, presenta una banda bien definida de DNA genómico de aproximadamente 23 000 kb (Fig. 6).

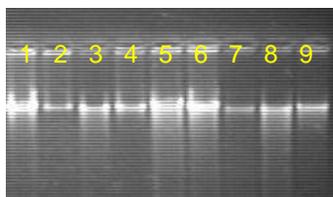


Fig. 6. Gel de calidad. DNA extraído de plantas *in vitro*. 1 y 2 - *A. salmiana* Chino, Aquiles Serdán; 3 a 5 - *A. scabra*, El Huizache; 6 - *A. salmiana* Amarillo, Ipiña; 7 - *A. salmiana* Chino, Ipiña; 8 y 9 *A. salmiana* Liso, Ipiña.

En cuanto al DNA extraído de hoja de hijuelo, las bandas de DNA genómico son evidentes aun cuando se observa un ligero barrido en algunas muestras (Fig. 7).

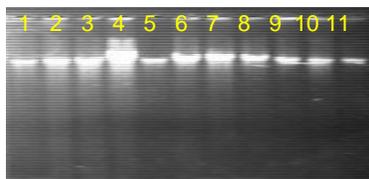


Fig.7. Gel de calidad. DNA extraído de hojas de hijuelo. 1 y 10 - *A. salmiana* Chino, Aquiles Serdán; 2 y 11 - *A. scabra*, El Huizache; 3 - *A. mapisaga*, I.C.A.; 4 - *A. mapisaga*, I.C.A.; 5 a 9 - *A. salmiana* Chino, El Cuervo.

5.3. Selección de oligonucleótidos

5.3.1. RAPD

Se contaba con referencias de un trabajo de RAPD en *A. tequilana* (Ramírez Ramírez, 2003) uno de los oligos reportados (OPA11), fue utilizado aunado a otros de las series A, B, E y F de Operon Technologies, dando un total de 40 oligos; con muestras de DNA de plantas micropropagadas de *A. salmiana* de diferente región y *A. scabra*.

El patrón de bandeo de cada oligo se observa en la Fig. 8. Se seleccionó el oligo OPA16 por ser el que muestra un patrón con la mayor cantidad de bandas polimórficas definidas. Se generaron dendrogramas preliminares con la opción Clustal Analysis de STATISTICAL. Y aunque los oligos OPA19, OPE7, OPF1 y OPF9 agrupan a *A. salmiana* de las tres regiones (Fig. 9), en subgrupos y dejan fuera a *A. scabra*; y el oligo OPA16 no lo hace, pero este oligo si dio consistentemente mas bandas en las muestras analizadas (Fig. 8).

5.3.2. AFLP

Ya que no existen reportes para la selección de oligos +3 de AFLP en *A. salmiana*, se probaron 4 combinaciones de oligos +3 con muestras de DNA de hoja de *A.*

salmiana de las tres regiones y *A. potatozum* (E-AAC + M-CAC; E-AAG + M-CTC; E-ACA + M-CTG; E-ACT + M-CTT). Y se observó que la cantidad de bandas generadas por E-ACA + M-CTG fue mayor (686 bandas en total) a la que generó la combinación E-ACT + M-CTT (224), quien tuvo la menor cantidad de bandas de las 4 combinaciones. Por lo que la combinación E-ACA + M-CTG fue seleccionada, ya que entre mayor cantidad de bandas generadas, la probabilidad de encontrar polimorfismos es también mayor (Fig. 10).

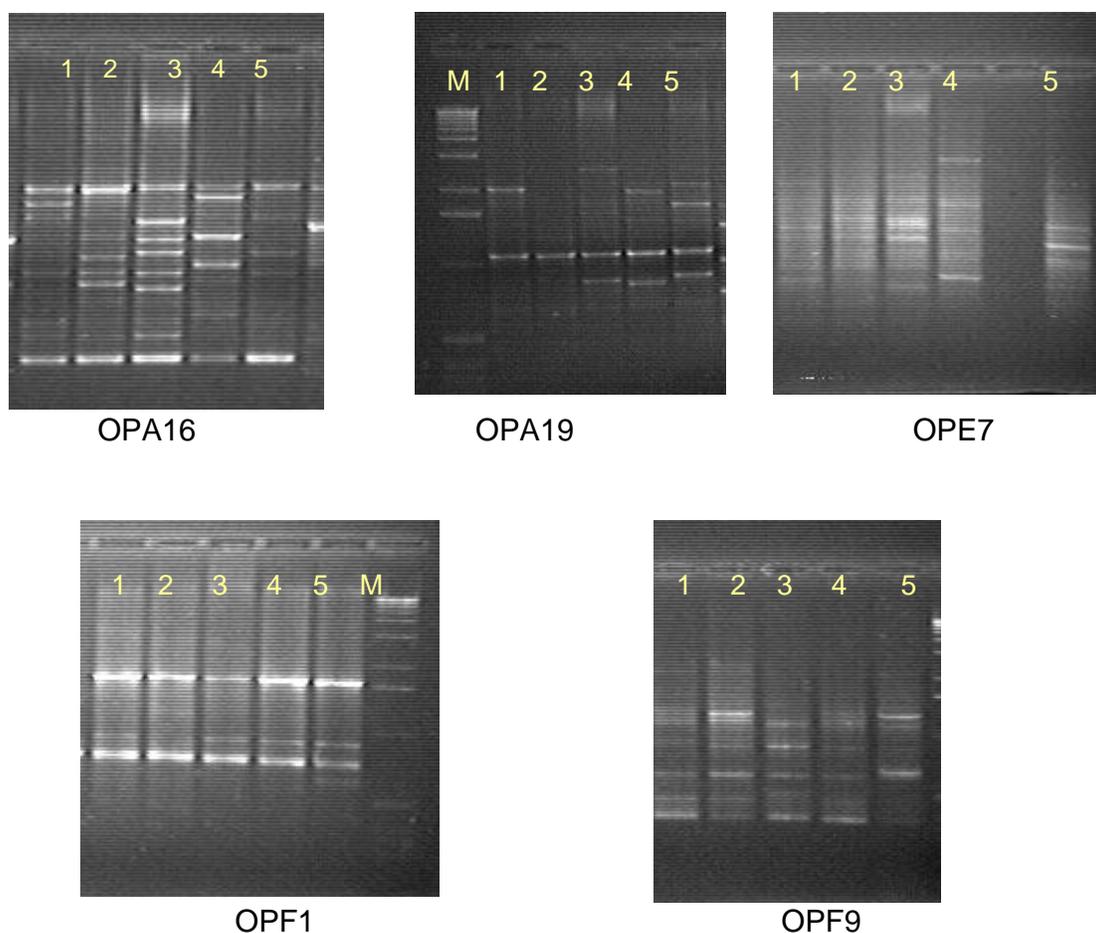


Fig. 8. Patrones de RAPD generados con los oligos OPA16, OPA19, OPE7, OPF1 y, OPF9 respectivamente en muestras de *A. salmiana*: 1 y 2 - *A. salmiana* Chino, El Cuervo; 3 - *A. salmiana* Amarillo, Ipiña; 4 - *A. salmiana* Chino, Aquiles Serdán; 5 - *A. scabra*, El Huizache; M marcador 1 kb.

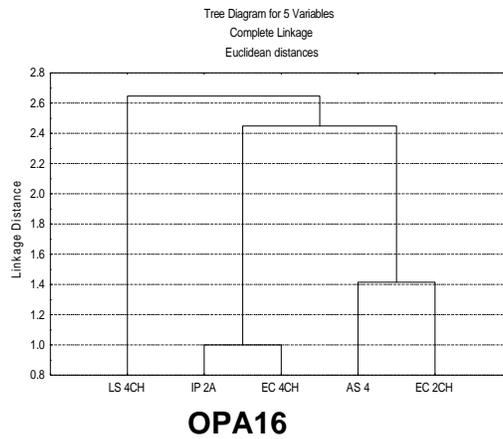
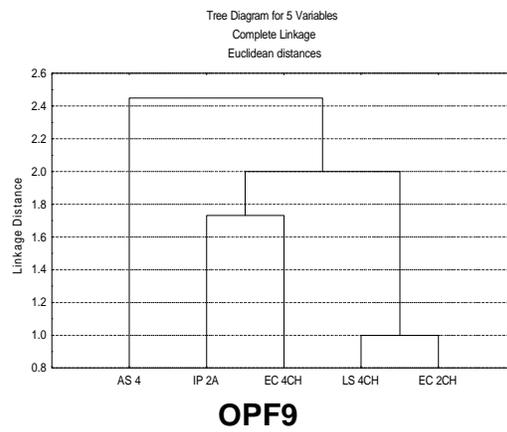
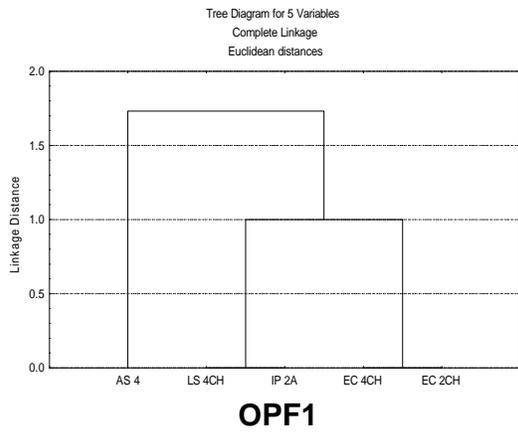
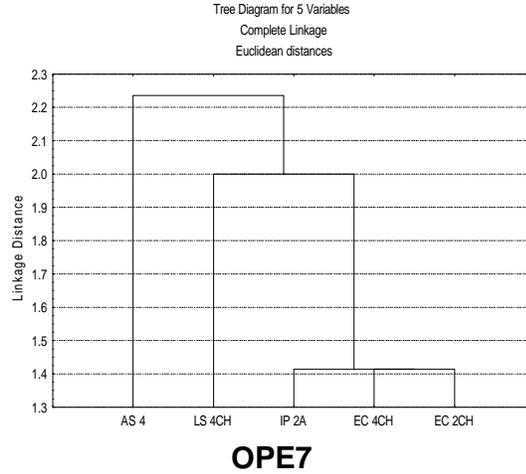
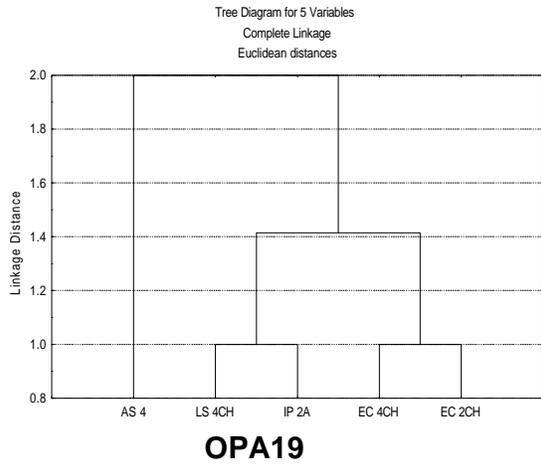


Fig. 9 Dendrogramas de RAPD generados por los oligo OPA19, OPE7, OPF1, OPF9 y OPA16 para muestras de *A. salmiana* de El Cuervo (EC), Ipiña (IP), Aquiles Serdán (LS) y *A. scabra* (AS 4).

En forma preliminar se las combinaciones E-ACA + M-CTG y E-ACT + M-CTT generaron dendrogramas en STATISTICAL donde *A. potatorum* es excluido de los grupos de *A. salmiana* formados. Lo que sugiere que estas combinaciones son capaces de encontrar diferencias genéticas entre *A. salmiana* y *A. potatorum*, dentro del género *Agave*. Sin embargo, en esta prueba preliminar también se observa que los agrupamientos de *A. salmiana* no son estrictamente en el orden geográfico, como pudiera esperarse (Fig. 11).

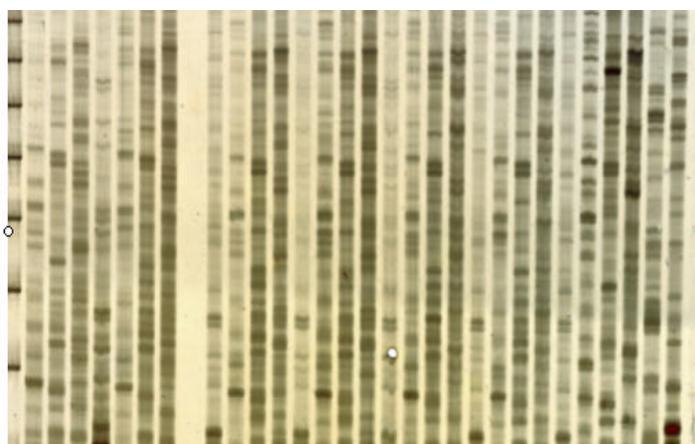


Fig. 10. Gel de AFLP teñido con nitrato de plata, que incluye muestras de *A. salmiana* de las tres regiones y *A. potatorum*, con las cuatro combinaciones de oligos +3.

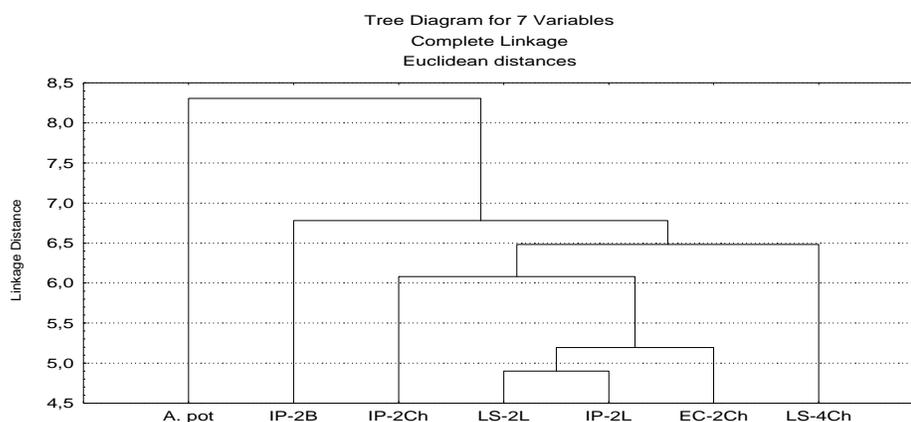


Fig. 11. Dendrograma de AFLP generado por la combinación E-ACA + M-CTG de muestras de *A. salmiana* de diferente región (EC- El Cuervo, IP- Ipiña, LS- Aquiles Serdán) y *A. potatorum* (A pot.).

5.4. Análisis de marcadores RAPD.

En las muestras de DNA de plantas micropropagadas: se analizaron 11 muestras de Aquiles Serdán, 19 muestras de Ipiña: 11 muestras de la variante chino, 6 de la variante liso y 2 de la variante amarillo; de El Cuervo se analizaron 19 de la variante chino; de El Huizache se analizaron 3 muestras de *A. scabra* y 12 muestras del I.C.A (*A. angustifolia*, *Pamino*, *A americana americana*, *A. americana americana manzo*, *A scabra*, *A. mapisaga*) (Fig. 12 a 14). La diferencia de plantas analizadas y colectadas se debió a que no todos los explantes sobrevivieron a la micropropagación. El oligo utilizado fue OPA16.

La cantidad de bandas reproducibles en *A. salmiana* de las tres regiones geográficas, fue en promedio de 7 por reacción, siendo la mayoría polimórficas.

No todas las muestras de DNA *in vitro* mostraron amplificación de PCR.

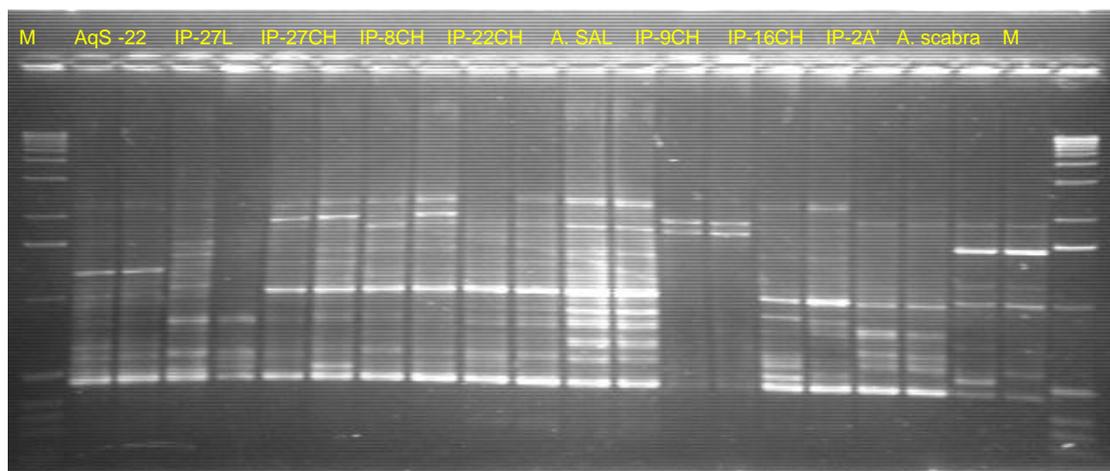


Fig. 12. Perfil de RAPD de DNA extraído de plantas *in vitro* por duplicado, procedentes de Aquiles Serdán (AqS-), Ipiña (IP-) y *A. scabra* (I.C.A.); M marcador de peso molecular 1 kb.

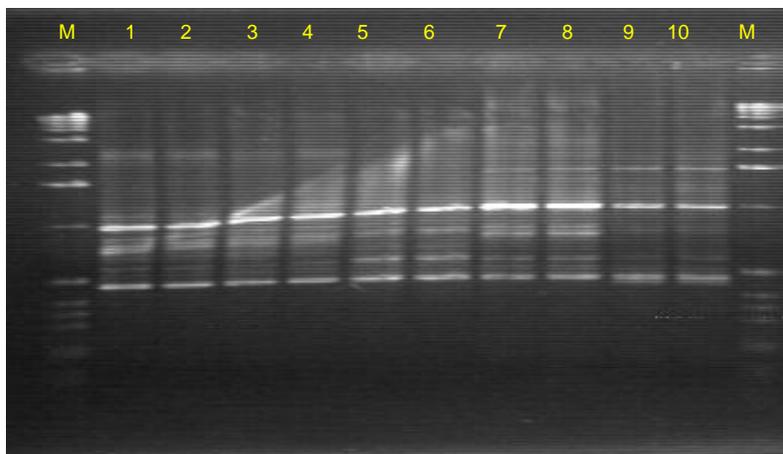


Fig. 13. Perfil de RAPD de DNA extraído de plantas in vitro procedentes del I.C.A. 1 y 2 - *A. americana americana-1*; 3 y 4 - *A. americana americana-2*; 5 y 6 - *A. americana americana manzo*; 7 y 8 - *A. mapisaga-4*; 9 y 10 - *A. mapisaga-3*; M marcador de peso molecular 1 kb.

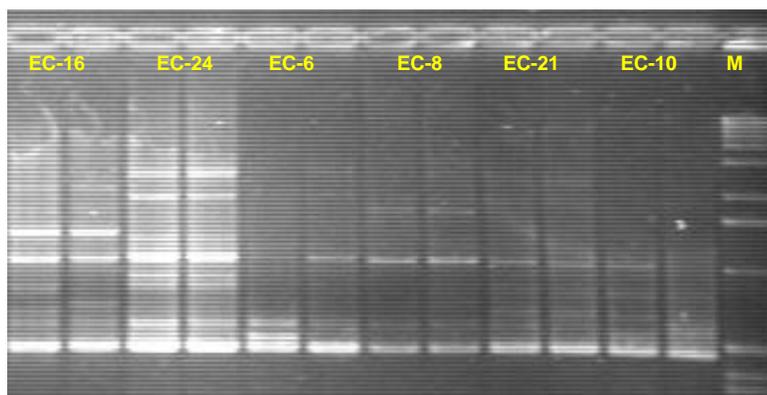


Fig. 14. Perfil de RAPD de DNA extraído de plantas in vitro procedentes de El Cuervo; M marcador de peso molecular 1 kb.

Para las muestras de DNA de hoja que se había congelado previamente, se analizaron 15 muestras de Aquiles Serdán, de Ipiña se analizaron 13 muestras de la variante chino, 10 de la variante liso y 2 de la variante amarillo; de El Cuervo se analizaron 30, 3 muestras de El Huizache y 6 del I.C.A. (*Pamino*, *A. angustifolia*, *A. mapisaga*, *A. americana americana*, *A. americana americana manzo*) (Fig, 15 a 17)

Hubo hojas que tuvieron que ser desechadas porque hubo proliferación de hongos en ellas después de ser cortadas, por lo que existe una diferencia entre el número

de plantas colectadas y el número de hojas analizadas. Además, hubo muestras que no mostraron amplificación de PCR.

Se obtuvieron 7 bandas reproducibles por reacción, siendo en la mayoría de los casos polimórficas. En el caso de las muestras de hoja de Aquiles Serdán (Fig. 16), el número de bandas observadas (de 1 a 3) fue menor a las observadas en las muestras de plantas micropropagadas; además, de las 15 muestras de esta localidad solo 7 mostraron amplificación.

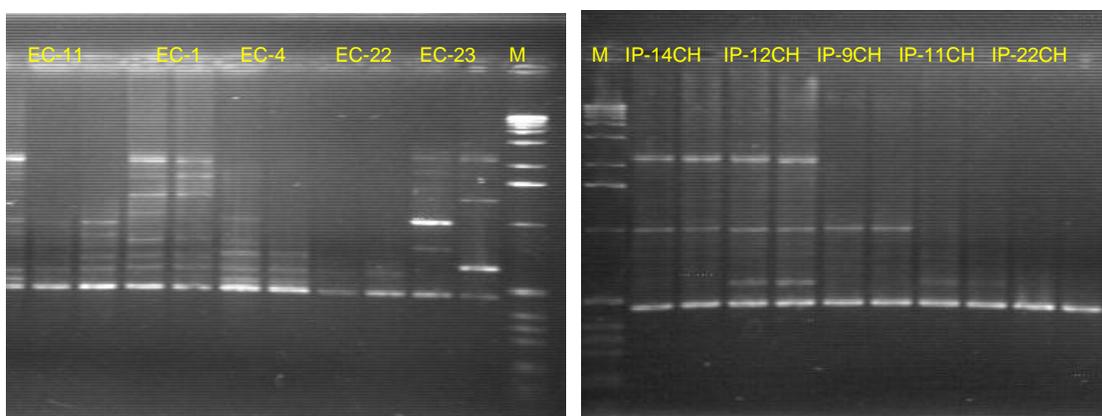


Fig. 15 Perfil de RAPD de DNA extraído de hoja de hijuelo de plantas por duplicado, procedentes de El Cuervo (EC-) e Ipiña (IP-); M marcador de peso molecular 1 kb.

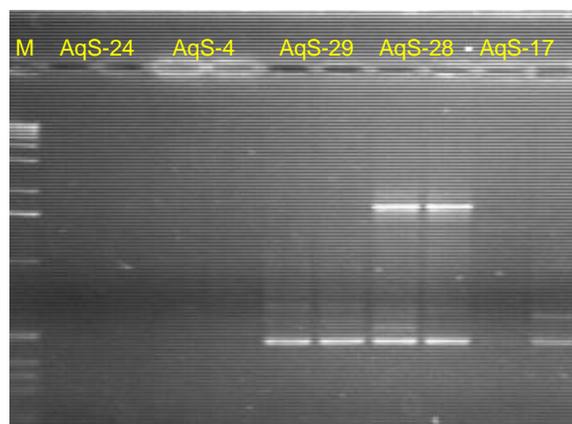


Fig. 16 Perfil de RAPD de DNA extraído de hoja de hijuelos procedentes de Aquiles Serdán (AqS), M marcador de peso molecular.

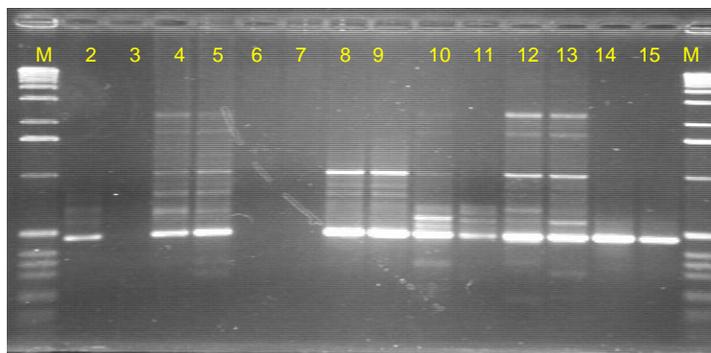


Fig. 17. Perfil de RAPD de DNA extraído de hoja de hijuelos procedentes del I.C.A., 2 y 3 - *A. mapisaga*-3; 4 y 5 - *A. angustifolia*-D; 6 y 7 - *A. angustifolia*-B; 8 y 9 - *A. angustifolia*-C; 10 y 11 - *A. americana americana* manzo; 12 y 13 - *A. americana americana*-2; 14 y 15 - *A. americana americana*; M marcador 1 kb.

Los patrones de bandeo obtenidos con el oligo OPA-16 de las muestras de DNA *in vitro* difieren de los obtenidos de las muestras de DNA de hoja, para cada población. Mientras que para las muestras de hoja de la población de Aquiles Serdán, el oligo OPA-16 produjo un número reducido de bandas.

A pesar de colectar hijuelos aparentemente sanos y de esterilizarlos superficialmente; dado el estado general de las magueyeras silvestres en Aquiles Serdán (Fig. 18), pudieron haber remanentes de DNA del patógeno en el stock de DNA extraído de hoja y la mezcla de estos DNA pudo no ser la adecuada para la amplificación por PCR con el oligo OPA16. Otra posibilidad, es la presencia de algún compuesto que inhibió la amplificación por PCR.

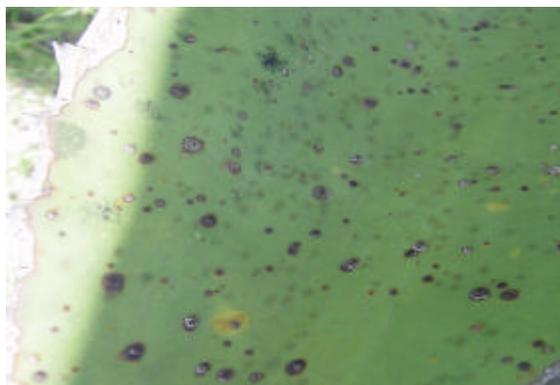


Fig. 18. Fotografía de la penca de un agave adulto en la localidad de Aquiles Serdán, Charcas.

5.5. Análisis de marcadores AFLP.

Por ser una técnica laboriosa, para evaluar la reproducibilidad inicialmente solo se amplificaron 5 muestras por duplicado (Fig. 19), obteniendo una excelente reproducibilidad, que concuerda con lo que han reportado varios autores (Jones y col., 1997). Por otro lado, al correr las muestras problemas se introduce un duplicado al azar para verificar reproducibilidad.

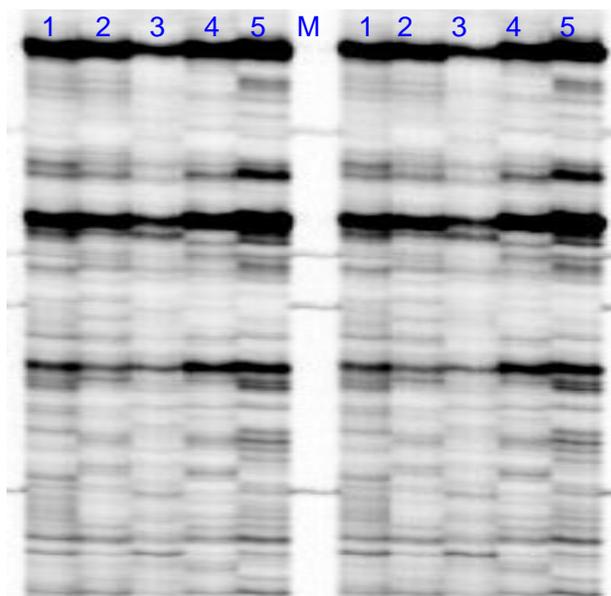


Fig. 19 Fragmento del gel de AFLP para reproducibilidad, 1 - AqS-7; 2 - AqS-19; 3 - EC-20, 4 - IP-28ch; 5 - A. mapisaga-3; M marcador de peso molecular 700 pb.

Para los AFLP en DNA de plantas *in vitro*, se analizaron 7 muestras de Aquiles Serdán, 13 muestras de El Cuervo, 13 de Ipiña, 7 muestras del I.C.A. y 2 de El Huizache (Fig. 20).

El número de bandas encontrado bajo la condición *in vitro*, utilizando el secuenciador LiCor 4200L, fue en promedio 122 bandas por reacción, encontrando diferencias en el número de bandas polimórficas en cada población (En Aquiles Serdán 64 fueron polimórficas, en El Cuervo 111, y en Ipiña 120).

En la Fig. 20 se puede observar una diferencia a simple vista en los patrones de *A. salmiana* de las tres regiones, con el patrón de las muestras de referencia procedentes del I.C.A. y de El Huizache; ya que los oligos +3 fueron seleccionados en base al polimorfismo generado en *A. salmiana*, y en el grupo de referencia las muestras son de especies diferentes.

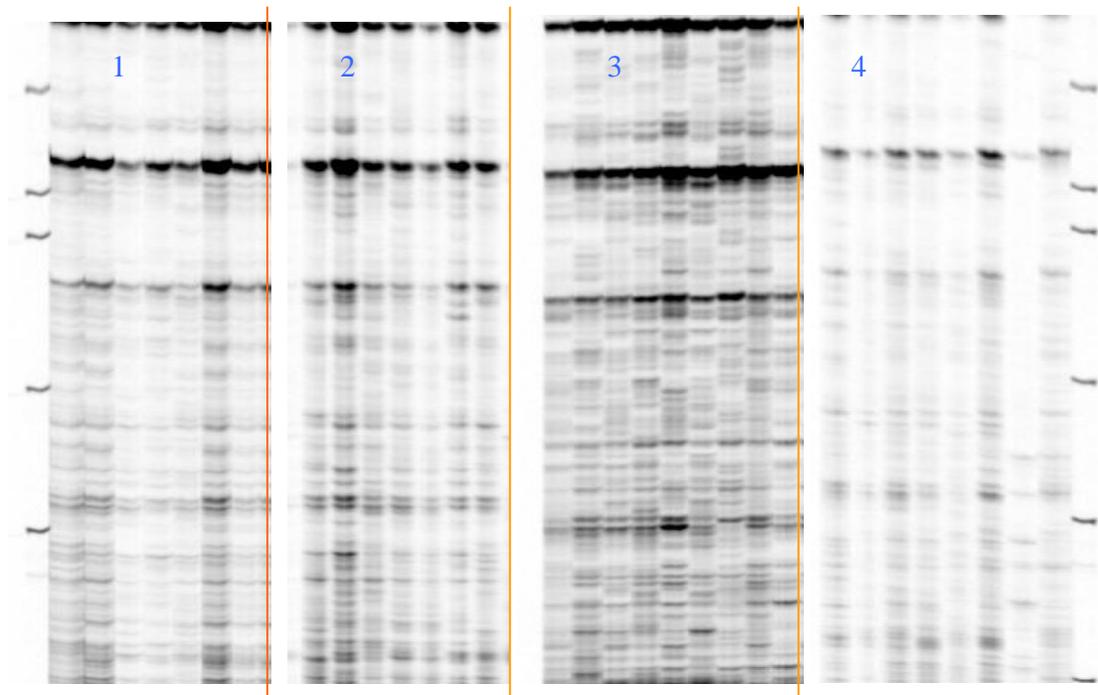


Fig. 20. Muestras de geles de AFLP de DNA de plantas *in vitro* de las tres localidades: (1) Ipiña, (2) Aquiles Serdán, (3) El Cuervo, (4) I.C.A. + El Huizache.

Para los AFLP en DNA de hoja, se analizaron 19 muestras de Aquiles Serdán, 23 muestras de El Cuervo, 24 muestras de Ipiña, 6 muestras de I.C.A. y 3 de El Huizache (Fig. 21).

Para esta condición, en el secuenciador automático de LiCor se encontraron 122 bandas por reacción en promedio, que son poco más de lo que se pudo detectar utilizando la tinción de plata (entre 80 y 90 bandas por reacción). También hubo

diferencias en el número de bandas polimórficas en cada población (Aguiles Serdán: 117, El Cuervo: 122, Ipiña: 83) (Fig. 21).

También en esta condición, son evidentes las diferencias en los patrones de bandeo de *A. salmiana* al ser comparados con el patrón de las muestras del I.C.A. y El Huizache que fueron utilizadas como referencia.

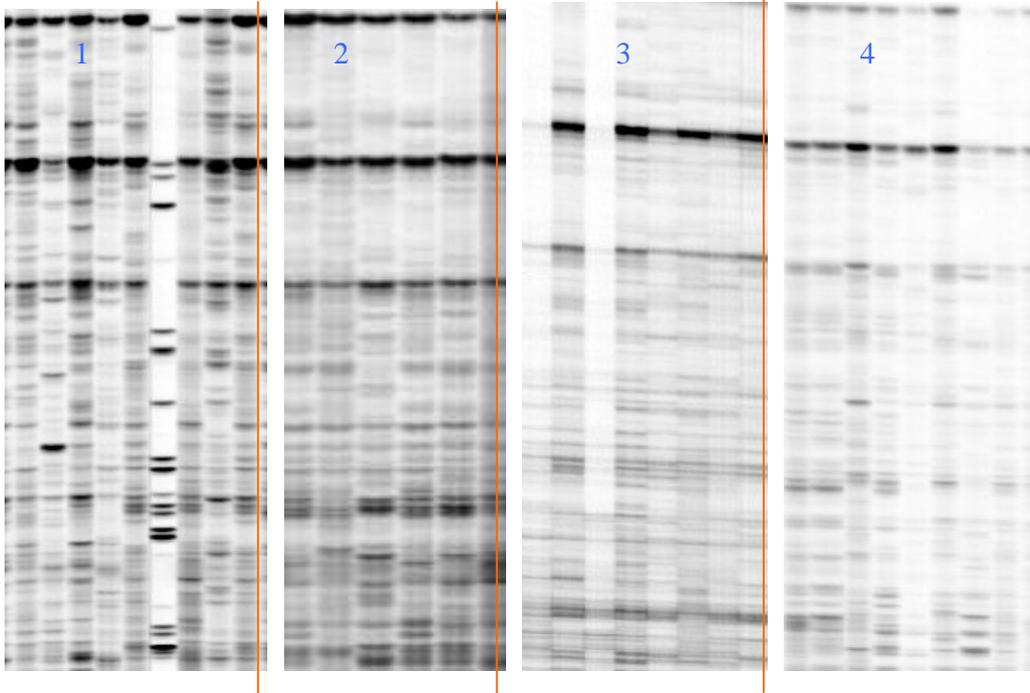


Fig. 21 Muestras de geles de AFLP de DNA de hoja de las tres localidades: (1) El Cuervo, (2) Ipiña, (3) Aguiles Serdán, (4) I.C.A. + El Huizache.

En ninguna de las dos condiciones, *in vitro* y hoja, hubo problemas para la amplificación. Se notan diferencias en los patrones de cada población, obtenidos de DNA *in vitro* comparados con los obtenidos de DNA de hoja

En ambos sistemas de marcadores, se observan algunas diferencias entre los patrones de bandeo de los dos tejidos (hoja y planta micropropagada) de una misma planta. Se cree que no debería haber diferencias al comparar los patrones de bandeo obtenidos de los dos tejidos, ya que provienen de un mismo individuo.

5.6. Análisis estadístico.

5.6.1. Estimación de la matriz de disimilaridad.

La matriz de distancia genética Simple Matching Coefficient (GD_{SM}) fue calculada para cada sistema de marcador bajo cada condición, *in vitro* y hoja; utilizando para este fin, las matrices binarias (1/0, presencia/ausencia) obtenidas con CrossChecker. El resumen de las distancias GD_{SM} es el siguiente:

Los elementos de la diagonal principal corresponden al promedio de las distancias genéticas dentro de cada población (PiX). Los elementos encima de la diagonal corresponden al promedio de las diferencias entre poblaciones ($PiXY$). Los elementos por debajo de la diagonal corresponden al promedio corregido de las diferencias entre poblaciones ($(PiXY-(PiX+PiY)/2)$).

AFLP: DNA *in vitro*

	Aquiles Serdán	El Cuervo	Ipiña	Referencia
Aquiles Serdán	0.21233	0.45361	0.33665	0.35398
El Cuervo	0.18813	0.31862	0.46112	0.44584
Ipiña	0.04010	0.11142	0.38077	0.39604
Referencia	0.06266	0.10137	0.02050	0.37031

AFLP: DNA hoja

	Aquiles Serdán	El Cuervo	Ipiña	Referencia
Aquiles Serdán	0.35484	0.44651	0.39196	0.42973
El Cuervo	0.07217	0.39383	0.39252	0.46175
Ipiña	0.05094	0.03200	0.32720	0.44870
Referencia	0.01104	0.02357	0.04384	0.48253

Para AFLP, los promedios de GD_{SM} dentro de Aquiles Serdán y en las muestras de referencia, son mayores en la condición de hoja; y aunque en El Cuervo e Ipiña la diferencia de los promedios de GD_{SM} entre una condición y otra, es mínima; podría afirmarse que para estas poblaciones entre una condición y otra, no hay

diferencias en el valor promedio de GD_{SM} . Sin embargo, para Aquiles Serdán si se observa una diferencia entre el promedio de las condiciones.

RAPD: DNA *in vitro*.

	Aquiles Serdán	El Cuervo	Ipiña	Referencia
Aquiles Serdán	0.34222	0.48597	0.49000	0.54762
El Cuervo	0.08042	0.46889	0.51181	0.43452
Ipiña	0.12947	0.08794	0.37885	0.51488
Referencia	0.18206	0.00563	0.13101	0.38889

RAPD: DNA hoja.

	Aquiles Serdán	El Cuervo	Ipiña	Referencia
Aquiles Serdán	NA	NA	NA	NA
El Cuervo	NA	0.48344	0.44680	0.50301
Ipiña	NA	0.02494	0.36028	0.50446
Referencia	NA	0.00653	0.06956	0.50952

Para RAPD, la diferencia de promedios en Ipiña y El Cuervo, entre una condición y otra, es mínima; por lo que podría afirmarse que para estas poblaciones entre una condición y otra, hay el mismo promedio de GD_{SM} . En las muestras de referencia el promedio es mayor en la condición de hoja. No se realizó la comparación en la población de Aquiles Serdán, ya que no se pudo obtener una matriz de GD_{SM} debido a los problemas de amplificación observados en la condición de hoja.

De manera general, para cada sistema de marcador, RAPD y AFLP; se encontró que en las poblaciones Ipiña y El Cuervo, existe el mismo promedio de GD_{SM} entre la condición *in vitro* y hoja. Mientras que para las muestras de referencia, el promedio de GD_{SM} , es mayor en la condición de hoja en ambos sistemas de marcadores (Tabla 6).

Para Aquiles Serdán, solo se puede afirmar que en AFLP el promedio de GD_{SM} es mayor en la condición de hoja (Tabla 6).

Tabla 6. Promedios de GD_{SM} dentro de cada población en cada sistema de marcador

	AFLP (IV)	AFLP (HOJA)	RAPD (IV)	RAPD (HOJA)
Aquiles Serdán	0.21233	0.35484	0.34222	NA
El Cuervo	0.31862	0.39383	0.46889	0.48344
Ipiña	0.38077	0.32720	0.37885	0.36028
Referencias	0.37031	0.48253	0.38889	0.50952

5.6.2. Análisis filogenético.

Se utilizaron las matrices disimilaridad GD_{SM} , para construir dendrogramas con el método UPGMA, para cada marcador, RAPD y AFLP; en cada condición, *in vitro* y hoja.

RAPD. En las Fig. 22 y 23 se pueden apreciar grupos de individuos de la población El Cuervo (ec) (barras color naranja); de Ipiña (ip) (barras azules) y de Aquiles Serdán (aqs) (barras verdes).

En el dendrograma generado para la condición *in vitro* (Fig. 22) se observa la tendencia a formarse tres grupos que corresponden al origen geográfico: El Cuervo, Ipiña y Aquiles Serdán; con algunos individuos dispersos. Las muestras de referencia no forman un grupo y se encuentran dispersas. En estas muestras era necesario incrementar el número de individuos de cada especie para la formación de su grupo correspondiente, pero no se contó con mas individuos de estas especies.

En el dendrograma de la condición de hoja (Fig. 23), también se aprecia la formación de los grupos correspondientes a las regiones geográficas, pero con

una diferencia, en El Cuervo se forman dos grupos, ubicados en extremos opuestos del dendrograma y las muestras de referencia se encuentran dispersas.

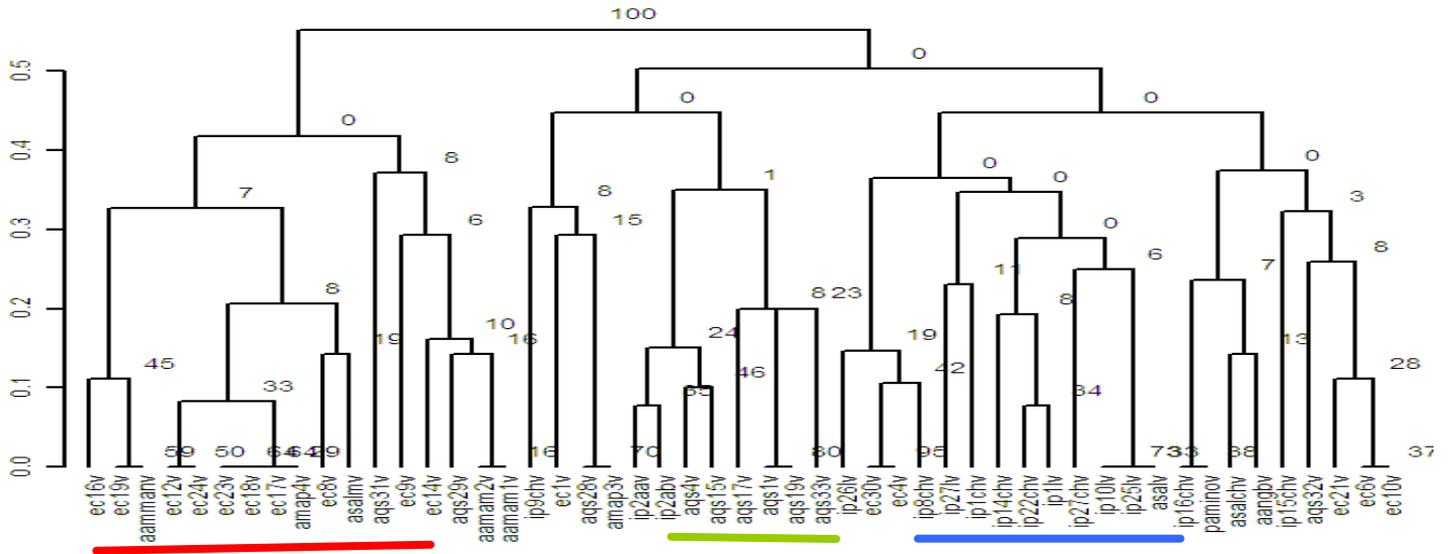


Fig. 22. Dendrograma generado para RAPD, bajo la condición in vitro (v), que incluye las tres regiones: Ipiña (ip), Aquiles Serdán (aq). El Cuervo (ec) y las muestras de referencia. Los valores de bootstrap se encuentran en cada nodo y la escala corresponde a GD_{SM}.

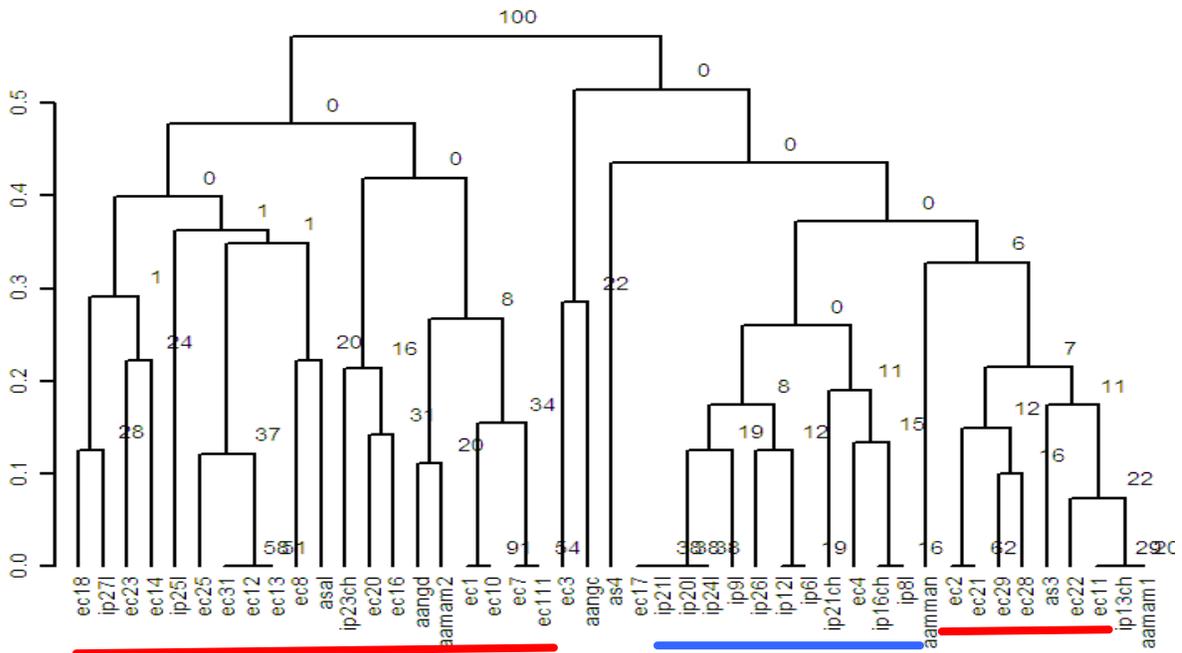


Fig. 23. Dendrograma generado para RAPD, bajo la condición de hoja, que incluye solo dos regiones: Ipiña (ip) y El Cuervo (ec), además, las muestras de referencia. Los valores de bootstrap se encuentran en cada nodo y la escala corresponde a GD_{SM}.

AFLP. En las Fig. 24 y 25, las barras color naranja indican grupos de varios individuos de la población El Cuervo (ec), las barras azules indican grupos de Ipiña (ip) y las barras verdes indican grupos de varios individuos de Aquiles Serdán (aqs).

En cuanto al dendrograma de la condición *in vitro* (Fig. 24), se observa un agrupamiento de El Cuervo y dos agrupamientos de Ipiña, aunque se observan pocos miembros de estas poblaciones que quedan dispersos. Las muestras de Aquiles Serdán se encuentran dispersas a lo largo del diagrama y no forman un grupo definido; al igual que las muestras de referencia.

En el dendrograma generado para la condición de hoja (Fig. 25), se observa que El Cuervo e Ipiña forman cada uno, dos grupos bien definidos, aunque con algunos individuos dispersos; Aquiles Serdán ahora forma tres grupos bien definidos. Las muestras de referencia no forman grupos y se encuentran dispersas.

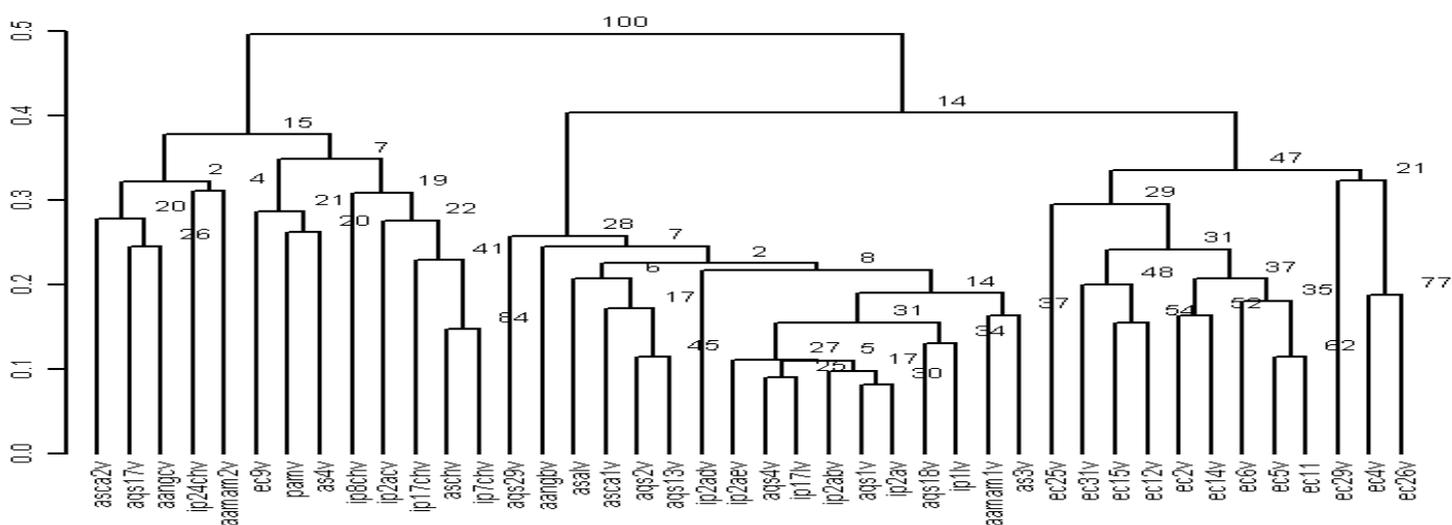


Fig. 24. Dendrograma generado para AFLP, bajo la condición *in vitro*, que incluye las tres regiones: Ipiña (ip), Aquiles Serdán (aqs), El Cuervo (ec) y las muestras de referencia. Los valores de bootstrap se encuentran en cada nodo y la escala corresponde a GD_{SM} .

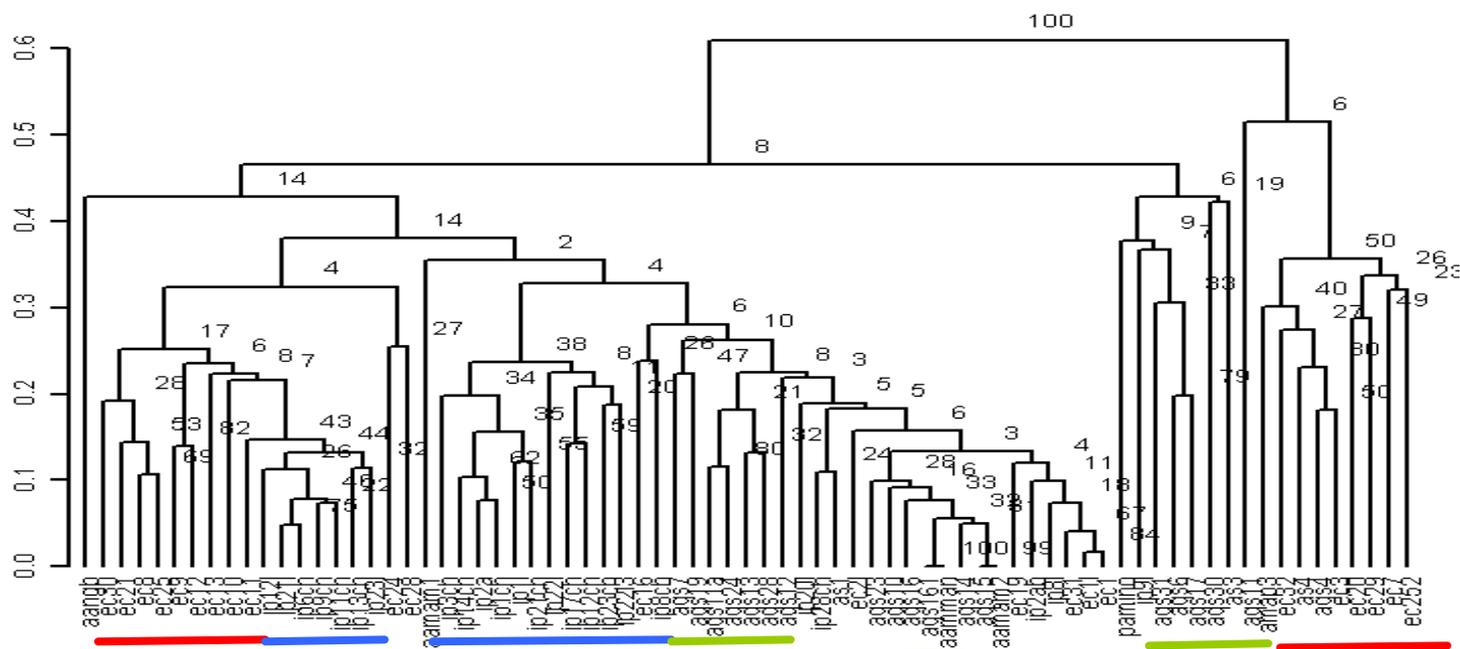


Fig. 25. Dendrograma generado para AFLP, bajo la condición hoja, que incluye las tres regiones: Ipiña (ip, Aquiles Serdán (aqs), El Cuervo (ec) y las muestras de referencia. Los valores de bootstrap se encuentran en cada nodo y la escala corresponde a GD_{SM} .

De manera general, los dendrogramas generados por RAPD y AFLP (Fig. 22 y 24) bajo la condición *in vitro*, presentan similitudes en el agrupamiento por región geográfica para El Cuervo e Ipiña principalmente; y además en presentar a las muestras de referencia dispersas entre los grupos. En RAPD, se pudo obtener un grupo de Aquiles Serdán, pero no con AFLP.

Para los dendrogramas generados por cada método para la condición de hoja (Fig. 23 y 25), se tiene la característica que en ambos, El Cuervo forma dos grupos que se encuentran en los extremos del dendrograma. Pero en RAPD, Ipiña solo forma un grupo bien definido sin individuos dispersos, y en AFLP, esta misma población forma dos grupos con algunos individuos dispersos entre los grupos.

Ya que los dendrogramas fueron construidos tomando como base la matriz disimilaridad GD_{SM} , las similitudes y diferencias de las topologías se deben al tipo de información que se encuentra contenida en cada matriz GD_{SM} .

5.6.3.- Análisis molecular de varianza.

Los análisis de AMOVA se realizaron utilizando la matriz GD_{SM} , para cada sistema de marcador (RAPD y AFLP), bajo cada condición (*in vitro* y hoja).

Se evaluó una estructura formada por un grupo: formado por las tres poblaciones de *A. salmiana*: Ipiña, Aquiles Serdán y El Cuervo.

Tabla 7. Porcentajes de variación encontrados en cada nivel jerárquico, para cada marcador en cada condición.

Fuente de variación	AFLP (iv)	AFLP (hoja)	RAPD (iv)	RAPD (hoja)
Entre poblaciones	25.93	12.31	19.24	5.03
Dentro de poblaciones (individuos)	74.07	87.69	80.76	94.97

El AMOVA indicó que para la condición *in vitro*, en RAPD y AFLP el 80.76 y 74.07% respectivamente, del total de la variación se debe a la variación dentro de cada población, es decir, se debe a la variación entre los individuos dentro de las poblaciones; y el resto de la variación se encuentra entre las poblaciones.

Para la condición de hoja, el 94.97 y el 87.69% de la variación encontrada por RAPD y AFLP respectivamente, se debe a la variación entre individuos dentro de las poblaciones; y el resto de la variación se encuentra entre las poblaciones.

La segunda estructura evaluada fue formada por dos grupos: el primero contenía las tres poblaciones de *A. salmiana* en la condición *in vitro* y el segundo contenía las tres poblaciones de *A. salmiana* en la condición hoja. Para esta estructura, Arlequín calculó la distancia euclidiana Pairwise difference.

Tabla 8. Porcentajes de variación encontrados en cada nivel jerárquico, para cada marcador.

Fuente de variación	AFLP (iv-hoja)	RAPD (iv-hoja)
Entre grupos	-0.64	-5.02
Entre Poblaciones/ dentro de Grupos	16.44	10.53
Dentro de poblaciones (individuos)	84.20	94.48

Este AMOVA reveló que en ambos sistemas de marcadores RAPD y AFLP, la mayor parte de la variación encontrada (92.48 y 84.20% respectivamente), se debe a la variación entre los individuos dentro de la poblaciones de cada condición. El restante se debe a la variación entre poblaciones y prácticamente no hay variación entre los grupos, puesto que ambos grupos son de *A. salmiana*.

5.6.4.- Prueba de Mantel: comparación de marcadores moleculares

Con el fin de evaluar la relación entre las matrices disimilaridad GD_{SM} , obtenidas con RAPD y AFLP, el coeficiente de correlación (r) de la prueba de Mantel fue estimado para cada población. De esta manera sabremos si es equivalente el uso de RAPD o AFLP.

Tabla 9. Coeficientes de correlación entre marcadores para cada condición. Para Aquiles Serdán no se pudo obtener matriz disimilaridad de hoja. P es el estimado de la probabilidad.

	AFLP-RAPD (IN VITRO)	AFLP-RAPD(HOJA)
Aquiles Serdán	0.632717 <i>P(0.004)</i>	NA
El Cuervo	-0.130030 <i>P(0.791)</i>	0.014612 <i>P(0.36)</i>
Ipiña	-0.172224 <i>P(0.943)</i>	0.144444 <i>P(0.171)</i>

Los coeficientes entre RAPD y AFLP, obtenidos bajo la condición *in vitro*, muestran valores que son significativamente bajos (-0.17 a -0.13) excepto en la población de Aquiles Serdán que muestra una correlación significativa de 0.63. Para la condición de hoja no existe una correlación significativa entre RAPD y AFLP (0.01 a 0.14), en El Cuervo e Ipiña.

Esto sugiere que no son métodos equivalentes al menos para las poblaciones El Cuervo e Ipiña. El dato de Aquiles Serdán debe tomarse con cautela por la condición de enfermedad mencionada anteriormente.

6.0. Discusión de resultados.

6.1. Cultivo de tejidos.

Las técnicas de cultivo de tejidos o micropropagación, permiten la multiplicación rápida de plantas libres de enfermedades a partir de un tejido sano; en un ambiente controlado e independiente de las condiciones ambientales, además que el meristemo es el tejido elegido para la creación de los bancos de germoplasma porque mantiene la estabilidad genética (Morel y Martin, 1952; Pierik, 1990a; Rout y col., 1997; Abdelnour, 1999; Polanco y Ruiz, 2002), y las plantas obtenidas por micropropagación conservan las características de la planta madre (clonas).

Es así, que en condiciones controladas se puede propagar especies en peligro de extinción. En el presente trabajo se obtuvieron brotes adventicios de *A. salmiana* a partir del meristemo central, en 3 meses de cultivo con reguladores de crecimiento BA (3mg/L) e IAA (0.5mg/L).

En el caso particular de las plantas procedentes de Aquiles Serdán, donde las magueyerías lucían enfermas en el campo, aunque durante el cultivo de tejidos inicial algunos brotes mostraron ciertos problemas de contaminación, finalmente con el uso de fungicidas y bactericidas se obtuvieron brotes en principio, sin contaminación visible.

El obtener plantas libres de otros microorganismos, es un paso muy importante para los análisis, ya que la presencia de un DNA extraño a la planta podría interferir con los estudios de marcadores basados en PCR.

También se pudo constatar que una variable importante en marcadores basados en PCR es la pureza del DNA extraído de plantas *in vitro* y de hoja. El caso que ejemplifica esta situación es el de Aquiles Serdán: al realizar los análisis de RAPD

en DNA de hoja, solo en pocos individuos se obtuvieron productos de amplificación de PCR; mientras que utilizando el DNA extraído de las plantas micropropagadas todos los individuos mostraron un buen número de productos de amplificación.

El DNA extraído de hoja tenía probablemente remanentes del DNA del patógeno debido al estado en que se encontraba la planta madre, es posible que el oligo utilizado no sea eficiente para el DNA de patógenos como el de agave. Otra posibilidad es que se pudo encontrar un compuesto del patógeno que inhibió a la PCR. Lo que demuestra la necesidad de mantener uniformes todas las condiciones de la técnica para obtener una buena reproducibilidad (Jones y col., 1997)

En AFLP no se observó inhibición de PCR en las muestras de hoja de Aquiles Serdán, ya que aquí se utilizan otro tipo de oligos con alta especificidad. Lo que demuestra la alta reproducibilidad de AFLP (Vos y col., 1995; Jones y col., 1997; Mueller y Wolfenbarger, 1999; Savelkoul y col., 1999; Becerra y Paredes, 2000).

6.2. Análisis estadístico.

Matriz de disimilaridad.

Los valores promedios de GD_{SM} encontrados dentro de las poblaciones El Cuervo e Ipiña bajo cada condición, *in vitro* y hoja; en cada marcador, RAPD y AFLP; fueron similares. En las muestras de referencia (I.C.A. y El Huizache) en ambos marcadores, mostraron un valor más alto en la condición de hoja, esto es congruente ya que el grupo no es uniforme y está formado por varias especies: A.

scabra, *A. angustifolia*, *A. americana americana*, *A. americana americana manzo*, “*pamino*”, *A. mapisaga*.

En el caso de Aquiles Serdán, el promedio de GD_{SM} es mayor en la condición de hoja en AFLP. Este valor debe tomarse con cautela ya que es probable que haya restos de DNA del patógeno.

En general, se puede afirmar que los valores promedios de GD_{SM} son mayores en RAPD que en AFLP. Esta diferencia se debe a la cantidad de bandas revelada por cada sistema de marcador siendo AFLP un método más robusto.

Los valores promedios de GD_{SM} dentro de cada población en hoja son elevados al ser comparados con los obtenidos en otras especies de Agave obtenidos por otros métodos de marcadores moleculares (Martínez-Palacios y col., 1999; Gil-Vega y col., 2001; Silva-Montellano y Eguiarte, 2003; Ramírez-Ramírez, 2003; Eguiarte-Frums, 2003; Navarro-Quezada y col., 2003). Lo que sugiere que la diversidad genética podría ser mayor en esta especie.

Análisis filogenético.

Los dendrogramas generados por cada marcador, bajo cada condición; muestran la tendencia a formar grupos de acuerdo a la región geográfica. La evidencia sugiere que, aun cuando las distancias genéticas son altas al interior de cada población, existe un patrón que agrupa los individuos por regiones geográficas.

Análisis molecular de varianza.

El análisis molecular de varianza aplicado a las tres poblaciones de *A. salmiana*: Aquiles Serdán, Ipiña y El Cuervo; reveló que la mayoría de la variabilidad (el 87.69 y el 74.07% en hoja e *in vitro* respectivamente para AFLP; y el 94.97 y el 80.76 % en hoja e *in vitro* respectivamente para RAPD) se encuentra al nivel de

los individuos de cada población. Mientras que la variabilidad restante se encuentra entre las poblaciones.

Por otro lado, al aplicar AMOVA a una estructura que integra la condición *in vitro* con hoja, en cada marcador; se encontró que el 94.48 y el 84.20% de la variación encontrada por RAPD y AFLP respectivamente, se encuentra entre los individuos y el resto se debe a la variabilidad de una población con otra. Mientras que entre no hay variación entre el grupo de plantas micropropagadas y de hoja, puesto que ambos grupos son de *A. salmiana*.

Con estos datos se concluye que la mayor variación genética de las muestras analizadas, se encuentra entre los individuos de cada población.

Prueba de Mantel.

Al comparar los métodos por la prueba de Mantel, se obtuvo un coeficiente de correlación que es significativamente bajo para dos poblaciones, que indica que la información encontrada por ambos sistemas de marcadores es diferente cuando se aplican al mismo tejido. Estos datos concuerdan con lo reportado en estudios anteriores acerca de la diferencia entre RAPD y AFLP (González y col., 1998). Sin embargo, se obtuvo una correlación significativa (0.63) en Aquiles Serdán al comparar AFLP y RAPD en la condición *in vitro*, pero este valor debe tomarse con cautela debido a la posible interferencia del DNA del patógeno presente en esa localidad.

6.3. Origen de la variabilidad genética en *A. salmiana*.

Tomando en cuenta que las muestras provienen de magueyeras silvestres es de esperarse variabilidad genética. Sin embargo, *A. salmiana* es una especie que

posee tanto la reproducción sexual como la asexual (por medio de hijuelos). Pero su reproducción es preferentemente por medio de hijuelos, ya que su reproducción sexual ocurre al final de su vida, aproximadamente a los 20 años de edad (Aguirre-Rivera y col., 2001). En la reproducción asexual, se espera que las plantas hijas sean clones de la madre, puesto que no hay intercambio genético con otro individuo. Lo cual se ha observado en agaves con siembra tecnificada, como en el caso de *A. tequilana* azul, en el cual no se permite que floree la planta. Para explicar la variabilidad genética entre los individuos de *A. salmiana*, es posible que las plantas madre de donde proceden los hijuelos colectados para este trabajo, sean producto de polinizaciones cruzadas anteriores. Lo que podría explicar la variabilidad genética en las muestras analizadas. Sin embargo, pueden postularse otras teorías de esta variabilidad.

Se ha reportado en el henequén (*A. fourcroydes*), una especie con reproducción asexual; la existencia de variabilidad genética entre el hijuelo y la planta madre, esta variabilidad fue detectada por AFLP al comparar los patrones de bandeo de la planta madre con el de sus hijuelos (Infante y col., 2003).

Existen dos posibilidades para explicar este fenómeno según los autores, la primera es que la acumulación de mutaciones somática durante el ciclo vital hace de la planta un mosaico genético, y durante la reproducción asexual estas mutaciones son fijadas y transmitidas a los descendientes. Esto porque existen reportes matemáticos acerca de que una mutación somática en una de las células iniciales en un meristemo apical puede fijarse rápidamente y puede traducirse en diferencias en el nuevo individuo (Infante y col., 2003).

La otra posibilidad es que la variabilidad pueda ser debida a rearrreglos de los cromosomas, que se mueven al azar durante la división celular. Lo que daría lugar a un aumento o disminución de la aneuploidia.

En resumen, los altos niveles de ploidia del henequén harían que a pesar de la acumulación de las mutaciones, su expresión es enmascarada por las demás copias de los genes afectados (Infante y col., 2003).

Por otro lado, una fuente importante de variabilidad genética son los elementos transponibles. En plantas, como el maíz donde se han hecho la mayoría de los estudios sobre elementos transponibles; los cuales equivalen a cerca del 50% del genoma nuclear. Por sus características de transposición y su abundancia, estos elementos pueden alterar la arquitectura del genoma e incluso la expresión genética (Bennetzen, 2000; Fedoroff, 2000).

Estos elementos, que cuentan con secuencias codificantes, muestran una expresión diferencial en tejidos incluso bajo diferentes condiciones, como el estrés biótico (Bennetzen, 2000).

En genomas complejos la variabilidad puede ser debida a los elementos transponibles, mientras que en otros genomas la variabilidad puede deberse a factores intrínsecos o extrínsecos (Bennetzen, 2000).

En *A. tequilana* se han podido aislar secuencias terminales de retrotransposones Ty-copia, que han mostrado ser altamente heterogéneas. El análisis mas detallado de estos elementos podría ser utilizado para la determinación de relaciones filogenéticas en esa especie y con otras especies de Agave (Bousios y col., 2004).

Por lo que existe la posibilidad de que en *A. salmiana*, el origen de la variabilidad genética entre los individuos sea debido a elementos transponibles del tipo retrotransposones LTR, que son los mas abundantes en plantas.

Para que una población natural pueda sobrevivir en un medio ambiente que cambia constantemente, se requiere de variabilidad genética. El género *Agave* se desarrolló en un ambiente árido y dentro de sus características esta el metabolismo CAM, que le permite sobrevivir en ambientes áridos, y su propagación vegetativa (SEMARNAT, 2005). En esta reproducción al no haber otro individuo que aporte una fracción del contenido genético para el nuevo individuo, los elementos transponibles pueden surgir como una fuente de variabilidad genética (Fedoroff, 2000).

Ya que en los tejidos de una misma planta los elementos transponibles difieren en su actividad de transposición, el tejido del cual emerja el hijuelo le confiere su propia variabilidad genética.

Con estos datos planteamos que pueda existir subespecies y/o subgrupos dentro de *A. salmiana*.

Por lo que es necesario una investigación más profunda y mas jerarquizada dentro de *A. salmiana*, y poder concluir si las variedades Chino, Liso, Blanco y Amarillo, son realmente subespecies. El conocer cual es la variante mas abundante y cual es la minoritaria y porque ocurre así, ayudaría a la conservación de la especie en el futuro; dada su importancia tanto en al ámbito ecológico por ser una especie endémica de regiones áridas, como en el ámbito económico de la región por ser la materia prima para la elaboración del tradicional mezcal.

6.4. Comparación de marcadores.

Los marcadores moleculares han sido extremadamente útiles en el estudio de la diversidad genética de diversos organismos. Se puede afirmar tomando en cuenta los valores de bootstrap de los dendrogramas generados en este trabajo que AFLP es más robusto que RAPD (Figs. 22, 23, 24 y 25)

Por otro lado, aunque en este estudio solo se utilizó un oligo para RAPD y una combinación de oligos +3 para AFLP, ambos mostraron la tendencia de agrupar a los individuos por regiones geográficas (Fig. 22, 23, 24 y 25) y también mostraron niveles comparables de variabilidad genética (Tablas 7 y 8).

En RAPD se observaron problemas de reproducibilidad y amplificaron en ciertas muestras por lo que no es la técnica más recomendada a utilizar para una huella genética.

Una ventaja que ofrece en particular AFLP es que el análisis de un número elevado de marcadores (bandas) que estén uniformemente distribuidos en el genoma, permite un análisis estadístico más robusto con una alta probabilidad de que el dendrograma generado sea representativo de la estructura poblacional del organismo bajo estudio, y reduce la varianza de las relaciones genéticas comparado con buscar solo en ciertas regiones del genoma (González y col., 1998; Mohammadi y Prasanna, 2003).

Una limitante de AFLP es que se recomienda un número grande de muestras lo que lo hace muy costoso. Por lo que es necesario balancear la necesidad de buscar en tantas poblaciones como sea posible y la necesidad de obtener las frecuencias de alelos de tantos loci como sea posible con un número de muestras adecuado sin que el costo del análisis elevado (Mohammadi y Prasanna, 2003).

7.0. Conclusiones

1. Los resultados de AMOVA indican diversidad genética en *A. salmiana*. De la cual la mayor parte se encuentra dentro de cada población (aprox. 80%) y el resto se encuentra entre poblaciones (aprox. 20%), sin embargo se puede observar una tendencia a la formación de grupos por región geográfica.
2. Las causas de la variabilidad entre los individuos pueden ser variadas, por ejemplo, que las plantas madre de los hijuelos colectados son producto de una polinización cruzada y/o por la presencia de elementos transponibles activos diferencialmente en tejidos.
3. El contar con diversidad genética es un hecho favorable en términos ecológicos, pues implica un mayor potencial de adaptación en condiciones de estrés biótico o abiótico.
4. Al aplicarse la técnica de AFLP en *A. salmiana* se encontró que posee una mayor robustez que RAPD, basados en los valores de bootstrap.
5. Al compararse los métodos de marcadores moleculares por medio de la prueba de Mantel, el resultado indica que cada marcador revela información diferente en el mismo tejido de un individuo de *A. salmiana*.

6. La comparación de las huellas genéticas de DNA de hoja e *in vitro* en una misma planta, en base a sus respectivas distancias genéticas, indican que no existen diferencias significativas entre las mismas.

7. El contar con un sistema de propagación *in vitro* para *A. salmiana*, abre la posibilidad para el establecimiento de un banco de germoplasma de esta especie.

8.0.- Perspectivas.

- Se plantea continuar con estudios como el presente, aumentando el tamaño de la muestra y efectuando pruebas pareadas *in vitro*-hoja para confirmar si existe diversidad genética entre tejidos de una misma planta, como varios investigadores lo han sugerido.
- Se requieren mas estudios para establecer la presencia de elementos transponibles en *A. salmiana*.

9.0. Referencias.

Abbot P (2003). Individual and population variation in invertebrates revealed by Inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Journal of Insect Science*. **1**: 1–3.

Abdelnour A (1999). Situación actual y perspectivas de las aplicaciones biotecnológicas en la conservación y uso de los recursos filogenéticos. XI Congreso Agronómico Nacional, Conferencia 65. Centro de Investigación en Biotecnología. Instituto Biotecnológico de Costa Rica.

Aguirre-Rivera JR, Charcas-Salazar H y Flores Flores JL (2001). Identidad botánica del maguey mezcalero potosino; en El maguey mezcalero potosino. COPOCYT-IIZD.

Awasthi AK, Nagaraja GM, Naik GV, Kanginakudru S, Thangavelu K y Nagaraju J (2004). Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. *BMC Genet*. **5**:161-172.

Baydar NG, Baydar H y Debener T (2004). Analysis of genetic relationships among *Rosa damascena* plants grown in Turkey by using AFLP and microsatellite markers. *J. Biotechnol*. **111**: 263-267.

Becerra V y Paredes M (2000). Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agric. Téc*. **60**: 270-281.

Becerra V, Paredes M y Romero O (2001). Diversidad bioquímica y molecular en frutillas chilenas (*fragaria chiloensis* l. duch.) y su implicancia en el mejoramiento genético de la especie. *Agric. Téc*. **61**: 413-428.

Bennetzen JL (2000). Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Mol Biol*. **42**:251-69

Besse P, Da Silva D, Bory S, Grisoni M, Le Bellec F y Duval MF (2004). RAPD genetic diversity in cultivated vanilla: *Vanilla planifolia*, and relationships with *V. tahitensis* and *V. pompona*. *Plant Science*. **167**:379-385

Bohn M, Utyz HF y Melchinger A (1999). Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of RFLP, AFLP, and SSR and their use for predicting progeny variance. *Crop Sci.* **39**: 228-237.

Bonnet E y Van De Peer Y (2000). zt: A software tool for simple and partial mantel tests. Department Of Plant Systems Biology. Flanders Interuniversity. Institute for Biotechnology. Belgium.

Botstein D, White RL, Skolnick M y Davis RW (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* **32**: 314-331.

Bousios A, Saldaña I, Valenzuela A y Pearce S. (2004) Aislamiento y caracterización de retrotransposones del grupo Ty1-copia en *Agave tequilana* y su uso como marcadores genéticos moleculares para evaluar diversidad en *Agavaceae*. *IV simposio internacional sobre Agavaceae y Nolinaceae. Los agaves de importancia económica en México. Exposición oral.*

Brettschneider R (1998) RFLP analysis. *En Molecular tools for screening biodiversity: plants and animals.* Karp A, Isaac PG y Ingram DS. Eds 1a ed. Kluwer Academic Publishers. p 83-96.

Capel J, Montero LM y Martinez-Zapatero J (1993). Non random distribution of TE in the nuclear genome of plants. *Nucleic Acids Res.* **21**:2369-2373

Dangi RS, Lagu MD, Choudhary LB, Ranjekar PK y Gupta VS (2004). Assessment of genetic diversity in *Trigonella foenum-graecum* and *Trigonella caerulea* using ISSR and RAPD markers. *BMC Plant Biology.* **4**: 13

Desai M, Tanna A, Wall R, Efstratiou A, George R y Stanley J (1998). Fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of an outbreak of group a streptococcal invasive disease. *J Clin Microbiol.* **36**: 3133–3137

Ditt RF, Nester EW y Comai L (2001). Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *PNAS.* **98**: 10954-10959.

Eguiarte-Frutos LE (2003). Diversidad genética en dos especies mezcaleras. Proyecto CONABIO V038. Instituto de Ecología. UNAM.

Excoffier L, Smouse y Quattro JM (1992). Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics.* **131**: 479-491

Farinho M, Coelho P, Carlier J, Svetleva D, Monteiro A y Leitao J (2004). Mapping of a locus for adult plant resistance to downy mildew in broccoli (*Brassica oleracea* convar. *italica*). *Theor Appl Genet.* **109**:1392-1398.

Federici MT, Vaughan D, Tomooka N, Kaga A, Wang Wang X, Doi K, Francis M, Zorrilla G y Saldain N (2000) Analysis of Uruguayan weedy rice genetic diversity using AFLP molecular markers. *EJB Electronic Journal of Biotechnology* **4**(3).

Fedoroff N (2000). Transposons and genome evolution in plants. *PNAS* **97**: 7002–7007

Felsenstein J (2000) PHYLIP: Phylogeny Inference Package, version 3.6 (alpha). University of Washington, Seattle, USA.

Foolad MR, Arulsekhar S, Becerra V y Bliss FA (1995). A genetic map of Prunus based on an interspecific cross between peach and almond. *Theor. Appl. Genet.* **91**: 262-269.

Friesen TL y Faris JD (2004). Molecular mapping of resistance to Pyrenophora Tritici-Repentis race 5 and sensitivity to Ptr Toxb in wheat. *Theor. Appl. Genet.* **109**: 464-471.

Gil-Vega K, González-Chavira M, Martínez de la Vega O, Simpson J y Vandemark G (2001). Analysis of genetic diversity in Agave tequilana var. Azul using RAPD markers. *Euphytica.* **119**: 335-341

González M, Rodríguez R, Zavala ME, Jacobo JL, Hernández F, Acosta J, Martínez O y Simpson J (1998). "Characterization Of Mexican Isolates Of Colletotrichum Lindemuthianum Using Differential Cultivars And Molecular Markers." *Phytopathology* **88**: 292-299.

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

Jones CJ, Edwards KJ, Castaglione S, Winfield MO, Sala F, van de Wiel C, Bredemeijer G, Vosman B, Matthes M, Daly A, Brettschneider R, Bettini P, Buiatti M, Maestri E, Malcevski A, Marmioli N, Aert R, Volckaert G, Rueda J, Linacero R, Vazquez A y Karp A (1997). Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding*, **3**: 381-390.

Julier B, Flajoulot S, Barre P, Cardinet G, Santoni S, Huguet T y Huyghe C (2003). Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (Medicago sativa) using microsatellite and AFLP markers. *BMC Plant Biol.* **3**(9).

Koch AM, Kuhn G, Fontanillas P, Fumagalli L, Goudet J y Sanders IR (2004). High genetic variability and low local diversity in a population of arbuscular mycorrhizal fungi. *PNAS.* **101**: 2369-2374.

Kokotovic B, Friis NF, Jensen JS y Ahrens P (1999). Amplified-fragment length polymorphism fingerprinting of mycoplasma species. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 3300-3307.

Korzun E (2002). Use of molecular markers in cereal breeding. *Cell Mol Biol Lett.* **7**: 811-20.

Labate JL (2000). Review and interpretation: Software for population genetic analysis of molecular marker data. *Crop Sci.* **40**: 1521-1526

Lionneton E, Ravera S, Sanchez L, Aubert G y Delourme R (2002). Development of an AFLP-based linkage map and localization of QTLs for seed fatty acid content in condiment mustard (*Brassica juncea*). *Genome.* **45**:1203-15

Liu CJ, Chang KW, Chao SY, Kwan PC, Chang SM, Yen RY, Wang CY y Wong YK (2004). The molecular markers for prognostic evaluation of areca-associated buccal squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* **33**:327-34.

Lombard V, Barilb CP, Dubreuilb P, Blouetb F, Zhanga D, Geves A, Du y Magneraud D (2000). Genetic relationships and fingerprinting of rapeseed cultivars by AFLP, consequences for varietal registration. *Crop. Science.* **40**: 1417-1425

Ma R, Yli-Mattila T y Pulli S (2004). Phylogenetic relationships among genotypes of worldwide collection of spring and winter ryes (*Secale cereale* L.) determined by RAPD-PCR markers. *Hereditas* **140**: 210-221

Martínez L, Cavagnaro P, Masuelli R y Rodríguez J (2003). Evaluation of diversity among argentine grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties using morphological data and AFLP markers. *Electronic Journal Of Biotechnology* **6**(3).

Martinez-Palacios A, Eguiarte LE y Furnier G (1999) Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoria-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. *American Journal of Botany* **86**: 1093-1098.

Miller M (1997) Tools for Population Genetic Analyses (TPFGA, version 1.3); Computer Software. Distributed by the autor.

Mohammadi SA y Prasanna BM (2003) Review & interpretation: Analysis of genetic diversity in crop plants—salient statistical tools and considerations. *Crop Science.* **43**:1235-1248.

Morel G y Martin C (1952). Guerison de dahlias atteints d'une maladie a virus. C.r. hebdomadaire de l'Académie des Sciences. *Acad. Sci.* **235**:1324-1325

Mueller UG y Wolfenbarger LL (1999). AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends Ecol Evol.* **14**:389-394.

Navarro-Quezada A, González-Chauvet R, Molina-Freaner F y Eguiarte LE (2003). Genetic differentiation in the *Agave deserti* (Agavaceae) complex of the Sonoran desert. *Heredity.* **90**: 220-227.

Nguyen NT, Reda E, Moghaieb A, Saneoka H y Fujita K (2004). RAPD markers associated with salt tolerance in *Acacia auriculiformis* and *Acacia mangium*. *Plant Science.* **167**: 797-805

O'Neill NR, Van Berkum P, Lin JJ, Kuo J, Ude GN, Kenworthy W y James Saunders A (1997). Application of amplified restriction fragment length polymorphism for genetic characterization of *Colletotrichum* pathogens of alfalfa. *Phytopatholog* **87**: 745-750

Osipova ES, Koveza OV, Troitskii AV, Dolgikh Iul, Shamina ZB y Gostimskii SA (2003). Analysis of specific RAPD- and ISSR-fragments in somaclonal maize (*Zea mays* L.) and development of SCAR markers based on them. *Genetika.* **39**: 1664-72.

Pierik RLM (1990a). Producción de plantas libres de enfermedades. *En: Cultivo in vitro de las plantas superiores.* 3ª ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España pp. 169-179.

Pierik RLM (1990b). Variación Somaclonal. *En: Cultivo in vitro de las plantas superiores.* 3ª ed. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España pp. 227-233.

Polanco C y Ruiz ML (2002). AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants. *Plant Science.* **162**: 817-824.

Poulsen GB (1988). Elimination of contaminating micro-organisms from meristem culture of apple rootstock m26. *Acta Hort.* **225**:193-198

Ramírez-Ramírez MJ (2003). Análisis molecular de la diversidad genética de *Agave tequilana* y especies relacionadas mediante marcadores RAPD y DNAr. Instituto Tecnológico Agropecuario de Jalisco. Tesis de maestría. 32-42

Raymond M y Rousset F (1995). GENEPOP (version 1.2) population genetic software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity.* **86**: 248-249.

Roberts MA y Crawford DL (2000). Use of randomly amplified polymorphic dna as a means of developing genus- and strain-specific *Streptomyces* DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 2555-2564

Rodríguez-Garay BA, Gutiérrez-Mora B y Acosta Dueñas (1996). Somatic embryogenesis of *A. victoria-reginae* Moore. *Plant Cel.Tis. Org. Cult.* **46**:85-87

Rohlf FJ (1993). NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariety analysis system. Version 2.02h. Applied Biostatistical Inc. New York.

Rout GR, Das P, Goel S y Raina SN (1997). Determination of genetic stability of micropropagated plants of ginger using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **39**: 23-27.

Santacruz-Ruvalcaba F, Gutiérrez-Pulido H y Rodríguez-Garay B (1999). Efficient in vitro propagation of *Agave parrasana* Berger. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* **56**: 163-167.

Savelkoul PHM, Aarts HJM, de Haas J, Dijkshoorn L, Duim B, Otsen M, Rademaker JLW, Schouls L y Lenstra JA (1999). Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *Clin Microbiol.* **37**: 3083–3091

Schmidt K y Jensen K (2000). Genetic structure and AFLP variation of remnant populations in the rare plant *Pedicularis palustris* (Scrophulariaceae) and its relation to population size and reproductive components. *American Journal Of Botany* **87**: 678–689.

Schneider S, Kueffer JM, Roessli D y Excoffier L (1997). Arlequin: a Software Package for Population Genetics, vers. 1.0. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva, Geneva.

SEMARNAT (2005). Mezcales y diversidad: Agaves. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.

Silva-Montellano A y Eguiarte L (2003). Geographic Patterns in the reproductive ecology of the *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. II. Genetic variation, differentiation and inbreeding estimates. *Am. J. Bot.* **90**:700-703.

Singla S, Reddy MS, Marmeisse R y Gay G (2004). Genetic variability and taxonomic position of ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* from India. *Microbiol Res.* **159**: 203-210.

Stark-Muller G (1998) Isozymes. *En Molecular tools for screening biodiversity: plants and animals.* Karp A, Isaac PG y Ingram DS. Eds. 1a ed. Kluwer Academic Publishers. p 73-82.

Tonon A, Ruiz M y Otegui M (2002) Utilidad de los marcadores moleculares en el mejoramiento genético de especies forestales. Novenas Jornadas Técnicas Forestales, Eldorado, Misiones, Argentina

Trébaol G, Manceau C, Tirilly Y y Boury S (2001). Assessment of the genetic diversity among strains of *Xanthomonas cynarae* by randomly amplified polymorphic DNA analysis and development of specific characterized amplified

regions for the rapid identification of *X. cynarae*. *Appl Environ Microbiol.* **67**: 3379–3384

Ude GN, Kenworthy WJ, Costa JM y Cregan PB (2003). Genetic diversity of soybean cultivars from China, Japan, North America and North America ancestral lines determined by AFLP. *Crop Sci.* **43**:1854-1867

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Rijans M, Van der Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M y Zabeau M (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* **23**: 4407–4414

Williams JGK, Kubelik A R, Livak KJ, Rafalski JA y Tingey SV (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6531-6535.

APENDICE I. Lista de oligonucleótidos utilizados para RAPD.

E03	5'-CCA GAT GCA C-3'	2,998.0	RAPD	Operon Technologies
E04	5'-GTG ACA TGC C-3'	3,029.0	RAPD	Operon Technologies
E05	5'-TCA GCG AAG T-3'	3,009.0	RAPD	Operon Technologies
E06	5'-GAG ACC CCG T-3'	2,988.0	RAPD	Operon Technologies
E07	5'-ACA GGG ATG G-3'	3,068.0	RAPD	Operon Technologies
E08	5'-TAG CAC CGA T-3'	2,989.0	RAPD	Operon Technologies
E09	5'-TCT GAG CTG A-3'	3,049.0	RAPD	Operon Technologies
E10	5'-TAC CAG ATG A-3'	3,048.0	RAPD	Operon Technologies
E11	5'-AGG GAG CGA A-3'	3,047.0	RAPD	Operon Technologies
E12	5'-GAG GAT TCG T-3'	3,029.0	RAPD	Operon Technologies
E13	5'-AGC GAA CAG T-3'	3,049.0	RAPD	Operon Technologies
E14	5'-GAA GAG TAG G-3'	3,068.0	RAPD	Operon Technologies
E15	5'-GTC GAT ATC C-3'	3,049.0	RAPD	Operon Technologies
B01	5'-GGT AAG CTC G-3'	3,009.0	RAPD	Operon Technologies
B02	5'-TGA ACA CTC G-3'	3,049.0	RAPD	Operon Technologies
B03	5'-GAG GCA CTC G-3'	3,009.0	RAPD	Operon Technologies
B04	5'-GCA ATG TAG T-3'	3,049.0	RAPD	Operon Technologies
B05	5'-TGA AGC TTC G-3'	3,066.0	RAPD	Operon Technologies
B06	5'-TGC TCT GCC C-3'	2,956.0	RAPD	Operon Technologies
B07	5'-GGT GAC GCA G-3'	3,094.0	RAPD	Operon Technologies
B08	5'-GTC CAC ACG G-3'	3,014.0	RAPD	Operon Technologies
B09	5'-TGG GGG ACT C-3'	3,085.0	RAPD	Operon Technologies
B10	5'-CTG CTG GGA C-3'	3,045.0	RAPD	Operon Technologies
E01	5'-CCC AAG GTC C-3'	2,974.0	RAPD	Operon Technologies
E02	5'-GTC GCG GCA A-3'	3,134.0	RAPD	Operon Technologies

APENDICE II. Alineación de adaptadores doble cadena para AFLP.

Nombre	Secuencia	Peso molecular (g/mol) / Long.	Referencia	mL para 100 pmol/mL
ECO RI-B	5'-AAT TGG TAC GCA GTC-3'	4592 / 15 mer.	Manual de CINVESTAV	167
ECO RI-A	5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3'	5146 / 17 mer.	Manual de CINVESTAV	212
MSE I - A	5'-GAC GAT GAG TCC TGA-3'	4946 / 16 mer.	Manual de CINVESTAV	132
MSE I - B	5'-TAC TCA GCA CTC AT- 3'	4223 / 14 mer.	Manual de CINVESTAV	481

MSE I- A cantidad: 65 µg longitud: 16 bases

MSE I- B cantidad: 203 µg longitud: 14 bases

ECO RI- A cantidad: 109 µg longitud: 17 bases

ECO RI- B cantidad: 77 µg longitud: 15 bases

Agregar 100 µL de TE estéril en campana, a cada tubo, la concentración resultante en ng / µL es:

MSE I- A : 650 ng / µL

MSE I- B : 2030 ng / µL

ECO RI- A: 1090 ng / µL

ECO RI- B: 770 ng / µL

El peso molecular de las 4 bases del DNA es: 650 pg / mol.

Multiplicar el peso promedio de las cuatro bases por la mitad de la longitud de cada oligo (obtener peso molecular):

$$\text{MSE I-A: } 650 \text{ pg / pmol} \times 8 = 5200 \text{ pg / pmol}$$

$$\text{MSE I-B: } 650 \text{ pg / pmol} \times 7 = 7550 \text{ pg / pmol}$$

$$\text{ECO RI- A: } 650 \text{ pg / pmol} \times 8.5 = 5525 \text{ pg / pmol}$$

$$\text{ECO RI- B: } 650 \text{ pg / pmol} \times 7.5 = 4875 \text{ pg / pmol}$$

Preparar 100 μL del adaptador a 50 pmol / μL :

$$50 \text{ pmol / } \mu\text{L} \times 100 \mu\text{L} = 5000 \text{ pmol}$$

Entonces:

$$\text{MSE I- A: } 5200 \text{ pg / pmol} \times 5000 \text{ pmol} = 26\,000\,000 \text{ pg}$$

$$\text{MSE I- B: } 7550 \text{ pg / pmol} \times 5000 \text{ pmol} = 37\,750\,000 \text{ pg}$$

$$\text{ECO RI- A: } 5525 \text{ pg / pmol} \times 5000 \text{ pmol} = 27\,625\,000 \text{ pg}$$

$$\text{ECO RI- B: } 4875 \text{ pg / pmol} \times 5000 \text{ pmol} = 24\,375\,000 \text{ pg}$$

Convertir a ng:

$$\text{MSE I- A: } 26\,000 \text{ ng}$$

$$\text{MSE I- B: } 37\,375 \text{ ng}$$

$$\text{ECO RI- A: } 27\,625 \text{ ng}$$

$$\text{ECO RI- B: } 24\,375 \text{ ng}$$

Calcular volumen a tomar del oligo:

$$\text{MSE I- A: } 26\,000 \text{ ng} / 650 \text{ ng}/\mu\text{L} = 40 \mu\text{L}$$

$$\text{MSE I- B: } 37\,375 \text{ ng} / 2030 \text{ ng}/\mu\text{L} = 18.41 \mu\text{L}$$

$$\text{ECO RI- A: } 27\,625 \text{ ng} / 1090 \text{ ng}/\mu\text{L} = 25.34 \mu\text{L}$$

$$\text{ECO RI- B: } 24\,375 \text{ ng} / 770 \text{ ng}/\mu\text{L} = 31.65 \mu\text{L}$$

Adaptador MSE I.

Nombre	Cantidad (mL)
Oligo MSE 1- A	40
Oligo MSE 1- B	18.41
Buffer H10X	10
H ₂ O milli Q estéril	41.58
Volumen total	100

Adaptador ECO RI

Nombre	Cantidad (mL)
Oligo ECO RI- A	25.34
Oligo ECO RI- B	31.65
Buffer H10X	10
H ₂ O milli Q estéril	33.01
Volumen total	100

Colocar los tubos bajo las siguientes temperaturas:

Temperatura	Tiempo
65 ° C	10 min
56 ° C	60 min
Temperatura ambiente	15 min
Almacenar a – 20 ° C	

Buffer H10X

- Tris HCl 0.5 M
- MgCl₂ 0.1 M
- Espermidina 10 mM
- DTT 0.05 M

APENDICE III. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

1.- Preparar stock de poliacrilamida 30% (19:1).

Acilamida	28.5 g
Bis- acilamida	1.5 g
Aforar a 100 mL con H ₂ O	

2.- Pesar 2 g de Resina y añadirselos al stock de poliacrilamida 30 %.

3.- Dejar 35 min en agitación

4.- Filtrar el stock en aparato de filtración con papel Millipore No. 22 µm

5.- Guardar a 4° C.

6.- Preparación de solución de poliacrilamida al 6% (150 mL) en condiciones desnaturalizantes (urea 8 M)

- Pesar 72 g de urea.
- Disolverlos en 55 mL de agua a 50° C.
- Pesar 3 g de resina y agregárselos a la urea una vez que ya esté disuelta.
- Dejar 35 min en agitación a temperatura ambiente.
- Filtrar en aparato de filtración.
- Agregar 15 mL de Buffer TBE 10 X
- Agregar 30 mL del stock poliacrilamida 30 % (19:1)
- Desgasificar con la bomba de vacío. Evitar mover bruscamente la solución.

NOTA: No dejar que la urea se precipite, para impedirlo hay que calentar.

Placas de la cámara.

1.- Limpiar cada placa 6 veces con windex, Etanol 70 % y al final con agua. Para cada placa cambiarse de guantes.

2.- Preparar solución de Bind Silane.

- 995 µL Etanol 95 %
- 5 µL Ácido acético glacial.
- 3 µL Bind silane

3.- Aplicar toda la solución de Bind Silane al cristal individual.

4.- Aplicar 1 mL de Sigmacote al cristal de la cámara en campana. Cambiarse de guantes al hacer esto.

- 5.- Armar la cámara.
 - Aplicar vaselina por ambos lados a las bandas laterales.
 - Colocar encima el cristal individual.
 - Colocar las pinzas laterales cuidando que los cristales estén al mismo nivel.
 - Insertar entre los cristales solo la punta del peine por la parte superior de la cámara.
 - 6.- Preparar Persulfato de amonio (APS) al 25% en un tubo Eppendorf:
 - 0.25 g APS
 - 1 mL agua
 - 7.- Agregar 150 μ L de APS y 150 μ L de TEMED a la solución de poliacrilamida al 6 %.
 - 8.- Conectar una jeringa al orificio de llenado en la base de la cámara, y vaciar por ahí la solución de poliacrilamida 6 %, lo más rápido posible. Cuando se tire por el peine no dejar que pase más solución e introducir bien el peine.
 - 9.- Esperar a que polimerice por 1 h.
 10. - Montar el gel en la base de la cámara.
 - 11.- Calentar el TBE 1 X a 65° C y poner 800 mL en la base y 1200 mL en el resto de la cámara.
 - 12.- Precorrer el gel a 90 W hasta alcanzar 48° C.
 13. Cargar muestras:
 - Agregar 10 μ L de amortiguador de carga (LB) a cada una.
 - Desnaturalizar a 95° C 5 min en termociclador.
 - Pasar a hielo inmediatamente.
 - Cargar en el gel 6 μ L muestra + LB y 4 μ L de marcador.
- NOTA: Al momento de cargar ir lavando los siguientes 5 pozos con pipeta para evitar que la urea precipite.
14. Correr el gel a 90 W aproximadamente por 2:30 hrs.

APENDICE IV. Tinción con plata.

Basado en el instructivo de Promega Corporation, 2000. Silver sequence, DNA sequencig system. Technical Manual No. 023

En un agitador orbital colocar la placa que contiene al gel, en la solución de fijación (Ácido Acético glacial 10 %) por 20 min. o se puede dejar toda la noche.

- 1.- Realizar 3 enjuagues con agua destilada al gel, cada uno de 2 min.
- 2.- Introducir la placa con el gel, a la solución de teñido y colocar en agitación por 30 min.

Solución de teñido.

- Nitrato de plata 1g/L
- Formaldehído (HCHO) (1.5 mL de 37 % HCHO/Litro) 0.056%

- 3.- Realizar un lavado de 10 seg. con agua destilada e inmediatamente después introducir a la primera parte de la solución de revelado.

Solución de revelado.

Esta solución se utiliza a 10° C y al momento de usar se agrega el formaldehído y el tiosulfato. De esta solución se preparan 2 L y se divide en dos partes para su uso.

- Carbonato de sodio 30 g/L
- Formaldehído (HCHO) (1.5 mL de 37 % HCHO/Litro) 0.056%
- Tiosulfato de sodio 2 mg/L

- 4.- Agitar hasta que aparezcan las primeras bandas.
- 5.- Introducir a la segunda mitad de la solución de revelado por espacio de 2 a 3 min. hasta que aparezcan todas las bandas y entonces detener la reacción agregando 1 L de la solución de fijación.
- 6.- Realizar 2 lavados de 2 min con agua destilada.

