



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**
Coordinación de Estudios de Posgrado

Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

**ANÁLISIS GENÉTICO PARA LA CONSERVACIÓN DE
Agave cupreata TREL. & BERGER (AGAVACEAE).**

TESIS

QUE PRESENTA

Biól. Juan Manuel Gómez Sierra

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Director de Tesis: Dr. Alejandro Martínez Palacios
Co-Director de Tesis: Dr. Cuauhtémoc Sáenz Romero



**INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
AGROPECUARIAS
Y FORESTALES**

Morelia, Michoacán, agosto de 2009.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa institucional de Maestría en Ciencias Biológicas de la UMSNH.

Al programa de becas nacionales para estudios de posgrado CONACYT.

Al Proyecto Conacyt (P47777Z) “Estructura Genética poblacional *de Pinus hatwegii* y *Agave cupreata* en Michoacán, para la implementación de programas de manejo y conservación”.

Al Instituto de Investigaciones Agrícolas y Forestales UMSNH.

AL Dr. ALEJANDRO MARTÍNEZ PALACIOS.

Por darme la oportunidad de realizar y concluir con esta tesis. Por su paciencia y apoyo en la elaboración de esta investigación y por todo apoyo brindado en este ciclo.

A LA COMISION REVISORA

Dr. Miguel Martínez Trujillo, Dr. Cuauhtémoc Sáenz Romero, Mc. Nidia Pérez Nasser, Dr. Nahúm Modesto Sánchez Vargas. Por las sugerencias y correcciones al trabajo, así como sus recomendaciones realizadas.

A MI FAMILIA

A mi madre Eloísa Sierra García y mi padre Ramón Gómez Gasca porque gracias a ellos tengo una familia y una razón de ser.

A mis herman@s Felisa, Claudia, Bertha, Nena, Ale, Maricela, Miguel, Ramón, Juan.

A mi novia Erika.

A mis tías Guillermina, Rita y Blanca.

A mi prima Ana.

DEDICATORIA.

A MIS PADRES

Y HERMAN@S

A MI NOVIA.

A MI TIA GUILLE.

A MIS SOBRIN@S.

A MIS AMIG@S.

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| Índice General | i |
| Índice de Cuadros | ii |
| Índice de Figuras | ii |
| I. Resumen general | 1 |
| II. Summary | 2 |
| III. Introducción general | 3 |
| IV. Planteamiento de hipótesis | 13 |
| V. Objetivos | 14 |
| VI. Resultados | 15 |
| <i>Resumen</i> | 15 |
| <i>Abstract</i> | 16 |
| <i>Introducción</i> | 17 |
| <i>Materiales y Métodos</i> | 18 |
| Ubicación de las poblaciones | 18 |
| Colecta de poblaciones estudiadas | 18 |
| Electroforesis | 18 |
| Análisis estadístico | 19 |
| <i>Resultados</i> | 20 |
| <i>Discusión</i> | 23 |
| <i>Conclusiones</i> | 25 |
| <i>Lineamientos para un programa de manejo y conservación de</i> | |
| <i>A. cupreata.</i> | 26 |
| <i>Literatura citada</i> | 29 |
| VII. Perspectivas y/o recomendaciones | 32 |
| VIII. Bibliografía complementaria | 34 |
| IX. Anexos | 38 |

INDICE DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Características geográfica de las poblaciones colectadas de <i>A. cupreata</i> en los estados de Michoacán y Guerrero. | 19 |
| Cuadro 2. Diversidad genética de las poblaciones de <i>A. cupreata</i> analizadas en los estados de Michoacán y Guerrero. | 21 |
| Cuadro 3. F de Wright en poblaciones de <i>A. cupreata</i> colectadas en los estados de Michoacán y Guerrero. | 21 |
| Cuadro 4. Distancias genéticas y geográficas. | 23 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Distribución del género <i>Agave</i> . | 8 |
| Figura 2. Planta silvestre, hoja y flor de <i>Agave cupreata</i> . | 12 |
| Figura 3. Relación de similitud entre las poblaciones de <i>A. cupreata</i> . | 22 |

I. RESUMEN GENERAL.

Agave cupreata (maguey chino o papalote), es una planta solitaria, se distribuye principalmente en bosques de pino-encino, en altitudes que varían de 1220 a 1850 msnm en la depresión del Balsas de los estados de Guerrero y Michoacán, en los municipios de Tzitzio, Villa Madero, Morelia, Jungapeo, Turicato y Charo en Michoacán., y en Xochipala, Tixtla, Atlixac, Chilapa de Alvarez entre otros en Guerrero (Gentry 1982, Martínez-Palacios comun. pers). Las comunidades marginadas asentadas en las áreas de distribución de la planta, por décadas e incluso centurias han sobre-colectado plantas silvestres potencialmente adultas para la elaboración de mezcal artesanal. Esta acción de sobre explotación de plantas en combinación con el hecho de que la planta no registra propagación vegetativa, paulatinamente ha evitado el reclutamiento de plantas por semillas, lo cual ha puesto en grave riesgo de extinción a las poblaciones, particularmente las distribuidas en el estado de Michoacán.

La disminución alarmante de las poblaciones, derivada del continuo saqueo de plantas, muestra la necesidad de conocer la estructura genética de las poblaciones para poder generar alternativas para su conservación. Por lo anterior, la aplicación de estudios en genética de poblaciones, a través de marcadores isoenzimáticos de 12 poblaciones o sitios de colecta, representativos de su distribución natural, permitió determinar altos niveles de variación genética ($H_e = 0.467$, $P = 92.6$). La diferenciación entre poblaciones fue baja ($F_{ST} = 0.042$), existe exceso de heterócigos tanto a nivel de subpoblación como a nivel de población ($F_{IS} = -0.1179$, $F_{IT} = -0.0708$). Por lo anterior no existe evidencia de que la especie esté entrando en un cuello de botella.

Los resultados genéticos registraron alta variación genética en *A. cupreata*, sin embargo, debido a la baja diferenciación entre poblaciones, existe un comportamiento de metapoblación, hecho que permitiría proponer que las poblaciones que contengan una mayor variabilidad genética se incorporen a programas de manejo y conservación.

II. SUMMARY

Agave cupreata (maguey chino or papalote), is solitary plant. It is principally distributed in woodlands of pine-quercus, the height could vary between 1220 and 1850 altitude in the basin of the River Balsas from the states of Guerrero and Michoacán. In Michoacán the *Agave cupreata* is localized in the municipality of Tzitzio, Villa Madero, Morelia, Jungapeo, Turicato and Charo; in other ways, in Guerrero is localized in Xochipala, Tixtla, Atlixac, Chilapa de Alvarez principally (Gentry 1982, Martínez-Palacios comun. pers). These places are harvesting this wild plant for centuries to elaborated artisanal “Mezcal”. These actions of over-exploitation of this plant in combination with no vegetative propagation recorded is the reason of avoiding the increment of new growing plants by seeds, in fact, this has incite to put in a great danger the population of this plant, affecting mainly the Michoacan’s population.

The alarming of population decrease is derived from the continuously extraction of plants, this shows us the needs to know the genetic structure of the population, so we can make alternatives to its conservation. In fact, the application on the studies in genetics of population, through the isozyme marker from 12 collect zone, representative of its nature distribution, allows determinate higher level of genetic variation ($H_e = 0.467$, $P = 92.6$). The difference between populations was lower ($F_{ST} = 0.042$), exist an excess of heterozygos in levels of subpopulation as much as levels of population ($F_{IS} = -0.1179$, $F_{IT} = -0.0708$). For the previously information there is no evidence that the species is not getting in a bottle neck.

The genetic results registered a higher variation in *A. cupreata*, however, due to the lower difference between population, exist a behavior of metapopulation, thing that allows propose that the populations that had a higher genetic variably can be incorporated to manage and conservation program.

III.INTRODUCCIÓN GENERAL.

Diversidad biológica.

La Diversidad Biológica es en general parte de la variabilidad de la vida, la variación presente en todas las especies, su material genético y los ecosistemas en los cuales esto ocurre, así como la diversidad entre las especies y dentro de cada especie, abarcando tres niveles de expresión: ecosistemas, especies y genes (Ramanatha y Hodgkin 2002). La diversidad genética es el resultado de las diferencias que existen entre las distintas versiones de las unidades de herencia de los individuos de una especie. Las diferencias heredables constituyen la materia prima sobre la que actúan las fuerzas evolutivas y moldean a los seres vivos. Por tanto, una de las razones más importantes para conservar la diversidad genética, es el mantenimiento del potencial evolutivo de las especies (Cordero y Morales 1998). Entre las causas que hacen de México un país de gran diversidad biológica está la topografía, la variedad de climas y una compleja historia geológica y biológica (Conabio 1998 y 2008).

Flora fanerogámica de México.

México cuenta con una de las floras fanerogámicas más diversas del planeta; las condiciones fisiográficas y climáticas han hecho posible esta amplia variación. Las estimaciones sobre la riqueza florística del país son varias, por ejemplo la propuesta por Rzedowski indica que en el territorio nacional existen 220 familias, 2,410 géneros y unas 22,000 especies, lo cual representa entre el 10 y 12% del total mundial (Toledo y Ordóñez 1993, Rzedowski 1998). Estimaciones más recientes indican que estos valores son superados (Toledo 1994, Villaseñor 2004).

Conservación biológica y la problemática de la conservación.

La conservación Biológica es la aplicación de la ciencia a los problemas de conservación aunados a la biología de las especies, comunidades y ecosistemas que son perturbados. El propósito de ésta es mantener la vida silvestre asumiendo los procesos evolutivos y ecológicos (Soulé 1985). La acelerada pérdida de la diversidad biológica del planeta a consecuencia directa e indirecta de las acciones antropogénicas, tales como: colonización progresiva, la

expansión de la agricultura, así como el desarrollo de la ganadería, la explotación forestal y en buena parte también por la minería, han ocasionado un desequilibrio en los ecosistemas, de los cuales, un gran número de especies se han extinto, mientras que muchas otras se están reduciendo a pequeñas poblaciones (Frankham *et al.* 2002).

Las razones por las que el hombre ha decidido conservar los recursos naturales son distintas, estas pueden ser por motivos ecológicos, económicos, éticos y genéticos (Eguiarte y Piñero 1990).

Para la conservación de las especies en cualquier país es necesario conocer qué es lo que se tiene en términos de número de especies, cantidad de individuos y en dónde se encuentran espacialmente. Estos tres componentes en conjunto proveen información acerca de cuáles son las especies que deben ser conservadas (Golubov *et al.* 2007).

Genética de poblaciones.

La genética de poblaciones es la base teórica de programas de conservación biológica enfocada a la preservación de la diversidad y esta permite comprender procesos evolutivos a partir del comportamiento de los genes en las poblaciones; analiza la distribución de la variación genética dentro y entre las poblaciones y estudia los procesos por medio de los cuales se da la evolución en las poblaciones silvestres. Es de fundamental importancia para entender cómo están evolucionando, adaptándose y coexistiendo, así como para proponer estrategias de manejo y conservación (Hartl y Clark 1989 y 1997, Hedrick 2005).

Genética de la conservación.

Durante miles de años el hombre ha tenido un papel central en los procesos ecológicos de la tierra, pero es en los últimos años que ciertos grupos han tomado conciencia de que esto es un problema. El modificar, seleccionar y cambiar los diferentes procesos, ha ocasionado la desaparición o reducción de los procesos ecológicos y evolutivos, perjudicando a las especies y los procesos que intervienen para la generación de nuevas especies así como la extinción de otras. La genética de la conservación surgió cuando fue evidente que existían varios problemas genéticos asociados a diferentes especies principalmente en peligro de extinción (Eguiarte y Piñero, 1990; Eguiarte *et al.* 2007). La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUNC, *International Union for Conservation of Nature and Nature Resources*)

reconoce la necesidad de conservar la diversidad genética como uno de los niveles fundamentales de la biodiversidad (Frankham *et al.* 2002). La conservación biológica intenta mantener un equilibrio en poblaciones y especies amenazadas, en peligro de extinción y/o de interés económico (Frankham *et al.* 2002), además de que el conocimiento genético de las poblaciones permite generar alternativas para su conservación (Eguiarte *et al.* 1999).

Conservación vegetal en México.

Estimaciones de la vegetación potencial de México indican que el 52% del país estaba cubierto con bosques y selvas (Rzedowski y Reyna-Trujillo 1990). En el Inventario Forestal Nacional-2000 se calculó que actualmente los bosques y las selvas cubren 33% del territorio nacional (Ricker *et al.* 2007). Esto significa que México ha perdido más de la tercera parte de sus bosques y selvas. Actualmente se ha identificado que se requiere de mayores acciones de protección para las selvas húmedas y los bosques mesófilos, dado que han sido drásticamente reducidas y sólo hay remanentes de su cobertura original (Conabio *et al.* 2007).

El establecimiento de un sistema nacional de Áreas Nacionales Protegidas (ANP) ha sido la principal estrategia para promover la conservación y uso sustentable de los ecosistemas. La superficie protegida bajo alguna categoría de ANP, en los órdenes federal, estatal y municipal es del 12% del territorio mexicano, además de 20.85% del mar territorial, 11.04% de la plataforma continental y 1.38% de la zona económica exclusiva. Existen 158 ANP de carácter federal, además de las estatales y municipales; también las hay de carácter privado (Conabio 2000)

En los planes de conservación y manejo que por ley deben tener las ANP, cumplen puntualmente con los lineamientos establecidos en la estrategia nacional sobre la biodiversidad (ENB), los cuales son: protección y conservación, valoración de la biodiversidad, conocimiento y manejo de la información, así como la diversificación del uso. Sólo 37 tienen asociado un programa de conservación y manejo. Es importante señalar que 95% de la superficie decretada como ANP, en cualquiera de sus categorías, es propiedad de ejidos, comunidades o pequeños propietarios, mientras que sólo 5% es propiedad de la Nación (Conabio 2000). Por otra parte, los jardines botánicos desempeñan un papel muy importante para la conservación *ex situ* de la diversidad vegetal. En conjunto, todos los jardines botánicos

de México mantienen en sus colecciones vivas ejemplares representantes de más de 5 000 especies de la flora de México (Conabio 2008).

La familia Agavaceae.

México es un país afortunado en diversidad de agaves; es el país donde se encuentra el mayor número de especies. La familia Agavaceae es un grupo de plantas que se distribuyen en ambientes áridos y semiáridos de gran importancia económica, ecológica y cultural. Estas constituyen un grupo clave por su abundancia como por los recursos que otorgan a los ecosistemas; cuenta con biología reproductivas contrastantes, algunas de sus especies son iterópadas (policárpicas, sus individuos pueden reproducirse cada año), mientras que las otras son semélparas (monocárpicas, produciendo una gran inflorescencia solo una vez en su vida y posteriormente mueren). Los agaves presentan una notable diversidad de morfologías florales y de polinizadores, que van desde abejas a murciélagos, y de colibríes a polillas. La familia es nativa de América, registra un total de 293 especies; en México se reportan 217, de las cuales más del 50% son endémicas. La familia está representada por nueve géneros, de estos todos están representados en México: el género *Agave* registra 125 especies (75%), para *Beschorneria* 7 (100%), *Furcraea* 11 (55%), *Hesperaloe* 5 (100%), *Manfreda* 27 (96%), *Polianthes* 13 (100%), *Prochnyanthes* 1 (100%), *Hesperoyucca* 1 (100%) y *Yucca* 29 (59%). Por lo anterior, se ha llegado a considerar que México es centro de origen, el de mayor riqueza y diversidad del grupo. (Eguiarte *et al.* 2000, García-Mendoza 2002, Eguiarte y Souza 2007).

La familia se distribuye de manera natural en el Continente Americano, desde el sur de Canadá en Alberta y Dakota del Norte en los Estados Unidos, pasando por México y Centroamérica, se extiende hacia el sur hasta Venezuela y las Guyanas y de ahí por los Andes hasta Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Paraguay. Crece también en todas las islas del Caribe, desde Cuba y las Bahamas hasta Curazao y Aruba frente a las costas de Venezuela. En México se halla en todos los tipos de vegetación (García-Mendoza 1992).

Los agaves son una familia de plantas perennes, generalmente con vástagos presentes, en ocasiones bulbíferas a nivel de la inflorescencia, raíces fibrosas con desarrollo radical poco profundo, acaules o con tallos cortos y gruesos, simples o ramificados; hojas grandes, dispuestas en roseta, con frecuencia suculentas y ápice con espina terminal; semillas planas, negras (Rzedowski y Rzedowski 2001).

La reproducción de los agaves puede ser sexual y/o asexual. La sexual es derivada de semillas, la obtención de semillas se logra mediante la polinización cruzada efectuada por animales, principalmente murciélagos nectarívoros y en menor grado, insectos diurnos y nocturnos (palomillas, abejas, abejorros) y aves (colibríes, aves percheras), la asexual o crecimiento vegetativo, involucra brotes o clones (García-Mendoza 2007).

Los agaves son plantas xerófilas, adaptadas a vivir en condiciones climáticas desfavorables, con largos períodos de sequías y altas temperaturas. Las especializaciones morfológicas a las condiciones adversas consisten en modificaciones en la estructura básica de las plantas como respuesta a las presiones ambientales: el desarrollo de succulencia en las hojas les permite almacenar agua para la época de sequía. El sistema de raíz en los agaves es superficial, lo cual facilita la absorción de agua; su forma de roseta permite concentrar el agua a la base y de esa forma las raíces la absorben. Estas modificaciones permiten mantener agua y carbohidratos durante sequías prolongadas (García-Mendoza 2007). Tienen un metabolismo tipo MAC (metabolismo ácido de las crasuláceas) (Granados 1993).

El número cromosómico básico de los agaves es 30 ($2n: 60$) con 5 cromosomas largos y 25 cortos, existiendo especies diploides, tetraploides y hasta octaploides. El número de cromosomas tan grande favorece la frecuencia de mutaciones puntuales y cromosómicas estructurales en su genoma, características que podrían estar asociadas con una gran especialización morfológica y ecológica (Palomino *et al.* 2007, García-Mendoza 2007).

El género *Agave*

Todas las especies del género *Agave* son semélparas (monocárpicas), generan inflorescencias gigantes con gran cantidad de flores que a su vez producen mucho néctar y polen, esfuerzo que les permite producir una gran cantidad de semillas de alta calidad. (Eguiarte *et al.* 2000, Eguiarte y Souza 2007). Este género es el más grande de la familia, cuenta con 200 especies, 150 se encuentran en México y representan 75% de la diversidad total de las especies, de ellas, 104 son endémicas y 84 micro-endémicas (García-Mendoza 2002).

El género *Agave* lo constituyen dos subgéneros, *Agave* y *Littaea*; la diferencia entre ambos es el tipo de inflorescencia. *Littaea* presenta inflorescencia espigada y flores en pares, mientras que en *Agave* las inflorescencias son paniculadas y las flores se presentan en grandes agregados umbelados sobre pedúnculos laterales (Gentry 1982, Eguiarte *et al.* 2000).

Los agaves del subgénero *Agave* son polinizados por murciélagos *Leptonycteris curasoae*, *L. nivalis*, *Choeronycteris mexicana* y *Glossophaga sp.*, mientras que los del subgénero *Littae* son polinizados por insectos (García-Mendoza 2007).

Dentro de las plantas suculentas en roseta del género *Agave*, numerosas especies presentan ambos mecanismos de propagación, reproducción sexual o clonación, los cuales incluyen bulbos aéreos producido en los escapos florales, brotes laterales producidos en las axilas de las hojas, brotes basales producidos en la parte baja de la roseta o brotes rizomatosos que emergen a cierta distancia de la planta madre (Arizaga y Ezcurra 1995 y 2002). El género se distribuye desde el sur de los Estados Unidos en la Florida hasta el norte de Colombia y Venezuela, incluyendo las islas del Caribe, desde las Bahamas a Aruba, Curazao y Trinidad y Tobago. Los países con el mayor número de taxones son México, Estados Unidos, Cuba y Guatemala (Fig. 1).

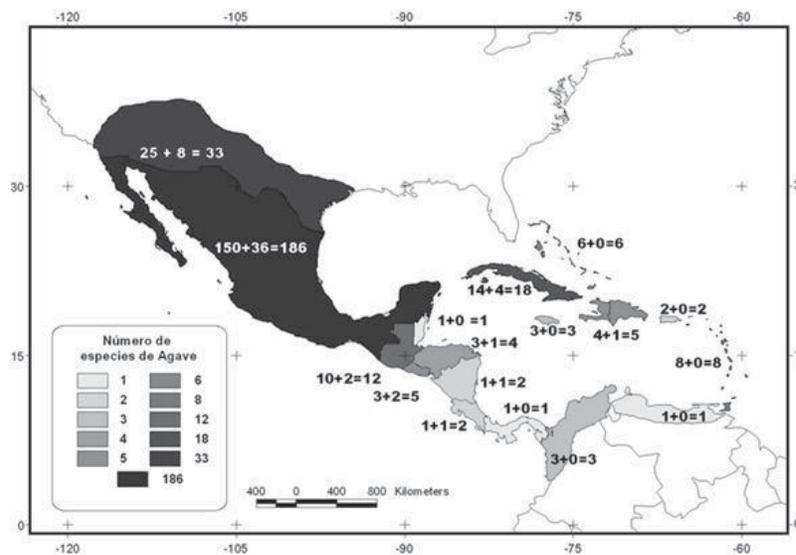


Figura 1. Distribución del género *Agave*. Las cantidades indican número de especies + número de categorías intraespecíficas (Tomada de García-Mendoza 2002).

En México, el género tiene una amplia distribución muy asimétrica, son más diversos en las provincias áridas y semiáridas del centro y norte, habitando prácticamente en todo el territorio nacional, en altitudes que van desde el nivel del mar (*A. angustifolia*) hasta por encima de los 3400 msnm (*A. inaequidens*). El área de mayor diversidad se encuentra en el valle de Tehuacán-Cuicatlán con 15 spp seguido por la Barranca de Metztitlán con 11 especies. (García-Mendoza 1992 y 2007, Rocha-Munive *et al.* 2006).

Esta riqueza en especies endémicas del género *Agave* en México se debe principalmente a los hábitats tan heterogéneos que presenta el país, los cuales difieren en clima, geología, suelos, topografía, altitud; así como a las propiedades intrínsecas de cada taxón tales como la plasticidad genética, la tolerancia ecológica, la capacidad de dispersión, la germinación de sus semillas, las interacciones bióticas con otros organismos incluidos los polinizadores, los cuales han influenciado la distribución actual de las especies (García-Mendoza 2002 y 2007).

Historia y usos de los agaves en México.

Mesoamérica es una de las áreas más importantes del origen y la diversidad de las plantas cultivadas del mundo, principal centro agrícola de las Américas. La coexistencia del hombre mesoamericano y los agaves prevalecen desde hace 10,000-8,000 años a.C. Antes del desarrollo de la agricultura, los agaves o magueyes representaban una fuente básica de alimentación para las poblaciones humanas recolectores de las zonas áridas del norte del Istmo de Tehuantepec y hasta el río Gila en Arizona, antes de que el cultivo del maíz se estableciera, como lo atestiguan restos de hojas mascadas y fibras encontradas en cuevas de Coahuila y el Valle de Tehuacán (Gómez-Pompa 1963, Callen 1965, Gentry 1982). Sin embargo, la domesticación de maguey del pulque (*Agave salmiana*) parece haberse iniciado hace unos 3500 años. Durante los años 2000 a 200 a.C., la domesticación permitió el desarrollo de un complejo social aportando comida y fibra (Parson y Darling 2000). El maguey era cultivado por las culturas de Tula, Tulancingo y Teotihuacán, en donde se han encontrado raspadores de piedra utilizados para la extracción de aguamiel. El agave fue la principal fuente de carbohidratos para las poblaciones nativas del occidente de México y del suroeste de Estados Unidos, consumiéndose los tallos, las bases de las hojas y el pedúnculo floral cocido en hornos de piedra (Callen 1965, Hodgson 2001).

La palabra "agave" fue propuesta por Linneo en 1753, que en griego significa admirable y describe una rara apariencia, además de su longevidad y floración. La palabra "maguey" parece ser de origen antillano derivado posiblemente de las palabras *meguey*, *magheih*, *magney* y fue traída por los españoles durante la conquista. Los nahuas conocen a los magueyes con el nombre genérico de *melt*; los otomíes como *dua o doba*, los mixtecos como *yabi* y los purépechas como *tacamba*. Los nahuas utilizaron los magueyes de forma

íntegra, desde la raíz hasta las semillas, recibiendo cada órgano de la planta un nombre. La diosa Mayahuel, diosa del maguey, madre de los 400 señores conejo, dioses de las múltiples formas de la embriaguez, era símbolo del maguey y el aguamiel, que estaba determinado a acontecimientos como la cosecha, ceremonia propiciatorias de la lluvia y entierros (García-Mendoza 1992 y 2007, Aguirre-Rivera *et al.* 2001).

El aprovechamiento de los agaves ha sido de gran importancia para los mexicanos en diferentes épocas y tal como en el pasado la utilización tanto en los pueblos como en las ciudades es inmensa: como alimento las flores de agave se venden en los mercados regionales para consumo humano, los troncos y quites de estos se utilizan como postes y travesaños para construir casas, al igual que las hojas, empleadas en el techado de estas. En el siglo pasado las fibras de agave fueron de gran importancia en México, donde existía el cultivo y producción del ixtle con el cual se elaboraban cuerdas, costales, cepillos, morrales, ayates, etc. (García-Mendoza 1992, Nobel 1998).

Actualmente la producción de fármacos y esteroides son nuevos hallazgos en el uso de la planta, donde a partir de las hojas de agave se pueden obtener sustancias tales como sapogeninas y esteroides, así como la posibilidad de extraer etanol y celulosa (Eichhorn *et al.* 2001, Groghari y Rajani 2006, Thamae *et al.* 2008).

El pulque y los mezcales.

La utilización del agave para la producción de bebidas alcohólicas es una de las fuentes de empleos y divisas más grandes para el país; las bebidas que se extraen de plantas del género *Agave* gozan de fama mundial. La de más tradición en México y consumida desde tiempo prehispánico es el pulque; obtenido de la fermentación del aguamiel; sin embargo, tienen un mayor consumo las bebidas que una vez fermentadas se destilan, como el tequila, el mezcal, el bacanora y el sotol (García-Mendoza 1992, Nobel 1998). Algunas de estas han adquirido una gran importancia en la formación de industrias, principalmente la producción de tequila para el consumo nacional y exportación; el aguamiel y el pulque aunque, a baja escala, se ha continuado incrementando su explotación (Granados 1993).

El Mezcal (*mexcalli*) es un destilado auténtico mexicano, la palabra es de origen náhuatl que significa metl = maguey + ixcalli = cocido, es decir el tallo y bases de las hojas (cabezas) cocidos. Tradicionalmente todos los derivados destilados de agave se llaman

mezcales, dentro de estos se pueden reconocer diferentes tipos dados por las regiones y las especies que se utilizan en su producción (García-Mendoza 1992, Eguiarte y Souza 2007).

Actualmente se elaboran diversos licores de agave (mezcales) los cuales son diferenciados por las especies que utilizan para su elaboración, el proceso de cocimiento, fermentación, destilación y el lugar geográfico de origen. Se han reportado 43 especies de plantas para la elaboración de mezcales con más de 80 nombres regionales (Colunga-GarcíaMarín 2006). La bebida alcohólica mexicana llamada Tequila extraída del *Agave tequilana* en el estado de Jalisco ha alcanzado un uso industrial, se explota para consumo nacional y para exportación. Además existe el mezcal (tequila) raicilla, obtenido de *A. inaequidens* y posiblemente en algunos casos *A. maximiliana*, también de Jalisco (Granados 1993, Valenzuela-Zapata 2007) en Sonora el legendario mezcal Bacanora que se elabora de *Agave pacifica* en la costa y Sur, y *A. palmeri* en el Norte, los Mezcales de Oaxaca son los más conocidos y se elaboran principalmente de *A. angustifolia* (maguey espadín) cultivado, aunque también se utiliza *A. carwinski* cultivado, y silvestres *Agave americana*, *A. catalan*, *A. macrocantha*, *A. potatorum*, *A. marmorata* (García-Mendoza 1992). En Guerrero y Michoacán se extrae principalmente del *A. cupreata*, de poblaciones silvestres, aunque en algunas regiones de Guerrero se replanta y se está comenzando a manejar; en San Luis Potosí y Zacatecas, aparentemente se utilizan poblaciones más o menos manejadas de *Agave salmiana* var. *crasispina* y de *A. asperrima* (*A. scabra*) silvestre (Gentry 1982, Eguiarte y Souza 2007).

***Agave cupreata*.**

Conocido en Michoacán como maguey chino y en Guerrero como papalometl (maguey mariposa), es una planta semélpara utilizada para la elaboración de mezcal de forma artesanal. *A. cupreata*, cuyo nombre responde al color cobre de sus espinas, se distingue por sus hojas anchas verde claro muy dentadas y con impresiones de espinas muy marcadas en los brotes (Gentry 1982) (Fig.2). Es una planta tipo roseta que varía en tamaño de acuerdo al sitio donde crece, pero generalmente crece de un metro por 80cm una panícula que puede medir de cuatro hasta siete metros de alto. Estudios de su biología reproductiva en una población describen que tienen flores perfectas, protándricas y dicogámicas, con 380 óvulos en promedio en las que la dehiscencia de las anteras se presenta al cuarto día de la apertura de la flor y el estigma es receptivo al quinto día. La floración del escapo dura aproximadamente 6 semanas, en las

cuales las flores van madurando de abajo hacia arriba en espiral, cada escapo en promedio presenta de 13 a 17 umbelas con 80 a 120 flores cada uno. Las semillas dispersadas por viento tienen un potencial de germinación de 90% (García-Meneses 2004).



Figura 2. Planta silvestre (a) y Hoja y flor (b) de *Agave cupreata*. (Tomado de Gentry 1982).

Esta especie se distribuye de manera silvestre en bosques de pino, pino/encino y palmares, principalmente en pendientes de montaña entre 1200 y 1850 msnm, se encuentra en poblaciones aisladas; en Michoacán y Guerrero en la cuenca del río Balsas (anexo 1) (Gentry 1982, Martínez-Palacios comun. pers.).

A. cupreata constituye una especie clave al proveer alimento y morada a múltiples organismos, sobre todo durante la época seca en que florece (de enero a marzo) y produce gran cantidad de néctar, de especial interés para insectos y aves. No existe reportes de reproducción asexual para esta especie (Gentry 1982). La falta de cultivos y la colecta exhaustiva de plantas silvestres justo antes de la floración, interrumpe la reproducción sexual y aporte de semillas o establecimiento de nuevas plantas a las poblaciones silvestres, lo anterior ocasiona que las poblaciones silvestres en Michoacán estén reducidas a unos cuantos individuos y que muchas otras poblaciones se hayan extinto (anexo 1) (Franco 1991, Gómez-Sierra 2005).

IV. PLANTEAMIENTO DE HIPÓTESIS.

Si *A. cupreata* es una planta solitaria, endémica de la Depresión del Balsas, con una distribución entre los 1220 y 1850 msnm y por décadas ha sido objeto de saqueo exhaustivo para la elaboración de mezcal, por lo que actualmente existen poblaciones reducidas a unos pocos individuos y otras aparentemente se han extinto, cabe esperar la presencia de endogamia dentro de poblaciones.

V. OBJETIVOS.

Objetivo General.

Estimar la variación genética dentro y entre poblaciones de *Agave cupreata* en Michoacán y Guerrero.

Objetivos específicos.

1. Determinar la ubicación y las distancias geográficas entre poblaciones o sitios de colecta.
2. Determinar la variación genética dentro y entre poblaciones de *Agave cupreata* en los estados de Michoacán y Guerrero, con base en el análisis isoenzimático.
3. Sugerir lineamientos para un programa de conservación y manejo de recursos genéticos de esta especie.

DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Agave cupreata* (AGAVACEAE), ENDÉMICA Y SOBRE
EXPLOTADA EN LA REGION DEL BALSAS, MEXICO.

J.M. Gómez Sierra¹, A. Martínez-Palacios¹, N. Pérez Nasser², C. Sáenz Romero¹

¹Laboratorio de Biotecnología y Genética, IIAF-UMSNH, Km 9.5 carr. Morelia-Zinapécuaro, C.P. 58880, Tarímbaro Michoacán México; ²Unidad del Jardín Botánico, CIECO-UNAM. Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701, Col. Ex-Hacienda de San José de la Huerta, C.P. 58190, Morelia Michoacán
e-mail: apalacios56@gmail.com

Resumen.

Agave cupreata Trel & Bergel, especie con reproducción exclusivamente sexual, es sobre-explotada para la elaboración de mezcal artesanal por comunidades humanas de alta marginación, ubicadas en el área de su distribución natural, entre los 1220 y 1850 mnsnm, de la Depresión del Balsas en los estados de Guerrero y Michoacán, México. La colecta de planta inicia con el corte del tallo floral en el inicio de su surgimiento, lo que interrumpe la floración y la posibilidad de que el individuo deje descendencia; con el correr del tiempo esta actividad ha puesto en grave riesgo de extinción a poblaciones silvestres, hecho que lleva a suponer la pérdida de variación genética de las poblaciones. Se colectaron muestras de hoja de 37 individuos de 12 poblaciones. Se realizó un análisis isoenzimático de 9 loci. Los resultados indican altos niveles de variación genética con un promedio de 2.9 alelos por locus, un polimorfismo del 92% y $H_e = 0.467$, la diferenciación entre poblaciones fue baja pero diferente de cero ($F_{ST} = 0.042$, $p \leq 0.05$), se registró exceso de heterocigos tanto a nivel de subpoblación como a nivel de población ($F_{IS} = -0.1179$, $p \leq 0.05$; $F_{IT} = -0.0708$, $p \leq 0.05$), la distancia genética promedio fue baja ($D = 0.038$), y el flujo genético ($N_m = 5.6$) fue relativamente alto. No se registró una relación entre los niveles de variación genética y la distribución geográfica. Por lo anterior, debido a la poca diferenciación entre poblaciones, será importante conservar aquellas que tengan el mayor número de individuos, con mayores niveles de diversidad genética y estén en sitios donde aún se puedan desarrollar programas de manejo y conservación.

Palabras claves: *Agave cupreata*, Agavaceae, isoenzimas, variación genética.

Abstract.

The Agaves are a very diverse group of plants endemic of America, with greater presence in Mexico. *Agave cupreata* is a specie with exclusively sexual reproduction, broadly used in “Mezcal” elaboration in the states of Guerrero and Michoacán. The elaboration of this alcoholic beverage requires the harvesting of the plant before inflorescence development is completed, avoiding this way, the plant reproduction, representing a potential risk for its conservation. In this study we analyzed the genetic diversity and structure of wild populations of *A. cupreata* with the use of isozymes markers. We used an intermediate green leaf of 37 individuals in each of 12 populations, representing all the geographic distribution in Michoacán and Guerrero, México. Eight of nine loci assayed were polymorphic, with an average of 2.9 alleles per locus (A) and a mean effective number of alleles per locus (A_e) was of 1.8, mean expected heterozygosity (H_e) was 0.467 y mean observed heterozygosity (H_o) was 0.521, the values are high with respect *A. lechuguilla* y *A. victoriae-reginae*. The total population differentiation was low (F_{ST}) 0.042, Nei genetic distances average was low (D) 0.04 and the genetic flow was relatively high (Nm) 5.6.

Introducción.

Agave cupreata Trel. & Berger es una Monocotiledónea perteneciente a la Familia Agavaceae, grupo Crenatea, subgénero *Agave*, planta solitaria endémica de la Depresión del Balsas, ubicada entre los 1220 y 1850 m de altitud en los estados de Guerrero y Michoacán, México (Gentry, 1982). Planta perenne semélpara, tarda entre 7 a 15 años en llegar a la madurez, las flores son hercogámicas, dicogámicas y protándricas, lo que favorece una polinización cruzada (Illsley *et al.*, 2007).

Comunidades marginadas que habitan dentro del área de distribución del *A. cupreata* por décadas han sobre-explotado el recurso natural para la elaboración de mezcal de forma artesanal; el uso de plantas silvestres implica la colecta del tallo de la planta en el inicio de su floración, hecho que suspende la floración y por ende la formación de semillas, siendo éste el único evento reproductivo de su vida (Illsley *et al.*, 2007; Martínez-Palacios *et al.*, 2007). La colecta exhaustiva de plantas ha disminuido drásticamente los individuos y poblaciones, particularmente en el estado de Michoacán (Eguiarte, 2003; Martínez-Palacios *et al.*, 2007).

Como una medida para frenar el saqueo de individuos silvestres y rescatar las fuentes de empleos en comunidades de alta marginación, a principios del año 2000 se desarrollaron programas de manejo de la especie a través de la propagación de plantas por semilla, sistema que ha generado la reintroducción de plantas en ambientes donde históricamente crecía, con el fin de establecer plantaciones comerciales en comunidades marginadas y que podría reducir o desalentar la colecta de plantas silvestres (Martínez-Palacios *et al.*, 2007).

La diversidad genética de poblaciones silvestres de la Familia Agavaceae ha sido ampliamente demostrada por el uso de marcadores isoenzimáticos desde la década pasada. En 18 poblaciones de *Yucca filamentosa* se registró 67.6% de polimorfismo y 0.213 de heterocigosidad esperada, en promedio se encontraron 83% de la diversidad genética total dentro de las poblaciones (Massey y Hamrick, 1998). En *Agave victoriae-reginae*, un estudio de 10 poblaciones usando 10 isoenzimas se encontró altos niveles de variación genética ($H_e = 0.335$) y de los niveles de diferenciación entre poblaciones ($F_{ST} = 0.236$) (Martínez-Palacios *et al.*, 1999). La variabilidad genética de 11 poblaciones silvestres de *Agave lechuguilla* fue alto ($H_e = 0.394$) y bajos niveles de diferenciación ($\theta = 0.083$) entre poblaciones (Silva-Montellano y Eguiarte, 2003b).

Análisis de DNA a partir de polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados al azar (RAPD) registró la diversidad genética baja en poblaciones de *Agave tequilana* (Gil-Vega *et al.*, 2001). La diferenciación genética en el complejo *Agave deserti*, *A. cerulata* y *A. subsimplex* del desierto Sonorense, estimado a partir de ADN analizado mediante RAPD, registraron altos niveles de variación genética ($H_e = 0.12$ a 0.29 , $P = 63.4$ a 95.1), y baja diferenciación genética entre poblaciones y especies (θ poblaciones = 0.14 ; $G_{ST} = 0.11 \pm 0.02$) (Navarro-Quezada *et al.*, 2003). Marcadores del polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y de secuencias inversas de pequeñas repeticiones (ISTR) para el análisis genético de *A. fourcroydes*, permitió distinguir diferencias entre planta madre, brotes derivado de la misma planta y bulbillos (Demey *et al.*, 2004). En *Agave angustifolia*, la variabilidad genética se analizó mediante AFLP en poblaciones del desierto Sonorense, la cual registró alta variabilidad intrapoblacional ($H_e = 0.261$; $P = 65.16$) (Barraza-Morales *et al.*, 2006).

Los objetivos del presente trabajo fueron determinar la ubicación geográfica, variación genética dentro y entre poblaciones de *Agave cupreata* en los estados de Michoacán y Guerrero, y dar alternativas para su conservación.

Materiales y Métodos.

Ubicación de las poblaciones. Las poblaciones o sitios de colecta fueron ubicadas de acuerdo a reportes de colectas (Gentry, 1982; Eguiarte *et al.*, 2003), y a exploraciones con guías. Todos los sitios de colecta fueron ubicados geográficamente con un geoposicionador marca GARMIN III y con un altímetro para determinar la altitud (Cuadro 1).

Colecta de material biológico. Se colectaron segmentos de hoja verde de 37 individuos por población, en 12 poblaciones o sitios de colecta, a lo largo de su distribución conocida entre los 1220 m y 1850 m de altitud; 8 poblaciones se colectaron en el estado de Michoacán y 4 en Guerrero. Las muestras se transportaron en hieleras. En el laboratorio, los segmentos de hoja se almacenaron en el ultra-congelador a una temperatura de -80° C hasta su procesamiento.

Electroforesis. Métodos estándar de electroforesis en gel de almidón fueron usados (Soltis *et al.*, 1983; Martínez-Palacios *et al.*, 1999). Las hojas fueron maceradas en frío usando un mortero y aplicando 10 a 15 gotas de buffer de extracción, compuesto de una mezcla de 3:1 de buffer Vegetal II (Pitel y Cheliak, 1984) y buffer YO (Yeh y O'Malley, 1980) (anexo 3). El extracto fue absorbiendo con papel de cromatografía wick de 12 x 1.5mm y almacenado a -

80°C hasta la electroforesis. Las Aloenzimas fueron separadas por electroforesis a 60 mA por 7 y 8 h usando 11% de geles de almidón (500 mL). Se usó el sistema 8 de LiOH (Soltis *et al.* 1983) y sistema C (Stubert *et al.*, 1988) (anexo 3). Se analizaron 7 enzimas, en total 9 loci: fosfogluco isomerasa (PGI, E.C. 5.3.1.9, dos loci), glutamato oxalacetato transaminasa (GOT, E.C. 2.6.1.1, un locus), Menadione reductasa (MNR, E.C. 1.6.9.9.2, un locus), enzima málica (ME, E.C.1.1.1.40, un locus), fosfoglucomutasa (PGM, E.C. 2.7.5.1, dos loci), fosfatasa acida (ACPH, E.C.3.1.3.2, un locus), y glutamato deshidrogenasa (GDH, E.C. 1.4.1.2, un locus). La selección de estos sistemas enzimáticos fue hecha debido a que tiñen con suficiente intensidad y dando una resolución confiable. Las técnicas fueron tomadas de Soltis *et al.*, (1983) y de Stubert *et al.*, (1988). La migración más rápida del loci y alelos fue designada como 1, seguida por 2, 3 etc (anexo 2). Los datos de frecuencia alélicas están disponibles por el autor para correspondencia.

Cuadro 1. Características geográfica de las poblaciones colectadas de *A. cupreata* en los estados de Michoacán y Guerrero.

| Localidad, Municipio, Estado | Altitud (msnm) | Vegetación | Coordenadas | |
|----------------------------------|----------------|-----------------|-------------|------------|
| | | | N | W |
| Chiquito-Grande, Turicato, Mich. | 1650 | Pino-Encino | 19°21'35" | 101°31'08" |
| San Miguel, V. Madero, Mich. | 1619 | Pino-Encino | 19°27'33" | 101°11'25" |
| Llanitos, Morelia, Mich. | 1887 | Pino-Encino | 19°35'27" | 101°06'29" |
| El Limón, Morelia, Mich. | 1811 | Encino-Matorral | 19°32'30" | 101°03'08" |
| Escalera, Morelia, Mich. | 1733 | Matorral | 19°36'75" | 101°01'71" |
| Pie de La Mesa, Charo, Mich. | 1927 | Pino-Encino | 19°36'96" | 100°56'90" |
| Tembladera, Tzitzio, Mich. | 1800 | Encino | 19°34'25" | 100°56'62" |
| Las Escobas, Jungapeo, Mich. | 1420 | Pino-Encino | 19°28'57" | 100°19'35" |
| Xochipala, Gro. | 1286 | Matorral | 17°47'97" | 99°40'82" |
| Tixtla, Gro. | 1561 | Encino | 17°32'68" | 99°27'18" |
| Ayahualco, Chilapa, Gro. | 1465 | Palma-Encino | 17°37'19" | 99°10'53" |
| Mesones, Atlixac, Gro. | 1703 | Pino-Encino | 17°32'64" | 98°51'79" |

Análisis estadístico. Los análisis genéticos fueron realizados usando el programa TFPGA (Miller, 1997). Se obtuvo la frecuencia para cada locus, con las cuales se calculó la proporción de alelos polimórficos, la heterocigosidad observada (H_o) y la esperada (H_e), el promedio de número de alelos por locus (A) y el número efectivo de alelos (A_e) (Hedrick, 2005). La

desviación al equilibrio de Hardy-Weinberg, se realizó por locus usando la prueba exacta de Haldane (1954). Se estimaron los estadísticos de F de Wright (1965), la desviación estándar sobre loci y el intervalo de confianza del 95% para cada estadístico de F con 10,000 iteraciones. El flujo génico (N_m) entre poblaciones se estimó a través de $N_m = ((1/F_{ST}) - 1)/4$. A partir de las distancias genéticas de Nei (1978), se construyó el dendrograma tipo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) con 1000 permutaciones, para visualizar el grado de similitud entre las poblaciones. El tamaño efectivo mínimo de la población viable (N_e) se estimó por dos formas: en relación a la H_e y asumiendo una tasa de mutación ($\mu=10^{-5}$), basado en estudios de poblaciones de coníferas (Millar y Libby, 1991) y a través de la F_{ST} usando la formula $N_e=2\pi Nm$ (Moreno, 2007). Se realizó la prueba de Mantel (Manly, 1987), para determinar el aislamiento por distancia usando los pares de las distancias genéticas de las poblaciones (Nei, 1978) y las distancias geográficas entre estas poblaciones.

Resultados.

Debido al exceso de colectas a la que ha estado sujeta la planta en el inicio del estado reproductivo, la mayoría de las poblaciones o sitios de colectas en Michoacán estuvieron representados por escasos individuos, no fue posible observar individuos en estado reproductivo, ni en estado de plántula, los escasos individuos registran una distribución fragmentada. Para el estudio de isoenzimas se analizaron 37 individuos por población para ambos Estados. Ocho de nueve loci fueron polimórficos, con un promedio de 2.9 alelos por locus y una media del número efectivo de alelos por locus de 1.8 (Cuadro 2). En promedio, el 92.6% de los loci fueron polimórficos en cada población y la media de heterocigosidad esperada fue alta ($H_e = 0.467$) y de la observada fue aun mayor ($H_o = 0.521$) (Cuadro 2). En la prueba de Haldane se encontró que 5 de los 9 locus analizados no se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg. La diferencia genética entre poblaciones ($F_{ST} = 0.042$) estimada mediante los estadísticos de Wright, fue bajo y significativamente diferente de cero, con un intervalo de confianza de 0.0613 a 0.0281 (Cuadro 3). El coeficiente de endogamia sobre loci fue negativo ($F_{IS} = -0.1179$), y fue significativamente diferente de cero, con intervalo de confianza de -0.0072 a -0.2054. La estimación del flujo génico fue alta ($N_m = 5.6$) (Cuadro 3).

Cuadro.2 Diversidad genética de las poblaciones de *A. cupreata* analizadas en los estados de Michoacán y Guerrero. n = tamaño de muestra 37 individuos; A = número promedio de alelos por locus; H_o = Heterocigosidad observada; H_e = Heterocigosidad esperada y P (%) = Porcentaje de loci polimórficos criterio 95% y SD = desviación estándar.

| Población | H_e (SD) | H_o (SD) | P (%) | A |
|-----------------|---------------|---------------|-------------|------------|
| 1 | 0.526 (0.059) | 0.605 (0.094) | 100 | 2.9 (0.3) |
| 2 | 0.439 (0.073) | 0.439 (0.091) | 89 | 2.8 (0.3) |
| 3 | 0.501 (0.057) | 0.556 (0.074) | 100 | 2.9 (0.3) |
| 4 | 0.474 (0.074) | 0.526 (0.094) | 89 | 2.8 (0.3) |
| 5 | 0.467 (0.079) | 0.550 (0.109) | 100 | 2.9 (0.3) |
| 6 | 0.436 (0.077) | 0.480 (0.092) | 100 | 2.9 (0.3) |
| 7 | 0.482 (0.082) | 0.496 (0.102) | 89 | 2.8 (0.3) |
| 8 | 0.442 (0.092) | 0.510 (0.115) | 78 | 2.9 (0.4) |
| 9 | 0.485 (0.073) | 0.567 (0.097) | 89 | 3.0 (0.3) |
| 10 | 0.452 (0.082) | 0.493 (0.109) | 89 | 3.0 (0.3) |
| 11 | 0.461 (0.080) | 0.532 (0.103) | 89 | 3.1 (0.3) |
| 12 | 0.472 (0.069) | 0.521 (0.106) | 100 | 3.0 (0.2) |
| <i>Promedio</i> | <i>0.467</i> | <i>0.521</i> | <i>92.6</i> | <i>2.9</i> |

Cuadro 3. F de Wright en poblaciones de *A. cupreata* colectadas en los estados de Michoacán y Guerrero.

| Locus | F_{IS} | F_{ST} | F_{IT} | N_m |
|--------|-------------------|-----------------|-------------------|-------|
| ACPH-1 | -0.1259 | 0.0425 | -0.0780 | 5.632 |
| PGI-1 | -0.1074 | 0.0450 | -0.0575 | 5.305 |
| PGI-2 | -0.0941 | 0.0342 | -0.0567 | 7.059 |
| PGM-2 | -0.0960 | 0.0443 | -0.0474 | 5.393 |
| PGM-3 | -0.1148 | 0.0432 | -0.0666 | 5.537 |
| ME-2 | -0.1501 | 0.0405 | -0.1035 | 5.922 |
| MNR-1 | -0.0971 | 0.0460 | -0.0466 | 5.184 |
| GDH-1 | -0.1170 | 0.0418 | -0.0704 | 5.730 |
| GOT-1 | -0.1418 | 0.0417 | -0.0942 | 5.745 |
| Media | -0.1179 | 0.0421 | -0.0708 | 5.683 |
| SD | 0.0537 | 0.0092 | 0.0530 | |
| 95% IC | -0.0072 a -0.2054 | 0.0613 a 0.0281 | -0.1564 a -0.0379 | |

Las distancias genéticas entre los pares de las poblaciones fue baja (media $D = 0.04$), registrando los valores más altos entre las poblaciones de Escobas, Mich. y Llanitos, Mich. ($D = 0.09$) y el más bajo entre las poblaciones de Tixtla, Gro. y Escalera, Mich. ($D = 0.008$) (Cuadro 4). El Dendrograma con base al método UPGMA, no mostró un patrón geográfico; esto se evidencia al no haber un agrupamiento por estado (Michoacán y Guerrero), sino que las poblaciones se agruparon indistintamente de su distancia geográfica. Por ejemplo, existe una similitud mayor en las poblaciones de Limón, Mich. con los Mesones, Gro.(distantes entre ellas 322km) y las Escaleras, Mich. con Tixtla, Gro.(distantes 282.80km) (Fig. 3)(cuadro 4).

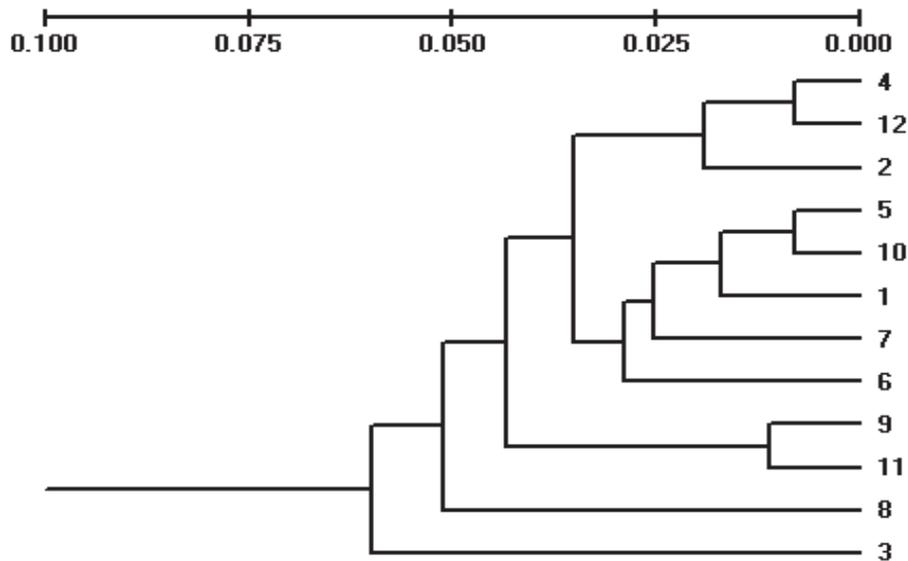
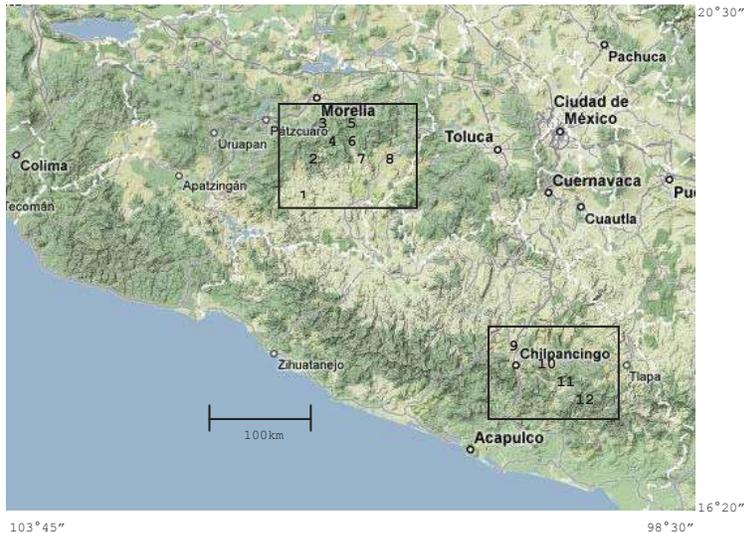


Figura 3. Relación de similitud entre las poblaciones de *A. cupreata* con base en las distancias de Nei.



- C. Grande, Mich. 1
- San Miguel, Mich. 2
- Llanitos, Mich. 3
- Limón, Mich. 4
- Escalera, Mich. 5
- Pie Mesa, Mich. 6
- Tembladera, Mich. 7
- Escobas, Mich. 8
- Xochipala, Gro. 9
- Tixtla, Gro. 10
- Chilapa, Gro. 11
- Mesones, Gro. 12

El tamaño efectivo mínimo de población viable es alto para el estimado en relación a la tasa de mutación y heterocigosidad ($N_e = 15,000$) y bajo para el estimado en relación a la F_{ST} ($N_e = 35$), con un flujo génico también alto ($N_m = 5.68$). El aislamiento por distancia no registró una relación significativa de la distancia geográfica con respecto a la distancia genética con una $r = -0.110$ y con una $p = 0.769$.

Cuadro 4. Distancias genéticas sobre la diagonal y geográficas bajo esta.

| Población | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----------|--------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1 | ----- | 0.0577 (0.0000) | 0.0604 (0.0000) | 0.0462 (0.0000) | 0.0233 (0.0001) | 0.0384 (0.0000) | 0.0275 (0.0000) | 0.0412 (0.0000) | 0.0184 (0.0005) | 0.0108 (0.0043) | 0.0341 (0.000) | 0.0352 (0.000) |
| 2 | 58.39 | ----- | 0.0665 (0.0000) | 0.0177 (0.0130) | 0.0277 (0.0001) | 0.0522 (0.0000) | 0.0373 (0.0000) | 0.0701 (0.0000) | 0.0477 (0.0000) | 0.0281 (0.0050) | 0.0709 (0.0000) | 0.0202 (0.0032) |
| 3 | 73.94 | 15.63 | ----- | 0.0144 (0.0032) | 0.0663 (0.0000) | 0.0829 (0.0002) | 0.0651 (0.0000) | 0.0989 (0.0000) | 0.0468 (0.0000) | 0.0705 (0.0000) | 0.0474 (0.0000) | 0.0383 (0.0000) |
| 4 | 74.60 | 17.16 | 5.75 | ----- | 0.0123 (0.0795) | 0.0348 (0.0000) | 0.0332 (0.0008) | 0.0520 (0.0001) | 0.0313 (0.0012) | 0.0252 (0.0044) | 0.0318 (0.0001) | 0.0080 (0.0384) |
| 5 | 81.40 | 24.00 | 9.00 | 7.54 | ----- | 0.0164 (0.0033) | 0.0268 (0.0000) | 0.0321 (0.0003) | 0.0348 (0.000) | 0.0080 (0.0806) | 0.0427 (0.0000) | 0.0172 (0.0087) |
| 6 | 87.96 | 30.63 | 16.50 | 13.55 | 7.55 | ----- | 0.0345 (0.0000) | 0.0853 (0.0000) | 0.0649 (0.0000) | 0.0267 (0.0000) | 0.0713 (0.0000) | 0.0573 (0.0000) |
| 7 | 84054 | 28.47 | 16.24 | 11.72 | 8.62 | 5.06 | ----- | 0.0833 (0.0000) | 0.0562 (0.0000) | 0.0214 (0.0061) | 0.0707 (0.0000) | 0.0475 (0.0000) |
| 8 | 118.49 | 73.05 | 64.22 | 59.08 | 56.90 | 50.07 | 44.33 | ----- | 0.0506 (0.0000) | 0.0234 (0.0020) | 0.0468 (0.000) | 0.0257 (0.0003) |
| 9 | 238.91 | 245.08 | 248.98 | 243.82 | 247.10 | 244.09 | 239.00 | 206.48 | ----- | 0.0230 (0.0035) | 0.0111 (0.0039) | 0.0357 (0.0017) |
| 10 | 274.60 | 282.52 | 284.94 | 279.26 | 282.80 | 279.28 | 275.00 | 241.60 | 35.85 | ----- | 0.0273 (0.0006) | 0.0145 (0.0184) |
| 11 | 292.69 | 294.48 | 296.11 | 290.81 | 293.03 | 288.98 | 285.19 | 249.05 | 54.64 | 30.63 | ----- | 0.0325 (0.0020) |
| 12 | 327.46 | 326.34 | 327.83 | 322.00 | 323.52 | 319.61 | 315.61 | 276.57 | 90.94 | 64.03 | 35.94 | ----- |

Discusión.

De los 12 sitios colectados, la mayoría fueron ubicados en el estado de Michoacán y han sido sobre explotados; actualmente están representados por algunas decenas de individuos, lo cual ha llegado a considerar a éstas poblaciones en grave riesgo de extinción (Eguiarte, 2003; Martínez-Palacios comun. person). La mayoría de estas plantas silvestres se les puede observar dentro terrenos usados para el pastoreo de ganado y en pequeñas islas de vegetación natural, en la mayoría de los casos los mezcaleros están a la espera de que esas plantas alcancen el estado adulto para su colecta y procesamiento de mezcal. Es común el comentario entre los mezcaleros que las plantas son cada vez más escasas y se deben recorrer mayores distancias para colectarlas, que en el pasado se distribuían de forma abundante en los lomeríos (Martínez-Palacios comun. pers.).

A. cupreata presenta altos niveles de variación genética dentro de las poblaciones, similares a los valores encontrados por Hamrick y Godt (1991) para monocotiledóneas longevas, perennes, con un sistema predominante de fertilización cruzada; esto es, niveles de variación mayores en comparación con especies autopolinizables, las cuales generalmente tienen menor diversidad genética.

En este estudio se encuentran niveles más altos en heterocigosidad y polimorfismo, a los reportados en otros taxones del género *Agave* (Martínez-Palacios et al., 1999; Silva-Montellano y Eguiarte, 2003ab), sin embargo, registra uno de los más bajos niveles de diferenciación entre poblaciones, similares a los reportados para *A. lechuguilla* ($\theta = F_{ST} = 0.083$) (Silva-Montellano y Eguiarte, 2003b), en *A. deserti* ($\theta = F_{ST} = 0.135$) y *A. subsimplex* ($F_{ST} = 0.08$) (Navarro-Quezada et al., 2003) y en *A. potatorum* ($F_{ST} = 0.084$) (Aguirre, 2004), factores que de alguna forma están relacionados a la distribución continua de las poblaciones o al alto flujo génico, posiblemente debido en parte a la eficiencia de los polinizadores, presumiblemente abejas, aves, polillas y murciélagos (Gentry, 1982; Eguiarte, 2000). *A. cupreata* no registró evidencia de endogamia, lo cual puede estar favorecido al sistema de reproducción únicamente vía sexual, con evidencia de que las flores son hercogámicas, dicogámicas y protándricas, hecho que favorece la polinización cruzada (Illsley et al., 2007). Estudios sobre autopolinización manual registraron una nula formación de semilla (Eguiarte, 2003; García-Meneses, 2004).

El coeficiente de endogamia fue negativo, lo cual aunado a la alta variación genética, nos muestra una falta de evidencia de endogamia. El flujo génico superior a cuatro indica que la población se comporta como una meta-población (González-González, 2005). En el subgénero *Agave* los murciélagos deben de estar jugando un papel importante en el flujo génico a grandes distancias, particularmente en las regiones del centro-sur del país (Eguiarte, 2000).

A. cupreata registró bajos valores de distancias genéticas (promedio $D = 0.0403$), que junto con la continuidad de distribución de plantas que existía en el pasado y la eficiencia de los polinizadores, muestra un comportamiento de meta-población. Valores similares ($D = 0.07$) se registran en *A. lechuguilla* (Silva-Montellano y Eguiarte, 2003b), *A. potatorum* ($D = 0.037$) (Aguirre, 2004), *A. subsimplex* ($D = 0.019$), *A. cerulata* ($D = 0.053$), *A. deserti* ($D = 0.017$) (Navarro-Quezada et al., 2003). Contrarios a los reportados para *A. victoriae-reginae*

($D = 0.182$), del subgénero *Littaea* caracterizadas por registrar un flujo génico principalmente por polinizadores locales (Eguiarte *et al.*, 2000) y que además registra barreras por distancia geográfica (Martínez-Palacios *et al.*, 1999).

El tamaño efectivo de la población es alto ($N_e = 15,000$) de acuerdo a los valores de H_e en relación a la tasa de mutación ($\mu = 10^{-5}$) que pueda estar expresándose en poblaciones de polinización libre, polen viable que puede dispersarse por 10 o cientos de kilómetros (Millar y Libby, 1991), pero diferente al obtenido en relación a la F_{ST} con un valor de ($N_e = 35$), basado en el modelo de islas donde las poblaciones estas subdivididas en un número aleatorio de islas con reproducción panmictica dentro de ellas (Moreno, 2007). Estos resultados muestran la importancia de generar zonas de conservación o corredores de polen para mantener las poblaciones actuales.

La creación de plantaciones en los diferentes municipios mezcaleros de Michoacán podría ayudar a conservar las pocas poblaciones silvestres. Actualmente existen plantaciones en diversos municipios del estado de Michoacán, es necesario seguir incrementándolas, con la finalidad de crear zonas de producción que soporten las necesidades de los productores de mezcal y permitan la conservación de *A. cupreata*. Si municipios mezcaleros de Morelia, Villa Madero, Tzitzio y Charo crean viveros y plantaciones escalonadas, en un lapso de 6 años las plantaciones iniciarían el estado de maduración. Los productores requerirían de semillas como materia prima para generar las nuevas plantaciones, que aunado con los individuos que no lograran cosechar, se podría generar los 15 mil individuos en estado reproductivo por región. Las plantaciones servirían de corredores de polen favorecido por los polinizadores (insectos, aves y murciélagos).

Conclusiones.

- El *A. cupreata* presenta altos valores de diversidad genética ($H_e = 0.467$ y $P = 92.6\%$); la que puede deberse a los ciclos de vida largos y a la reproducción únicamente sexual y posibles barreras de autopolinización. La mayor parte de la variación genética (94.8%) se encuentra dentro de las poblaciones.
- *A. cupreata* muestra poblaciones poco diferenciadas ($F_{ST} = 0.042$) y los niveles de flujo génico son altos ($N_m = 5.68$), mayores a los promedios para otros agaves. Parece no haber deriva génica. Las distancias genéticas son bajas, entre ($D = 0.008$ y 0.090).

- De acuerdo a los resultados parece indicar que se trata de una meta-población aun cuando los años de la explotación de la especie ha ocasionado la fragmentación. Sin embargo, podría perderse el equilibrio si las acciones antropogénicas continúan afectando las poblaciones ya de por si disminuidas.
- Se rechaza la hipótesis planteada, a pesar de que las poblaciones han sido muy reducidas en número y en individuos, aparentemente las barreras de autopolinización y el eficiente flujo génico dentro y entre poblaciones ha permitido hasta el momento la existencia de alta variación genética, sin evidencia de endogamia.

Lineamientos para un programa de manejo y conservación de *A. cupreata*.

Los resultados indican que se tienen altos niveles de diversidad genética, poca diferencia entre sus poblaciones y un tamaño efectivo de población viable alto, por lo que se proponen estrategias de conservación que puedan ser de ayuda, para mantener y conservar este recurso tan valioso para comunidades marginadas de Michoacán y Guerrero.

- **Unidades de conservación** (conservación *in situ*).

Son necesarias varias unidades de conservación de los recursos genéticos, pero por lo difícil que es para crearlas, únicamente se proponen dos para Michoacán, para Guerrero no, ya que en este Estado se tienen programas para su manejo y conservación. Se consideraron los tipos de vegetación (bosque de pino-encino y matorral caducifolio), su distribución conocida, la altitud donde se desarrollan las poblaciones o las zonas más viables para la conservación y las distancias genéticas.

La primera población propuesta sería la localidad de las Escobas en Jungapeo, Michoacán, es una región donde el *A. cupreata* no es explotado, muestra una población estable, se presenta en una zona con tipo de vegetación pino-encino, a una altura de 1400 msnm. El dendograma muestra que es una población de las más separadas genéticamente. La segunda población propuesta es en la localidad de la Escalera, Morelia, Michoacán, región con tipo de vegetación y altura contrastante a la primera, está cerca del límite superior donde crece la especie, a 1733 msnm, con tipo de vegetación de matorral caducifolio con encino, muestra una relación genética más cercana a las demás poblaciones.

Genéticamente las poblaciones son de las más separadas, aunque de acuerdo a los resultados no existe mucha diferencia, la población Llanitos sería importante proponerla como

unidad de conservación, pero se encuentra en una región muy accesible, siendo muy vulnerable a los productores de mezcal.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el tamaño mínimo de población viable, estas unidades de conservación de los recursos genéticos deberían de tener la mayor cantidad posible de individuos con el fin de equilibrar la balanza con las plantaciones, permitiendo un intercambio de polen.

- **Viveros** (conservación *ex situ*).

En Michoacán existen cuatro agrupaciones que conforman la unión de mezcaleros de Michoacán. Estas uniones están determinadas por las regiones donde se produce el mezcal, que son: Morelia, Villa Madero, Tzitzio y Charo. Es necesario seguir apoyando el desarrollo de viveros por agrupación, con lo cual se estaría abasteciendo de plantas para la demanda de mezcal, además de mantener germoplasma de las diferentes regiones. Desde el 2003 se inició un vivero en Tzitzio, Mich. con la generación de 2000 plantas por año, actualmente la producción se estima superior por año a esa cifra, con la integración de nuevos agaveros-mezcaleros.

- **Plantaciones** (conservación *ex situ-in situ*).

Actualmente las plantaciones son una buena opción para la conservación de las poblaciones silvestres de forma indirecta. Para el establecimiento de plantaciones se requeriría de:

1. Usar semillas de la región donde se desea explotar el mezcal, con lo cual se consideran el uso de genes adaptados a la región, para evitar pérdida de genotipos.
2. Concientizar a los productores de dejar que el 5-10% de sus plantaciones alcancen el estado reproductivo y el aporte de semillas, con lo cual se podría garantizar el reclutamiento de plantas por semillas, el flujo de genes entre las plantaciones y las poblaciones silvestres, incrementar el tamaño mínimo de la población, que según los cálculos registrados debe ser de 15000 plantas en etapa reproductiva, cantidad que podría ser cubierta por la producción de plantas en las cuatro diferentes municipios mezcaleros de Michoacán por año, al alcanzar la etapa reproductiva, se estaría cubriendo con la cantidad requerida del tamaño mínimo de la población. La semilla producida de estas plantaciones es la fuente para las nuevas plantaciones.

3. Concientizar a los productores a ya no cosechar plantas silvestres. La maduración, fructificación y liberación de semillas de forma natural, permitirá el restablecimiento de las poblaciones silvestres, recuperación que se ha observado en una población en Michoacán, donde por más de 60 años dejaron de explotarla, fue posible observar individuos reproduciéndose, en las diferentes tallas, así como en estado de plántulas.

- **Banco de germoplasma** (conservación *ex situ-in vitro*).

La conservación de semillas en forma de bancos de semillas permitiría almacenar variación genética de las diferentes localidades.

Conservar tejido en forma de cultivo de tejidos vegetales, a través del cultivo en medios mínimos, bajas temperaturas, reguladores del crecimiento (ácido abscísico), estrés osmótico, etc.

Literatura Citada.

- Aguirre, D. X. 2004. **Genética de Poblaciones de *A. cupreata* y *A. potatorum*: Aportaciones para el manejo y conservación de dos especies mezcaleras**, Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM, México. 73 pp.
- Barraza-Morales, A; F. Lorenzo-Sánchez, M. Robert, M. Esqueda y A. Gardea. 2006. **Variabilidad genética en *Agave angustifolia* Haw. De la sierra Sonorense, México, determinada con marcadores AFLP**. *Rev. Fitotec. Mex.* 29 (1): 1-8.
- Demey, J.R; E. Gamez, S. Molina and D. Infante. 2004. **Comparative Study of the Discriminating Capacity of AFLP and ISTR Markers for Genetic Analysis of *Agave fourcroydes***. *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 29-35.
- Eguiarte, L. E., V. Souza y A. Silva-Montellano. 2000. **Evolución de la Familia Agavaceae: Filogenia, Biología Reproductiva y Genética de Poblaciones**. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 66:131-150pp.
- Eguiarte, L. E., X. Aguirre, C. Rocha, A. Torres, A. Silva y A. Valera. 2003. **Diversidad genética de dos especies mezcaleras**. Proyecto Conabio V038, Informe final. México.
- García-Meneses, P. M. 2004. **Reproducción y germinación de *Agave cupreata* Trel. & Berger (Agavaceae) en la localidad de Ayahualco, Guerrero**, Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM, México. 78pp.
- Gentry, S. H. 1982. **Agaves of Continental North America**. Univ. Arizona Press, Tucson. 669pp.
- Gil-Vega, K., M. Gonzalez-Chavira, O. Martínez de la Vega, J. Simpson and G. Vandemark. 2001. **Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers**. *Euphytica* 119: 335-341.
- González-González, A. 2005. **Biología Reproductiva y Genética de Poblaciones de *Agave garciae-mendozae***. Tesis profesional. Facultad de Ciencias. UMSNH. México. 89pp.
- Granados, S. D. 1993. **Los Agaves en México**. Universidad Autónoma de Chapingo 252pp.
- Haldane, J. B. S. 1954. An exact test for randomness of mating. *Jour. of Genet.* 52: 631-635.
- Hamrick, J. L., M. J. W. Godt, D. A. Murawski and M. D. Loveless. 1991. **Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology**. In: D. A. Falk and K. E. Holsinger (eds.), *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, New York: 75-86pp.
- Hedrick, P. W. 2005. **Genetics of populations**. Jones and Bartlett Pub, Mass. 725pp

Illsley C., E. Veg, I. Pinanty, A. Tlacotempa, P. García, P. Morales, G. Rivera, J. García, V. Jiménez, F. Castro y M. Calsada. 2007. **Magüey papalote: hacia el manejo campesino de un recurso colectivo en el trópico seco de Guerrero, México.** En: Colunga-GarcíaMarín, P., L. Eguiarte, A. Larque's S. y D. Zizumbo-Villarreal (Ed). En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. CICY-CONABIO-INE. México.

Manly, B. 1987. **The statistics of natural selection on animal populations.** Chapman and Hall, New York, New York, USA. *Statistical methods*, 6th ed. The Iowa State University Press, Ames, IA.

Martínez-Palacios A., L. E. Eguiarte and G. R. Furnier. 1999. **Genetic diversity of endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in Chihuahua desert.** *American Journal of Botany* 86: 1093-1098.

Martínez-Palacios A., S. Chávez Mendoza, M. Sierra Yxta, M. Gómez Sierra. 2007. **Transferencia de Tecnología para el Cultivo del Magüey Mezcalero (*A. cupreata*), en Comunidades de Alta Marginación en el Estado de Michoacán.** 3^o Congreso Estatal de Ciencia y Tecnología. Octubre 2007. Morelia Mich. México.

Massey, L. y J. L. Hamrick. 1998. **Genetic diversity and population structure of *Yucca filamentosa* (Agavaceae).** *American Journal of Botany* 85:340-345.

Miller, M. P., 1997. **Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.** Computer software distributed by author.

Millar, C. I. and W. J. Libby. 1991. **Strategies for conserving clinal, ecotypic, and Disjunct population diversity in widespread species.** 149-170pp. In: Falk, D. A. and K. E. Holsinger (eds.), *Genetics and Conservation of Rare Plants*, Oxford University Press, New York. 283pp.

Moreno, A. L. 2007. **Tamaño efectivo de la población.** En: Eguiarte, L. E., V. Souza y X. Aguirre (comp). *Ecología molecular*. SEMARNAT, INE, UNAM y CONABIO. 63-84pp.

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

Nei, M. 1972. **Genetic distance between populations.** *American Naturalist* 106(949): 283-292.

Nei, M. 1978. **The theory of genetic distance and evolution of human races.** *Japanese Journal of Human Genetics*. 23: 341-369.

Pitel, J. A. and W. H. Cheliak. 1984. **Effect of extraction buffers on characterization of isoenzymes from vegetative tissues of five's conifers species: a user's manual.** Information Report PI-X-34, Petawawa National Forestry Institute, Canadian Forestry Service, Chalk River, Ontario, Canada.

Silva-Montellano, A. and L. E. Eguiarte. 2003a. **Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the chihuahuan desert. I. Floral Characteristics visitors and fecundity**, *American Journal of Botany*. **90**(3):377-387

Silva-Montellano, A. and L. E. Eguiarte. 2003b. **Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert: II. Genetic variation, differentiation and inbreeding estimates**. *American Journal of Botany*. **90**: 700-706.

Soltis, D. E., C. H. Haufler, D. C. Darrow and G. J. Gastromy. 1983. **Starch gel electrophoresis of ferns: A compilation of grinding buffer, and staining schedules**. *American Fern Journal*. **73**: 9-27.

Stuber, C. W., J. M. Wendel and M. Goodman. 1988. **Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays*)**. *Technical Bulletin* 286. North Carolina State University, EUA.

Wright, S. 1965. **The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regard to systems of mating**. *Evolution* **19**: 395-420.

Yeh, F. C., and D. M. O'Malley, 1980. **Enzyme variation in natural populations of Douglas-fir, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb) Franco, from British Columbia. I. Genetic variation patterns in coastal populations**. *Silvae Genetica* **29**: 83-92

VII. PERSPECTIVAS Y/O RECOMENDACIONES.

Recomendaciones para trabajos posteriores

1. Es necesario hacer estudios de la biología de la especie, dinámica poblacional, polinizadores y sobre las interacciones bióticas.
2. También es de suma importancia conocer más los aspectos antropogénicos que afectan a la especie.

Recomendaciones para productores de Mezcal

Los acelerados cambios en los mercados de licores a causa de la globalización, representan una amenaza para la diversidad cultural de los procesos tradicionales en la producción del mezcal, sin embargo, esta misma globalización ofrece alternativas para mantener y difundir los productos artesanales del pueblo. Se debe estar consciente que la utilización de los agaves en México es un trabajo de siglos, acumulado por comunidades campesinas, que ha sido parte fundamental del desarrollo nacional. Mantener y proteger tales plantas permitirá continuar con las prácticas tradicionales.

En Michoacán como en Guerrero existen organizaciones dedicadas a la explotación de *A. cupreata* para la elaboración de mezcal artesanal. En Guerrero existe la organización conocida como Sanzekan-Tinemi y en Michoacán se encuentra la unión de mezcaleros de Michoacán con su marca colectiva llamada Sikua, es importante señalar que su problemática no es la misma, para Guerrero se tiene un manejo de las poblaciones silvestres, cuentan con varios viveros, mientras que para Michoacán el establecimiento de plantaciones se inicia apenas a principios del 2000.

Algunas de las consideraciones que deben tomar en cuenta los productores de mezcal son, entre otras, que:

1. Los cambios ambientales como el calentamiento global en algún momento podrían afectar los ecosistemas y por ende algunas poblaciones de *A. cupreata*, pero si mantiene, en este momento, germoplasma (plantas silvestres) de los diferentes lugares,

principalmente en diferente altitud y tipo de vegetación, se podría estar rescatando este recurso económicamente muy importante para todos los productores de mezcal.

2. En la actualidad ya son varios los productos o usos que se le confieren a los agaves, el maguey chino no se ha explotado más que para la producción de mezcal pero existe la posibilidad de que más adelante se use la hoja o el bagazo que prácticamente se tiran. Además de la utilización de la piña para producir etanol como combustible o azúcar para consumo humano. Las nuevas demandas y hallazgos en la planta (medicinas, fungicidas, herbicidas o insecticidas) pueden ser su futuro y no únicamente la producción de mezcal.
3. El mantenimiento de diversidad es el reservorio genético de la plantas para contrarrestar las posibles plagas o enfermedades que existen o puedan existir. La variación genética necesaria podría no encontrarse en todas las poblaciones. En *A. tequilana* se ha experimentado con diferentes plagas que ha arruinado las cosechas y dejado pérdidas millonarias, en ocasiones terminando con toda la producción.
4. Si ya no existen poblaciones silvestres en las regiones de los mezcaleros, es recomendable replantar con fuente local de semilla (la más cercana a la población desaparecida).
5. El uso integral y manejo sustentable del recurso genético *A. cupreata*, es la clave para su conservación.
6. La reintroducción de plantas generadas de semillas en ambientes históricamente naturales, puede ser la respuesta para evitar que se siga colectando plantas en las poblaciones silvestres y no desaparezca la fuente de empleo de comunidades marginadas.

VIII. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA.

Aguirre-Rivera, J.R., H. Charcas-Salazar y J. L. Flores-Flores. 2001. **El maguey mezcalero potosino**. Universidad Autónoma de SLP, México, 87pp.

Arizaga, S. y Ezcurra E. 1995. **Insurance against reproductive failure in a semelparous plant: bulbil formation in *Agave macroacantha* flowering stalks**. *Oecologia* 101:329-334.

Arizaga, S. y Ezcurra E. 2002. **Propagation mechanisms in *Agave macroacantha* (Agavaceae), a tropical arid-land succulent rosette**. *Am. Journal of Botany* 89 (4):632-641.

Callen, E.O. 1965. **Food habits of some Pre-Columbic Mexican Indians**. *Economic Botany* 19:335-343.

Conabio, 1998. **La diversidad biológica de México: Estudio de País, 1998**. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. <http://www.conabio.gob.mx>.

Conabio, 2000. **Estrategia nacional sobre biodiversidad de México**. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. <http://www.conabio.gob.mx>.

Conabio, Conanp, Tnc, Pronatura, Fcf y Uanl. 2007. **Análisis de vacíos y omisiones en conservación de la biodiversidad terrestre de México: espacios y especies**. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, The Nature Conservancy-Programa México, Pronatura, A.C., Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Nuevo León, México. <http://www.conabio.gob.mx>.

Conabio, Conanp y Semarnat, 2008. **Estrategia Mexicana para la Conservación Vegetal: Objetivos y Metas**, México. 32pp.

Colunga- GarcíaMarín, P. 2006. **Base de datos de nombres técnicos o de uso común en el aprovechamiento de los agaves en México**, Informe Final proyecto SNIB-CONABIO CS007, Conabio, México.

Cordero, C. y Morales. E. 1998. **Panorama de la biodiversidad de México**. Conabio, México.

Eichhorn, S. J., C. Baillie, N. Zafeiropoulos, L. Mwaikambo, M. Ansell, A. Dufresne, K. Entwistle, P. Herrera-Franco, G. Escamilla, L. Groom, M. Hughes, C. Hill, T. Rials and P. Wild. 2001. **Review Current international research into cellulosic fibres and composites**. *Journal of Materials Science* 36: 2107-2131.

Eguiarte, L.E. y D. Piñero. 1990. **Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos**. *Ciencias número especial* 4:34-47.

Eguiarte L.E., J. Larson-Guerra, J. Núñez-Farfán, A. Martínez-Palacios, K. Santos del Prado y H. T. Arita. 1999. **Diversidad filogenética y conservación: ejemplos a diferentes escalas y una propuesta a nivel poblacional para *Agave victoriae-reginae* en el desierto de Chihuahua, México.** *Rev. Chilena de Historia Natural* 72: 475-491.

Eguiarte, L. E y V. Souza. 2007. **Historia natural del Agave y sus parientes: Evolución y Ecología.** En: Colunga-GarcíaMarín, P., L. Eguiarte, A. Larque's S. y D. Zizumbo-Villarreal (Ed). En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. CICY-CONABIO-INE. México.

Franco, C. G. 1991. **Estudios Etnobotánicos de los "Magueyes" en Xochipila Guerrero.** Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM. México.

Frankham, R., J.D. Ballou, y D.A. Briscoe. 2002. **Introduction to conservation genetics.** Cambridge, Reino Unido. 607pp.

García-Mendoza, A. 1992. **Con Sabor a Maguey,** Guía de la colección Nacional de Agavaceas y Nolinaceas del Jardín Botánico, Instituto de Biología UNAM, Jardín Botánico, IB-UNAM, México. 47pp.

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

García-Mendoza, A. 2007. **Los Agaves de México,** *Ciencias* 87:14.23

Ghoghari, A. M. and M. Rajani. 2006. **Densitometric Determination of Hecogenin from *Agave Americana* Leaf Using HPTLC.** *Chromatographia* 64:113-116 India.

Golubov, J., M. Mandujano, S. Arizaga, A. Martínez-Palacios y P. Koleff. 2007. **Inventarios y conservación de Agavaceae y Nolinaceae.** En: Colunga-GarcíaMarín, P., L. Eguiarte, A.Larque's S. y D. Zizumbo-Villarreal (Ed). En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. CICY-CONABIO-INE. México.

Gómez-Pompa, A. 1963. **El Género Agave.** *Cact. Suculent.* México. 8:3-28.

Gómez-Sierra, J. 2005. **Organogénesis y Embriogénesis Somática de *Agave mezcalero* (*Agave cupreata* TREL. & BERGER, AGAVACEAE) con potencial industrial.** Tesis profesional. Facultad de Biología. UMSNH. México.

Hartl, D.L. and A.G. Clark. 1989. **Principles of population genetics.** Sinauer, Sunderland, Massachusetts. 682 pp.

Hartl, D. L. and A. G. Clark. 1997. **Principles of Population Genetics.** Sinauer Sunderland, Massachusetts. 554pp

Hodgson, W. C. 2001. **Food plants of the Sonoran Desert.** University of Arizona Press, Tucson, Arizona, USA.

Novel, P. S. 1998. **Los Incomparables Agaves y Cactus**. Trillas, México.

Palomino, G., J. Martínez e I. Méndez. 2007. **Variación inter e intraespecífica en especies de *Agave* por citometría de flujo y análisis de sus cromosomas**. En: Colunga-GarcíaMarín, P., L. Eguiarte, A. Larque's S. y D. Zizumbo-Villarreal (Ed). En lo ancestral hay futuro: del tequila, los mezcales y otros agaves. CICY-CONABIO-INE. México.

Parsons, J. R. y J.A. Darling. 2000. **Maguey (*Agave* spp) Utilization in Mesoamerican civilization: a case for pre-columbian Pastoralism**, *Bol. Soc. Bot. Mexico* 66:81-90.

Ramanatha. Rao y T. Hodgkin. 2002. **Genetic diversity and conservation and utilización of plant genetic resources**. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 1-9.

Rocha- Munive, M., A.S. Good-Avila, F. Molina-Freaner, H.T. Arita, A. Castillo, A. García-Mendoza, A. Silva-Montello, B. S. Gaut, V. Souza and L. E. Eguiarte. 2006. **Pollination Biology and adaptive radiation of Agavaceae, with special emphasis on the genus *Agave***, *Aliso* 22:329-344

Ricker, M., I. Ramírez-Krauss, G. Ibarra-Manríquez, E. Martínez, C. Ramos, G. González-Medellín, G. Gómez-Rodríguez, J.L. Palacio-Prieto and H.M. Hernández. 2007. **Optimizing conservation of forest diversity: a country-wide approach in Mexico**. *Biodiversity and Conservation* 16:1927-1957.

Rzedowski, J. y T. Reyna-Trujillo. 1990. **Vegetación potencial. Map IV.8.2 of the Atlas Nacional de México**, Instituto de Geografía, UNAM, México.

Rzedowski, J. 1998. **Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México**. En T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (eds.) *Diversidad biológica de México: orígenes y su distribución*. IBUNAM, México, 129-145pp.

Rzedowski, G. C. y J. Rzedowski. 2001. **Flora fanerogámica del Valle de México**. 2ª ed., Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), México. 1406 pp.

Soulé, M. E. 1985. **What is Conservation Biology?**. *BioScience*, 35 11: 727-734.

Thamae, T., R. Marien, L. Chong, C. Wu and C. Baillie. 2008. **Developing and characterizing new materials based on waste plastic and agro-fibre**. *J. Mater Sci* 43: 4057-4068. Canada.

Toledo, V. M. y M. J. Ordóñez. 1993. **The biodiversity scenario of Mexico: a review of terrestrial habitats**. En: T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (eds.) *Diversidad biológica de México: orígenes y su distribución*. IBUNAM, México, 129-145pp.

Toledo, V. M. 1994. **La diversidad biológica de México: nuestros retos para la investigación en los noventa**. *Ciencias. Facultad de Ciencias, UNAM*. México, 34:43-59.

Valenzuela-Zapata, A. G., 2007. **Ponencia As Denominacoes de Origem do Tequila e Mezcal e a biodiversidade no genero Agave sp**, Seminário Biodiversidade e Denominações de Origem: Uma problemática global, Escola Superior Agrária de Coimbra,Coimbra, Portugal.

Villaseñor, J.L. 2004. **Los géneros de plantas vasculares de la flora de México.** *Bol. Soc. Bot. México* 75:105-135.

IX. ANEXOS

Anexos I. Poblaciones estudiadas de *Agave cupreata*

Poblaciones silvestres de Michoacán.



El Limón, Morelia, Michoacán.
Altitud: 1811
Tipo de vegetación: selva baja caducifolia



Las Escobas, Jungapeo, Michoacán.
Altitud: 1420
Tipo de vegetación: bosque de encino



Escalera, Morelia, Michoacán.
Altitud: 1733
Tipo de vegetación: selva baja caducifolia



Llanitos, Morelia, Michoacán.
Altitud: 1887
Tipo de vegetación: bosque de encino

Poblaciones silvestres de Guerrero.



Ayahualco, Chilapa, Guerrero.
Altitud: 1465
Tipo de vegetación: palmar



Mesones, Atlixnac, Guerrero.
Altitud: 1703
Tipo de vegetación: bosque de pino-encino



Tixtla, Tixtla, Guerrero.
Altitud: 1561
Tipo de vegetación: bosque de encino



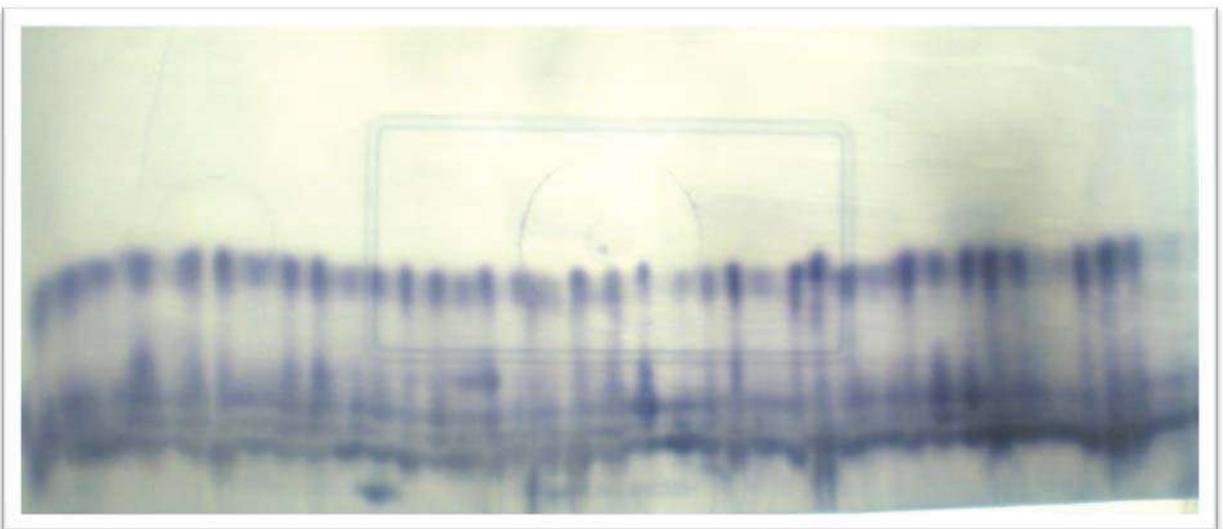
Xochipala, Xochipala, Guerrero.
Altitud: 1286
Tipo de vegetación: matorral

Anexo II. Ejemplos de interpretación de geles resultado de la electroforesis



ME (Población Chiquito el Grande, Mich.) (Enzima Málica)

Me-2 1)3,3 2)3,3 3)3,3 4)1,2 5)2,3 6)3,3 7)3,3 8)1,2 9)1,1 10)3,3 11)3,3 12)3,3 13)3,3 14)1,2 15)3,3 16)3,3 17)1,2 18)2,2 19)2,2
20)3,3 21)3,3 22)3,3 23)3,3 24)1,2 25)2,2 26)2,2 27)2,2 28)2,2 29)2,2 30)1,1 31)1,2 32)2,3 33)2,3 34)3,3 35)3,3 36)3,3 37)3,3



PGI (Población Ayahualco, Gro.) (Fosfoglucosa Isomerasa)

Pgi-1 1)2,3 2)2,3 3)2,2 4)2,3 5)1,3 6)1,3 7)2,2 8)1,3 9)1,3 10)2,2 11)2,2 12)1,3 13)2,3 14)2,2 15)2,3 16)2,2 17)2,3 18)2,3 19)1,3
20)1,2 21)2,2 22)2,2 23)1,3 24)2,2 25)2,3 26)1,3 27)2,3 28)2,2 29)2,2 30)1,3 31)1,3 32)1,3 33)1,2 34)0,0 35)1,3 36)1,3 37)1,3

Pgi-2 1)2,3 2)2,3 3)3,3 4)1,3 5)1,3 6)1,3 7)2,3 8)1,3 9)1,3 10)1,3 11)2,4 12)2,3 13)2,3 14)1,3 15)1,3 16)2,3 17)2,3 18)2,3 19)2,3
20)1,3 21)2,3 22)2,3 23)2,3 24)2,3 25)2,3 26)1,4 27)2,3 28)2,3 29)2,3 30)1,3 31)1,3 32)2,3 33)2,3 34)2,3 35)2,3 36)2,4 37)2,3

Anexo III. Sistemas de buffers del electrodo y para geles. Formulas para la tinción de las isoenzimas.

SISTEMA # 8 LiOH (Soltis et al; 1983)

Buffer del Gel (pH 7.6)

- 1) 0.42M Tris(T-1378)..... 5.04gr
- 2) 0.007M Ac citrico (Monoh.) 1.47 (Anhidro).....1.35gr
- 3) 0.004M LiOH.....0.16gr
- 4) 0.025M Ac Bórico.....1.56gr
- 5) H₂O destilada (aforar).....1000ml

Ajustar a pH 7.6 con 1M de HCL.

Buffer de electrodo (pH 8.0)

- 0.039M Hidróxido de Litio (LiOH)..... 1.64g
0.263M Ac. Bórico.....16.23g
H₂O destilada (aforar).....1000ml

Correr a 60mA, desplazamiento por 6cm, tiempo de corrida 6-7 hrs. Se puede ajustar con Na OH o HCl no es necesario.

SISTEMA C de maíz (Stuber et al., 1988)

Buffer del gel:

- 9 partes del buffer trizma base (pH 8.3)
1 parte del buffer del electrodo (pH 8.3)
Buffer Trizma base (pH 8.3)
0.05 M Trizma base T-1503 6.20g
0.007 M Ácido cítrico (monohidratado) 1.50g
Agua destilada 1000ml (aforar)

Buffer del electrodo (pH 8.3)

- 0.19 M Ácido bórico 11.875g
0.04 M Hidróxido de litio 1.60g

Agua destilada 1000ml (aforar)

Ajustar el pH a 8.3 con LiOH. Corre a 225 volts por 6-7 horas.

Buffer de Extracción

Se prepara mezclando tres partes de buffer YO y una de buffer Veg. II

Buffer Vegetal II

0.31g Ácido bórico.....0084-20 BAKER
2ml Tergitol.....15-S-9
2g Polyethylene Glycol.....PEG8000
7g Polyvinylpolypyrrolidone.....PVP40
1g Polyvinylpolypyrrolidone.....PVP360
0.88g L- Ascorbic acidA-7631
0.2g B-Nicotinamide Adenine Dinucleotide NAD N-7004
0.1g Suero de albúmina de bovino.....B-4287
0.005g Piridoxal-5-phosphate.....P-9255
0.27g Sacarosa
0.19g Cisterna-HCL.....C-1276
0.66ml 2mercaptoetanol.....M-3148
Aforar a 100ml con H₂O destilada y ajustar el pH a 7.1 con NaOH.

Buffer YO

10ml de solución de **Tris-ácido cítrico** (1.57g de trizma base, 0.83g de ácido cítrico aforar con H₂O destilada y ajustar el pH a 7.0).

0.05g NADP (TPN).....N-0505
0.05g NAD (DPN).....N-7004
0.018g ácido ascórbico.....A-7631
0.034g EDTA disódico.....E0255
0.10g Suero de albúmina de bovino.....B4287
0.33ml 2mercaptoetanol.....M3148
Aforar a 100ml con H₂O destilada.

Formulas para la tincion de las isoenzimas analizadas en *Agave cupreata*

ACPH (FOSFATASA ACIDA; C.E. 3.1.3.2)

Pesar:

Fast Garnet GBC Salt.....75mg

Añadir:

- 1) Buffer 1M de acetato de sodio pH 5.0.....4ml
- 2) H₂O destilada.....40ml
- 3) 1M Mg Cl o al 10 %.....1ml
- 4) α -Naphthyl acid phosphate 1%.....2ml

Incubar en oscuridad a temperatura ambiente.

GOT (GLUTAMATO OXALACETATO TRANSAMINASA; E.C. 2.6.1.1)

Pesar:

- 1) Pyridoxal 5- phosphate.....4mg
- 2) Fats Blue BB salt.....150mg

Añadir:

- 1) 0.2M Tris – HCL pH 8.0.....50ml
- 2) substrato GOT pH 8.0.....5ml

Incubar en la oscuridad a 37°C.

GDH (GLUTAMATE DEHYDROGENASE; E.C. 1.4.1.2)

Pesar:

L – Glutamic acid (G1626).....2.5g

Añadir:

- 1) 0.2M Tris- HCL pH 8.0.....50ml
- 2) NAD 1%.....1ml
- 3) NBT 1%.....1.5ml
- 4) PMS %.....1ml

Incubar en oscuridad a temperatura ambiente.

ME (ENZIMA MALICA; E.C. 1.1.1.40)

Añadir:

- 1) 0.2M Tris- HCl pH 8.0.....40ml
- 2) 1M DL- Malato pH 8.0.....6ml
- 3) 1M Mg Cl₂ o al 10%.....1ml
- 4) TPN(=NADTP) 1%.....1ml
- 5) MTT 1%.....2ml
- 6) PMS 1%.....0.5ml

Incubar en la obscuridad a 30°C.

MNR (MENADIONE REDUCTASA; E.C. 1.6.9.9.2)

Pesar:

- Menadione.....M5750.....25mg
β- NADH.....N8129.....25mg

Añadir:

- 0.05M Tris – HCL pH 7.0.....75ml
NBT.....8.0mg...o.....1ml

Incubar a obscuridad a temperatura ambiente.

PGI (FOSFOGLUCOSA ISOMERASA; E.C. 5.3.1.9)

Pesar:

- D- fructosa- 6- fosfato sal disodica (F3627).....20mg

Añadir:

- 1) 0.1M Tris- HCL pH 7.5.....50ml
- 2) Glucosa- 6- fosfato deshidrogenasa (10_u / ml)....3ml
- 3) 1M Mg Cl₂ al 10%.....1ml
- 4) TPN (=NADP) 1%.....1ml
- 5) MTT 1%.....1ml
- 6) PMS 1%.....0.8ml

Incubar en obscuridad a temperatura ambiente.

PGM (FOSFOGLUCOMUTASA E.C. 2.7.5.1)

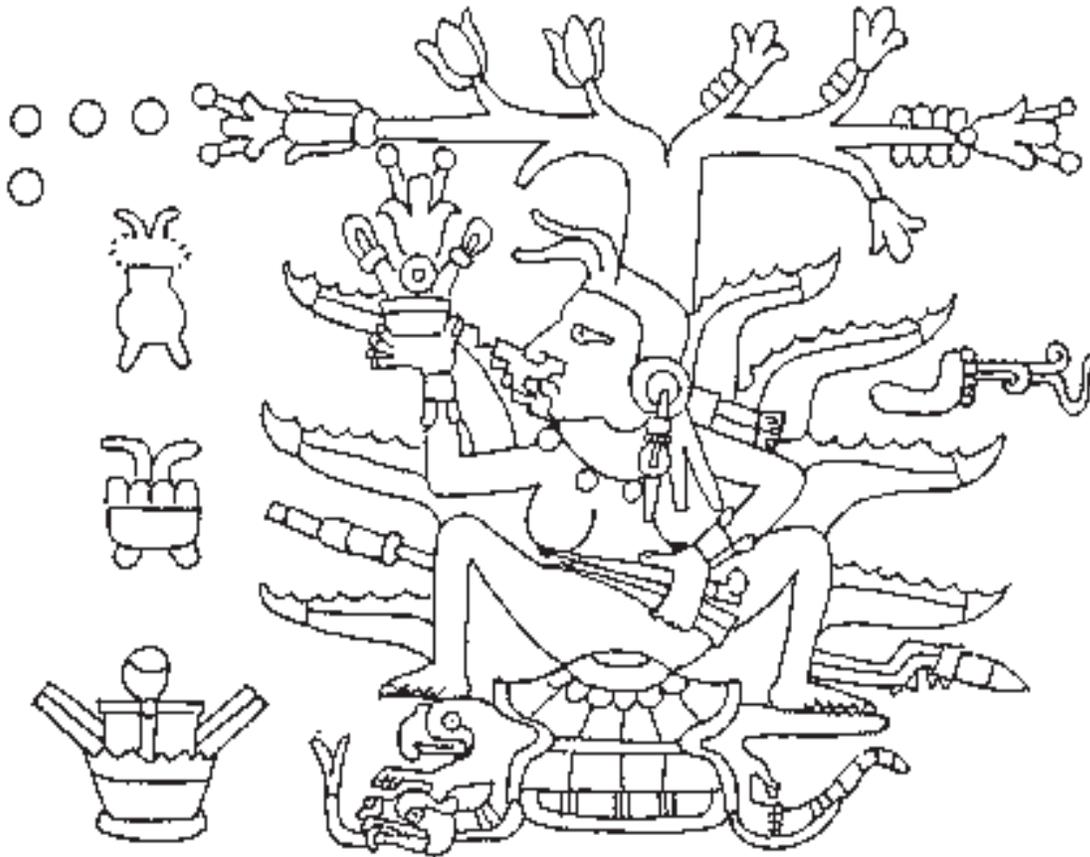
Pesar:

- 1) α - D- Glucosa – 1 – fosfato (G1259).....C.....80mg
- 2) D- Glucosa – 1 – fosfato (G7000).....C.....75mg

Añadir:

- 1) 1M Tris – HCL pH 8.0.....5ml
- 2) H₂O destilada.....40ml
- 3) 1M MgCl₂ o al 10%.....1ml
- 4) Glucosa -6- fosfato deshidrogenasa (10_u/ ml)....3ml
- 5) TPN(=NADP) 1%.....1ml
- 6) MTT 1% o NBT.....1.5ml
- 7) PMS 1%.....0.8ml

Incubar en oscuridad a temperatura ambiente.



MAYAHUAL
(Diosa prehispánica del maguey)